

環境 DNA 分析における採水量の最適化及び中小河川流域の魚類相評価の検討

パシフィックコンサルタンツ(株)

研究担当者：渡部 健、真木 伸隆、池田 幸資、
小菅 敏裕、岡田 泰明

【要旨】

神奈川県の小出川水系で、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。採水試料あたりの検出種数は採水量 1,000mL までは採水量に応じて検出種数が大きく増加したが、1,000mL 以上では横ばい又は微増となる傾向が見られた。また、採水地点（左右岸、流心）の違いに起因する検出種の差異がみられ、採水量を増やしても 1,000mL 以上では採水地点間で検出種の共通度に大きな変化は見られなかった。これらの結果により、都道府県管理の中小規模の河川において環境 DNA 分析で網羅的に魚類を検出するためには、一箇所での採水量は 1,000mL 程度とするのが効率的であり、より網羅的に検出するためには採水地点を増やす必要があることが示唆された。

キーワード：環境 DNA、メタバーコーディング分析、採水量、魚類相、流域

1. はじめに

環境 DNA メタバーコーディング分析は、土壌試料や河川、湖沼等の採水試料中に含まれる DNA 分子から、環境中の様々な分類群の生物を網羅的に把握する生物調査の手法であり、生物多様性を効率的に評価するための新たなツールとして注目され、急速に研究が進展している (Thomsen & Willerslev, 2015)。近年では、採水試料から魚類の DNA を網羅的に検出するユニバーサル・プライマーと次世代シーケンサーを利用したメタバーコーディング分析の手法が開発され (Miya et al., 2015)、優れた検出能力を示す結果が報告されている (Yamamoto et al., 2017. Fujii et al., 2019)。

水域の生物に関する環境 DNA 分析では、これまで様々な量の採水試料について分析が行われており (Mächler et al., 2016)、環境 DNA 分析により検出される種数は分析する水量の影響を受けることが知られている (Deiner et al., 2015, Muha et al., 2019)。異なる地点・時点の環境 DNA 分析のデータを比較するためには、厳密には同じ量の採水試料に対して分析を実施する必要があると考えられるが、これまでに最適な採水量に関しての知見はなかった。

本研究は、環境 DNA メタバーコーディング分析による魚類の検出種数への採水量の影響を分析し、効率的な採水量を検討することを目的として行った。併せて、環境 DNA 分析の流域レベルでの魚類相の検出能力を検証する実験を実施した。その結果、既往の捕獲調査で得られている魚類の生息情報を概ね網羅する良好な検出結果を得たので、その成果も合わせて報告する。

2. 研究方法

2.1 採水量の検出種数への影響に関する実験

1) 採水地点

採水は、相模川の支川小出川の中流域（鷹匠橋の上流、幅約 10m の低水路内）に設置した採水地点で、2017 年 8 月 3 日に行った（図. 1）。

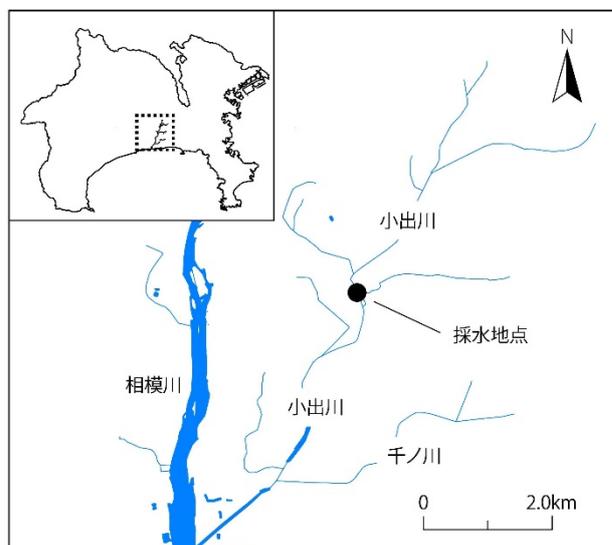


図. 1 調査河川位置図。採水地点は、相模川の支川小出川（延長：約 11.1km、集水域面積：約 34.7km²）の中流域に設定した。小出川の中～下流域は市街化が進行している。感潮域は二次支川千ノ川の合流点付近までで、採水地点は淡水環境である。

