

河道内における環境DNAの動態解明と河川事業への適用技術の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 29～令 2

担当チーム：河川生態チーム

研究担当者：中村圭吾、村岡敬子

【要旨】

河川や湖沼の水の中に浮遊する生物の組織片から DNA を抽出・分析し、そこにいる生物の情報を得る環境 DNA 技術は、調査の効率化・高度化につながる新しい技術として注目されている。本研究では、国の直轄管理区間における環境 DNA の動態を明らかとするとともに、河川管理の現場における実施体制等を踏まえた課題解決のための技術開発を行った。直轄河川における詳細な調査により、環境 DNA 含有物質の動態を明らかにするとともに、現地でのサンプリング時の負担を軽減する目的で保冷なしでの環境 DNA サンプルの保存方法の開発を行った。また、共同研究を通じて、実際の現場で生じている課題を解決するための環境 DNA の活用方法の検討を行った。これらの取り組みは、河川管理の現場において潜在的に存在する課題を解決した。さらに、2021 年以降に国が行う調査のための、環境 DNA を活用した生物調査の基本方針が提案された。

キーワード：環境 DNA、河川、魚類、流下距離、河川水辺の国勢調査

1. はじめに

近年、環境や生態系の保全に対する国民の意識が高まる一方、河川事業者らが「河川水辺の国勢調査」を含む環境調査を実施する際に調査技能者の不足や予算的な課題がある。また、河川事業の実施に当たっては、当該流域に生息する希少な生物の保全を視野に入れた対策が必要となるが、調査の実施が希少生物に直接影響を与えるなどの問題がある。

昨今、新しい遺伝子分析技術が開発され、河川水中に浮遊する組織片の DNA = “環境 DNA” から間接的に生物の分布情報を得ることが可能となった。この環境 DNA の活用により、希少生物も含め河川に生息する生物を網羅的に捉えることができれば、事業者の負担を低減するとともに、効率的な環境調査が可能となる。河川事業者らからも、実河川における個別の案件を解決するための手法として実用化が期待されている。一方で、環境 DNA の河道内における動態には不明な点が多く、実河川における活用には解決すべき課題も多い。本研究は、実験や現地調査を通じて河道内における環境 DNA の動態を明らかにし、河川環境調査への適用を踏まえた要素技術の開発を行うことにより、効率的・効果的な環境調査を可能とすることを目的に実施するものである。

環境 DNA の研究事例はすでに多くあるものの、河川管理の現場での実施体制下においては、受注者や分析体制が変わっても、経年的なデータを客観的に比較できることが望ましい。そこで本研究では、以下の達

成目標を設定した。

- ① 水域における環境 DNA の動態解明
- ② 環境 DNA サンプル技術の確立
- ③ 環境 DNA を活用した生物分布域調査法の提案

2. 研究方法

2. 1 水域における環境 DNA の動態に関する研究

河道内における環境 DNA の動態を捉えるために、中部地方整備局三重河川国道事務所の協力を得ながら、雲津川の直轄管理区間 0.0～16.2K において 200m 間隔の地点で採水を行い、抽出した環境 DNA の MiFish 領域の MB 解析を行った。

MB 解析によって構築された魚類リストから、外洋性海産魚類や純淡水区間 (3.4～16.2 km) における海産魚類など生理的機能から雲出川の河道内に生息し得ない、もしくは日本国内および近海での確認記録がない海産 taxon と判定された OTU を抽出し、河川内に生息していない魚類の eDNA 含有物質に由来する OTU として選定した。選定に際しては、PCR 時の増幅エラーなど解析過程に生じるエラーの影響を最小化するため、単一地区のみで検出され、かつ地区内における総リード数に占める割合が 1 % に満たない OTU を選定対象から除いた。

選定した非生息 OTU を単一の供給源に基づく可能性が高いと判断される検出区間 (以下、在区間) に区分し、在区間にそれぞれ含まれる検出ブロック上流端から下流端までの距離を eDNA 含有物質の流下範囲と

想定し有効検出範囲の推定を行った

2. 2 環境 DNA サンプリング技術に関する検討

河川行政の分野では、河川環境調査の際に魚を直接採捕し、そこに分布する種リストを得てきたが、環境 DNA を組み合わせることによって、調査の高度化・効率化を図ることが期待できる。しかしながら、調査地の地理的条件等によっては、水サンプルを保冷しながら持ち運び、分析会社に持ち込むことが困難な場合もある。そこで、本研究では、現地でもろ過を行い、これを常温で持ち運ぶ方法を検討した。

