

環境 DNA を活用した環境情報の 高度化に関する共同研究報告書

令和 7 年 7 月

国立研究開発法人 土木研究所

国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
いであ株式会社、株式会社ウエスコ、株式会社エコー
応用地質株式会社、株式会社建設環境研究所、株式会
社建設技術研究所、日本工営株式会社、大成建設株式
会社、パシフィックコンサルタンツ株式会社、公益財
団法人リバーフロント研究所、一般財団法人水源地環
境センター

Copyright © (2025) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、国立研究開発法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、国立研究開発法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

環境 DNA を活用した環境情報の 高度化に関する共同研究報告書

国立研究開発法人 土木研究所
国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
いであ 株式会社
株式会社 ウエスコ
株式会社 エコー
応用地質 株式会社
株式会社 建設環境研究所
株式会社 建設技術研究所
日本工営 株式会社
大成建設 株式会社
パシフィックコンサルタンツ 株式会社
公益財団法人 リバーフロント研究所
一般財団法人 水源地環境センター

要 旨

国土交通省では、河川水辺の国勢調査への環境 DNA 技術の実装に向けた検討が進められており、本技術の実装にあたっては、実務の現場の実情を踏まえながら技術の標準化を進める必要がある。また環境 DNA は、生物調査の高度化や流域レベルの河道管理につながる技術として期待も高いが、そのために解決すべき課題は多岐にわたっている。

本研究では、環境 DNA の河川水辺の国勢調査等への実装に向けた技術体系の構築、環境 DNA の活用による環境調査の高度化に関して、民間企業 11 社等との共同研究を実施した。

キーワード：環境 DNA、河川水辺の国勢調査、環境調査の高度化

はじめに

水や土壌に含まれる生物由来の DNA を分析し、生物情報を得る環境 DNA 技術は、遺伝子分析技術の高度化に伴い急速に拡大しつつある。国土交通省においても、河川水辺の国勢調査（以下「水国調査」という。）への実装に向けた取り組みが進められているところである。

本技術の水国調査への実装に当たっては、実務の現場の実情を踏まえながら、技術の標準化を進める必要がある。また、環境 DNA は、生物調査の高度化につながる技術として期待も高いが、そのために解決すべき課題は多岐にわたっている。そのため、現場で実務を担う民間事業者と連携し、実施可能な技術体系を構築するとともに、環境 DNA 導入による調査の高度化に向けた技術的課題を解決しようとするものである。

さらに、面的な生物情報という特徴を有している環境 DNA は、今後重要となる沿岸域も含んだ流域レベルの河道管理に資することが期待される。そこで、本共同研究（以下「本研究」という。）の取り組みに当たっては、農地や沿岸域の研究を進めている研究機関とも連携し、より国土交通省の施策につながる成果を得ようとするものである。

本研究は、土木研究所、国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所 港湾空港技術研究所、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 及び 土木研究所の実施した公募によって参画した民間事業者 11 社によって実施された。

本研究では、環境 DNA を活用した環境情報の高度化を目指し、「環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築」と「環境 DNA の活用による環境調査の高度化」の 2 つの研究項目に対して調査研究が行われた。本書では、この調査研究結果を共同研究報告書として取りまとめたものである。

環境 DNA を活用した環境情報の高度化に関する共同研究

目次

1 共同研究の概要	1
1.1 背景	1
1.2 共同研究の実施体制	1
1.3 共同研究の実施機関	1
1.4 共同研究の全体像	2
1.5 共同研究の役割分担	3
1.6 共同研究の参加者	4
2 環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築	5
2.1 河川における効率的な環境 DNA 採水条件の検討	5
2.2 環境 DNA 導入時のとりまとめにおける実務的な対応	8
2.3 パッシブサンプリング法による環境 DNA 調査の試行	11
2.4 リファレンス整備の推進と排水流入に起因する擬陽性の検証	13
2.5 MiFish 法における環境 DNA 種判別方法の検討	16
2.6 ダム湖における環境 DNA 導入方法に関する基礎研究	18
2.7 ダムにおける水国実装に向けた技術体系の構築	21
3 環境 DNA の活用による環境調査の高度化	23
3.1 環境 DNA による陸域の生物相把握の可能性検討	23
3.2 大気中からの環境 DNA 採取の試み	25
3.3 多分類群一斉環境 DNA 分析法の開発と 水国調査全項目の環境 DNA 適用に向けた試行調査	27
3.4 環境 DNA を用いた特定外来生物カワヒバリガイの 分布調査と環境 DNA 濃度の評価	31
3.5 環境 DNA 分析を用いたユスリカの把握	34
3.6 両生類の生息状況の把握に向けた取り組み	36
3.7 環境 DNA データを用いた流域における魚類のポテンシャルマップ作成	39
4 おわりに	42

5 巻末資料（共同研究報告会資料）	43
研究項目 1 環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築	45
河川における効率的な環境 DNA 採水条件の検討	47
環境 DNA 導入時のとりまとめにおける実務的な対応	54
パッシブサンプリング法による環境 DNA 調査の試行	63
リファレンス整備の推進と排水流入に起因する擬陽性の検証	71
MiFish 法における環境 DNA 種判別方法の検討	81
ダム湖における環境 DNA 導入方法に関する基礎研究	86
研究項目 2 環境 DNA の活用による環境調査の高度化	93
環境 DNA による陸域の生物相把握の可能性検討	95
大気中からの環境 DNA 採取の試み	102
多分類群一斉環境 DNA 分析法の開発と	
水国調査全項目の環境 DNA 適用に向けた試行調査	108
環境 DNA を用いた特定外来生物カワヒバリガイの分布調査と環境 DNA 濃度の評価	122
環境 DNA 分析を用いたユスリカの把握	128
両生類の生息状況の把握に向けた取り組み	134
環境 DNA データを用いた流域における魚類のポテンシャルマップ作成	142

1 共同研究の概要

1.1 背景

国土交通省では、水国調査への環境 DNA 技術の実装に向けた検討が進められており、本技術の実装にあたっては、実務の現場の実情を踏まえながら技術の標準化を進める必要がある。また、環境 DNA は生物調査の高度化や流域レベルの河道管理につながる技術として期待も高いが、そのために解決すべき課題は多岐にわたっている。

そのため、本研究においては、上記の課題を踏まえて、環境 DNA を活用した環境情報の高度化の実現のために、必要な技術的課題の検討、技術体系の整理、調査手法の提案等を行った。

1.2 共同研究の実施体制

土木研究所、指定機関 2 機関及び土木研究所の実施した公募によって参画した民間事業者 11 社によって実施された。なお、指定機関は、国立研究開発法人土木研究所共同研究規程に基づく手続きにより、本研究の相手方として承認され、本研究の実施について承諾を受けた国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所 港湾空港技術研究所、及び国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構である。

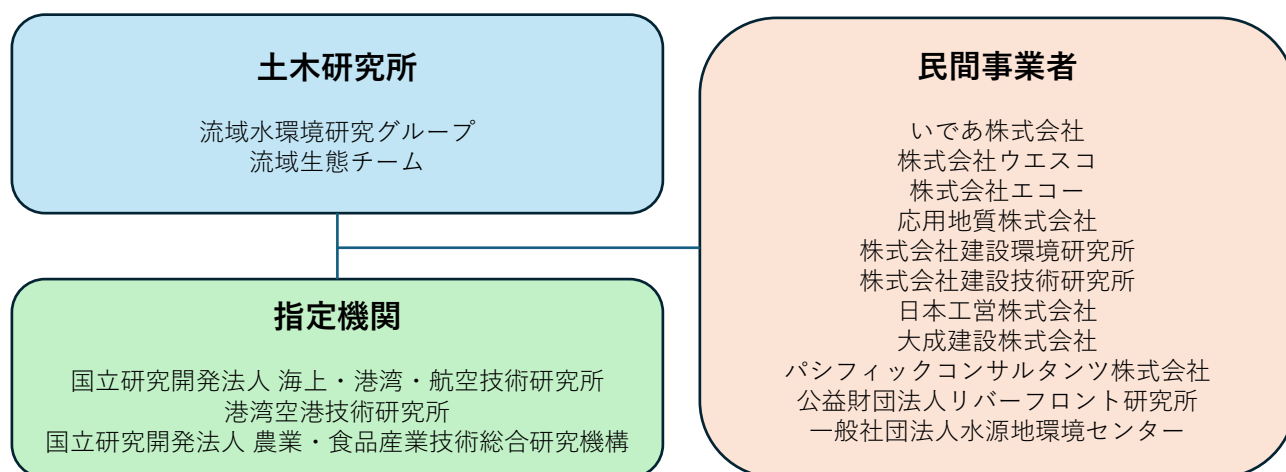


図 1.2-1 共同研究の実施体制

1.3 共同研究の実施期間

2022 年 4 月 1 日 ～ 2025 年 3 月 31 日 （3 年間）

1.4 共同研究の全体像

本研究では、水国調査マニュアル改定を想定した調査技術の標準化と高度化、環境 DNA 技術の高度化を目的として、「環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築」と「環境 DNA の活用による環境調査の高度化」という 2 つのテーマを設定し、各々のテーマに対して、以下の通り、必要な技術的検討を行った。

研究項目 1：環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築

〈採水計画～サンプリング〉

- ・ 河川における効率的な環境 DNA 採水条件の検討
- ・ 環境 DNA 導入時のとりまとめにおける実務的な対応
- ・ パッシブサンプリング法による環境 DNA 調査の試行

〈種リスト作成～とりまとめ〉

- ・ リファレンス整備の推進と排水流入に起因する擬陽性の検証
- ・ MiFish 法における環境 DNA 種判別方法の検討

〈ダム〉

- ・ ダム湖における環境 DNA 導入方法に関する基礎研究
- ・ ダムにおける水国実装に向けた技術体系の構築

研究項目 2：環境 DNA の活用による環境調査の高度化

〈対象生物群の拡充〉

- ・ 環境 DNA による陸域の生物相把握の可能性検討
- ・ 大気中からの環境 DNA 採集の試み
- ・ 多分類群一斉環境 DNA 分析法の開発と水国調査全項目の環境 DNA 適用に向けた試行調査

〈実地の課題解決に向けた取り組み〉

- ・ 環境 DNA を用いた特定外来生物カワヒバリガイの分布調査と環境 DNA 濃度の評価
- ・ 環境 DNA 分析を用いたユスリカの把握
- ・ 両生類の生息状況の把握に向けた取り組み

〈調査結果の活用〉

- ・ 環境 DNA データを用いた流域における魚類のポテンシャルマップ作成

1.5 共同研究の役割分担

表 1.5-1 共同研究の役割分担

	環境DNAの水国調査等への 実装に向けた技術体系の構築	環境DNAの活用による 環境調査の高度化
国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ流域生態チーム	○	○
指定機関 国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所 港湾空港技術研究所	○	○
指定機関 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構	○	○
民間事業者 いであ株式会社	○	○
民間事業者 株式会社ウエスコ	○	○
民間事業者 株式会社エコー		○
民間事業者 応用地質株式会社		○
民間事業者 株式会社建設環境研究所	○	○
民間事業者 株式会社建設技術研究所	○	○
民間事業者 大成建設株式会社		○
民間事業者 日本工営株式会社	○	
民間事業者 パシフィックコンサルタンツ株式会社	○	
民間事業者 公益財団法人リバーフロント研究所	○	
民間事業者 一般社団法人水源地環境センター	○	

1.6 共同研究の参加者

表 1.6-1 共同研究の参加者一覧(1)

機関名	所属名	氏名	役職名	備考
国立研究開発法人 土木研究所	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	崎谷 和貴	元上席研究員	2022年4月～2024年3月
	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	田中 孝幸	上席研究員	2024年4月～2025年3月
	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	村岡 敬子	特任研究員	
	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	中島 颯大	元研究員	2022年4月～2024年3月
	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	菅野 一輝	元交流研究員	2022年4月～2023年3月
	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	篠原 隆佑	元交流研究員	2022年4月～2023年4月
	流域水環境研究グループ 流域生態チーム	釣 健司	交流研究員	2023年4月～2025年3月
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構	農業環境研究部門 農業生態系管理研究領域 生物多様性保全・利用グループ	伊藤 健二	上級研究員	
	農業環境研究部門 農業生態系管理研究領域 生物多様性保全・利用グループ	片山 直樹	主任研究員	
	農業環境研究部門 農業生態系管理研究領域 生物多様性保全・利用グループ	大久 保悟	グループ長	2022年4月～2024年3月
	農業環境研究部門 農業生態系管理研究領域 生物多様性保全・利用グループ	芝池 博幸	主任研究員	
	農業環境研究部門 農業生態系管理研究領域 生物多様性保全・利用グループ	馬場 友希	上級研究員	2022年4月～2024年3月
	農業環境研究部門 農業生態系管理研究領域 生物多様性保全・利用グループ	山本 哲史	主任研究員	
	海洋環境制御システム研究領域 海洋環境情報研究グループ	細川 真也	グループ長	
国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所	ビッグデータ研究グループ	本間 翔太	研究官	
いであ 株式会社	環境創造研究所 遺伝子解析室	中村 匡聡	室長	
	環境創造研究所 遺伝子解析室	白子 智康	上級研究員	
	名古屋支店 環境生態部	南野 洋孝	グループ長	
	名古屋支店 環境生態部	生駒 歩	研究員	
	九州支店 環境技術・生態部	荒巻 陽介	グループ長	
株式会社 ウエスコ	防災・環境事業部	野嶋 宏一	技師長	
	防災・環境事業部 環境計画課	藤原 正季	課長補佐	
	島根支社技術部 環境計画課	佐貫 方城	課長補佐	
	島根支社技術部 環境計画課	篠原 隆佑	係長	2023年4月～2025年3月

表 1.6-1 共同研究の参加者一覧(2)