2) 採水方法

環境 DNA メタバーコーディング分析による魚類の検出種数への採水量の影響を検討するため、異なる量の試料を分析し検出種数を比較する実験を行った。

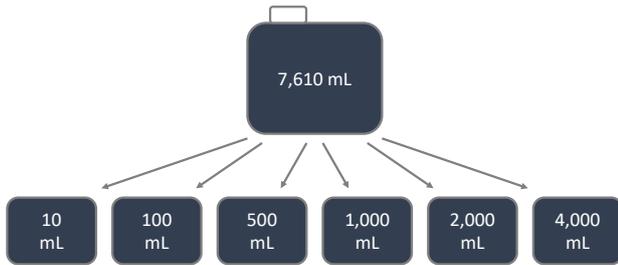


図. 2 採水試料の分注。河川の左岸、右岸、流心で採水した試料を、大型容器内で転倒混和した後、異なる6つの容量(10mL、100mL、500mL、1,000mL、2,000mL、4,000mL)に分注した。

小出川に設定した3箇所の採水地点(左岸、右岸、流心)で、表層水(7,610ml)を大型のポリエチレン容器に採水し、転倒混合した後、異なる容量のポリエチレン容器(10ml、100ml、500ml、1,000ml、2,000ml、4,000ml)に分注した(図. 2)。細菌によるDNA分解を抑制するため、分注後、速やかに市販の塩化ベンザルコニウム 10w/v%水溶液を終濃度0.1%になるように添加した(Yamanaka et al., 2017)。検体は、クーラーボックスとともに遮光・冷蔵状態で実験室に運搬し、30時間以内にろ過(フィルター: Whatman, Grade GF/F)を行い、DNA抽出まで-20°Cの冷凍庫で保存した。

3) DNA 分析

冷凍保存されたフィルターからDNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAはMiya et al. (2015)による魚類のユニバーサルプライマー(MiFish)で増幅し、次世代シーケンサー(MiSeq, Illumina社製)により分析した。分析結果は、MiFishパイプラインにより解析し、リード数10以上、配列の相同性98.5%以上までのデータを抽出した。

解析で得られた魚種リストには、純淡水魚以外に汽水・海水魚や回遊魚が含まれていたが、生活排水由来と考えられる汽水・海水魚(カライワシ科、カタクチイワシ科、ニシン科、キンメダイ科、フサカサゴ科、コチ科、アジ科、ニザダイ科、サバ科、マハゼ属)及び当該水域に分布していないと考えられるサケ属を除く、純淡水魚と回遊魚を抽出して分析を行った。

2.2 流域の魚類相検出能力の検証

1) 採水地点の配置

環境DNA分析により流域の魚類相を把握する実験の調査地点は、茅ヶ崎市が2011年に実施している魚類調査(木村ら, 2015)の調査地点を参考に10地点を選定した(図. 3)。各地点では1,000mLをポリエチレン容器で1検体、採水を行った。

