

河川下流域における回遊型カジカ属の稚魚に由来する環境 DNA 含有物質の拡散

DIFFUSION OF THE ENVIRONMENTAL DNA-CONTAINING SUBSTANCE DERIVED FROM THE JUVENILE AMPHIDROMOUS *COTTUS* FISHES IN DOWNSTREAM BASIN

北川哲郎¹・村岡敬子²・中村圭吾³

Tetsuro KITAGAWA¹, Keiko MURAOKA² and Keigo NAKAMURA³

¹非会員 博(農) 株式会社建設環境研究所 (〒170-0013 東京都豊島区東池袋2-23-2)
(研究当時: 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ)

²正会員 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

³正会員 博(工) 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

The bidimensional diffusion pattern of environmental DNA (eDNA) was investigated by analyzing its concentration in juvenile amphidromous *Cottus* fishes (*C. hangiongensis* and *C. amblystomopsis*) using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay. Environmental water samples were obtained from the left bank, center flow, and right bank of the mid-sized Ohno River, Hokkaido, Japan. at five cross-sectional lines situated between 50 m and 1,000 m from the mouth of the river. The sampling was conducted three times between June and July 2019. When compared with the results of direct capture conducted during the same time, the eDNA concentration rose in direct proportion to the number of *Cottus* fishes. The correlation coefficient reached its highest level when it was calculated with the eDNA concentration and the number of fish collected 550–800 m upstream, without considering diffusion in the transverse diffusion. Thus, eDNA sampling in mid-sized rivers would be more effective if conducted separately for each bank and the center flow.

Key Words: Cottidae, migration, estuarine, quantitative evaluation

1. はじめに

環境 DNA (environmental DNA ; 以下, eDNA) 分析は, 水中や土壌中に存在する組織片等の遺伝情報を読み取り生物種の生息を推定する調査技術のひとつで, 現地での採水物の分析から生物の在・不在など様々なデータを得ることができる効率的かつ安価な調査手法として注目を集めている^{1,2)}. 本技術は, 従来行われてきた直接採捕による調査と比較して非侵襲的であることから³⁾, とりわけ採捕が難しいうえに調査圧の影響を強く受ける仔稚魚調査への活用に対して, 大きな効果が期待できる.

淡水域における仔稚魚類は, 基礎生産力が高く外敵の侵入が少ないワンドや氾濫原, 水草帯といった環境を選好することで知られ, 水域の中でも限られた範囲に集中分布することが多いと考えられている^{4,5)}. したがって, 仔稚魚の生息確認や好適環境の把握を目的とした調査に eDNA 分析技術を活用していくためには, eDNA 含有物質の移流拡

散パターンなどについて, 成魚を対象とする場合よりも解像度の高い検証が求められる. しかし, 河川における eDNA 含有物質の動態については, 河川縦断方向に対する拡散を取り上げた研究が数多く行われている一方で^{6,7,8,9)}, 横断方向を含めた面的な分布様式に関する検証例はきわめて少ない. また, 仔稚魚期の個体に対する eDNA 分析の活用例として, アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* やイタセンパラ *Acheilognathus longipinnis* を対象とした調査が試みられているが^{10,11)}, eDNA 定量 PCR 解析 (quantitative PCR: 以下, qPCR) における定量結果と資源量との相関性に関する具体的知見は得られていない.

そこで本研究では, 両側性回遊型カジカ属魚類の初期遡上群 (以下, 遡上個体) を対象とした採捕調査と同時に河川水を採水し, qPCR によって定量された eDNA 含有物質の分布と採捕個体の二次元的な分布とを比較することで, eDNA 含有物質の拡散様式および仔稚魚類のモニタリングに対する eDNA 分析の利用性について考察した.

2. 材料・方法

現地調査は、北海道函館湾に注ぐ中規模河川である大野川（流路延長: 28.6 km）の、明瞭な瀬淵構造が見られず横断工作物がない感潮区間で、2019年6月4日、18日、7月4日に計3回実施した。調査時の流況を確認するため、初回調査時には調査区間上流の河口から1,400mの地点へドップラー式流量計（SonTek-IQ, Xylem Inc.）を設置し、10分間隔で9:00–17:30の流量を連続測定した。その後、測定結果をもとに水位と流量との換算式を作成し、以降の調査時には同地点における水位を記録して流量を推算した。