機関名	所属名	氏名	役職名	備考
株式会社 エコー	環境系事業部 河川・環境部	平田 真二	統括技師	
	環境系事業部 河川・環境部	滝澤 将弥		
	環境系事業部 河川・環境部	井上 綾佳		
	環境系事業部 河川・環境部	宇根 大介		
応用地質 株式会社	地球環境事業部 応用生態工学研究所	沖津 二朗	所長	
	地球環境事業部 応用生態工学研究所	稲川 崇史		
株式会社 建設環境研究所	環境DNA室	宮脇 成生	室長	
	環境DNA室	高木 真也	室長代理	
	環境DNA室	釣 健司		2022年4月～2023年3月
	環境DNA室	藤澤 貴弘		
	環境DNA室	横山 良太		
	環境DNA室	太田 宗宏		
	流域計画部	菅野 一輝	課長	2023年4月～2025年3月
	環境部	江口 健斗	研究員	2024年4月～2025年3月
	環境DNA室	加藤 康充		2022年4月～2023年3月
	環境DNA室	天野 浩美		2022年4月～2023年3月
株式会社 建設技術研究所	環境DNA室	宮川 光一		2022年4月～2023年3月
	東京本社環境部	堀 裕和	グループ長	
	中部支社環境室	堀田 大貴	グループ長	
	大阪本社環境部	澤樹 征司	部長	
	東京本社環境部	大須賀 麻希	主任	
大成建設 株式会社	東京本社環境部	野中 俊文	技師長	
	技術センター 社会基盤技術研究部 環境研究室	赤塚 真依子	課長代理	
	技術センター 社会基盤技術研究部 水理研究室	高山 百合子	次長	
	技術センター 社会基盤技術研究部 環境研究室	高畑 陽	室長	
	サステナビリティ総本部 クリーンエネルギー・環境事業推進本部 自然共生技術部 生物多様性技術室	内池 智広	室長	
	サステナビリティ総本部 クリーンエネルギー・環境事業推進本部 自然共生技術部 生物多様性技術室	渡邊 千佳子	課長	
	サステナビリティ総本部 クリーンエネルギー・環境事業推進本部 自然共生技術部 生物多様性技術室	大井 涼太郎		
日本工営 株式会社	地球環境事業部環境部	加藤 靖広	次長	
	地球環境事業部環境部	前原 裕	技師	
	仙台支店基盤技術部	五十嵐 美穂	課長	
	中央研究所試験・実験センター	郡司 未佳	技師	
	事業戦略本部技術戦略室	今村 史子	チーフスペシャリスト	
パシフィックコンサルタンツ 株式会社	社会イノベーション事業本部 環境共生部	小菅 敏裕	部長	
	大阪社会イノベーション事業部 環境・エネルギー室	渡部 健	課長代理	
	東北支社 社会イノベーション事業部 環境室	伊豆 凜太郎	主任	
	社会イノベーション事業本部 環境共生部 自然資本マネジメント室	地引 汰一	技師	
	中部社会イノベーション事業部プロジェクト推進室（環境）	内田 健太郎	技師	
	社会イノベーション事業本部 環境共生部 自然資本マネジメント室	尾形 将臣	技師	
	北海道社会イノベーション事業部 環境・エネルギー室	池田 幸資	室長	
	東北支社 社会イノベーション事業部 環境室	真木 伸隆	室長	
	大阪社会イノベーション事業部 環境エネルギー室	岡田 泰明	技術課長	2022年4月～2023年3月
	北海道社会イノベーション事業部 環境室	横田 和弥	主任	2022年4月～2023年3月
	社会イノベーション事業本部 グリーン社会戦略部 自然資本マネジメント室	渡辺 弘生	技術課長	2022年4月～2023年9月
	社会イノベーション事業本部 グリーン社会戦略部 自然資本マネジメント室	上田 夏希	課長補佐	2022年4月～2023年12月
	社会イノベーション事業本部 グリーン社会戦略部 自然資本マネジメント室	山下 大佑	技師	2022年4月～2023年9月
	中部社会イノベーション事業部 地域創造室	野村 七重	主任	2022年4月～2023年9月
	大阪社会イノベーション事業部 環境エネルギー室	市谷 優太	主任	2022年4月～2023年9月
	九州社会イノベーション事業部 総合プロジェクト室	立松 俊和	主任	2022年4月～2023年9月
	北海道社会イノベーション事業部 環境室	三塚 多佳志	課長代理	2022年4月～2023年9月
	北海道社会イノベーション事業部 環境室	加藤 敦子	課長代理	2022年4月～2022年9月
公益財団法人 リバーフロント研究所	自然環境グループ	都築 隆禎	グループ長	
一般社団法人 水資源環境センター	自然環境グループ	内藤 太輔	主任研究員	
	研究第三部	大杉 奉功	次長	

2 環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築

2.1 河川における効率的な環境 DNA 採水条件の検討 (パシフィックコンサルタンツ株式会社)

(1) 研究の背景と目的

流域スケールでの効率的な生物モニタリング手法として、水国調査への環境 DNA の導入に向けた動きが進んでいるが、網羅的に生息種を確認するには、限られた予算（調査地点数）の中で、どのような場所に採水地点を設定すべきかは、重要な課題である。本研究では環境 DNA 調査において、「採水すべき環境条件」を明らかにすることを目的とした。

(2) 研究の概要

- ・ 雲出川の直轄管理区間 0～16.2k において 200m ピッチで魚類の環境 DNA メタバーコーディング (MB) 分析が行われており（合計 79 地点の在不在データ）、当該データを用いて解析を実施した。（採水日：2020/11/2～4）、（欠測 3 地点：0.0k、1.2k、4.8k）
- ・ 上記区間を対象として、地点による検出種組成の違いを表現するため、非類似度指数（Sorensen 指数）に基づく nMDS を実施した。また類似度に対して、複数の環境変数を説明変数としてランダムフォレスト解析を実施し、寄与度（重要度）を算出した。
- ・ 出現する全種を 1 回以上検出するようにデータセットから採水地点を選択するときに、選択回数の多い（重要な）地点を抽出し、重要な地点に出現する魚種、その地点の環境的特徴を分析した。

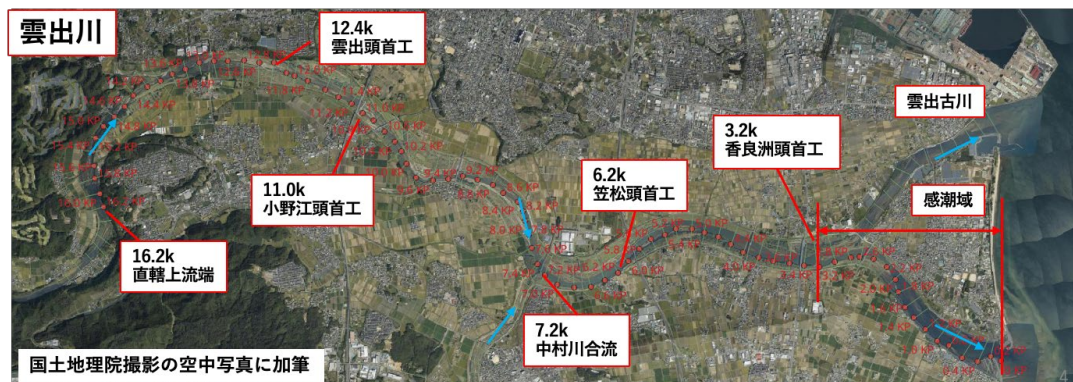


図 2.1-1 雲出川における調査地区位置図

(3) 研究結果のとりまとめ

〈流程の検出魚類相の変化を把握できる環境条件〉

- ・ 「流入支川下流・横断構造物」に魚類相の変化への影響が大きい箇所が確認された。河床勾配の変化点では特に流速の変化による環境 DNA の滞留が起きるほか、魚類のハビタットの物理環境（流速、河床材、水深）の変化による魚類相の変化も見られると考えられる。

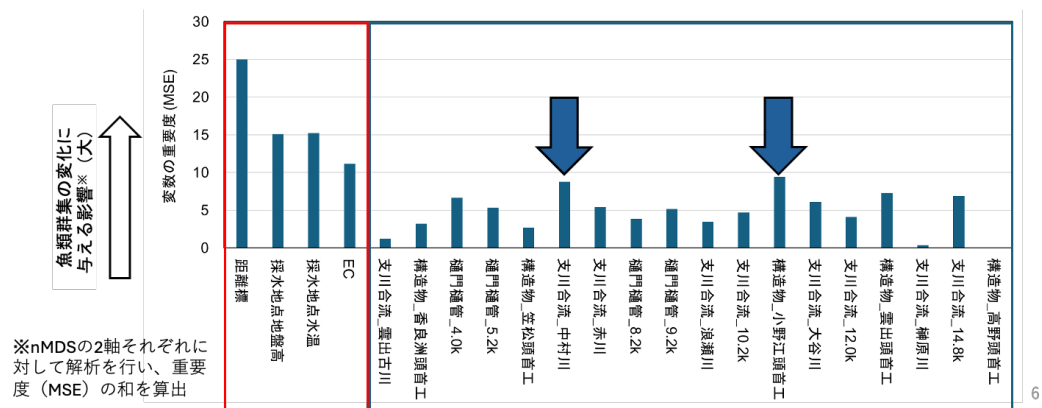


図 2.1-2 ランダムフォレストにより算出した魚類群集への影響度合

〈魚類相を効率的に網羅するために重要な環境条件〉

- ・ 河床勾配が緩くなる下流区間で砂礫底を利用する回遊魚が多く検出された。
- ・ 河口部では干潟付近で多くの種が検出された（潮汐を考慮）。

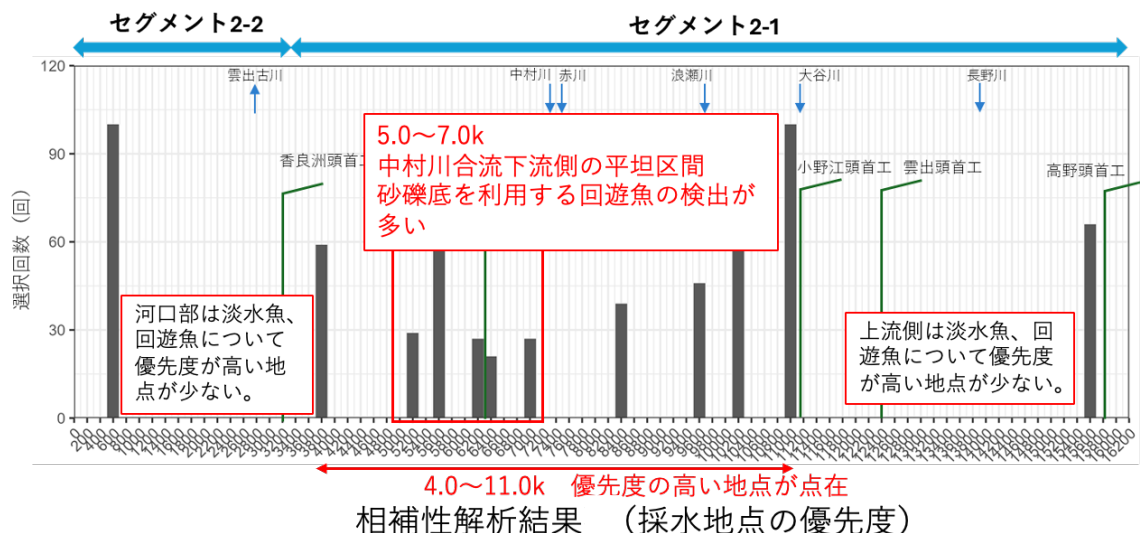


図 2.1-3 相補性の解析結果

(4) 参考文献

1. 北川 哲郎, 村岡 敬子, 天羽 淳, 堀江 隆生, 岡本 祐司, 中村 圭吾 : 環境 DNA 分析を用いた河川調査における地点間隔設定の最適化に向けた検討, 河川技術論文集 28 巻 , 2022.
2. 土居 秀幸, 岡村 寛 : 生物群集解析のための類似度とその応用 : R を使った類似度の算出、グラフ化、検定, 日本生態学会誌 61, 2011.
3. 松葉 史紗子, 赤坂 宗光, 宮下 直 : Marxan による効率的な保全計画 : その原理と適用事例, 保全生態学研究 20 巻 1 号, 2015.
4. 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
5. 菅野 一輝, 篠原 隆佑, 中島 颯大, 村岡 敬子, 崎谷 和貴 : 汽水域の魚類群集把握に向けた環境 DNA の最適な採水手法の検討 : 河川技術論文集, 第 29 巻, 2023

2.2 環境 DNA 導入時のとりまとめにおける実務的な対応 (株式会社ウエスコ)

(1) 研究の背景と目的

水国調査における魚類の採捕結果と環境 DNA 解析結果を比較し、実務的な観点から、環境 DNA 導入における以下の懸念事項をふまえた検証と対応案を検討した。

- ・ 採捕と環境 DNA の検出種が一致しない種に対する考え方
- ・ 生息環境との関係性及び、その考え方
- ・ 環境 DNA そのもの、あるいは採捕との評価方法や基準の考え方
- ・ 従来の調査データとの精度の連続性及び、その考え方
- ・ 環境 DNA で検出されない種に対する考え方

(2) 研究の概要

- ・ 岡山県の一級水系高梁川及び吉井川を対象として、水国調査における採捕調査と環境 DNA メタバーコーディング調査結果を比較した。
- ・ 研究に供したデータは、高梁川水系 6 地点、吉井川水系（苫田ダム周辺含む）12 地点の計 18 地点の結果を使用した。なお、採捕調査・採水・環境 DNA 分析ともに実施者が異なる結果を使用した。
- ・ 環境 DNA 分析と採捕調査による魚類の確認種数や確認種の比較結果から、環境 DNA 結果を用いた水国調査のとりまとめにおける実務的な対応と課題を整理した。

■対象河川



■調査概要

項目	高梁川水系	吉井川水系
調査年度	令和4年度(2022年)	令和3年度(2021年)
調査対象	河川(県～国管理区間)	河川・苫田ダム(国管理区間)
調査地区数	河川 6 地点(淡水)	河川 5 地点(汽水1, 淡水4) ダム 7 地点(湖内3, 流入河川2, 下流河川2)
採捕調査方法	投網, タモ網, 刺網, はえなわ, どう, セルびん, 潜水捕獲	投網, タモ網, 刺網, はえなわ, どう, セルびん, 定置網, 潜水捕獲
環境 DNA 検体数/地点	4 検体	河川 5 検体, ダム 1~2 検体
採水時期	夏季(8月)	秋季(10月)
採水量	1 L	2 L (1 L × 2 本)
PCR 反復数	8 反復	8 反復
備考	採捕調査, 採水者, 分析者は水系で異なる	

■採水位置



図 2.2-1 調査概要

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 高梁川及び吉井川水系における環境 DNA 調査と採捕調査の結果を比較し、環境 DNA 調査導入時に想定される課題ととりまとめにおける実務的な対応を整理した。
- ・ 採捕調査と比較して、環境 DNA 調査による確認種数は多い傾向がみられ、優占種は両調査で概ね一致して確認された。調査地区に生息する魚類の推定は、既往採捕結果、生息環境の変遷、土地利用等の情報から可能と考えられた。
- ・ 環境 DNA での確認が不安定な緩流域の重要種(スナヤツメ類等)への対応として、コスト縮減も考慮し、タモ網での補足的な採捕が考えられる。

