希少淡水魚ニッポンバラタナゴ保護の取組み —タイリクバラタナゴ混入個体群の池干しと捕獲による防除の試み—

白井 康子^{*,***} 池田 滋^{**}
 伊藤 英夫^{***} 横井 聰^{***}

Organized Activities for Conserving A Critically Endangered Freshwater Fish, *Rhodeus Ocellatus Kurumeus* —An Attempt to Eradicate the Population Contaminated with *Rhodeus Ocellatus Ocellatus* by Pond Drying and Fish Removal—

Yasuko SHIRAI^{*,***}, Shigeru IKEDA^{**},
 Hideo ITO^{***} and Satoru YOKOI^{***}

* Environment and Forestry section, Shozu Regional Office, Kagawa Prefectural Government, 2079-5 Fuchizakiko, Tonosyo-cho, 761-4121, Japan

** Gene Research Center, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, Japan

*** Association for Preservation of TANAGO in Kagawa

Abstract

Japanese rose bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus*, is an endangered freshwater fish in Japan. Both the expansion of the habitat of an alien subspecies, *R. o. ocellatus*, and the increased chances of hybridization between the two subspecies have threatened the genetic identity of *R. o. kurumeus*. To conserve *R. o. kurumeus* in Kagawa Prefecture, 17 populations were genetically monitored in 2006. Two individuals in a pond were found to harbor *R. o. ocellatus* type mitochondrial DNA through PCR-RFLP analysis. Then the contaminated population was transplanted to a closed Bio-top water system to prevent contamination in other ponds. Three-day pond drying was found to be insufficient to eradicate *R. ocellatus*.

Key words: *Rhodeus ocellatus kurumeus*, endemic rare freshwater fish, conservation activities, genetic analysis

1. はじめに

小型コイ科魚類のニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Fig. 1)は、かつて、琵琶湖淀川水系以西、九州中北部に至る瀬戸内海沿岸など西日本の淡水域に広く分布していた^{1,2)}。ニッポンバラタナゴは、池の改修工事などによる生息環境の劣化、ブルーギルやオオクチバス等の外来種による捕食、亜種タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* との交雑などにより生息数を減らし²⁻⁴⁾、環境省のレッドデータブックでは絶滅危惧IA類(CR)に指定され、現在の生息地は香川県や大阪府、九州中北部に限られている²⁾。

一方、タイリクバラタナゴは1942年にソウギョ等の種苗に混じって国内に持ち込まれた⁵⁾とされるが、現在では全国に分布を拡大⁶⁾している。タイリクバラタナゴはニッポンバラタナゴと交雑可能⁷⁾なため、ニッポンバラタナゴの種同一性の維持を困難にするほか、他のタナゴ類とも生息場所等をめぐり競合⁴⁾することが知られ、日本の侵略的

Fig. 1 *Rhodeus ocellatus kurumeus* (♂)

来種ワースト100⁸⁾に選定されている。

香川県でも県西部の財田川で1982年に最初に確認⁹⁾されて以来、タイリクバラタナゴの分布拡大が続いており¹⁰⁾、最近になってニッポンバラタナゴ分布の中心的地域(東讃地区)への侵入が遺伝子解析によって確認された¹¹⁾。ニッポンバラタナゴの生息地にタイリクバラタナゴが侵入す

* 香川県小豆総合事務所環境森林課 〒761-4121 香川県小豆郡土庄町湊崎甲2079-5

** 香川大学総合生命科学研究センター 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸2393

*** かがわたナゴ倶楽部

れば、タイリクバラタナゴからニッポンバラタナゴへの遺伝子移入が進むことが指摘^{12,13)}されており、系統保存のための施設整備などニッポンバラタナゴの保護体制の整備は急務である。