材料は、土木研究所実験室内のメダカの飼育水槽の水を用い、1 サンプルあたり 500mL の水を 0.22 μ m 目合のグラスファイバーろ紙もしくはカートリッジフィルターでろ過をした。1 回の実験で約 20 サンプルのろ過サンプルを用い、DNA 濃度を Thermo Fisher SCIENTIFIC 社製 Qubit および Agilent 社製 Tape Station を用いて濃度をした。サンプルの処理方法として、Buffer ATL の添加、Buffer ATL + Proteinase K の添加および 99.5%エタノールを用いた脱水処理を行い、これをろ過直後に DNA を抽出したものと比較した。各回とも 1 条件あたりのサンプル数は 4 を基本とした。

また、次節で述べる環境 DNA に関わる民間コンサルタントとの共同研究においても、実際の現場でのサンプリング地点の検討などを行った。

2. 3 環境 DNA を活用した生物分布域調査法の提案

河川水辺の国勢調査を始めとする国が行う環境調査に環境 DNA を展開するためには、「目的に沿った調査計画の立案」、「信頼できる調査結果（調査担当者等が変わっても同様の結果が得られること、客観性の担保）」、「わかりやすい結果報告（環境 DNA に精通していない者が、結果を正しく理解できる情報の見せ方）」が必要である。本研究では、国が行う環境調査の実施体制を想定し、以下のような取り組みを行った。

- ① 民間コンサルタント会社との共同研究による実務展開に向けた取り組み
- ② 分析会社らへのヒアリングによる技術的課題の整理
- ③ 河川管理者を対象とした環境 DNA に関する情報発信・関東技術事務所との連携調査
- ④ 環境 DNA を取り扱う他省庁との意見交換
- ⑤ 国土交通省と連携した、河川水辺の国勢調査テーマ調査としての大規模調査

3. 研究結果

3. 1 水域における環境 DNA の動態

各在区間に含まれる検出ブロックの連続性に基づいて推算された eDNA 含有物質の流下範囲は 1–28 ブロックとなった。推定流下範囲の頻度分布を見ると、全体の 60.8%にあたる 45/74 例までが 1 ブロックのみ (< 0.2 km) での検出例であった (図-1)。Smirnov-Grubb' s test によって頻度分布内における外れ値の検定を実施したところ、1–8 ブロック (0.2–1.6 km) からなる 69 の検出区間が 99%信頼区間に含まれる範囲として抽出され、11 ブロック (2.2 km) 以上を含む 5 つの検出区間は外れ値として除外された ($p < 0.01$)。

以上、MB 解析によって検出された非生息 OTU の出現傾向から、大部分がセグメント 2 ないし 3 に該当する雲出川の下流域においては、単一の供給源に由来する eDNA 含有物質の有効検出範囲は 1.6 km 程度に達する一方で、供給量が少ない場合には 0.2 km 程度で検出されなくなる可能性が高いと示された。

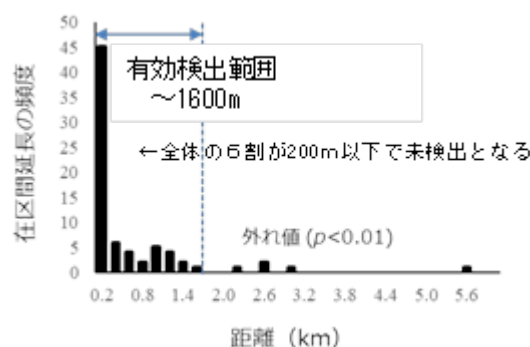


図-1 環境 DNA 含有物質の有効検出範囲

3. 2 環境 DNA サンプリング技術に関する検討²⁾

グラスファイバーろ紙サンプルをシャーレに移し、①Buffer ATL、②Buffer ATL + Proteinase を添加し、20°Cで 24 時間インキュベート後、DNA を抽出した時の、コントロールサンプル (ろ過直後に DNA を抽出) に対する減耗率は、それぞれ 52%、53%であった。また、③エタノールを添加し乾燥させたのち、-80°Cで 24 時間保存した後 DNA を抽出したサンプルの減耗率は 42%であった。抽出した DNA を分注して-80°Cのディープフリーザーに保管し、1 週間ごとに解凍し、DNA 濃度の時系列的変化を 1 か月にわたり観察したところ (図-2)、いずれの処理方法も経過日数に対する勾配は有意に 0 から偏りがあり (デミングの線形回帰、 $p =$ ①0.0452, ②0.0461, ③0.0070)、抽出後-80°Cで保管