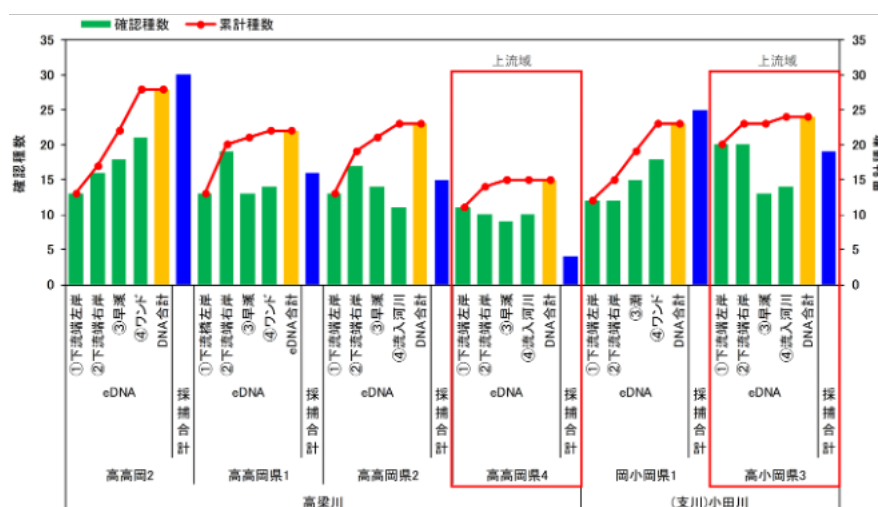


図 2.2-2 環境 DNA と採捕調査の結果の比較（高梁川水系）

表 2.2-1 環境 DNA 調査でのみ確認された魚類一覧

No.	種名	高梁川水系	吉井川水系	水国調査での既往確認	生息有無の判定	重要種の選定基準			
						文化財保護法	種の保存法	環境省 RL2020	岡山県 RL2025
1	マイワシ		●	×	× (生息域外)				
2	シロヒレタビラ	●	●	○	○生息情報あり			EN	CR+EN
3	ニッポンバラタナゴ		●	×	○生息情報あり			CR	CR+EN
4	ソウギョ		●	×	○生息情報あり				
5	マルタ		●	×	× (生息域外)				
6	エゾウグイ		●	×	× (生息域外)				
7	フクドジョウ		●	×	× (生息域外)				
8	アユモドキ		●	○	○生息情報あり	国指定	国内	CR	CR+EN
9	ナガレホトケドジョウ	●		×	○生息情報あり			EN	VU
10	ブリ		●	×	× (生息域外)				
11	カンパチ		●	×	× (生息域外)				
12	イドミズハゼ		●	×	× 生息域外(淡水域で確認)			NT	CR+EN
13	ボウズハゼ		●	×	× 生息域外(淡水域で確認)				
14	タイリクスナモグリ	●		×	▲判断に迷う				
15	チャブ	●		×	▲判断に迷う				

表 2.2-2 たも網での補足調査を行った場合のコスト比較

内容	金額比率
従来の採捕	100%
eDNAのみ(4検体)	68%
eDNA(4検体)+タモ網	78%
eDNA(2検体)+タモ網	51%

(4) 参考文献

1. 篠原隆佑，村岡敬子，菅野一輝，天羽淳，中村圭吾：環境 DNA 分析の河川の魚類調査への適用に向けた最適な採水地点の検討，河川技術論文集，第 28 巻，2022 .
2. 村岡敬子，菅野一輝，篠原隆佑，天羽淳，中村圭吾：河川水辺の国勢調査への環境 DNA 導入に向けた取組み，土木技術資料，第 64 巻 5 号，2022.
3. Doi, H., Nakamura, K. Dominant barriers and the solutions to the social application of environmental DNA. Landscape and Ecological Engineering 19, 305-312 , 2023.
4. 北川哲郎，村岡敬子，中村圭吾：淡水魚類の生息場評価に対する環境 DNA 分析の有効性，土木技術資料，第 63 巻 5 号，2021.
5. S Tsuji, R Inui, R Nakao, S Miyazono, M Saito, T Kono, Y Akamatsu : Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community, Scientific Reports, 2022
6. 環境省：岡山県内におけるスイゲンゼニタナゴの危機的状況について（外来タナゴ類の確認について），中国四国地方環境事務所ホームページ，2024 (<https://chushikoku.env.go.jp/procure/alienbl.html>)

2.3 パッシブサンプリング法による環境 DNA 調査の試行 (日本工営株式会社・公益財団法人リバーフロント研究所)

(1) 研究の背景と目的

河川等における環境 DNA の捕集方法は水 1L を採水することが主流であるが、直接採捕されいながら MB 解析で検出されない、感潮域など特定の環境下において検出率が低下するといった課題が明らかとなっている。これは採水による方法が、採水した瞬間値の取得となることが原因のひとつと考えられる。

一方で、近年では環境 DNA を吸着する素材を環境中に設置し、一定期間後に回収するパッシブサンプリング法（以下「PS 法」という。）が提案され始めている。PS 法の特徴は、サンプリングの際に環境 DNA の吸着材を一定期間環境中に設置(放置)するだけでよいため、①簡易的かつ省力的である、②時間累積的な生物情報を環境中への長時間の設置により得られる可能性が高い、等の利点があげられる。

そのため、PS 法での、採水時間以外に活動が活発化する種（夜行性の種等）の検出効率の向上の可能性、感潮域等の採水方法では検出率が低下する環境下での活用の可能性を検討した。

(2) 研究の概要

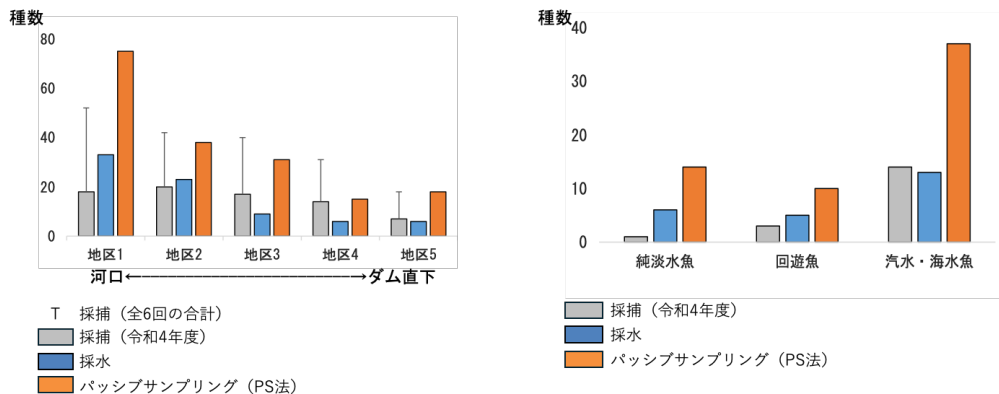
- ・ PS 法を用いた環境 DNA 研究では研究者ごとに天然海綿(生体)や活性炭、粘土、カルシウム化合物等の様々な吸着素材が用いられており、日本工営では山口大学と共同研究で天然海綿スポンジを用いた環境 DNA PS 法を開発し、河川や海域での生物モニタリングに活用している。
- ・ 天然海綿スポンジは海綿の骨格と海綿質繊維を素材としており、比較的安価で入手可能な吸着素材となっている。ここでは、吸着素材として天然海綿スポンジを用いた。
- ・ 天然海綿スポンジは、環境 DNA を捕捉する力が強い。トラップした環境 DNA を回収するために、今回は天然海綿スポンジをそのまま抽出液に浸漬し環境 DNA を剥離、大容量の溶液を処理できるプロメガ株式会社の DNA 抽出精製キットを用いて DNA を精製する方法を用いた。精製後の DNA 溶液は、従来と同様の環境 DNA 分析に使用した。



図 2.3-1 海綿スポンジから DNA を抽出する流れ

(3) 研究結果のとりまとめ

砂礫河川での事例（庄川における河川水辺の国勢調査結果との比較）



砂礫河川（庄川）での結果

- ・砂礫河川では、PS法で採捕調査や従来の採水法に比べて多くの種数を得られた。
- ・夜行性の魚種や重要種等で、時間累積的な結果を得られた。
- ・感潮域や広い河口域で特に有効な結果が得られた。

干潟等（白川・緑川）での結果

- ・干潟等ではPCR阻害が生じるサンプルもみられるが、カラム精製により十分なPCR増幅結果が得られた。
- ・巻き上がる懸濁物等の目詰まりによって海綿が十分に暴露されない場合には、目詰まりの原因となった沈着物の分析で良好な結果が得られた。
- ・海綿を下げ潮時のみ設置することで目詰まりの影響を軽減することができるが、時間累積効果はやや低下した。

水国等の環境調査におけるPS法の活用場面

- ・夜行性の魚種、重要種等の在・不在を精査する場合
- ・感潮域で上げ潮・下げ潮等の影響を受け魚類相の時間変化が大きい環境である場合（ただし、泥や浮遊物等の多い環境では海綿だけでなく、沈着物も分析することが有効なことも。）

今後の展開

- ・PS法は時間累積の結果を得るために有効であったが、設置方法や設置回収のタイミング、沈着物分析といった適用方法や適用範囲を整理していく必要がある。

(4) 参考文献

1. 北側哲郎, 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. 26, 319-324.
2. Mariani S., Baillie C., Colosimo G., Riesgo A. : Sponges as natural environmental DNA samplers. Current Biology 29, R395-R402, 2019.
3. Kirtane A., Atkinson J., Sassoubre L. : Design and validation of passive environmental DNA samplers using granular activated carbon and montmorillonite clay. Environ. Sci. Technol. 54, 11961-11970, 2020.
4. Verdier, H., Konecny-Dupre, L., Marquette, C., Reveron, H., Tadier, S., Grémillard, L., Barthès, A., 562 Datry, T., Bouchez, A., & Lefébure, T. : Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers. Mol. Ecol. Resour. 22, 2158-2170, 2022.

2.4 リファレンス整備の推進と排水流入に起因する擬陽性の検証 (いであ株式会社)

(1) 研究の背景と目的

環境 DNA 分析技術の主要な課題である「偽陰性」と「偽陽性」に着目し、リファレンスの整備の推進と、排水流入に起因する偽陽性の検証を行った。

表 2.4-1 環境 DNA 調査における課題と研究テーマ

環境DNA調査の課題	主な要因(一部抜粋)	研究テーマ
偽陰性 (生息している種が検出できない)	国際塩基配列データベースにリファレンスとなる配列の登録がない種・種内系統があり、正確な種同定ができない。結果的に、DNA配列が検出されても、種リストに載らないことになってしまう。	テーマ① 種内系統を網羅することを目指したリファレンス整備の推進
偽陽性 (生息していない種が検出される)	採水地点の上流側に存在する排水(生活排水、工場、飲食店など)や死亡個体由来するDNAがサンプルに混入することによって、調査地点に生息していない種が検出されてしまう。	テーマ② 排水流入に起因する偽陽性の検証

(2) 研究の概要

〈リファレンスの整備〉

- 網羅的解析による種同定では、検出された DNA 配列とデータベースの登録配列との一致率が「魚類では 98.5%以上」「両生類では 97.0%以上」を判定基準とすることが多い。しかし、ある種の 2 つの種内系統 A・B 間の DNA 配列の一致率が判定基準以下であった場合、種内系統 A のリファレンス配列だけがデータベースに登録されている状態では種内系統 B が検出されても正しく種同定ができないという問題が生じる。
- そのため、日本国内に生息する淡水魚類・両生類を対象に、すでにデータベースに登録されている種であっても、その種内系統までを網羅することを目指して生体標本を集め、リファレンス配列を取得し、データベースに登録を行った。

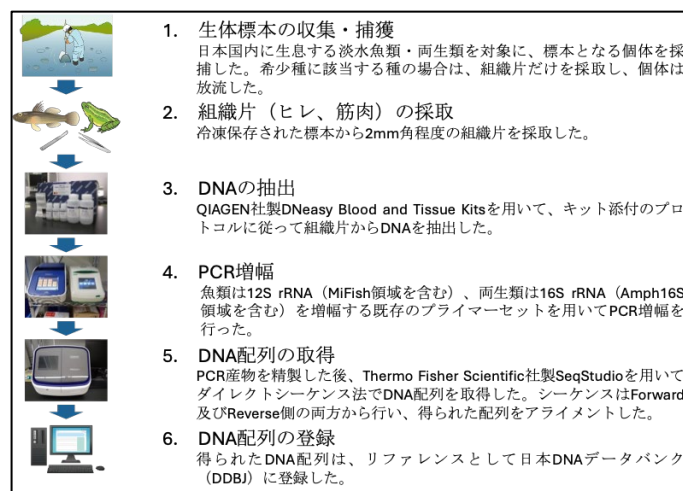


図 2.4-1 DNA 塩基配列の登録手順

<排水流入に起因する偽陽性の検証>

- 日本国内の下水処理場では、一般的には標準活性汚泥法が採用され、さらに何らかの高度処理が追加されるケースが多い。下水処理水は、最終的に塩素や紫外線等による消毒処理がなされた後に河川に放流されるが、それらの処理によって処理水中の環境 DNA（ここでは、細菌や原生動物以外のマクロ生物由来のものを対象とする）がどの程度残存しているのか、また河川中での拡散範囲はどのくらいなのかといった実態については、あまりよく知られていない。
- そのため、複数の下水処理場（浄化センター）を対象に、直轄河川に流入する下水処理水及び放流先の河川水を採水し、下水処理水由来の環境 DNA の検出状況から、一級河川における排水流入に起因する偽陽性の影響を評価した。

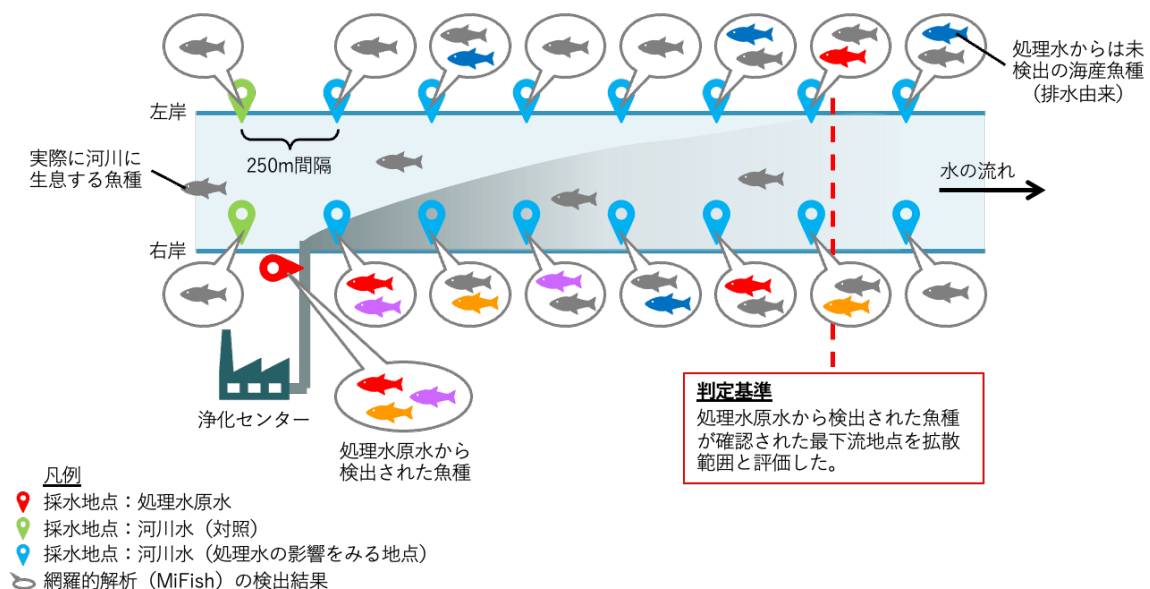


図 2.4-2 擬陽性の検証における調査地区の設置の考え方

(3) 研究結果のとりまとめ

- リファレンスの整備では、魚類は 55 種 99 個体、両生類は 20 種 45 個体の標本を集め、リファレンス配列を新たに取得してデータベースの拡充を図った。その結果、これまで網羅的解析による識別性が不明確だった複数の種において、種の同定精度の信頼性が補強された。
- 環境 DNA 調査における偽陰性の課題を解決する一つの策として、リファレンス整備によるデータベースの拡充が重要であることが改めて示された。
- 排水流入に起因する偽陽性の検証では、河川に流入する下水処理水には、活性汚泥や塩素等による処理後も検出可能なレベルで排水由来の環境 DNA が残存しており、一級河川で環境 DNA 調査を行う際に偽陽性の原因となりうるということが明らかとなった。
- 一級河川に放出された下水処理水由来の環境 DNA の拡散距離は、1.0~1.5km 程度と推定された。北川ら (2021) の雲出川下流域における類似調査の事例では、排水由来 DNA の検出範囲は 1.6km 程度と見積もられており、本調査の結果とかなり近い推定結果であった。
- 排水由来の偽陽性を避けることは難しいが、排水の混合率が高い水を試料にしまうと、相対的に偽陽性のリード比が大きくなり、本来の調査対象である「実際に河川に生息する生物」の検出効率が低下する可能性がある。採水する地点を選定する際は、下水処理水等の人為排水の流入箇所周辺を避けるべきである。