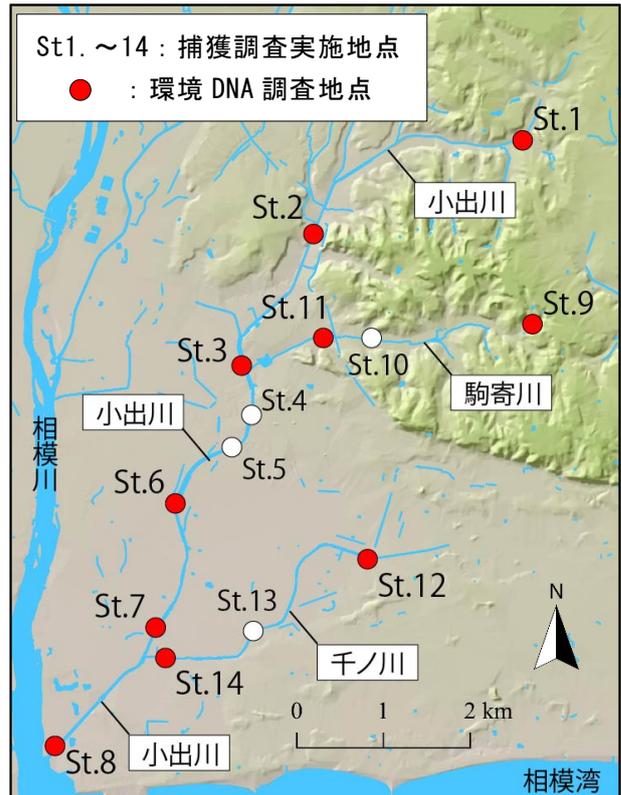


図. 3 採水地点位置図。捕獲調査が実施された14地点(小出川(本川): St. 1~8の8地点、支川駒寄川: St. 9~11の3地点、支川千ノ川: St. 12~14の3地点)のうち、St. 4、St. 5、St. 10、St. 13を除く10地点で、環境DNA分析のため1,000mLの採水を行った。

2) DNA 分析

採水後の検体の処置及び実験室でのDNA分析手法と手順は、採水量の影響を検討する実験と同様とした。

流域の調査範囲には汽水域が含まれるため、相模川河口付近で合流する下流域の地点では汽水・海水魚も生息していると考えられるが、感潮域の範囲について正確な情報が得られなかった。このため、MiFish法の解析で得られた魚種のリストから、生活型が汽水・海水魚の魚類及び主な生息環境を汽水域とする周縁性魚類を除いた、純淡水魚と回遊魚(サケ属を除く)(計11科27種)について、茅ヶ崎市が実施した捕獲調査のデータと比較を行った。

なお、小出川の捕獲調査による魚類相のデータは、茅ヶ崎市が2011年3月から同年11月までに延べ15日間にわたって実施した結果をまとめた資料(木村ら, 2015)を用いた。上記の捕獲調査では、各地点で水路に沿って50~100mの調査区間を設定している。この調査区間を、平均4人の調査員により、平均50分間で手網、投網、叉手網を用いた調査が行われている。

3. 研究結果

3.1 採水量の検出種数への影響

1) 検出状況

採水箇所（左右岸、流心）別の環境 DNA 分析による検出種数は表.1 のとおりである。右岸の採水試料からは 24 種、流心の採水試料からは 27 種、左岸の採水試料からは 29 種、全体では 31 種が検出された。

いずれの採水箇所でも最少試料量である 10mL で検出された種数が最も少なく、試料量が多くなるにつれて検出種数も増える傾向が見られた（表.2）。また、少ない試料量で検出された種は、より多くの試料量でも検出が維持され、各試料量の検体中におけるリード数が相対的に多い傾向も見られた。この結果は、環境中の環境 DNA の検出確率には、各種の環境 DNA 濃度の濃淡と採水量が影響を与えることを示しており、少量の試料では環境 DNA 濃度が相対的に高い種が検出され、試料量が増えるに従い濃度が相対的に低い種も順次、検出されるようになったと考えられる。

採水箇所間で検出種を比較すると、互いに 80%程度 の共通する種を検出したが（表.3）、各採水箇所のみで検出される種も見られたことから、10m 程度の低水路幅でも環境 DNA は不均質に流下・分布していたと考えられる。