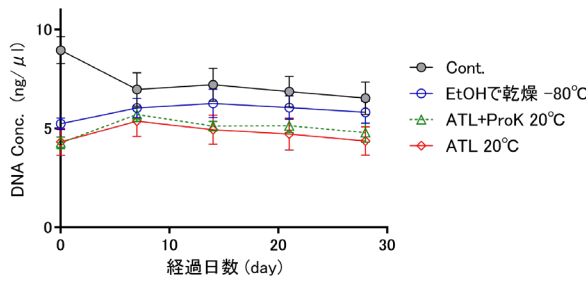


図-2 ろ紙処理方法と DNA の減耗状況

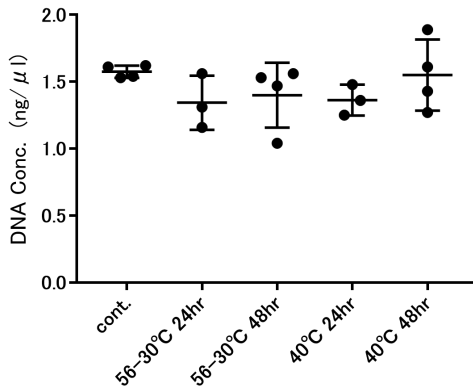


図-3 ステリベクスの処理温度と DNA の減耗

しているものの、緩やかに減耗していくと考えられた。コントロールサンプルにおいては、初回の凍結融解となる 7 日目にコントロールに対して 22%の減耗が起こっていた。また、同じサンプルの凍結融解を 4 回繰り返した後の DNA 濃度は、未処理（コントロールサンプルを凍結融解）とエタノールによる乾燥処理の間に有意な差は認められなかった ($P < 0.05$)。これらのことから、いずれの処理方法においても、初期減耗を小さく抑えることが重要であるとともに、3 つの処理方法のうち EtOH による乾燥処理が最も状態の良いサンプルが得られていると考えられた。

グラスファイバーろ紙の脱水処理方法について検討を行った結果、ろ過作業を行った直後、ろ紙をそのままに 99.5%EtOH 50ml をろ過ユニットに通してろ紙の乾燥を行い、さらにシリカゲル 2g とともにチャック付きビニール袋に密閉することが最も簡便な方法であると考えられた。本処理の実施による初期減耗は 18%、1 週間経過後抽出した DNA においても 22%であった (図-2)。さらに、エタノール脱水処理後の DNA 濃度は、7 日間通じて有意な差は見られなかった。

カートリッジ式フィルターであるステリベクスは、エタノールを通過させた直後にろ紙の変性と思われる目詰まりが発生し、抽出できる DNA の量も半分程度

となることから、エタノールによる乾燥処理は有効では無いと判断された。そこで、ステリベクスに対する処理方法として、Buffer ATL と Proteinase K の投入について検討を行った。これらをステリベクスに投入後、25°C、30°C でインキュベートを行った場合、DNA の濃度が低い結果が得られた。これは、Proteinase K の活性が低く酵素処理に時間がかかるため、その間に組織片もまた分解していると考え、ろ過直後のなるべく早い時間に酵素の活性を高めるために、温度を上げる方向で検討を行った。温度条件の最適化の検討の結果、56°C に 40 分間インキュベートすることにより解消され、さらにその後、30°C で 48 時間インキュベート後、DNA を抽出した場合の減耗率は 7%であった。同様に、56°C の処理を行わず、40°C で 48 時間インキュベート後の減耗率は 2%であった。尚、56°C でのインキュベートの後、40°C もしくは 56°C を維持させた場合には、24 時間経過後に DNA 濃度が減少した (図-3)。