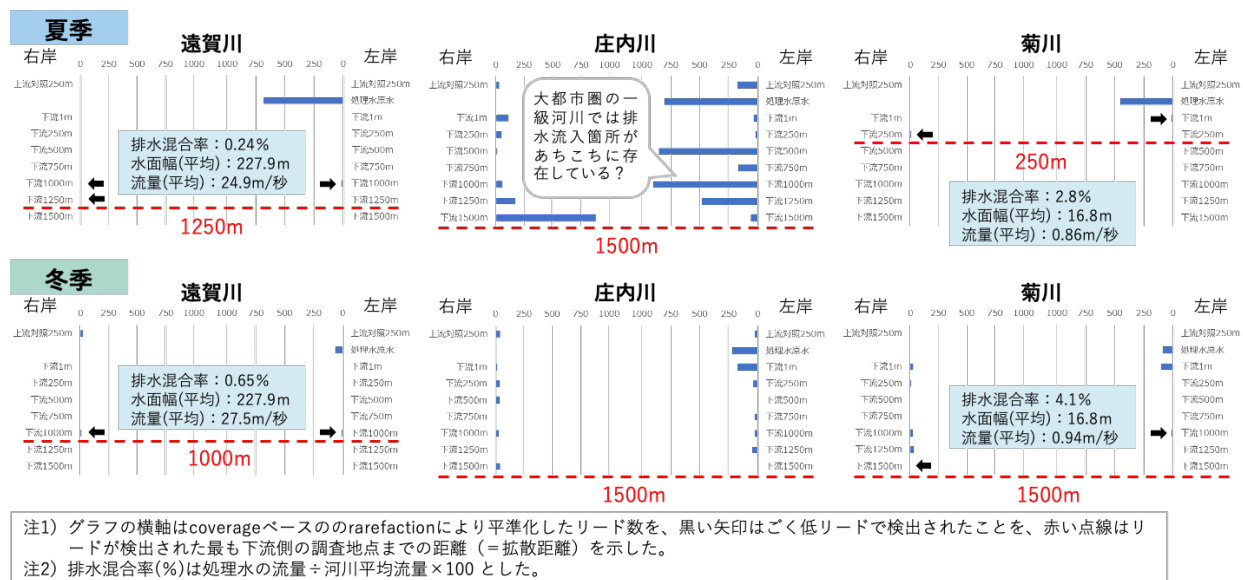


図 2.4-3 夏季及び冬季における各河川の拡散状況

(4) 参考文献

- 北川哲郎・村岡敬子・天野 聡・岡本祐司・中村圭吾：河道内で検出された海産魚類を指標とした環境 DNA 含有物質の有効検出範囲の推定，河川技術論文集，27 巻，2021

2.5 MiFish 法における環境 DNA 種判別方法の検討 (株式会社建設環境研究所)

(1) 研究の背景と目的

環境 DNA の水国調査への導入にあたり、定期的・継続的・統一的な河川に関する基礎情報の収集整備のための調査という水国調査の目的に沿うように、環境 DNA メタバーコーディングの採水、分析、データ解析の各工程における課題を挙げ、対応を検討する必要がある。

データ解析における種名確定作業は塩基配列の相動性検索の結果等を元に種同定を行う。しかし、近縁種間の識別の判断やリファレンス配列の誤登録などにより調査者間の種同定結果にばらつきが生じる可能性がある。そのため、一定の精度を確保しながら、誰が作業をしても、同じ種リストが作成できる手法を検討した。

(2) 研究の概要

- ・ 他マニュアルを参照に、水国調査に環境 DNA を導入する際に必要となる事項を検討した。
- ・ 環境 DNA 学会『環境 DNA 調査・実験マニュアル』では、採水、分析の具体的な使用機器や詳細な手順が記されている。
- ・ 環境省『環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き』では、環境 DNA の基礎的な情報、調査計画の立案から、採水、分析、調査結果の判読、分析結果の精査等、環境 DNA 調査の一連の流れが記されている。
- ・ H28 水国マニュアル（魚類調査編）と同様の流れで環境 DNA による種同定を行う場合は、「水国調査のための生物リスト」の環境 DNA 版が必要となってくる。
- ・ 上記の事例を踏まえて、調査結果の判読と分析結果の精査の具体的な工程に着目し、①種名確定作業のフロー、②MiFish 種名リストの素案を作成することとした。

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 水国マニュアルでの記載を想定した種同定フロー（案）および、「水国調査のための MiFish 種名リスト（仮称）」を作成した。
- ・ 分岐①として「種名が確定できる種」or「注意を要する種」、分岐②として「種特定」or「高次分類群止め」、で分けることで、同一の魚種リストを出せると考えられる。
- ・ 低一致率への対応、種名リストにない種への対応等、フローを適応する上で想定される事項と対処方法について検討して、フローに組み込んだ。
- ・ 今後の課題として、種名リストの具体の種名の妥当性や、スクリーニングを行う事項についての検討が必要と考えられる。

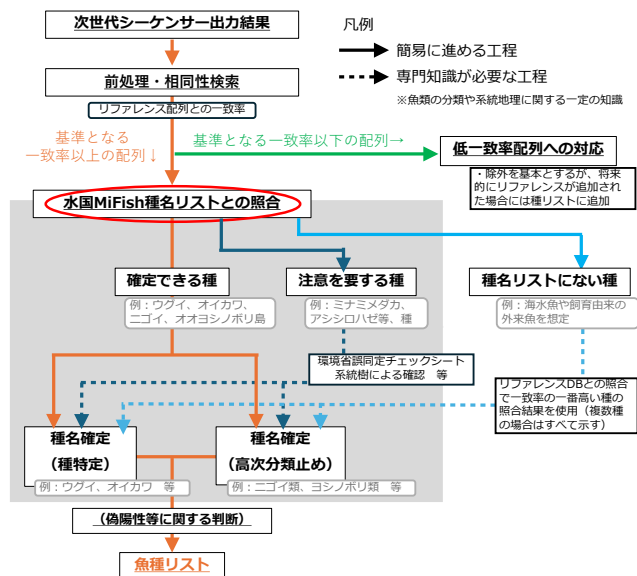


図 2.5-1 水国調査マニュアルでの起債を想定した種同定フロー（案）

表 2.5-1 水国調査のための MiFish 種名リスト（仮称）：ハゼ科の一部

No	目	科	属	eDNA種名	注釈あり	注釈	分類②	分類①	備考
194	スズキ目	ハゼ科	ミミズハゼ属	ミミズハゼ属	※	※ミミズハゼ属：ミミズハゼ/ミナミミミズハゼ/イドミミズハ	高次分類群止め		◎高度な情報。系統樹から、ユウスイミミズハゼ等が分けられる可能性がある
195	スズキ目	ハゼ科	ミミズハゼ属	イドミミズハゼ			種特定		
196	スズキ目	ハゼ科	ミミズハゼ属	ミミズハゼ属	※	※ミミズハゼ属：ミミズハゼ/ミナミミミズハゼ	高次分類群止め		
197	スズキ目	ハゼ科	ミミズハゼ属	イノミミズハゼ			種特定		
198	スズキ目	ハゼ科	トビハゼ属	トビハゼ			種特定		
199	スズキ目	ハゼ科	シロウオ属	シロウオ			種特定		
200	スズキ目	ハゼ科	チウラスボ属	チウラスボ			種特定		
201	スズキ目	ハゼ科	チウラスボ属	コガネチウラスボ			種特定		
202	スズキ目	ハゼ科	トビハゼ属	トビハゼ属	※	※トビハゼ属：トビハゼ/ミナミトビハゼ	高次分類群止め		
203	スズキ目	ハゼ科	マハゼ属	マハゼ			種特定	注意を要する	●DBの問題で確認が必要な可能性あり。マハゼとアンシロハゼは混って登録されていることがある。系統樹の作成か、アクセッション番号から「環境省同定チェックシート」による確認が必要
204	スズキ目	ハゼ科	マハゼ属	アシロハゼ			種特定	注意を要する	●DBの問題で確認が必要な可能性あり。マハゼとアンシロハゼは混って登録されていることがある。系統樹の作成か、アクセッション番号から「環境省同定チェックシート」による確認が必要
205	スズキ目	ハゼ科	ボウスハゼ属	ボウスハゼ			種特定		
206	スズキ目	ハゼ科	アベハゼ属	アベハゼ			種特定		
207	スズキ目	ハゼ科	チチブ属	アカオビシマハゼ			種特定	注意を要する	●DBの問題で確認が必要な可能性あり。アカオビシマハゼとシモフリシマハゼは混って登録されていることがある。系統樹の作成か、アクセッション番号から「環境省同定チェックシート」による確認が必要
208	スズキ目	ハゼ科	チチブ属	シモフリシマハゼ			種特定	注意を要する	●DBの問題で確認が必要な可能性あり。アカオビシマハゼとシモフリシマハゼは混って登録されていることがある。系統樹の作成か、アクセッション番号から「環境省同定チェックシート」による確認が必要
209	スズキ目	ハゼ科	チチブ属	チチブ属	※	※チチブ属：チチブ/マチチブ/ナガノコリ	高次分類群止め		

(4) 参考文献

1. 環境省：MiFish 法に係る誤同定チェックシート，
(https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_anphi_tebiki1.pdf)，2024.
2. 環境省：環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）第1版，
(https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_anphi_tebiki1.pdf)，2024.
3. 一般社団法人環境 DNA 学会：環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.0（2024年8月9日発行），(<https://ednasociety.org/manual/>)，2024.

2.6 ダム湖における環境 DNA 導入方法に関する基礎研究 (株式会社建設技術研究所)

(1) 研究の背景と目的

ダム湖では水深の大きな湖心をはじめ、採捕調査に大きな労力を伴うため、魚類相把握の効率化に環境 DNA 技術は大きく貢献すると考えられる。水国調査のテーマ調査等を通じ、ダム湖では採捕よりも環境 DNA による魚類の検出種数が多くなる傾向が示された一方で、環境 DNA による魚類の検出率は河川に比べ有意に低いことや、ダム毎の流動特性により魚類の検出結果に違いが生じること、検出種数と水深との関係が季節によって変化する可能性などが報告されており、今後の事例の追加や検証等が必要である。

そこで、ダム湖での水国調査に環境 DNA 技術を導入するための基礎資料を得ることを目的として、①ダム湖内での環境 DNA 分析に関する適切な採水量の検討、②採捕調査と環境 DNA 分析の比較分析を行った。

(2) 研究の概要

- ・ 長野県に位置する天竜川水系三峰川の美和ダムを対象とし、水国調査の調査地点である 4 箇所で秋季に計 1 回採水を行った。
- ・ 採水箇所は、湖心部 2 箇所、湖岸部 1 箇所、流入部 1 箇所とし、湖心部のうち 1 箇所では表層・中層（表層から 5m）・底層（表層から 9m）の 3 層、その他の 3 箇所では表層の 1 層で採水を行った。
- ・ 採水量は、各層ごとに 1L、2L、3L の計 3 サンプルとした。
- ・ 採水したサンプルをもとに定量メタバーコーディングにより環境 DNA を分析し、採捕調査と環境 DNA による魚種の検出数、及び採水量や採水層による魚類の検出種数を比較した。
- ・ 本研究により、平均水深が比較的小さく回転率が大きいダムにおいて、採捕と同程度の魚類数を検出することを目的とした場合、採水層は表層、採水量は 1L でよいと考えられた。

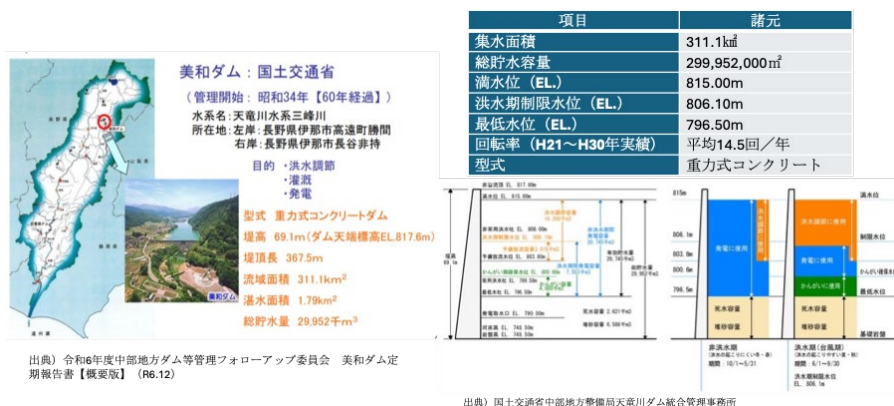


図 2.6-1 調査対象ダムの概要

(3) 研究結果のとりまとめ

- 長野県美和ダムの 4 箇所、採水層・採水量の条件を複数設定し採水を行い、採水による環境 DNA 分析（定量メタバーコーディング）結果と採捕結果から魚類の検出種数やコピー数を比較した。
- その結果、全ての調査地点で採水容量と環境 DNA のコピー数に比例関係がみられた。なお、採水による環境 DNA 分析で検出された魚種は、採捕調査による魚種を包含していた。また、確認種数のみで比較すると、一部を除いて採捕結果より環境 DNA 分析による検出種数が多く、採水量に比例して確認種数も多くなる傾向がみられた。

表 2.6-1 各調査地区にて検出された魚類一覧

調査方法		湖心部①			湖心部②	湖岸部	流入部
		表層	中層5m	底層9m			
環境 DNA ※1	1L	6種 (4種)	3種 (1種)	7種 (4種)	1種 (1種)	8種 (2種)	11種 (8種)
	2L	6種 (4種)	5種 (3種)	5種 (4種)	1種 (1種)	11種 (2種)	11種 (8種)
	3L	8種 (4種)	7種 (3種)	7種 (4種)	2種 (1種)	11種 (3種)	13種 (7種)
採捕※2		4種 (0種)			1種 (0種)	4種 (1種)	9種 (1種)