表.1 検出種数

採水箇所	種数	総種数との共通度
右岸	24 種	77.4%
流心	27 種	87.1%
左岸	29 種	93.5%
総種数	31 種	100.0%

表.2(a~c) 調査箇所別（a. 右岸、b. 流心、c. 左岸、）の分析結果。いずれの採水箇所の試料でも、分析試料量が増えるに従い検出種数が増える傾向が見られた。

a. 右岸

種名	10ml	100ml	500ml	1000ml	2000ml	4000ml
コイ	○	○	○	○	○	○
フナ属	○	○	○	○	○	○
ウグイ	○	○	○	○	○	○
ニゴイ属	○	○	○	○	○	○
ナマズ	○	○	○	○	○	○
ドジョウ	○	○	○	○	○	○
カラドジョウ属		○	○	○	○	○
ボラ		○	○	○	○	○
オイカワ		○	○	○	○	○
メダカ属		○	○	○	○	○
カムルチー		○		○	○	○
チチブ属		○		○	○	○
ウグイ属			○	○	○	○
ゴクラクハゼ			○	○	○	○
モツゴ			○	○	○	○
カマツカ			○	○	○	○
アユ			○	○	○	○
ウナギ			○	○	○	○
オオクチバス		○		○	○	○
スミウキゴリ				○	○	○
ヨシノボリ属				○	○	○
カワアナゴ				○	○	○
スズキ					○	○
ウキゴリ					○	○
種数	6種	13種	16種	21種	24種	23種

b. 流心

種名	10ml	100ml	500ml	1000ml	2000ml	4000ml
コイ	○	○	○	○	○	○
フナ属	○	○	○	○	○	○
ニゴイ属	○	○	○	○	○	○
ゴクラクハゼ	○	○	○	○	○	○
ボラ	○	○	○	○	○	○
ドジョウ		○	○	○	○	○
ウグイ		○	○	○	○	○
オイカワ		○	○	○	○	○
ナマズ		○	○	○	○	○
カラドジョウ属		○	○	○	○	○
モツゴ		○	○	○	○	○
メダカ属		○	○	○	○	○
ウグイ属			○	○	○	○
スミウキゴリ			○	○	○	○
カムルチー			○	○	○	○
カマツカ			○	○	○	○
アユ			○	○	○	○
ウナギ			○	○	○	○
チチブ属			○	○	○	○
オオクチバス			○	○		○
ヨシノボリ属				○	○	○
スズキ				○	○	○
アブラハヤ				○	○	○
ハス				○		
ソウギョ					○	
ボウスハゼ					○	
ウキゴリ						○
種数	5種	12種	20種	24種	24種	24種

c. 左岸

種名	10ml	100ml	500ml	1000ml	2000ml	4000ml
コイ	○	○	○	○	○	○
オイカワ	○	○	○	○	○	○
フナ属	○	○	○	○	○	○
ナマズ	○	○	○	○	○	○
ニゴイ属		○	○	○	○	○
ドジョウ		○	○	○	○	○
ボラ		○	○	○	○	○
ウグイ		○	○	○	○	○
ウグイ属		○	○	○	○	○
モツゴ		○	○	○	○	○
カラドジョウ属		○	○	○	○	○
ゴクラクハゼ		○	○	○	○	○
メダカ属		○	○	○	○	○
アブラハヤ		○	○	○	○	○
アユ		○	○	○	○	○
スズキ		○	○	○	○	○
スミウキゴリ			○	○	○	○
ウナギ			○	○	○	○
カムルチー			○	○	○	○
チチブ属			○	○	○	○
ヨシノボリ属			○	○	○	○
ウキゴリ			○	○		○
ハス			○	○		○
オオクチバス				○	○	○
カマツカ				○		○
カワアナゴ					○	○
ブルーギル				○		
タモロコ						○
ホンモロコ						○
種数	4種	16種	23種	26種	22種	28種