(1) 直接採捕

カジカ属魚類の採捕は、河口から上流1,000mまでの区間を対象として、河口部から上流方向へと向かって行った。採捕努力量は5人・時間とし、Dフレームネット（目合い約1.5mm、底辺長250mm、以下、タモ網）を用いて実施した。大野川にはいずれも両側回遊型であるカンキョウカジカ *Cottus hangiongensis* とエゾハナカジカ *C. amblystomopsis* が同所的に生息するが^{12,13}、遡上初期の小型個体は正確な種判別が困難なことに加え、同定作業の際に個体へ大きなダメージが生じると予期されたことから、カジカ属までの同定に止めた。遡上個体が採捕された場合には、地点情報を携帯型GPS（eTrex 20J, Garmin 社, Olathe, 現地測定誤差: ±3m）で記録した。ただし、遡上個体がきわめて密な集団を形成していると判断された場合には、50個体を上限に個体数を計数し1つの地点情報として記録した。

(2) qPCR 解析

河口から50mを起点とする5本の横断測線上に左右岸の岸際線から2m離れた地点と流路中央を加えた3点を設定し、各回15サンプルを採水した（図-1）。各測線の延長は39.1–48.9mであった。採水は最干潮の前後から上げ潮にあたる時間帯に実施し、塩水遡上に伴う反転流が生じていないことを確認したうえで、新品のポリエチレンバッグ（Ziploc フリーザーバッグ L, 旭化成社）を用いて表層水1Lを採水した。採水後のサンプルは速やかに孔径0.45 μmのメンブレンフィルター（セルロース混合エステルタイプ, ADVANTEC 社）で濾過し、アルミホイルに包んだうえでドライアイスによって凍結し研究室へ持ち帰り、DNA抽出作業までの間、-80℃下で保管した。

凍結サンプルからDNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen 社）を用いてDNAを抽出し、さらにQIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社）を用いて阻害物質を除去して解析試料とした。増幅領域は、ミトコンドリアDNAのCyt-b領域上の79bpとし、カンキョウカジカとエゾハナカジカの両種を増幅可能なプライマーセット（F-primer: 5'-GCAGACGTCGCCAATTC-3', R-primer: 5'-GAGATGCAATGGCCAA-TG-3'）を新たに設計して用いた。プライマーの特異性は、National Center for Biotechnology Information が有するデータ

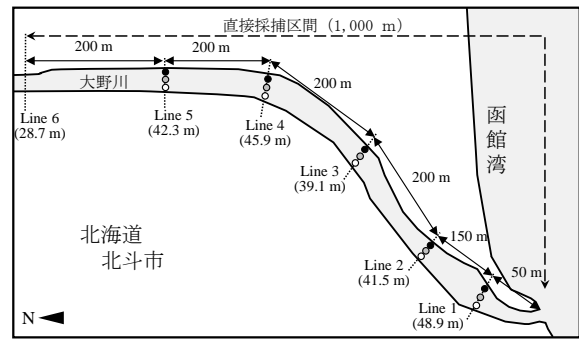


図-1 調査区間の設定状況。Line 1–5: 採水を実施した横断測線（各測線の延長 [m]）。●: 左岸側, ●: 流路中央, ○: 右岸側, に設けた採水地点。両岸際は水際から2mに設定。

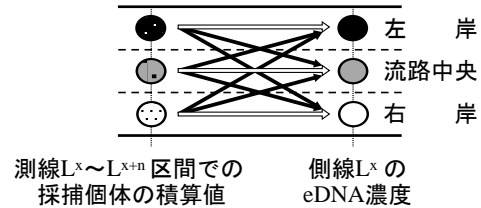


図-2 各測点における環境DNA濃度と採捕個体数との比較パターンイメージ。上流区間で獲られた全個体数との比較時には横断方向への拡散が含まれるため ⇨ と ⇨ で示される地点へのeDNA含有物質の拡散が（表-1A）、横断区分別に集計する場合には ⇨ で示される地点のみへの拡散が（表-1B）、それぞれ想定される。

ベースへ登録されたゲノム情報と照合して検証し、調査地で出現し得る目的外の生物由来の配列情報と一致しないことを確認した。

eDNAの検出には、SYBR-Green法に基づくqPCR解析を用いた¹⁴。今回の解析では、StepOnePlus Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific inc.）を使用し、50サイクルのPCR反応により、解析試料ないし検量線作成用の標準試料を含む20 μLの反応液（PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix [2x, Thermo Fisher Scientific inc., USA]: 10 μL, F-R primer: 各0.4 μL, 蒸留水: 7.2 μL, 試料: 2 μL）中に含まれるeDNA濃度を定量した。qPCR解析は1試料4反復ずつ行い、中央値を代表とした。また、毎回の解析時には、試料に代えて蒸留水を加えた反応液を、対照区として設けた。