※1 括弧内の種数は、各環境DNAサンプルで確認された種のうち、採捕でも確認された種数を示す。

※2 括弧内の種数は、採捕で確認された種のうち、環境DNAで確認されなかった種数を示す。

- 採水量 1L による検出種数は、採捕と同程度であった。

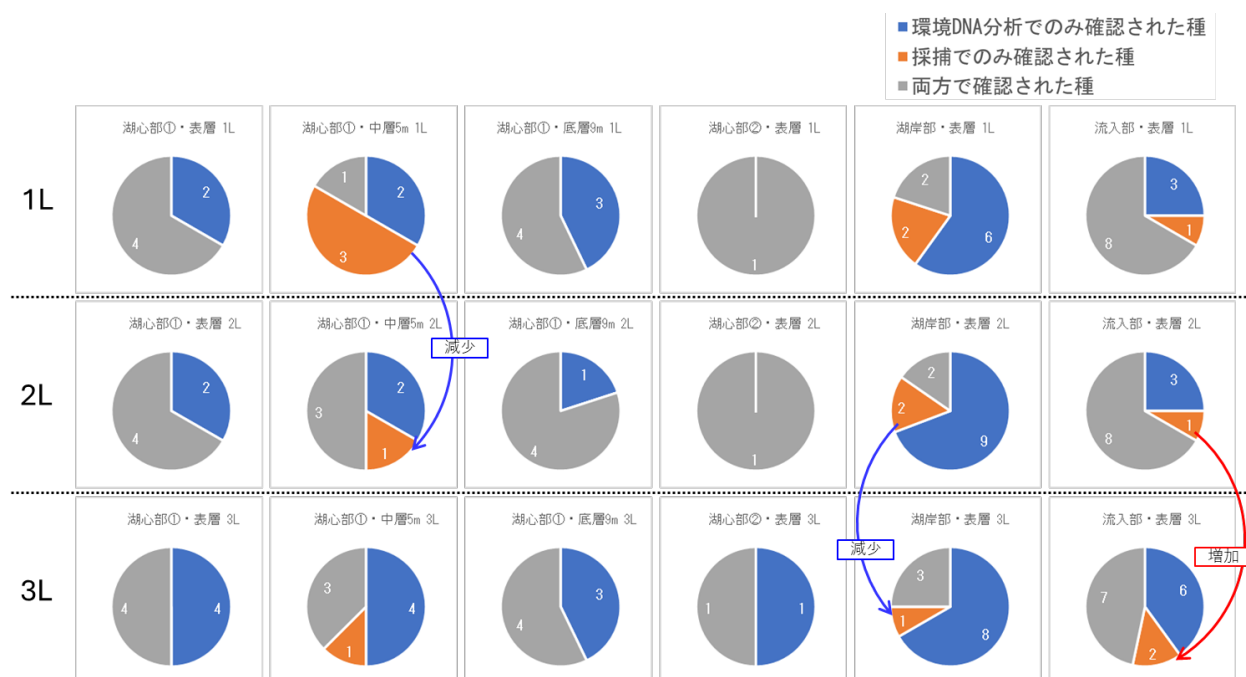


図 2.6-2 採水量と採捕結果の種数比較

- ・ 以上より、水深が比較的小さく、回転率が高いダムで、採水による環境 DNA 分析で採捕と同程度の確認種数を検出することを目的とした場合、採水量は 1L かつ表層の採水でよいと考えられた。

(4) 参考文献

1. Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., & Uchii, K. : An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, 3(1), 8-13, 2021.
2. Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., & Iwasaki, W. : MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088, 2015.
3. Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., & Kondo, A. : A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology* Vol.18, pp.233-241, 2017.
4. Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., & Kondoh, M. Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *BioRxiv*, 113472, 2017.

2.7 環境 DNA を活用した環境情報の高度化

-水国実装に向けた技術体系の構築-（ダム湖版）

（一般財団法人 水源地環境センター）

（1）研究の背景と目的

河川に比べて流れの緩やかな湖沼では、環境 DNA 含有物質の拡散範囲も狭くなると考えられる。特にダム湖では、小型の魚が利用しやすい湖岸帯の植生帯が不連続に分布し、さらに三次元的に流動する湖内の流れの影響も受けると考えられる。そこで、本研究ではダム湖内流動と環境 DNA 含有物質の挙動について現地調査を通じて捉えることを試みた。

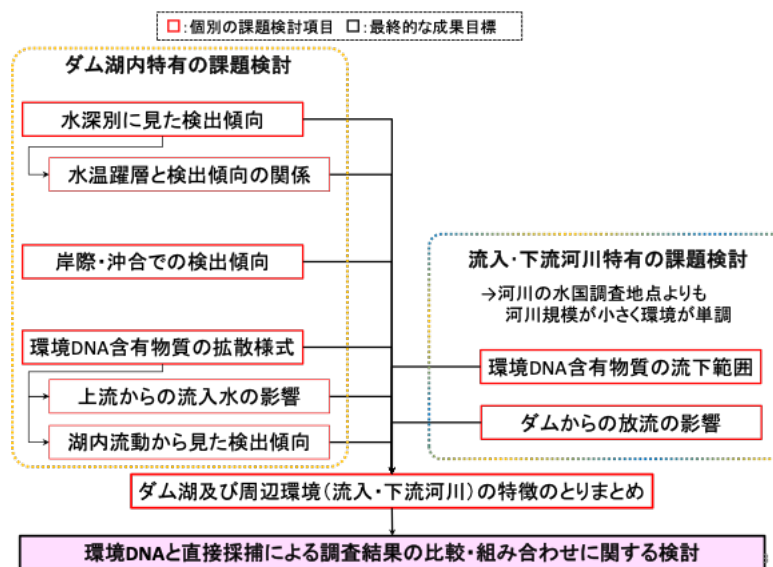


図 2.7-1 環境 DNA 調査の導入に向けたダム湖におけるダム特有の検討課題

（2）研究の概要

本研究では、中筋川ダム、富郷ダム、早明浦ダムにおいて実施した環境 DNA 調査の結果を用い、湖内においては湖内流動や流入河川の関係、下流河川においてはダム放流水の影響の有無を検討した。本調査においては、3 ダム共に流入河川に海水魚をトレーサーとして投入するとともに、湖心・湖岸に設定した複数の地点上の複数の水深で採水を行うことで、流入水の三次元的な挙動を捉えることを試みている。尚、検討にあたっては、R3 の国土交通省からの受託業務成果の提供を受け実施している。

<ダム湖内特有の課題検討>

- ・ 水深別に見た検出傾向

ダム湖表層が最も確認種数が多く、中層下層と水深が深くなるにつれて種数が減少傾向にあった。

- ・ 水温躍層と検出傾向の関係

水温躍層より下層においても環境 DNA の結果では魚類が確認された。しかし水質調査の結果では、DO 濃度が低く魚類の生存は難しいことが考えられ、魚類の生息状況を示した結果ではないと考えられた。

- ・ 岸際・沖合での検出傾向

ダム湖内の横断方向の調査結果の比較では、岸際と沖合では岸際の方が、環境 DNA による確認種数が多い傾向が見られた。この傾向は、ダム湖の流程方向の複数地点においても同様であった。

- ・ 流入水の湖内における流動

海水魚の出現状況から、上流から流入した水は流下しながら水深の深い方向に沈み込んでいることが確認された。本調査は夏期に実施しており、水温の低い上流河川の水は水温の高いダム湖表層の水よりも下層に潜り込む湖内流動を反映したものと考えられる。

< 流入・下流河川特有の課題検討 >

- ・ 環境 DNA 含有物質の流下範囲

ダム下流河川において、ダム湖内からの環境 DNA 物質のダムからの流下を示唆する調査結果が得られた。

- ・ ダムからの放流の影響

下流河川の流下範囲については明瞭な傾向が見られず、今後の課題と考えられる。

(3) 研究結果のとりまとめ

本調査の結果、表層水の地点間比較では湖岸のほうが湖心よりも多くの種を検出し、水深方向では表層水において、表層よりも下層の水深に対して多くの種を検出した。さらに、ダム湖内における環境 DNA 含有物質の拡散様式は、ダム湖水の流動特性と同様の傾向を示すこと明らかとなった。ダム湖内の流動は、ダム湖の諸元や季節、取水等の影響を受けると考えられ、ダム湖ごとの特徴を踏まえた調査地点の選定が重要と考えられた。

3 環境 DNA の活用による環境調査の高度化

3.1 環境 DNA による陸域の生物相把握の可能性検討 (株式会社建設技術研究所)

(1) 研究の背景と目的

環境 DNA による生物相の把握は、水生生物で知見が蓄積されている一方、陸域については事例数が少ない。そこで、陸棲または半水棲の生物相の効率的な把握方法を確立するための知見を蓄積することを目的として、農地環境においてサンプルの取得を行い、環境 DNA 分析を行うこととした。

研究にあたっては、農地環境におけるサンプルの取得及び環境 DNA 分析を通じて、陸域の環境 DNA の効率的な採集方法及び採集素材の検討を行った。なお、サンプルの取得にあたっては、農研機構にご協力・ご助言をいただきながら実施した。

(2) 研究の概要

- ・ 栃木県上三川町の農耕地を対象として、3 区分の環境（農道脇の低茎草地、畔の低茎草地、水路のコンクリート面）でペイントローラーによるサンプル収集、1 区分の環境（農道脇の高茎草地）で塩ビ管によるサンプル収集を各 2 回（夏季、秋季）実施した。
- ・ 夏季調査では採集素材として綿を使用した。秋季調査では、採集素材として綿と粘着テープを使用したほか、昆虫類について比較のため昆虫網を用いて採取し、昆虫網の残滓を対象に環境 DNA 分析を実施した。
- ・ 環境 DNA 分析結果をもとに、環境区分、採集素材での検出数の比較を行った。



図 3.1-1 調査対象地区の概要

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 簡易な材料（ペイントローラー、塩ビ管）による採集で、陸棲生物の DNA が検出された。
- ・ 調査箇所別では、低茎草地（農道脇、畔）、高茎草地（農道脇）と比較してコンクリート面（水路等）での検出数が多い結果となったことから、コンクリートでは DNA が残りやすい、もしくは採集素材との接地面が大きく、採集できる DNA が多い可能性が考えられた。
- ・ 採集素材としては、綿と粘着テープを用いたが、綿の方が粘着テープよりも適していた。
- ・ 哺乳類では農地環境に特徴的な種やペット由来の種、両生類では水田性のカエル類が確認され、本地域に特徴的な種が検出された。両生類では、場ごとに異なる種が検出されたことから、上陸後の生息場を把握できる可能性が考えられた
- ・ 昆虫類では、実際の採集に比べ多くの種が検出されたほか、季節傾向（目ごとの検出数の増減）が把握でき、複数のプライマーを組み合わせることで網羅的に把握可能な可能性が考えられた。また、環境 DNA による分析、既往の農研機構によるセンサス調査、秋季採集時の昆虫網を比較した結果、確認種数は、環境 DNA の検出数が採集と比べて多かった。
- ・ 今後は、更に知見を蓄積することで検証を続けることが望ましい。

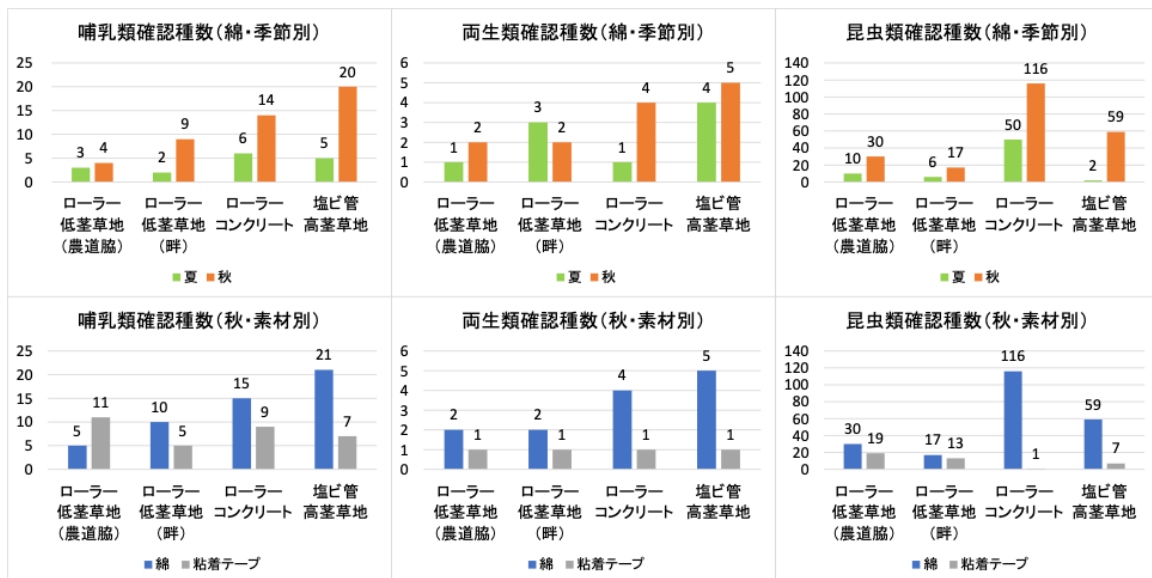


図 3.1-2 哺乳類、両生類、昆虫類の確認状況

(4) 参考文献

1. Yoneya, K., Ushio, M. & Miki, T. :Non-destructive collection and metabarcoding of arthropod environmental DNA remained on a terrestrial plant. Sci Rep 13, 7125, 2023
2. 三木健：野外植物上の動物群集に対する非破壊 eDNA 回収方法,
<https://sites.google.com/view/ecology-method-portal/experiments/eDNA-on-plant>

3.2 大気中からの環境 DNA 採取の試み (応用地質株式会社)

(1) 研究の背景と目的

環境 DNA は水・土・大気中存在し、動植物に関する水・土のサンプリング手法は確立されつつある。一方、大気からのサンプリングはまだ技術が確立されていない。大気中の環境 DNA サンプリング技術の確立は、水・土での検出が不十分だった陸生動物（哺乳類、鳥類、昆虫類等）や植物（花粉）の種の検出精度の向上に寄与することが期待される。

本技術の確立は、ダム、道路、砂防堰堤等の建設事業における調査やモニタリングの高度化・効率化、具体的には種の確認精度向上や調査コストの縮減に寄与する可能性がある。そして、農林など他分野への展開も期待される。そのため、静電気フィルターを用いて、大気からの陸生動物の環境 DNA 採集に取り組んだ。

(2) 研究の概要

- ・ 採集システムの検討（採集機器の検討）では、ポンプ種類、バッテリー等の性能も確認し、野外調査で簡易に運用可能なサンプリングシステムを検討した。
- ・ 採集試験では、製作したシステムを用いて、実際に野外で採集試験を実施し、大気から環境 DNA の採集の可能性を検討した。



図 3.2-1 制作したサンプリングシステムと環境 DNA の採集状況

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 大気中の環境 DNA について、静電気フィルターとポンプを活用した安価な採集システムの構築は可能である。但し、大気からの環境 DNA の採集では、気体の状態方程式、ブラウン運動、気象学などの知識が必要で、正確な流量の測定にも留意が必要である。
- ・ 静電気フィルターを活用した環境 DNA の検出について、真菌類や植物では活用が期待された（事例有）。但し、広い範囲を対象とした動物種の検出は容易ではないと考えられ、地点の周辺の生物の存在量が影響している可能性も考えられる。