3. 3 環境 DNA を活用した

生物分布域調査法の提案^{3~6)}

- ・ 民間コンサルタント会社との共同研究等
民間コンサルタント会社との共同研究において、それぞれの社において以下のような成果が得られた。

・ 汽水域及び河川下流域における環境 DNA 適正サンプリング手法の検討 (株)エコー

水深が大きく流速が遅い水域でのメタバーコーディング法は、沈降や移流・拡散により、DNA 物質の偏在が予測される。そこで、利根川下流域をフィールドに河川横断方向及び鉛直方向に採水位置を変化させ、種検出状況の比較分析を実施した。横断的な採水位置は、流心よりも河岸の検出種数及び検出効率が高く、鉛直方向の採水位置は表層よりも下層での検出種数が高いことが確認された。

・ 止水域における環境 DNA 活用のための基礎研究の事例 応用地質 (株)

環境 DNA 技術を野外調査に活用するためには、採水時期や場所、採水前の流況等に対する環境 DNA の応答を理解した上での採水計画の立案や分析結果の解釈が必要である。本研究では、支水域を対象として、出水前後における環境 DNA の量の変化や、環境 DNA の平面的な分布を調査した。調査の結果、止水域では、出水後は流入河川からの流入水に含まれる環境 DNA 量が増加すること、湖岸と湖心部では環境 DNA による検出種数が異なることが明らかと

なった。

・アユ仔稚魚の河口部における動態解明に向けて

(株) 建設技術研究所

アユは日本の河川における代表的な魚類であり、その保全に際しては河川と海域の連続性の確保が重要と指摘されているものの、既往調査では産卵・孵化後に河口部へ流下した後のアユの動態を的確に把握できていない現状がある。淀川河口部において環境 DNA によってアユの仔稚魚の生息場所を時空間スケールで把握したことで、今後のアユの保全を検討する上で重要な知見を得た。

・環境 DNA 分析における採水量の最適化及び流域（小出川）の魚類相評価能力の検討

パシフィックコンサルタンツ (株)

環境 DNA メタバーコーディング分析により魚類相を調査する際に最適な採水量の検討を行った。試料あたりの検出種数は、採水量 1,000mL まで検出種数が大きく増加したが、1,000mL 以上では微増となる傾向がみられ、採水量は 1,000mL 程度とするのが効率的であると考えられた。また、相模川水系小出川で環境 DNA 分析による魚類相調査を試みた結果、流域の魚類相を概網羅的に検出することができた。

さらに、共同研究では、上記に示すような個別の課題だけでなく、調査受注者が昨年度の情報を踏襲することができるよう、採水～分析の内容を記入する報告書様式(案)を作成し、分析会社や共同研究参画者以外のコンサルタント会社へのヒアリングを実施した。さらに環境 DNA により得られる情報の将来的な共有を

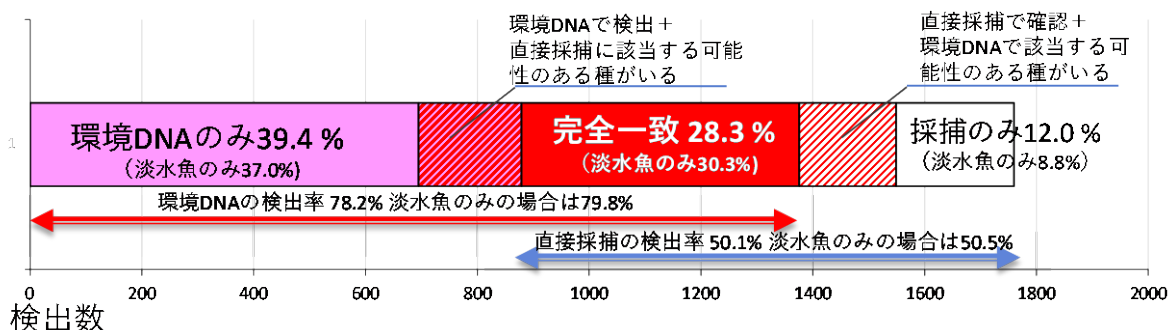
念頭とした他省庁との意見交換などを行うとともに、令和 2 年度以降の国土交通省の環境 DNA を使った業務を対象に展開しているところである。