ニッポンバラタナゴの保護には、タイリクバラタナゴや亜種間雑種との正確な種判別が不可欠である。形態的には側線有孔鱗数(ニッポンバラタナゴ; 0-5, タイリクバラタナゴ; 2-7), 腹鰭前縁部の白色帯の有無(ニッポンバラタナゴには無い)などである程度区別が可能²⁾であるとされているが、両亜種の交雑個体には腹鰭の白色帯をもたない個体が存在する場合⁷⁾, またアイソザイム分析で雑種とされる個体が有孔鱗をもたない場合¹⁴⁾も知られており、両亜種とその雑種の外見上の判別は困難^{2,12)}といわれている。このため、ミトコンドリアDNA(mtDNA)のPCR-RFLP分析^{13, 15)}, RAPD分析¹³⁾, マイクロサテライトマーカー分析¹⁶⁾のような遺伝子解析による遺伝子型判別が必要となる。

現在、香川県内でニッポンバラタナゴが生息しているのは山間の小規模ため池がほとんどである。著者らはこれらの生息池について、2001年(15ヶ所), 2006年(17ヶ所, 2001年と重複しない5ヶ所が含まれる)の2回, mtDNAのPCR-RFLP分析による遺伝子モニタリングを実施した。香川県のニッポンバラタナゴは、県外の個体群とは異なる2つのmtDNAのハプロタイプを持つ¹⁵⁾ことがわかっている。2001年のモニタリングでは、15池144個体がすべて香川型ハプロタイプ2型のいずれかを持つことを確認した¹⁷⁾。ところが、2006年の遺伝子モニタリングにより、タイリクバラタナゴ型mtDNAをもつ個体が1ヶ所の生息池で見つかった。当該生息池では既に雑種化が進行しているか、今後進行する可能性が考えられる。そこで、近隣のニッポンバラタナゴ生息池への亜種間雑種個体の拡散を防ぐために、池干しと捕獲による全生息個体の排除をボランティア団体(かがわたナゴ倶楽部)とともに行った。ニッポンバラタナゴの地域個体群の保護のためにタイリクバラタナゴとの交雑の疑われる個体群を池干しによって防除しようとした事例は、これまでに報告がなく、2006年の遺伝子モニタリングの結果とあわせて報告する。

Table 1 Conditions for PCR-RFLP analysis

Primers and restriction enzymes			
D-loop	F:	CACATCCAGCCAGAAGATATTT	<i>Eco</i> RI, <i>Msp</i> I
	R:	TAATCCCAGTTTGTTCCTTAGC	
ND-1	F:	ACCCCGCCTGTTTACCAAAACAT	<i>Dde</i> I, <i>Hae</i> III
	R:	GGTATGAGCCCGATAGCTTA	
Temperature cycling			
95°C-5min			
95°C-30sec→50°C-1min→72°C-2min(40cycles)			
72°C-7min			
Reaction mixture			
0.2U Takara Ex Taq, Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ free), 2mM MgCl ₂ , 200μM each dNTP, 20ng templete, 0.4μM each primer (total 10μl)			

2. 方 法

2.1 遺伝子解析の方法

2.1.1 検体の採取

モニタリング検体は、2006年10月23日～24日に、香川県内の17ヶ所の生息池よりモンドリ(25×25×45cm, 1ヶ所あたり5個程度, 設置時間は1時間程度, 寄せ餌としてサナギ粉, マッシュポテト, 魚粉を練ったもの)を用い採取した。原則として1生息池あたり10個体を目安に165個体を分析に供した。検体は現場で氷で絞め、DNAの抽出まで冷凍保存(-40°C)した。

ニッポンバラタナゴは「香川県希少野生生物の保護に関する条例」の指定希少野生生物であるため、捕獲にあたっては捕獲許可の手続きを行った。なお、ニッポンバラタナゴ保護の観点から、調査地点の詳細は明らかにできない。

2.1.2 ミトコンドリアDNA(mtDNA)のPCR-RFLP分析

DNAの抽出にはDNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いた。抽出したDNA溶液は吸光度計で濃度と純度を推定した。

Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用い、mtDNAのND-1領域およびD-loop領域を標的にしたPCRを行った(Table 1)。各プライマーの塩基配列および制限酵素の選択はKawamuraらの報告^{13,15)}を参考にした。制限酵素(NEB)処理は、1Uの制限酵素, 1x添付バッファーを含む反応液9μlに、PCR増幅産物1μlを加え、37°C, 1時間, 加温して行った。バンドの検出にはマイクロチップ電気泳動(日立SV1210)を用いた。

mtDNAのD-loop領域の増幅産物を*Eco* RI処理することにより、検体のmtDNAがタイリクバラタナゴ型かニッポンバラタナゴ型か判別できる¹³⁾。他の制限酵素処理によって香川県産ニッポンバラタナゴのハプロタイプが明らかになる¹⁵⁾。

2.2 池干しと捕獲による個体群隔離とその効果の確認

北村¹⁸⁾によれば、タナゴ類の生息池の保全手順は、何年かに一度池干しを行い、そのつど魚貝類は生息域外で保護し、外来種は駆除し、池干し後に保護した生物を放流するというものである。今回は、タイリクバラタナゴの侵入が確認された両亜種混合個体群の隔離のみを行い、再導入は行わなかった。

タイリクバラタナゴ型mtDNAをもつ個体の確認された生息池の所有者の了解を得て、利水期直前に3日間の池干しを行った。対象となったため池は径20m, 満水時水深2.5mほどと小規模(Fig. 2)なため池である。

Fig. 2 A view of the pond before drying

2007年3月17日、かがわたナゴ俱樂部が主体となって、池干しと捕獲による全ての魚類および二枚貝の除去を行った。魚類の捕獲にはモンドリ(約20個)および玉網を用いた。捕獲したバラタナゴ(以下、亜種を区別しない場合は「バラタナゴ」と表記する)全個体を、一般環境への流出の恐れのない工場内ビオトープ池へ、関係者の理解を得て、隔離移植した。

2007年5月29日(移植2ヵ月後)と10月22日(同7ヵ月後)に、モンドリによるサンプリングで池干し後の残存個体の確認を行った。

3. 結果

3.1 遺伝的モニタリングの結果

PCR-RFLP分析の結果、1ヶ所の池で、10個体中2個体(いずれも成魚)がタイリクバラタナゴ型のmtDNAを持つことが確認された。この池は2001年には調査されていない池である。タイリクバラタナゴ型のmtDNAを持つ個体が確認された生息池の10個体についての電気泳動結果(D-loop領域の増幅産物をEco RI処理したもの)をFig. 3に示す。

なお、これら2個体以外の163個体はすべて香川型のmtDNAハプロタイプ2型のいずれかを持つことが確認された。

Fig. 3 Electrophoresis of PCR-RFLP of D-loop fragments from *R. o. kurumeus* (lane 2), *R. o. ocellatus* (lane 3), and 10 samples from one out of 17 ponds monitored in 2006 (lane 4-13). Lane 1: non-digested standard. Samples 5 and 10 showed the *R. o. ocellatus* pattern.

Fig. 4 Capturing fish with a landing net from the partially dried pond

3.2 池干しと捕獲による個体群隔離の実施

3月5日にため池の所有者と池干しの予定について打ち合わせを行った後、3月9日より作業前日までかけて水深50cmまで徐々に水位を下げた。作業日(3月17日)午前中にモンドリで大部分の魚類を捕獲し、続いてポンプを使って排水し水位をさらに下げ、玉網で残った魚類を捕獲(Fig. 4)した。魚類の捕獲に併せ、バラタナゴの母貝となるドブガイ等の二枚貝も捕獲した。また、下流側の水路にも網を置き、魚類が直接下流に流出しないようにした。移植には、かがわたナゴ俱樂部の会員等約10名がほぼ1日従事した。排水作業完了後3日間池干しを行い、再び湛水した。なお、2007年3月16日(池干しの前日)~23日(池干しの6日後)まで1mm以上の降水は観測されていない(アメダス 高松)が、池内にはわずかに底水が残る干上がることはなかった。