表.3 各調査箇所の総検出種（右岸：24 種）について Jaccard 係数により箇所間の類似性を比較した。互いに 80%程度の共通度が見られた。

	右岸	流心	左岸
右岸	—	0.821	0.828
流心	—	—	0.806
左岸	—	—	—

2) 採水量と検出種数の関係

採水量と検出種数の関係を見ると、試料量 10mL から 1,000mL までは検出種数が急激に増加するが、1,000mL 以上ではほぼ横ばいとなる傾向が各採水箇所でも共通して見られた (図. 4)。また、1,000mL 程度で検体当たりの検出種数はほぼ上限に達していた。

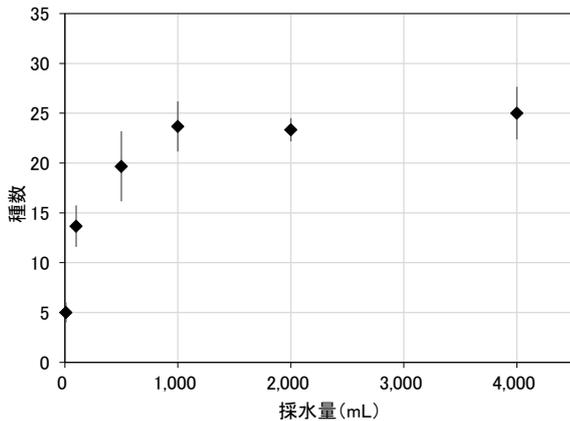


図. 4 採水量と検出種数の関係。◆は右岸、左岸、流心の平均値、縦棒は標準偏差値を示す。採水量の増加に伴い検出数は増加したが、いずれの調査箇所でも 1,000mL 以上では種数は横ばいもしくは微増となった。

3) 採水箇所間の検出種の共通度と採水量の関係

「左岸と右岸」、「右岸と流心」、「流心と左岸」の組合せで、検出種の共通度を算出し、採水量と共通度との関係を検討した。その結果、10mL から 100mL では共通度が大きく上昇した後、100mL から 1,000mL では微増となり、1,000mL 以上では、共通度約 84% 程度で大きな変化は見られなかった (図. 5)。採水箇所間では、採水量を増やしても解消できない環境 DNA の種組成の不均一性が存在していたと考えられる。

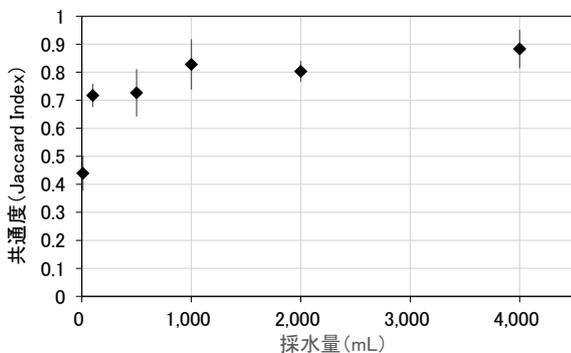


図. 5 採水箇所間の検出種の共通度と採水量の関係。◆は箇所間の組み合わせの平均値、縦棒は標準偏差値を示す。いずれの調査箇所間でも 1,000mL まで共通度が大きく上昇した後、横ばいもしくは微増となった。

3.2 流域の魚類相検出能力の検証

1) 検出状況

小出川流域 10 地点の採水試料 (各 1,000mL) から検出された魚種は表. 4 に示すとおりである。表には、既往捕獲調査で確認されている種も併せて示した。なお、環境 DNA 分析において種の同定に至らず属までの判定となった種については、属までの同定で整理し、捕獲調査でのみ判定された種については脚注に示した。ただし、ヨシノボリ属のゴクラクハゼは、その他のヨシノボリ属と区別が可能であることから属のまとまりと種を併用してリストを整理した。