(3) 資源量評価

定量されたeDNA濃度と直接採捕で獲られた個体数とを用いて相関係数を算出し、eDNA濃度と資源量との関係について検討した。相関係数の算出に際しては、Line 1–4（以下、Line 1–6をL1–6と記載）では採水地点から上流の測線まで、L5では上流200m（L6）までの、上流区間で獲られた全ての個体を集計した値と、さらに調査測線上の3つの横断区分（左岸側、流路中央、右岸側）別に細分した値とを用いて、eDNA濃度と最も高い相関性を示す範囲の推定を試みた（図-2）。なお、両側回遊型カジカ類の遡上個体の資源量については、50個体を上限とした10段階に区分し評価した。統計解析にはR ver. 3.6.1を用いた。

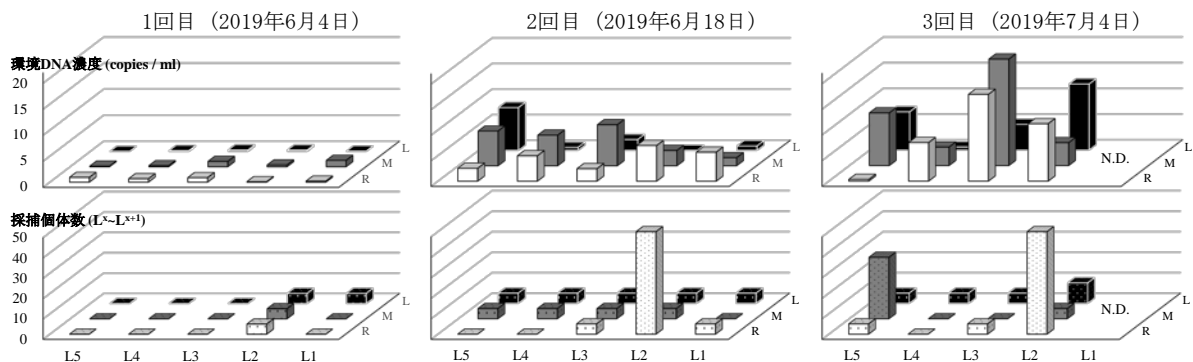


図-3 環境DNA定量解析で検出されたカジカ属遡上個体のeDNA濃度(上)ならびに同日に直接採捕された個体数。N.D.: 環境DNA欠測のため除外。L: 左岸から2m, M: 流路中央, R: 右岸から2m。L1-L5: 図-1参照。

表-1 各側線における環境DNA量と上流で採捕されたカジカ属遡上個体数の相関係数行列

		カジカ属遡上個体の積算個体数									
		A: 測線上で獲られた全個体数と比較した値 [†]					B: 横断区分別に集計した個体数と比較した値 [†]				
		L ^x	~L ^{x+1}	~L ^{x+2}	~L ^{x+3}	~L ^{x+4}	~L ^{x+1}	~L ^{x+2}	~L ^{x+3}	~L ^{x+4}	~L ^{x+5}
環境DNA濃度	L5	0.483					0.701				
	L4	0.617	0.500				-0.001	0.181			
	L3	0.345	0.445	0.753			0.082	0.250	0.778		
	L2	0.668	0.621	0.545	0.741		0.601	0.630	0.676	0.706	
	L1	0.583	0.583	0.583	0.583	0.583	0.313	0.936	0.949	0.946	0.929

黒字: $p < 0.05$, 灰色字: $p > 0.05$ (無相関検定)。[†]図-2参照。

3. 結果・考察

(1) 採捕個体数および調査時の流況

計3回の現地調査において、393個体のカジカ属魚類の遡上個体が獲られた(1回目:13個体,2回目:141個体,3回目:239個体; 図-3)。調査区間の上流端とした河口1,000mへの遡上個体の到達が確認されたのは2回目調査時以降であった。同時に50個体以上の遡上個体が採捕された高密度地点は、2回目調査時と3回目調査時に各1地点、それぞれL2-L3区間の右岸側のみで確認された。なお、調査区間内においてカンキョウカジカないしエゾハナカジカの成魚は採捕されなかった。