表 3.2-1 サンプルングの実施状況

測定年	2022年			2024年	
サンプル	1	2	3	1	2
時 期	8 月	8 月	9 月	11月	11月
時 間	約8時間×3日間 ※3日間のサンプルを、1サンプルとして分析			9 時間	9時間
フィルター	静電気①	静電気②	静電気②	静電気②	静電気②
流 量	約30L/min	約30L/min	約20L/min	約80/Lmin	約80/Lmin
電源	バッテリー	バッテリー	バッテリー	外部電源	外部電源
その他				吸引口の口径大 (吸引速度低)	吸引口の口径小 (吸引速度大)
プライマー					
MiMammal Mi-bird Mtinsects-16S COI	1種	1種	7種	2種	4種
Plant	4種	6種	10種	0種	9種
ITS※種まで特定	62種(128種群)	166種(337種群)	220種(418種群)	—	—

Filter Collection Efficiency：静電気①50% at 0.5 µm, 静電気②More than 95% for > 0.3 µm

- ・ 今回の研究では、大気中からの動物の環境 DNA の採集について、手法の大幅な見直しが必要という結果となった。大気中からの動物の環境 DNA 採集を試みる場合は、現時点では、限られた範囲（例えば動物園）を対象にするなど、適用範囲が限定されると考えられる。
- ・ 一方で、今回の結果を踏まえ、新たな手法の検討を開始している。今後、新たな採集試験に取り組み、活用の可否を検討していきたい

(4) 参考文献

1. Christina Lynggaard et al.:Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring, CurRent biology32, 2022.

3.3 多分類群一斉環境 DNA 分析法の開発と水国調査全項目の環境 DNA 適用に向けた試行 (いであ株式会社)

(1) 研究の背景と目的

例えば、魚類と鳥類では全く調査方法や必要なスキルが異なるように、従来型の生物調査は、対象となる分類群ごとに調査方法が変わる上に、高度な種同定スキルが求められる。

一方で、環境 DNA 調査は、基本的には分類群が変わっても現地調査の方法や種同定のスキームは変わることがなく、標準化が可能である。さらには、1 つの環境 DNA 試料を使って複数の分類群を調査することも可能であり、環境 DNA 分析技術は生物調査の高度化に役立つツールとして期待されている。

そのため、河川流域だけでなく沿岸域までも含めた広範なエリアに生息する多種多様な生物を対象に、それらを包括的に環境 DNA 調査で把握しようとする際の現場適用性や課題を検証することを目的とした。

表 3.3-1 環境 DNA を用いた生物相の把握における課題と研究テーマ

環境調査の目的	環境DNAを活用する際の課題	研究テーマ
生物相の把握	水国調査の全11項目のうち、現時点で網羅的解析が適用できない生物分類群(環形動物・爬虫類)がある。	テーマ① 環形動物及び爬虫類を検出対象とした網羅的解析法の開発
	- 複数の分類群に適用が広がると、分析コストが膨大となる。 - 水国調査の全11項目(ダムは13項目)に対して、現時点で環境DNA調査がどの程度適用可能であるのか、その調査精度等に関する情報がない。	テーマ② 多分類群一斉環境DNA分析法の開発と水国調査全項目の環境DNA適用に向けた試行調査

(2) 研究の概要

〈環形動物及び爬虫類を対象とした網羅的解析手法の開発〉

- 環境 DNA メタバーコーディング（以降、網羅的解析とする）では、魚類特異的に設計された MiFish プライマーに代表されるように、分類群特異的なユニバーサルプライマーが必要不可欠である。しかし、生物調査の対象となる主要な分類群すべてにおいてユニバーサルプライマーが公開されているわけではない。
- そこで、現時点で網羅的解析のためのユニバーサルプライマーが公開されていない分類群のうち、水国調査の項目である「底生動物：環形動物（ゴカイ類・ヒル類・ミミズ類）」と「爬虫類」の2つの分類群を対象に、新たな検出手法の開発を行った。

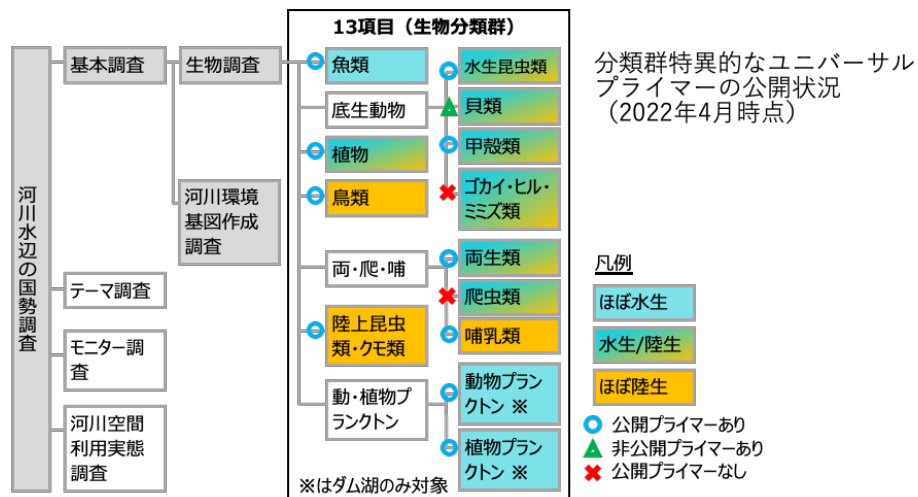


図 3.3-1 ユニバーサルプライマーの公開状況

〈多分類群一斉環境 DNA 分析法の開発と水国調査全項目の環境 DNA 適用に向けた試行調査〉

- ・ 水国調査では、まずは魚類を対象とした環境 DNA 調査の実装が検討されているが、将来的にそれ以外の生物分類群にも適用範囲を広げることができれば、生物調査をさらに高度化できる。しかし、1 つの採水試料から複数の分類群を包括的に検出した研究は、まだごく少数の事例があるだけである。
- ・ 1 つの採水試料から複数の分類群を包括的に検出しようとした場合、1 分類群ごと個別に網羅的解析を行った上で統合することになるが、そうすると 1 試料当たりの分析コストが膨大になってしまう。仮に、1 回の分析で複数の分類群をまとめて一斉に分析できれば、調査の効率化と分析コストの削減につながり、様々な分類群で網羅的解析の適用が進むと期待される。
- ・ そこで、マルチプレックス PCR 法を網羅的解析に応用し、複数の分類群をまとめて 1 回の分析で同時に検出する手法の開発を試み、その検出精度を検証した。
- ・ さらに、水国調査におけるすべての生物調査項目（魚類、底生動物、植物、鳥類、両生類・爬虫類・哺乳類、陸上昆虫類、ダム湖は動・植物プランクトンを追加）を対象に試行的な環境 DNA 調査を実施し、従来調査（採捕調査）の過年度調査結果との比較を行うことで、その現場適用性を分類群別に検証した。

(3) 研究結果のとりまとめ

〈環形動物及び爬虫類を対象とした網羅的解析手法の開発〉

- ・ 「環形動物（ゴカイ類・ヒル類・ミミズ類）」と「爬虫類」の 2 つの分類群を検出対象とした網羅的解析のためのユニバーサルプライマーを開発した。これにより、水国調査における生物調査の対象となっている 11 分類群（ダムは 13 分類群）すべてで、網羅的解析が適用可能となった。

〈多分類群一斉環境 DNA 分析法の開発と水国調査全項目の環境 DNA 適用に向けた試行調査〉

- ・ 将来的に魚類以外の生物分類群にも環境 DNA 調査の適用範囲を広げることを想定し、かつ、調査の効率化と分析コストの削減を考慮した分析方法として、多分類群一斉分析法の開発を試みた。これにより、13 分類群を最小で 4 つのセットに分けて、複数の分類群をまとめて 1 回の分析で同時に検出することが可能であることを示した。
- ・ この多分類群一斉分析法を用いて、国土交通省が直轄管理する河川及びダム湖、さらには沿岸域への適用も検討するために河口干潟においてに採水した試料を環境 DNA 分析し、河川環境データベースに収録されている従来調査（採捕調査）の過年度調査結果に対する検出状況を評価した。
- ・ 検出状況は分類群によってそれぞれ特有の傾向を示し、脊椎動物（魚類・両生類・爬虫類・哺乳類・鳥類）では適用性が比較的高かったものの、無脊椎動物では従来調査に並ぶほどの検出精度ではなかった。
- ・ 水国調査の全項目に対して環境 DNA 調査を適用することに関して、現時点では検出精度に問題がある分類群が残るものの、リファレンスの整備が大きく進めば、水生無脊椎動物への現場適用性がさらに改善されることが期待された。

表 3.3-2 各分類群における現場的陽性と課題

No.	検出対象分類群	現場適用性の判定※1	リファレンス整備率※2	課題
1	魚類	◎	92.3%	さらに偽陰性を減らすには採水方法・頻度・地点の工夫が必要。
2	両生類	○	87.6%	採水する時期に工夫が必要。サンショウウオ類のリファレンス不足。
3	爬虫類	○	55.9%	カメ・ヘビ類には有効だが、トカゲには不向き。リファレンスの不足。
4	哺乳類	○	66.4%	水生哺乳類には有効だが、コウモリ類には不向き。
5	鳥類	○	65.8%	水鳥類には有効だが、水辺に近寄る頻度が少ない種には不向き。
6	陸上昆虫類	×	—	偶発的にしか検出できず、それらも死体や魚類等の糞由来の可能性もある。
7	水生昆虫類	△	—	リファレンスの不足。節足動物はDNA放出量が少ない？
8	甲殻類	△	28.3%	リファレンスの不足。節足動物はDNA放出量が少ない？
9	環形動物	○	13.4%	リファレンスの不足。増幅断片長の長さ(約400bp)が検出に影響？
10	貝類	△	34.1%	リファレンスの不足。増幅断片長の長さ(約400bp)が検出に影響？
11	植物	○	水生植物のみ (68.4%)	水生植物・コケ類には有効だが、陸上植物には不向き。 リファレンスの不足。増幅断片長の長さ(約400bp)が検出に影響？
12	植プラ	△	—	リファレンスの不足。調査間で分類レベルのずれがあり結果の比較が困難。
13	動プラ	△	—	リファレンスの不足。調査間で分類レベルのずれがあり結果の比較が困難。

※1 現場適用性の判定は、現時点におけるものであり、かつ、多分類群一斉分析法を用いた時の評価である。

※2 R6水国調査生物リスト掲載種数に対する国際DNAデータベースにリファレンスが登録されている種数の割合を示した。

(4) 参考文献

1. Miya M, et al. :MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*. 2:150088. 1-33, 2015.
2. Ushio M, Fukuda H, Inoue T, et al. :Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17(6):e63-e75, 2017.
3. Ushio M, Murata K, Sado T, Nishiumi I, Takeshita M, Iwasaki W, Miya M. :Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports*, 8: 4493, 2018.
4. Takenaka M, Yano K, Suzuki T, et al. :Development of novel PCR primer sets for DNA barcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species. *Limnology* 24, 121-136, 2023.
5. Komai T, Gotoh RO, Sado T, Miya M. :Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3: e33835, 2019.
6. Sakata MK, Kawata MU, Kurabayashi A., Kurita T, Nakamura M, Shirako T, Kakehashi R, Nishikawa K, Hossman MY, Nishijima T, Kabamoto J, Miya M, Minamoto T. :Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. *Metabarcoding and Metagenomics* 6: e76534, 2022.
7. Cheng T, et al. :Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 138-149, 2016.
8. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glockner FO. :Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1): e1, 2013.
9. Amaral-Zettler LA, McCliment EA, Ducklow HW, Huse, SM. :A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS ONE*, 4: e6372, 2009.
10. Eastwood N, Kissane S, Campbell L, Briscoe AG, Egeter B, Orsini L. :Single metabarcoding multiplex captures community-level freshwater biodiversity and beyond. *Environmental DNA*, 6(1): e515, 2024.

3.4 環境 DNA を用いた特定外来生物カワヒバリガイの分布調査と環境 DNA 濃度の評価 (株式会社エコー)

(1) 研究の背景と目的

カワヒバリガイは東アジア～東南アジア原産の二枚貝で、導水管などに大量に付着し、通水障害の原因となっている。霞ヶ浦近辺において、分布が 2010 年代に急速に拡大し、農業用水路網などを通じて他水系に拡散している。

これらの拡散を早期に発見する手法として環境 DNA の活用が期待されている。そのため、①環境 DNA 濃度によりカワヒバリガイ生息有無を効率的に把握できるかを検証する、②環境 DNA 濃度によりカワヒバリガイの生息量の推定や、分布偏在水域における侵入抑制要因の推定に活用できるかを検証する、以上の 2 項目を研究目的とする。



図 3.4-1 カワヒバリガイの概要

(2) 研究の概要

- ・ 霞ヶ浦の接続水域 24 地点において、カワヒバリガイの定量 PCR 調査・浮遊幼生の個体数調査・親貝の個体数調査を実施した。地点ごとにカワヒバリガイの生息・繁殖状況と環境 DNA 濃度の関係を検証した。
- ・ カワヒバリガイの分布が少ない高浜入及び恋瀬川にて、カワヒバリガイの定量 PCR 調査・親貝の個体数調査を実施した。環境 DNA 濃度と親貝の調査結果を比較した。



図 3.4-2 環境 DNA 調査、浮遊幼生調査、親貝調査の実施状況

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 親貝や浮遊幼生が見つからなかった地点においてもカワヒバリガイを環境 DNA で検出することができ、環境 DNA を用いることで高い感度でカワヒバリガイの有無を確認できる可能性が示された。