環境 DNA 分析により小出川(本川)で 11 科 27 種、支川駒寄川で 5 科 11 種、支川千ノ川で 10 科 22 種の魚類が検出された。一方、既往の捕獲調査では、支川小出川で 7 科 19 種、支川駒寄川で 4 科 7 種、支川千ノ川で 6 科 13 種が確認されている (表. 4)。いずれの流域でも、環境 DNA 分析による検出種数が捕獲調査の結果を上回った。ただし、タモロコ、スゴモロコ、ホトケドジョウ、シマヨシノボリは捕獲調査では確認されたが、環境 DNA 分析では検出されなかった。一方、カワムツ、ムギツク、コウライモロコ、カラドジョウ属、シマドジョウ属、カジカ属、テンジクカワアナゴ、カムルチーの 8 種は環境 DNA 分析のみで確認された。

捕獲調査のみで確認された種の確認状況を詳細にみると、ホトケドジョウは支川駒寄川の upstream に近い St. 9 のみで確認されており、本種の生態的特徴として湧水が水源である谷戸の細流に限定的に生息している状況と考えられる。また、タモロコ及びスゴモロコについては St. 5 でそれぞれ 1 個体及び 3 個体が捕獲されている。両種ともに、今回、採水を行っていない地点のみで確認されており捕獲された個体数も少ないことから、小出川流域での分布は限定的で個体数も少ない状況と推測される。なお、タモロコについては、St. 3 で採水量の検討をした実験では、左岸の 4,000mL の検体から検出されている。以上の状況から、小出川流域においてホトケドジョウ、タモロコ、スゴモロコについては、分布が限定的、もしくは個体数が少ないことで、各地点 1,000mL の採水による調査では検出できなかった可能性がある。

一方、シマヨシノボリは、捕獲調査により小出川の St. 2 で 1 個体、St. 6 で 1 個体が捕獲されている。回遊魚であり、小出川流域に広く分布していることが示唆されるが、個体数は少ないと考えられる。また、MiFish 法による種の識別が困難でヨシノボリ属までの同定となるため、St. 3, 6, 7, 8, 12 でヨシノボリ属としたシークエンスデータにシマヨシノボリが含まれていた可能性がある。

表. 4 捕獲調査による確認種（木村ら, 2015）と、環境 DNA 分析（10 地点）による検出種の比較。環境 DNA 分析では純淡水魚と回遊魚を併せて 11 科 27 種の魚種を検出した。調査地点の配置は図. 3 を参照。

No.	科名	種名	生活型	小出川(本川)		駒寄川		千ノ川		環境DNA(地点別)										
				DNA	捕獲	DNA	捕獲	DNA	捕獲	小出川(本川)					駒寄川		千ノ川			
										St.1	St.2	St.3	St.6	St.7	St.8	St.9	St.11	St.12	St.14	
1	ウナギ科	ニホンウナギ	回遊	●	○			●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
2	コイ科	コイ	純淡水	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
3		フナ属	純淡水	●	○*1	●	○*1	●	○*1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
4		オイカワ	純淡水	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
5		カウムツ	純淡水	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
6		アブラハヤ	純淡水	●	○	●	○	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
7		ウグイ属	純淡水・回遊	●	○	●		●	○*2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
8		モツコ	純淡水	●	○	●	○	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
9		ムギツク	純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10		タモロコ	純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
11		カマツカ	純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
12		ニゴイ属	純淡水	●	○*3	●		●	○*3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
13		スゴモロコ	純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
14		コウライモロコ	純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
15		ドジョウ科	ドジョウ	純淡水	●	○	●	○	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
16	カラドジョウ属		純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
17	シマドジョウ属		純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
18	ホトケドジョウ		純淡水	●	○	●	○	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
19	ナマズ科	ナマズ	純淡水	●	○	●	○	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
20	アユ科	アユ	回遊	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
21	カダヤシ科	カダヤシ	純淡水	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
22	メダカ科	メダカ属	純淡水	●	○	●	○	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
23	カジカ科	カジカ属	純淡水・回遊	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
24	カワアナゴ科	カワアナゴ	回遊	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
25		テンジクカワアナゴ	純淡水	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
26	ハゼ科	チチブ属	回遊	●	○*4	●		●	○*4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
27		シマヨシノボリ	回遊	●	○	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
28		ゴクラクハゼ	回遊	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
29		ヨシノボリ属	不明	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
29		スミウキゴリ	回遊	●	○	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
30		ウキゴリ	回遊	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
31	タイワンドジョウ科	カムルチー	純淡水	●	○	●		●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
計	11科	31種	—	27種	19種	11種	7種	22種	13種	7種	13種	17種	24種	21種	20種	5種	11種	17種	19種	