調査区間の流量は、6月4日に測定された実測値は $1.3 \pm 0.31 \text{ m}^3/\text{s}$ (平均値 ± 標準偏差 [0.8-2.1 m^3/s :最小-最大])で、実測値から得られた換算式($y=4.3224x-0.771$, $R=0.795$, $N=52$, y =流量, x =代表点水位)に基づき算出された6月18日と7月4日の推定流量はそれぞれ $1.7 \text{ m}^3/\text{s}$ と $1.9 \text{ m}^3/\text{s}$ であった。流量測定時の流速は $0.19 \pm 0.02 \text{ m/s}$ 、水深は $0.49 \pm 0.06 \text{ m}$ で、測定時間中に降雨等は確認されなかった。

(2) eDNAの検出状況

解析試料は、河川中に設置されたオイルフェンスの影響で採水できなかった第3回調査時L1上の3地点を除く延べ42地点から得られた。そのうち、両側回遊型カジカ類に由来するeDNAが検出されたのは40/42(95.2%)試料

であった。サンプルの解析は6回に分けて実施した。eDNAの定量に用いた検量線の決定係数は0.964-0.993(R^2 , Y -intercept: 64.3-77.7)で、PCR増幅効率は53.1-69.5%であった。対照区からの増幅は生じなかった。

今回の解析で定量されたeDNA濃度は $4.0 \pm 4.87 \text{ copies/ml}$ (1回目: $0.4 \pm 0.40 \text{ copies/ml}$, 2回目: $4.0 \pm 2.83 \text{ copies/ml}$, 3回目: $8.4 \pm 6.27 \text{ copies/ml}$; 図-3)であった。なお、Steel-Dwass testを用いた検定の結果、eDNA濃度の分布には、左右岸あるいは流心付近のいずれかに偏る傾向は認められなかった。

(3) 環境DNA含有物質の拡散範囲

本研究においては、個体サイズの変化が少ない遡上個体に対してはるかに大きなeDNAの排出源となり得る成魚は採捕されず、また成魚の存在を予期させる高いeDNA濃度の地点は確認されなかった。さらに、カジカ属の遡上盛期に至っていない可能性が高い6月4日に採水したサンプル中のeDNA濃度は、後2回の調査時と比較して著しく低い値であった(図-3)。直接採捕とqPCR解析の結果は互いに矛盾せず、今回検出されたeDNA含有物質は遡上個体に由来し、qPCR解析の活用によって初期遡上群の到達地点や遡上盛期の推定が可能と考えられた。

eDNA含有物質の主たる影響範囲、すなわちqPCR解析で定量されるeDNA濃度と直接採捕で獲られた資源量との相関を示す区間の指標として、各測点でのeDNA濃度と上流区間における採捕個体数との相関係数を算出した

ところ、採水地点を設けた測線から上流 550–950 m の区間で獲られた積算個体数との比較時に、有意な正相関を示す組み合わせが多く生じた(表-1; 無相関検定, $p < 0.05$)。また、350 m 以上の検出範囲を想定した場合には横断区別(左岸側, 流路中央, 右岸側)に積算個体数を集計した組み合わせに、200 m 以下の検出範囲を想定した場合には流路全体で獲られた積算個体数との組み合わせに、それぞれ正の相関性が強くなる傾向が生じたが、既往知見により eDNA 含有物質の検出範囲は 350 m を超えると想定されることから⁸⁾⁹⁾、横断方向に対する eDNA 含有物質の拡散は限定的である可能性が高いと判断された。加えて、2 次流の一般則に従い¹⁵⁾、流路が大きく湾曲する L2–L4 区間では、採水を行った表層付近に外側(右岸側)へ向けた 2 次流が生じていたと想定されたが、今回の結果からは、eDNA 濃度のピークが全体的に右岸側へとシフトすることで L2 以下の相関係数が低下するといった現象は生じず、2 次流による横断的な混合効果の影響は読み取られなかった。