捕獲した魚貝類は、現地でバラタナゴ(ニッポンバラタナゴおよびタイリクバラタナゴを区別しない、約2,000匹)とその他の魚類(コイ1匹、フナ類約300匹、ヤリタナゴ約20匹、モツゴ約50匹、ヨシノボリ類約50匹)に分け、バラタナゴおよび二枚貝(ドブガイ約200個、ニセマツカサガイ2個およびイシガイ5個、いずれも成貝で稚貝は確認できなかった)はビオトープ池へ、他の魚類は直下流のため池へ放流した。放流先のため池は、今回移植作業を行ったため池より大きく、コイ、フナ等の香川県下で一般的な魚類の生息が推定されるほか、ブルーギル、ブラックバスの生息が確認されているが、ニッポンバラタナゴの生息は確認されていないため池である。

残存個体の確認調査では、2007年5月と10月にそれぞれ2個体と20個体のバラタナゴ成魚が捕獲された。現地ではニッポンバラタナゴと確認できなかったため、採捕個体は再放流しなかった。

4. 考察

ニッポンバラタナゴを保護する上で、タイリクバラタナゴの侵入は回避すべきである。侵入リスク軽減のための普及啓発、侵入された場合の防除、再導入個体の確保(系統保存)が重要となる。不幸にもニッポンバラタナゴ生息地へタイリクバラタナゴが侵入した場合、生息地での亜種間交雑の進行および交雑個体の近隣生息地への拡散が懸念されるため、両亜種混合個体群全体の防除を選択せざるを得ない。

2006年の遺伝子モニタリングにより、香川県内のニッポンバラタナゴ生息池17ヶ所のうち1ヶ所でタイリクバラタナゴ型のmtDNAをもつ個体の混入が確認された。そのタイリクバラタナゴ混入池について、2007年3月、全生息魚貝類を除去し池干しを行い、バラタナゴの駆除を試みたが、池干し後にバラタナゴの生存が確認された。3日間の池干しでは底水が残っていたため、バラタナゴを完全には防除できなかったと考えられる。今回の池干しは利水期前であり、農業用水確保のため長期間の池干しはできなかった。バラタナゴを完全に防除するには、春先ではなく、長期に干すことができる秋~冬季に池干しを行い、底泥を完全に乾燥させなければならない。

タイリクバラタナゴ混入池の池干し後の残存個体のモニタリングでは、形態的特徴は亜種判別の決め手にならない^{7,14)}ため、個体数調査と同時に遺伝子分析を行う必要がある。その結果次第では、再度、池干しと隔離移植を実施

する必要が生じる。

池干し時に移植したバラタナゴや池干し後の残存個体からマイクロサテライトマーカーの遺伝子解析¹⁶⁾により再導入個体を選別すれば、このため池にニッポンバラタナゴ個体群を復元することは技術的に可能であろうと思われる。しかし、このため池が閉鎖的な水環境であることから意図的な放流によりタイリクバラタナゴが混入したと考えられるので、そのような違法行為を防ぐ手立てがない限り、現地での復元は困難である。同様の放流によるタイリクバラタナゴの混入は、どのニッポンバラタナゴ生息池でも起こりうる。タイリクバラタナゴの侵入リスクを軽減するための普及啓発と、生息池の定期的な遺伝子モニタリングによるタイリクバラタナゴの侵入監視が欠かせない。さらに、侵入が確認された場合、防除後の再導入が担保されるべきだが、それには十分な個体数のニッポンバラタナゴとその母貝が確保されなければならないため、遺伝子解析の体制の確立と系統保存のための施設の整備が望まれる。

香川県では、2005年7月、「香川県希少野生生物の保護に関する条例」が施行され、ニッポンバラタナゴは指定希少野生生物8種の1つに指定された。条例により指定希少野生生物の捕獲等が禁じられ、ニッポンバラタナゴの捕獲には採捕許可が必要となった。この条例によって、香川県のニッポンバラタナゴの保護の促進が期待される。しかし、すでに侵入してしまったタイリクバラタナゴを排除することはきわめて困難な作業であり、行政機関や研究者のみでは現地作業に必要な人員が確保できず、地元住民やボランティアの理解と協力が欠かせない。そのような共同作業の円滑な実施には、日常的な啓蒙活動や情報共有により相互の信頼関係を構築することが重要である。今回の取組みは、条例施行後初の事例であったが、隔離移植実施の緊急性に鑑み、速やかに許可された。また、移植先の確保も含め、行政と大学、ボランティア団体の協働がうまく機能したといえる。