※1: 捕獲調査ではゲンブナが確認されている。※2: 捕獲調査ではウグイが確認されている。※3: 捕獲調査ではニゴイが確認されている。※4: 捕獲調査ではヌマチチブが確認されている。

2) 採水地点数と検出種数

小出川（本川）について、採水地点数と下流側からの累積の検出種数の関係をみると、下流側の3地点(St. 6、St. 7、St. 8)で、中上流側の調査地点も含めた検出種が全て出そろっている状況であった(図. 6)。この結果は、環境 DNA 分析により流域の魚類相を効率的に把握するためには、下流側に採水地点を配置することが効率的であることを示している。一方で、捕獲調査では支川駒寄川の源頭域のホトケドジョウや、小出川（本川）中流域のタモロコなどが、局所的に確認されていることから、より網羅的に検出するためには下流域から上流域までの多様な環境に採水地点を配置すべきであると考えられる。

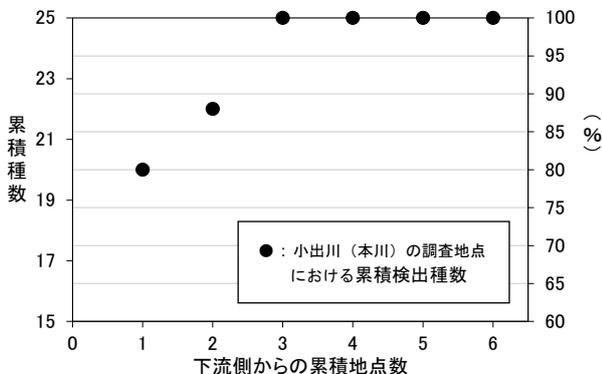


図. 6 採水地点数と検出種数の関係。横軸は小出川（本川）について、下流側からの累積採水地点数、縦軸は累積検出種数及び検出率（%）を示す。（支川の駒寄川と千ノ川は2地点のみであるため同様の分析はしなかった。）

3) 回遊魚の遡上範囲

小出川（本川）における回遊魚の確認状況は表. 5 のとおりである。小出川（本川）では、7種の回遊魚が確認されているが、ニホンウナギ、アユ、ゴクラクハゼ、スミウキゴリの4種は環境 DNA 分析の方が、捕獲調査の確認地点より上流で検出された。カワアナゴ及びヌマチチブ（チチブ属）は、それぞれ環境 DNA 分析と捕獲調査による最上流の確認地点は同じであった。ウキゴリについては、捕獲調査ではSt. 4が最上流確認地点であったが、環境 DNA 分析が未実施の地点であった。

以上の結果は、環境 DNA 分析は捕獲調査に比べて回遊魚の分布範囲（到達上流地点）をより詳細に明らかにできる可能性を示している。

表. 5 回遊魚の確認状況。丸印は、捕獲調査及び環境 DNA 分析それぞれで確認・検出した地点を示す。環境 DNA 分析調査は、St. 4 及び St. 5 では未実施であることに注意。