・国土交通省と連携した調査

国土交通省と連携し、水国調査（魚類）にあわせ、水サンプルと水国調査結果の提供を受けた。採水は、それぞれの各調査地区内の代表 1 地点で行っており、環境 DNA 分析により得られた魚類リストと、水国調査時の直接採捕（以降「直接採捕」という）により得られた魚類リストと照合した(図-4)。調査により得られる種数は、環境 DNA > 直接採捕となり、総確認数に占める環境 DNA 確認数の割合は 78.2%と、R1 水国テーマ調査と同様の結果が得られた。また、環境 DNA で検出され、直接採捕で確認されなかったのは 39.4%で、これは環境 DNA が採捕しにくい魚種に有効であること、人間活動を含む調査地区外の情報を反映していることに起因すると考えられた。一方、直接採捕で確認されているのに、全く環境 DNA で検出されなかった種は 12.0%で、その主な要因として①汽水域で確認された海産/汽水性魚類、②MiFish 解析では判読が困難な種があげられました。汽水域では、潮の干満の影響があること、海域からの偶来種の影響も受けていることが考えられる。ここに、MiFish 解析で判読が困難な種は、DNA データベースの整備や新規プライマーなどによる検出技術の向上により徐々に解決していくものと考えられる。

4. まとめ

本研究では、環境 DNA を河川水辺の国勢調査を始めとする国の事業に展開するために必要な基礎事項の検討、関係者らと連携した各種調査や技術開発、得



8水系（5河川+3ダム）55/60地区（うち感潮:12地区）で得られた、258検出数（Taxa）の結果と水国調査結果を比較



“スナヤツメ”は、DNAデータベースの登録情報の関係で、MiFish解析では“ヤツメウナギ属”と出力される。この場合、直接採捕で確認されたスナヤツメは  に、環境DNAのヤツメウナギは  にカウントされている。

図-4 環境 DNA と直接採捕 検出結果の整合性

られた情報に基づく統一項目について検討を行った。
この取り組みを通じ得られた知見は、土木研究所河川生態チームの HP を通じ発信するとともに、河川管理者らに対する情報共有、関係機関らとの情報共有と意見交換を行ってきた。さらに、令和3年度の河川水辺の国勢調査テーマ調査の調査標準案が策定された。

参考文献

- 1) 北川哲郎、村岡敬子、山田拓也、中村圭吾：河川水辺の国勢調査（魚類）における環境 DNA メタバーコーディング解析の試行事例分析、河川技術論文集第26巻、2020.6
- 2) 村岡敬子、北川哲郎、相島芳江、雨貝則子、中村圭吾、依田憲彦：環境 DNA 現地濾過サンプルの取り扱いに関する実験的研究，DNA 多型，2020.7
- 3) 村岡敬子，鈴木宏幸，中村圭吾：河川管理の現場への環境DNA導入に向けた取り組み，第1回環境DNA学会東京大会，2018.9
- 4) 鈴木宏幸，村岡敬子，中村圭吾：河川管理の現場への環境DNA導入に向けて，応用生態工学会仙台東北地域研究発表会，2018.11.
- 5) 村岡敬子，鈴木宏幸，相島芳江，加藤徳子，中村圭吾：環境DNAによる河川魚類相調査データの再現性に関する基礎検討，日本DNA多型学会第27回学術集会，2018.12.
- 6) 村岡敬子，中村圭吾：河川における環境DNAの実用化に向けた土木研究所の取り組み，土木技術資料，2019.2.

A STUDY ON ENVIRONMENTAL DNA TECHNOLOGY FOR FISH SURVEY FOR THE NATIONAL CENSUS ON RIVER ENVIRONMENTS

Research Period : FY2017-2020

Research Team : Water Environment Research
Group(Water
Environmental Research
Institute)

Author : NAKAMURA Keigo
MURAOK Keiko

Abstract : The applicability of the environmental DNA (eDNA) metabarcoding (MB) assay was investigated for fish survey as a public work through a case study for the National Census on River Environments. In this study, environmental DNA motion in a large river was analyzed using an MB assay. A preservation method for eDNA samples without cooling was developed for simplified operation in the field. Furthermore, several subjects in a large river were resolved through corporative research with four consultant companies. These activities clarify how eDNA technology can be employed for river environmental management, and a basic policy for fish surveys using eDNA was proposed for the National Census for 2021.

Key words: environmental DNA, river, fish, flow down distance