謝 辞

モニタリングおよび移植作業の実施にあたっては、香川県環境森林部みどり保全課より全面的な支援をいただいている。また、かがわたナゴ倶楽部顧問大高裕幸教諭(高松市立川添小学校)、安芸昌彦教諭(香川県立高松商業高等学校)には、移植作業等について多くの助言、協力をいただいた。加えて、安芸教諭には二枚貝の同定もお願いした。上記の方々のほか、肌寒い中、移植作業に従事していただいたかがわたナゴ倶楽部会員の方々へ深く感謝申し上げる。

(原稿受付 2009年4月20日)

(原稿受理 2009年10月30日)

参 考 文 献

- 1) 中村守純 (1969) ニッポンバラタナゴ, 「日本のコイ科魚類」, pp.66-72, 資源科学研究所, 東京。
- 2) 生物多様性情報システム, 環境省, <http://www.biodic.go.jp/J-IBIS.html>
- 3) 香川県 (2004) ニッポンバラタナゴ, 「香川県レッドデータブック」, p264.
- 4) 加納義彦 (2002) タイリクバラタナゴ, 「外来種ハンドブック」(日本生態学会編), p110, 地人書館, 東京。
- 5) 中村守純 (1955) 関東地方に繁殖した移植魚, 日本生物地理学会会報, 16-19, 333-337.
- 6) 侵入生物データベース, 国立環境研究所, <http://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/index.html>
- 7) 長田芳和 (1980) タイリクバラタナゴ—純潔の危機, 「日本の淡水生物 侵略と攪乱の生態学」(河合貞次, 川那部浩哉, 水野信彦編), pp.147-153, 東海大学出版会, 東京。
- 8) 村上興正, 鷲谷いづみ (2002) 日本の侵略的外来種ワースト100, 「外来種ハンドブック」(日本生態学会編), pp.362-363, 地人書館, 東京。
- 9) 植松辰美 (1983) 財田川(香川県)で採集されたタイリクバラタナゴ, 香川生物, 11, 7-8.
- 10) 安芸昌彦 (1994) 外部形態からみたバラタナゴ2亜種の香川県内での分布, 香川生物, 21, 15-21.
- 11) 白井康子, 伊藤英夫, 池田滋 (2008) ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(3)—東讃地域で採捕されたバラタナゴの遺伝子解析—, 香川県環境保健研究センター所報, 7, 48-53.
- 12) 加納義彦, 原田康志, 河村功一 (2005) ニッポンバラタナゴ—外来種と隔離がもたらしたもの—, 「希少淡水魚の現在と未来: 積極的保全のシナリオ」(片野修, 森誠一編), pp.122-132, 信山社, 東京。
- 13) Kawamura, K., Ueda, T., Arai, R., Nagata, Y., Ohtaka, H. and Kanoh, Y. (2001) Genetic introgression by the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*, into the Japanese rose bitterling, *R. o. kurumeus* (Teleostei: Cyprinidae), *Zool Sci*, 18, 1027-1039.
- 14) 長田芳和, 片山めぐみ, 田部雅昭, 福原修一, 加納義彦 (2003) ニッポンバラタナゴの遺伝的変異性と亜種間交雑に関する研究, 大阪教育大学紀要第III部門, 52(1), 29-40.
- 15) Kawamura, K., Nagata, Y., Ohtaka, H., Kanoh, Y. and Kitamura, J. (2001) Genetic diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae), *Ichthyol Res*, 48, 369-378.
- 16) Shirai, Y., Ikeda, S. and Tajima, S. (2009) Isolation and characterization of new microsatellite markers for rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus*, *Mol Ecol Resour*, 9(3), 1031-1033.
- 17) 白井康子, 藤野恵美, 池田滋 (2006) ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(1)—香川県のニッポンバラタナゴのmtDNAのPCR-RFLP分析結果—, 香川県環境保健研究センター所報, 5, 39-46.
- 18) 北村淳一 (2008) タナゴ亜科魚類: 現状と保全, 魚類学雑誌, 55(2), 139-144.