回遊魚	調査手法	遡上範囲							
		下流	上流						
		St.8	St.7	St.6	St.5	St.4	St.3	St.2	St.1
ニホンウナギ	捕獲		○	○					
	DNA	○	○	○	未調査	○	○		
アユ	捕獲		○						
	DNA	○	○	○	未調査	○		○	
カワアナゴ	捕獲			○					
	DNA	○	○	○	未調査				
ヌマチチブ チチブ属	捕獲	○	○	○	○				
	DNA	○	○	○	未調査	○	○		
ゴクラクハゼ	捕獲		○	○	○				
	DNA	○	○	○	未調査	○			
スミウキゴリ	捕獲		○			○			
	DNA	○	○	○	未調査	○	○	○	
ウキゴリ	捕獲					○			
	DNA		○	○	未調査				

4. まとめ

本研究では、河川で環境DNAメタバーコーディング分析(MiFish法)により魚類相調査を行う場合の採水量の効率性に関する検討を行った。併せて、同手法による流域レベルでの魚類相調査を試み、検出結果と既往知見の捕獲調査と比較することで、環境DNAメタバーコーディング分析の魚類相検出能力の評価を行った。これらの検討・評価に関する実験は、都道府県管理の低水路幅10m程度、延長11km程度の比較的小規模な河川を対象にした事例ではあるが、その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 30種(純淡水魚+回遊魚)程度の種が確認される小規模な河川(低水路幅10m程度)で環境DNAメタバーコーディング分析を行う際には、1,000mLを検体当たりの採水量とすることが効率的である。
- 2) 河川の1地点について横断面3箇所(左岸・流心・右岸)の表層水について検出種を比較すると、互いに8割程度は共通する種を検出した。採水量を増やすことで箇所間の共通度は増加する傾向が見られたが、1,000mL程度で共通度の増加はほぼ上限に達した。
- 3) 採水量を増やしても各箇所のみで検出される種が見られ、河道内を流下する環境DNAの種組成については横断方向に不均一性が存在することが示唆された。
- 4) 環境DNA分析により流域の魚類相をより網羅的に把握する(検出種数を増やす)ためには、1箇所での採水量を増やすよりも、1箇所での採水量は1,000mL程度として、異なる箇所(環境)で採水する方が効果的である。
- 5) 流域全体の魚類相を把握するツールとして、環境DNAメタバーコーディング分析は有効である。ただし、分布が局所的な種や、生息密度の低い種は検出しにくいことに留意する必要がある。

謝辞

資料の提供等でご協力いただきました茅ヶ崎市、環境DNA分析および本稿の取りまとめにあたりご指導いただいた神戸大学大学院人間発達環境学研究科の源准教授及び坂田氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Thomsen P. F. & Willerslev E. (2015) Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* 183: pp4-18.
- 2) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen

- J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M., Iwasaki W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. open sci.* 2: 150088.
- 3) Yamamoto S., Masuda R., Sato Y., Sado T., Araki H., Kondoh M., Minamoto T., Miya M. (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci Rep.* 7: 40368.
- 4) Fujii K., Doi H., Matsuoka S., Nagano M., Sato H., Yamanaka H. (2019) Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. *PLoS ONE.* 14(1): e0210357.
- 5) Mächler E., Deiner K., Spahn F., Altermatt F. (2016) Fishing in the Water: Effect Sampled Water Volume on Environmental DNA Based Detection of Macroinvertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 50: pp305-312.
- 6) Deiner K., Walser J. C., Mächler E., Altermatt F. (2015) Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183: pp53-63.
- 7) Muha T.P., Robinson C.V., Garcia de Leaniz C., Consuegra S. (2019) An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. *PLoS One.* 14(7):e0219218.
- 8) Yamanaka H., Minamoto T., Matsuura J., Sakurai S., Tsuji S., Hotozawa H., Hongo M., Sogo Y., Kakimi N., Teramura I., Sugita M., Baba M., Kondo A. (2017) A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology.* 18: pp233-241.
- 9) 木村喜芳、齋藤和久、森上義孝. 茅ヶ崎市の淡水魚類相(第3報). (2015) 文化資料館調査研究報告 24: pp21-46.