最下流の測点を設けた L1 における上流区間の積算個体数と eDNA 濃度との相関係数は、550 m 区間での値を頂点として 950 m 区間で低下傾向を呈した(表-1)。さらに、有意な正相関が確認された組合せにおいて、L2 では 800 m 区間、L3 では 600 m 区間と、採捕個体数との比較が可能であった最長区間で最も強い正相関が確認された。eDNA 含有物質の減耗について、山口ほか(2018)⁹⁾は、小河川におけるアユの浸漬実験から、eDNA 含有物質は排出源から 1,000 m 下流までに 10–20 % 程度へ減少し 2,000 m 下流では検出されなくなったと報告している。L1–L5 から得られた相関係数の推移傾向は既往知見と矛盾せず、今回採水時の流況下で検出された eDNA 濃度は、上流約 550–800 m 区間における資源量が強く反映された値と推定された。また、eDNA 含有物質の横断方向への拡散に見られた傾向から、とりわけ流況が穏やかな中・下流域での正確な資源量推定には、左・右岸および流心付近の別にサンプリングを行い面的な推定を行う必要があると考えられた。

4. 結論

本研究で得られた知見により、中規模河川の下流域における eDNA 含有物質の分散様式の一端が明らかとなると同時に、仔稚魚類のモニタリングに対する qPCR 解析の活用へ向けた端緒が開かれた。今後は、中・上流域など多様な流況下における eDNA 含有物質の拡散様式を検証し、qPCR に基づく資源量推定の利用性について精査していく必要がある。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、北の川魚研究所の後藤 晃博士からは、計画策定および取りまとめに対する助言をいただいた。また、国立研究開発法人土木研究所水環境研究グループのメンバー諸氏には、現地調査や解析作業を行う上で多くの助力をいただいた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) Ruppert, K., M., R. J. Kline and M.S. Rahman: Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA, *Global Ecol. Conserv.*, Vol.17, e00547, 2019.
- 2) Compson, Z. G., B. McClenaghan, G. A. C. Singer, N. A. Fahner and M. Hajibabaei: Metabarcoding from microbes to mammals: comprehensive bioassessment on a global scale, *Front. Ecol. Evol.*, Vol.8, 581835, 2020.
- 3) Thomsen, P. F. and E. Willerslev: Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, Vol.183, 4-18, 2015.
- 4) 平井賢一: びわ湖内湾の水生植物帯における仔稚魚の生態: I 仔稚魚の生息場所について, 金沢大学教育学部紀要自然科学編 Vol.19, 93-105, 1970.
- 5) Love, S. A., Q. E. Phelps, S. J. Tripp and D. P. Herzog: The importance of shallow-low velocity habitats to juvenile fish in the middle Mississippi River, *River Res. Appl.*, Vol.33, pp.321-327, 2016.
- 6) 赤松良久・乾 隆帝・一松晃弘・河野誉仁・土居幸秀: 環境 DNA を用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討, 土木学会論文集 B1 (水工学) Vol.73, No.4, pp.I_1111-I_1116, 2017.
- 7) Shogren, A. J., J. L. Tank, E. Andruszkiewicz, B. Olds, A. R. Mahon, C. L. Jerde and D. Bolster, 2017. Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension, *Sci. Rep.*, Vol.7, pp.1-11, 2017.
- 8) Pont, D., M. Rocle, A. Valentini, R. Civade, P. Jean, A. Maire, N. Roset, M. Schabuss, H. Zornig and T. Dejean: Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation, *Sci. Rep.*, Vol.8, Article Number 10361, 2018.
- 9) 山口皓平・赤松良久・乾 隆帝・後藤益滋・河野誉仁: 河川における環境 DNA 含有物質の動態に関する基礎的研究, 土木学会論文集 B1 (水工学) Vol.74, No.5, pp.I_409-I_414, 2018.
- 10) 山崎裕治・西尾正輝: 簡易的な環境 DNA 分析方法を用いた絶滅危惧種イタセンバラの検出, *魚類学雑誌* Vol.66, pp.171-179, 2019.
- 11) 村岡敬子: 河川環境調査への環境 DNA の展開に向けた共同研究発表会, 日本水産学会誌 Vol.86, p.232, 2020.
- 12) 後藤 晃・中西照幸・宇藤 均・濱田啓吉: 北海道南部の河川の魚類相についての予察的研究, 北海道大学水産学部研究彙報 Vol.29, pp.118-130, 1978.
- 13) 後藤 晃: カンキョウカジカ *Cottus hangiongensis* の生活史と分布, 北海道大学水産学部研究彙報 Vol.32, pp.10-21, 1981.
- 14) Morrison, T. B., J. J. Weis and C. T. Wittwer: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotech.*, Vol.24, pp.954-958, +960+962, 1998.
- 15) 石川忠晴・金 舜範: 湾曲部の 2 次流に関する基礎的研究, 土木学会論文集, Vol.375, No.II-6, pp.143-149, 1986.

(2021. 4. 2 受付)