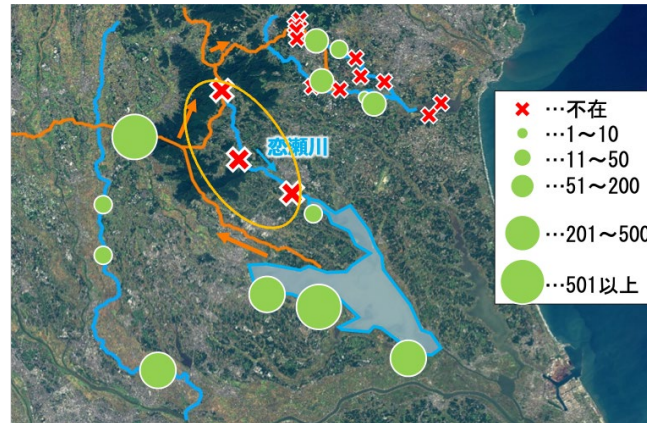


図 3.4-3 環境 DNA におけるカワヒバリガイの検出状況

- ・ 環境 DNA 濃度と個体密度の相関は低く、環境 DNA による開放水域での個体数推定には不向きである可能性が示された。

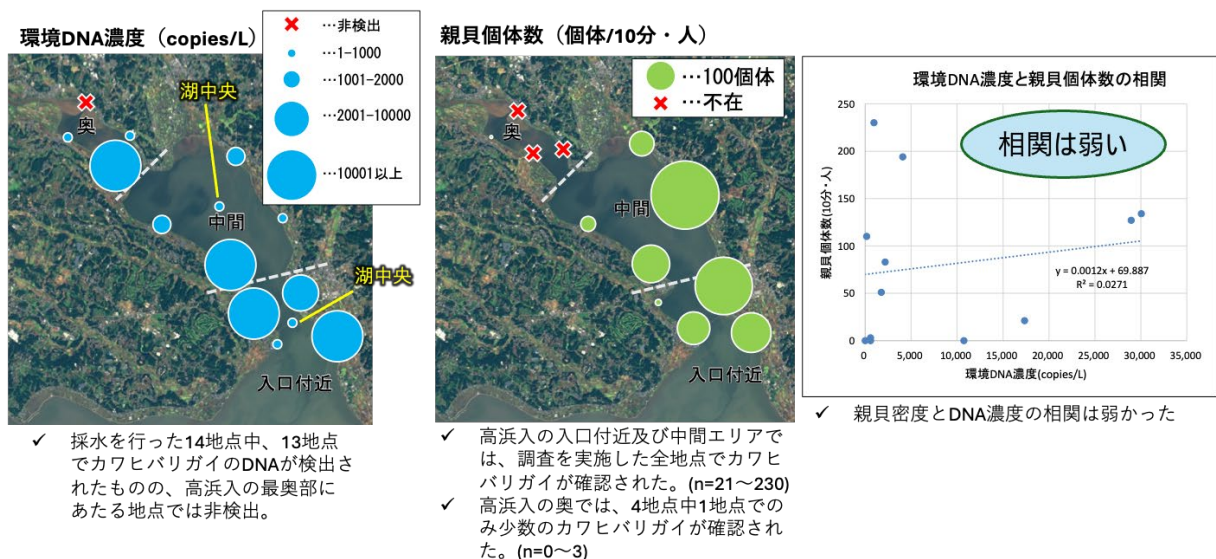


図 3.4-4 環境 DNA 濃度と親貝個体数の関係

- ・ 霞ヶ浦や流入河川でカワヒバリガイの分布が少ない場所を環境 DNA 調査で確認することが出来た。分布が少ない理由を考察することで、カワヒバリガイが侵入した水域での水利用を行っている現場において、被害を抑制できる可能性がある。

(4) 参考文献

1. Kenji Ito, Hiroyuki Shibaike. :Use of environmental DNA to survey the distribution of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* in farm ponds, *Plankton and Benthos Research*, 16(2), pp. 100-108, 2021.
2. 伊藤健二, 瀧本岳: メタ個体群モデルを用いた霞ヶ浦におけるカワヒバリガイの分布拡大予測, *日本ベントス学会誌*, 68, pp. 42-48, 2013.

3.5 環境 DNA 分析を用いたユスリカの把握 (株式会社ウエスコ)

(1) 研究の背景と目的

ユスリカは、水環境の生物指標であり、不快被害（洗濯物への付着、飲食物への混入、野外活動時の妨げ等）の要因のひとつである。ユスリカは、幼虫の時点では種の同定が困難であることや、同定・計数に係るコストが河川環境の保全効果（底質環境の改善等）を検証する上で課題となっている。そこで、ユスリカの動態把握に着目し、経年的なモニタリングにおける環境 DNA 解析の有用性を検証することを目的とした。着眼点は以下の通りである。

- ・ 深い砂泥河床である河口堰湛水域において、採水のみでユスリカの生息状況が取得できるか
- ・ DNA 分析を用い、幼虫の時点でユスリカの同定ができるか
- ・ 幼虫の現存量と DNA 分析結果に相関性がみられるか

(2) 研究の概要

- ・ 芦田川河口堰（広島県福山市）により形成されている湛水域の 2 地点を対象に、採水と環境 DNA 分析、定量採集と検鏡、群集 DNA 分析を行った。
- ・ ユスリカ幼虫の検鏡による同定結果と環境 DNA 分析、群集 DNA 分析の結果比較により、DNA 分析の有効性について考察を行った。
- ・ また、ユスリカ幼虫の検鏡で得られた個体数と群集 DNA 分析で得られた配列数の相関性を確認し、幼虫の現存量把握における DNA 分析の有効性を確認した。

環境DNA分析を用いたユスリカの把握

- ・ 対象範囲：芦田川河口堰湛水域
- ・ 調査対象地点：2地点（St.1, St.3）
- ・ 調査方法
 - 環境DNA分析による確認
 - 採水日（時期、採水層、時間帯、最水量）
 - 夏季：2022年 7月25日、表層、夜（20時頃）、2L
 - ：2022年 7月26日、表層、朝（7時頃）、2L
 - 冬季：2023年 1月 5日、表層および底層、昼間
 - 検鏡と群集DNA分析による確認
 - 定量採集（時期、採集面積）
 - 冬季：2023年 1月 5日、0.0675m²（15×15cm、3回）

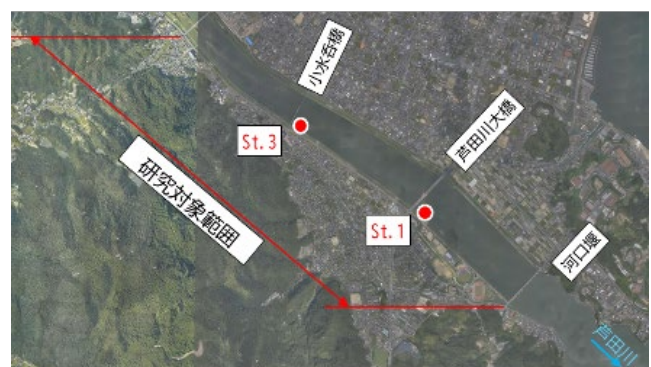


図 3.5-1 ユスリカ調査の概要

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 芦田川河口堰湛水域における環境 DNA 分析、定量採集と検鏡、群集 DNA 分析の比較により、ユスリカ幼虫の把握における DNA 分析の有効性を確認した。
- ・ 採水サンプルの環境 DNA 分析では、ユスリカ幼虫の把握には不十分であった。
- ・ 検鏡と群集 DNA 分析結果の比較により、定量採集のサンプルにおける群集 DNA 分析は、種の同定の効率化や現存量の把握に有効であることが示唆された。

表 3.5-1 検鏡および DNA 分析結果の比較

No.	亜科	検鏡による同定種		個体数		群集DNA分析による同定種		配列数		
		和名	学名	St.1	St.3	和名	学名	St.1	St.3	
1	モンユスリカ亜科	カユスリカ属	<i>Procladius</i> sp.	9	48	ウスイロカユスリカ	<i>Procladius choreus</i>	277	11653	
2	ヤマユスリカ亜科	トゲヤマユスリカ属	<i>Monodiamesa</i> sp.	1		シブタニオオヤマユスリカ	<i>Monodiamesa bathyphila</i>	126		
3	エリユスリカ亜科	アカムシユスリカ	<i>Prosilocerus akamusi</i>	67	5	アカムシユスリカ	<i>Prosilocerus akamusi</i>	1770	488	
4	ユスリカ亜科	クロユスリカ	<i>Benthalia dissidens</i>	271	17	クロユスリカ	<i>Benthalia dissidens</i>	32412	8468	
5		オオユスリカ	<i>Chironomus plumosus</i>	1		オオユスリカ	<i>Chironomus plumosus</i>	6919		
-		ユスリカ属	<i>Chironomus</i> sp.		1					
6						● イシガキユスリカ	<i>Gledopelma edwardsi</i>		127	
7		エダゲヒゲユスリカ属	<i>Gledotanytarsus</i> sp.		101	ムナグロエダゲヒゲユスリカ	<i>Gledotanytarsus vanderwulpi</i>		8294	
8		カマガタユスリカ属	<i>Cryptochironomus</i> sp.		1				■	
9		オオミドリユスリカ属	<i>Lipiniella</i> sp.	1					■	
10		コガタユスリカ属	<i>Microchironomus</i> sp.	29		ヒメコガタユスリカ	<i>Microchironomus tener</i>	379	1596	
11		ハモンユスリカ属	<i>Polypedilum</i> sp.	1		● ハマダラハモンユスリカ	<i>Polypedilum masudai</i>	4	27	
12		ムナコブヒゲユスリカ属	<i>Stempellina</i> sp.		13				■	
13		アシマダラユスリカ属	<i>Stictochironomus</i> sp.		99				■	
-		ヒゲユスリカ属	<i>Tanytarsus</i> sp.	259	67	オナガヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus takahashii</i>		675	
14						ウナギケヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus unagisoptinus</i>	26	217	
15						コニシヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus konishii</i>	2160	1337	
合計		個体数		639	352	配列数		44073	32882	
		種数		9	9	種数		7	8	

調査実施日：2023年1月5日 採取面積：0.0675m² ●:DNAのみ確認、■:検鏡のみ確認

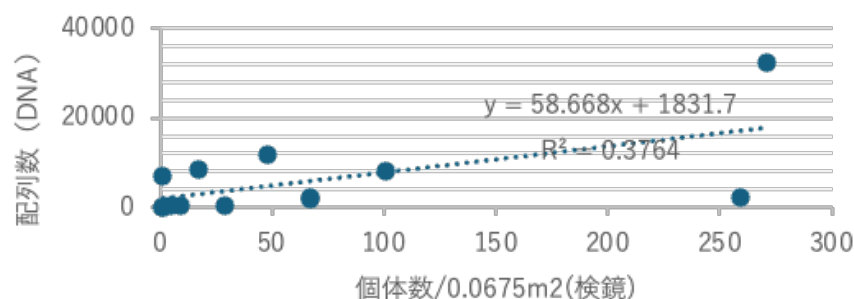


図 3.5-2 DNA 配列数と検鏡による確認数の比較

- ・ 課題として、検鏡による確認種が群集 DNA 分析により未検出の場合があることが挙げられる。
- ・ 今後、検体数を増やすことにより、現存量と配列数の関連性について、精度を高めることが望まれる。

3.6 両生類の生息状況の把握に向けた取り組み (大成建設株式会社)

(1) 研究の背景と目的

両生類の生息状況調査の高度化を目指し、環境 DNA 分析による高頻度調査を検討した。高頻度調査は、生息状況を連続的に把握し、自然再生や卵塊の移設後の経過観察や、生息環境の異変への対応に活用が期待できる。両生類の環境 DNA 調査では、生活史（主な生息場所が水域から陸域に変わる時期）と環境 DNA の有無に関係が得られている。

両生類の調査における環境 DNA 分析の課題として、環境 DNA の検出傾向や分解傾向を把握し、両生類の現地調査での試料採取方法や分析手法を確立することが挙げられる。課題解決のために、現地調査の調査地で採取した水（以降、「現地水」）と蒸留水における両生類の環境 DNA の分解状況を水槽試験により把握すると共に、現地調査を実施して採水地点や時間帯における生物種別の環境 DNA の検出傾向を調査した。

(2) 研究の概要

- ・ 環境 DNA の水中での分解状況を把握するため、水槽実験を実施した。現地水を混合した飼育水では生体取り出し後の環境 DNA の残存期間が短かった一方で、蒸留水を混合した飼育水では、生体取り出し後の環境 DNA の残存期間が長くなることを確認できた。
- ・ 現地調査として、5m 間隔で区切ったため池内の採水地点で採取した試料では、生息数が多い生物種は概ねどの地点においても環境 DNA を検出できた。一方、生息数が少ない生物種については検出の有無のばらつきが大きかったことから、採水地点を複数設置するなど調査方法について考慮することが重要となる。

水槽実験による環境DNAの分解特性の把握

- ・ 対象種：アカガエル類 幼生（5匹、25匹）
ヤマアカガエル 成体（2匹、10匹）
- ・ 採水：10分、30分、2時間、4時間、24時間後
- ・ 分解確認：24時間後、48時間後



現地調査による環境DNAの検出特性の把握

- ・ 対象種：カエル類
サンショウウオ科
アカハライモリ
- ・ 調査：6月、8月
- ・ 目視：5分間（岸から）
- ・ 採捕：タモ網
- ・ 採水：1L

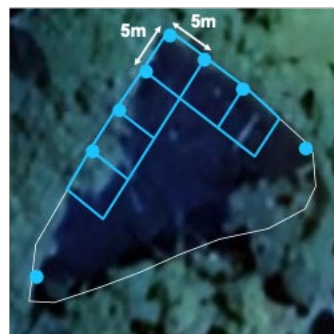


図 3.6-1 両生類調査の概要

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 水槽実験の結果、生体と水との接触時間が 10 分程度でも、環境 DNA が検出され、短時間でも表皮、粘液等の生物組織片が水中に放出されている可能性を確認した。
- ・ 蒸留水のみ条件では環境 DNA は数日経過後も検出でき、現地水と混合した条件では環境 DNA が短時間で検出されにくくなった。
- ・ 環境 DNA は、実環境で現地の微生物等により速やかに分解されていると推察された。したがって、分解状況を考慮した採水方法や採水計画を立案することが重要となる。

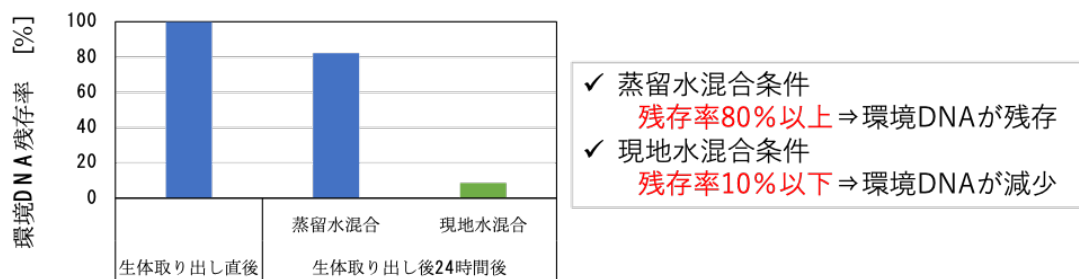


図 3.6-2 DNA の残存量の比較

- ・ 現地調査において、生息数が多い生物種の場合、5m 間隔で採水地点設定した場合にどの地点で採取しても環境 DNA を検出でき、生息の有無を概ね把握できることを確認した。

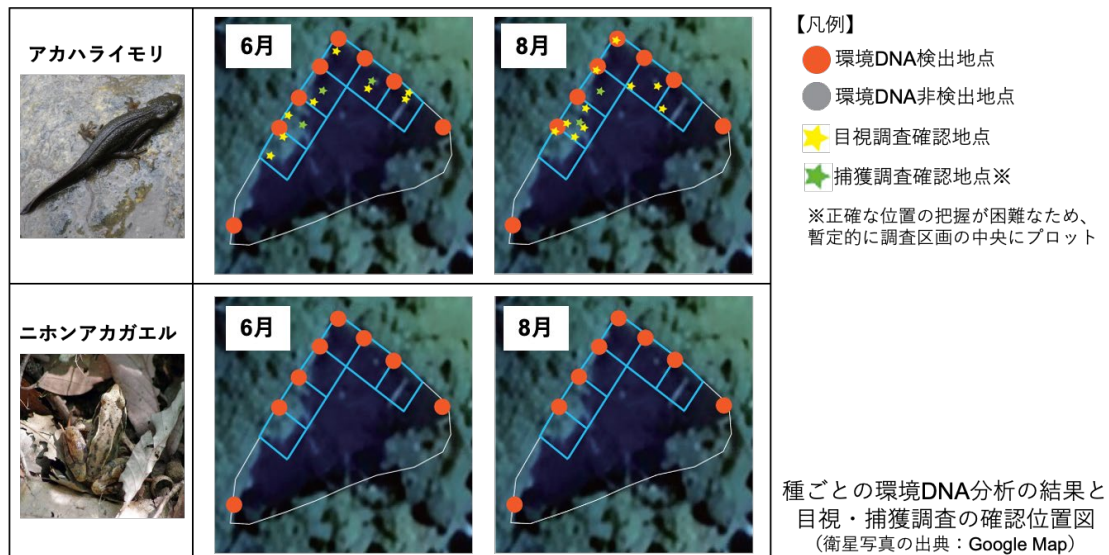


図 3.6-3 アカハライモリ、ニホンアカガエルの確認状況

- ・ 一方、生息数が少ない生物種の場合、環境 DNA と目視・捕獲調査の結果に一定の傾向が得られなかった。環境 DNA の検出率を高めるために採水地点を複数設置するなど試料の採取方法の検討が必要である。

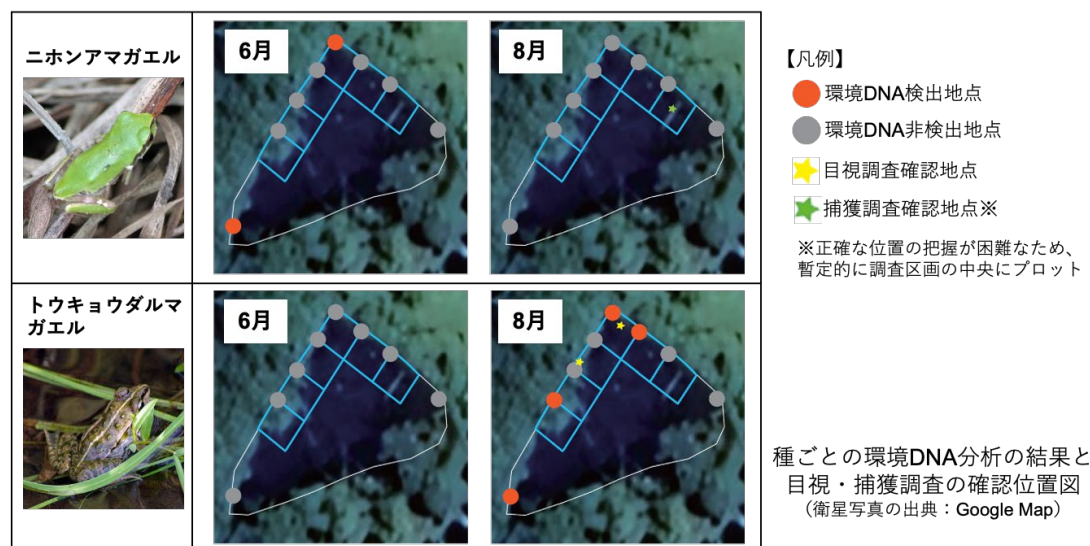


図 3.6-4 ニホンアマガエル、トウキョウダルマガエルの確認状況

- ・ 今後も、両生類の生息調査における環境 DNA の活用に向けて、模擬的な環境下や現地調査での環境 DNA の分析結果を積み重ねていく必要がある。

(4) 参考文献

1. Sakata, M., Kawata, M., Kurabayashi, A., Kurita, T., Nakamura, M., Shirako, T., Kakehashi, R., Nishikawa, K., Hossman, M., Nishijima, T., Kabamoto, J., Miya, M. and Minamoto, T.: Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia, *Metabarcoding and Metagenomics*, Volume 6, pp. 15-26, 2022.
2. Sakai, Y., Kusakabe, A., Tsuchida, K., Tsuzuku, Y., Okada, S., Kitamura, T., Tomita, S., Mukai, T., Tagami, M., Takagi, M., Yaoi, Y. and Minamoto, T.: Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis, *Environmental DNA*, Volume 1, Issue3, pp. 281-289, 2019.
3. 赤塚真依子, 大井涼太郎, 渡邊千佳子, 内池智広: 環境 DNA 調査における両生類の DNA 分解特性, 土木学会全国大会第 78 回年次学術講演会, VII-49, pp. 1-2, 2023.
4. 大井涼太郎, 赤塚真依子, 渡邊千佳子, 内池智広, 須田真一, 佐藤良平: 同一ため池内の異なる採水地点における両生類の環境 DNA の検出傾向について, 土木学会全国大会第 79 回年次学術講演会, VII-82, pp. 1-2, 2024.
5. 赤塚真依子, 大井涼太郎, 渡邊千佳子, 内池智広, 須田真一, 佐藤良平: ため池における環境 DNA の検出種数の時間変化と設置型採取容器の検討について, 土木学会全国大会第 79 回年次学術講演会, VII-83, pp. 1-2, 2024.

3.7 環境 DNA データを用いた流域における魚類のポテンシャルマップ作成 (株式会社建設環境研究所)

(1) 研究の背景と目的

河川行政においては、「流域治水」に関連する法律が施行され、流域単位での環境情報が今後重要となる。例えば、流域内での魚類の分布は環境管理上重要な情報となる。しかし、直轄河川における魚類の分布情報は、水国調査の調査地点（直轄管理区間の数地点）の情報が主なものとなる。これでは流域全域をカバー出来ない。

環境 DNA 分析の、従来の捕獲調査と比較したときの特徴として、1 地点あたりの調査コストが「低コスト」であることが挙げられる。すなわち、環境 DNA 分析は、従来調査と比較して低コストであるため、同じコストでも多地点での調査データ取得が可能である。

そこで、多くの調査地点でデータを収集可能であり、直轄管理区間だけでなく、流域内のより広い範囲でのデータ収集も可能である環境 DNA を用いた流域内での魚類の分布の把握手法について検討した。

(2) 研究の概要

- ・ 筑後川水系を対象として、88 地点における環境 DNA メタバーコーディング（ユニバーサルプライマーMiFish）調査結果を用いて水系における魚類の生息状況を概括的に把握した。
- ・ 標高や河床勾配、地質条件など魚類の生息分布に影響を及ぼす可能性のある河川的环境条件（15 要素）を河川縦断方向に 200m ピッチで整理した。
- ・ 筑後川水系で確認された魚類（75 種）を対象として各環境条件における在不在情報をもとに一般化線形モデル及び Maxent を用いて生息適地モデルを構築した。
- ・ 種毎に、生息適地モデルを環境データに適用し、流域各区分（200m 区分）におけるその種の出現可能性をマップ化し、ポテンシャルマップを作成した。

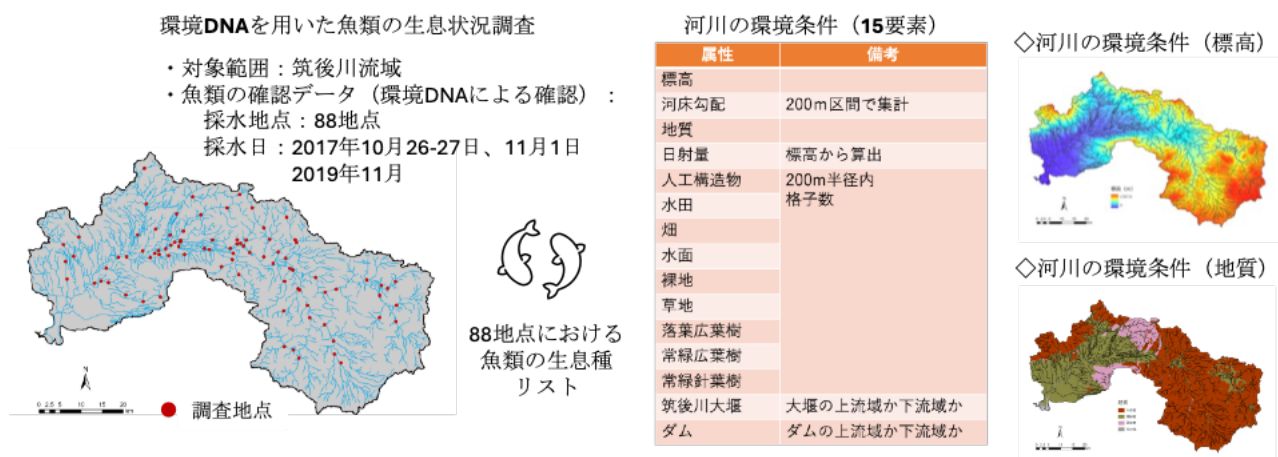


図 3.7-1 調査地区概要と使用した河川的环境条件一覧

(3) 研究結果のとりまとめ

- ・ 筑後川水系における環境 DNA 調査結果と関連する環境データセットをもとに、確認された魚類 75 種の生物生息適地モデルを構築した。
- ・ 種毎のモデルの予測結果は、GLM と Maxent で多くの種で同様の傾向を示した。一方で確認地点が多い種（88 地点中 75 地点以上で確認された 9 種）で GLM は流域全域で高いポテンシャルを示す結果を示し、Maxent は採水地点より上流側では低いポテンシャルを示した。
- ・ 今後の課題は、各種のモデルで採用された説明変数とその種の生態特性との関連について確認し、モデルの妥当性について検討する必要がある。

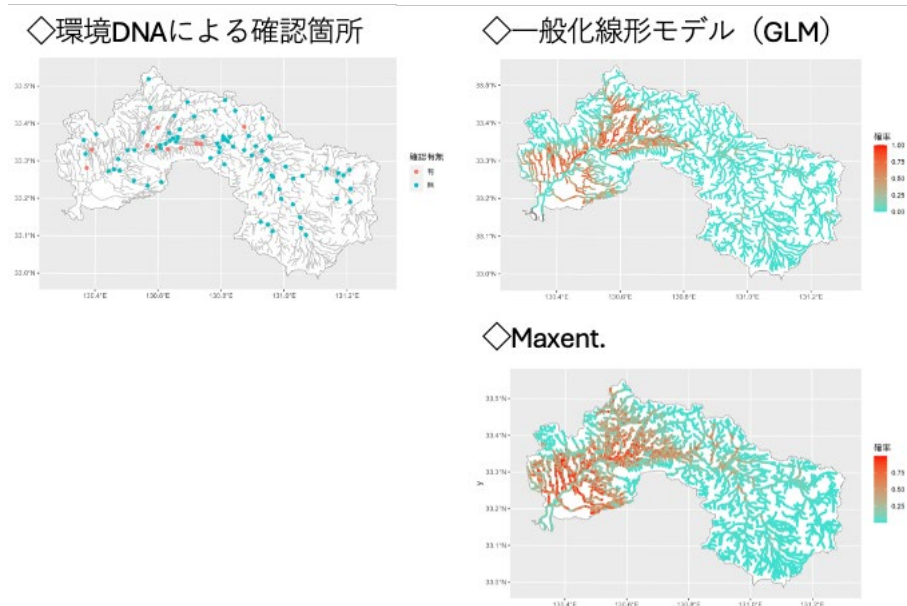


図 3.7-2 確認された魚種毎の生息適地モデル（コイ科ヌマムツ）

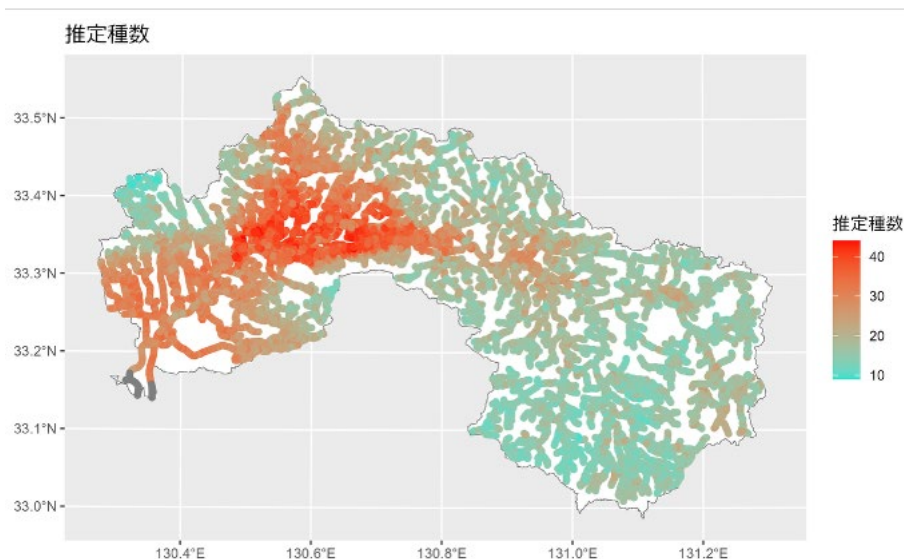


図 3.7-3 算出された魚類の推定種数

(4) 参考文献

1. Guisan, A., W. Thuiller, and N. E., Zimmermann : Habitat suitability and distribution models. Cambridge university press, 2017
2. Ishiyama, N., M. Ryo, T. Kataoka, S. Nagayama, M. Sueyoshi, A. Terui, T. Mori, T. Akasaka, and F. Nakamura: Predicting the ecological impacts of large-dam removals on a river network based on habitat-network structure and flow regimes. Conservation Biology, Volume 32, 2018
3. 遠山貴之, 鬼倉徳雄, 光益慎也, 齋藤康宏 : 一級水系流域における魚類分布予測モデルの構築と多自然川づくり支援システムの開発, 河川技術論文集 25 巻, 2019

4 おわりに

環境 DNA 技術は、従来の生物調査に比べて簡易に調査結果を得られ、生物情報の高度化や調査期間の短縮、現地調査の省力化などが期待されている技術であり、国土交通省の実施する水国調査への導入に向けた検討が進められているなど、今後河川行政のさまざまな場面での活用が期待されている技術である。

本研究では、環境 DNA を活用した環境情報の高度化を目指し、土木研究所、国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所 港湾空港技術研究所、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 及び 土木研究所の実施した公募によって参画した民間事業者 11 社が共同で、「環境 DNA の水国調査等への実装に向けた技術体系の構築」と「環境 DNA の活用による環境調査の高度化」の 2 つの研究項目に対して、水国調査マニュアル改定を想定した調査技術の標準化と高度化、環境 DNA 技術の高度化に関する技術的検討を行った。

本研究の成果は、今後一層拡大していくと想定される河川分野における環境 DNA 技術実装の基礎的知見になるものであり、これらの知見をもとにした環境 DNA 技術の現場実装が進んでいくことで、全国の河川で環境 DNA を活用した環境情報の高度化が図られ、河川法の目的である河川環境の整備と保全の取り組みの推進につながっていくことを期待したい。

5 巻末資料

共同研究報告会にて使用された資料については、巻末資料として整理した。