



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

パッシブサンプリング法による 環境DNA調査（魚類）の試行結果について

公益財団法人リバーフロント研究所

日本工営株式会社



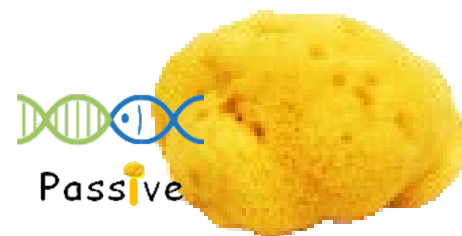
1. 研究の目的と背景

2. 実証調査

2-1 砂礫河川での事例（庄川）

2-2 泥干潟での事例（白川・緑川）

3. 課題と活用の方向性



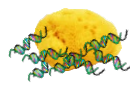
1. 研究の背景と目的

～課題と解決の方向性～



- ✓ 河川等における魚類を対象とした環境DNAのサンプリング方法は水1Lを採水することが主流であるが、直接で確認された種の一部がMB解析で検出されない、環境の時間変化が大きい感潮域において検出率が低下するといった課題¹⁾が明らかとなっている。これは採水によるサンプリングが、採水時の瞬間値の取得となることが原因のひとつと考えられる。
- ✓ これらの課題の解決策として、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」。）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)するだけであるため、①時間累積的な生物情報を得られる可能性が高いこと、②簡易的かつ省力的であること、があげられる。
- ✓ 本研究は、PS法を用いることで、採水時間以外で活動が活発化する種（夜行性の種等）の検出効率、及び採水方法で検出率が低い感潮域での検出率の向上につながる可能性を示し水国実装に資することを目的とした。

PS法 (時間積算値を取得)



一定時間流れてきたDNAを
トラップ



各種に特異的な
DNA断片が存在

採水法 (瞬間値を取得)



水を1L採水



各種に特異的な
DNA断片が存在

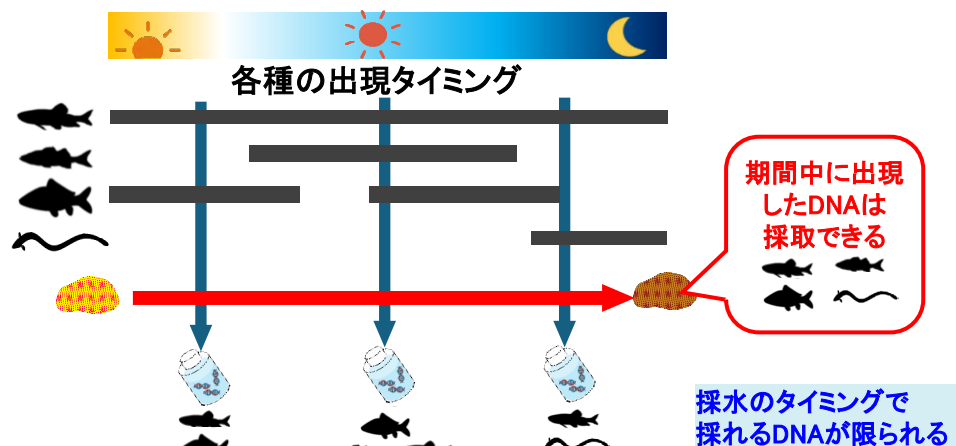


図1-1 PS法と採水法の違い

1. 研究の背景と目的 ～今回使用した技術～



- ✓ 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)²⁾や活性炭、粘土³⁾、カルシウム化合物⁴⁾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。
- ✓ 本研究では、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。



2. 実証調査

2-1 砂礫河川での事例(庄川)



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

- ✓ 調査は秋季（令和4年10月19～21日）に実施した。
- ✓ 調査対象範囲は庄川の直轄管理区間（河口～ダム直下）とした。
- ✓ 環境DNA調査として採水とパッシブサンプリングツールの設置・回収（一昼夜）を実施した。
- ✓ 試料はDNA抽出後に、MiFish法にて分析した。
- ✓ 調査地区の流水部下流端の左右岸1～2地点ずつの結果を整理した。
- ✓ 比較データには、河川水辺の国勢調査（魚類）の令和4年度秋季調査結果や過去データ（計6回）を利用した（北陸地方整備局 富山河川国道事務所よりデータを借用）。

■庄川において利用したPSツール



PSツールの設置状況



PSツールの設置状況



海綿の回収作業状況



今回は、1gにカットした海綿を1地点につき4個ずつカゴ等に入れ設置した。



PSツールの設置状況



採水の実施状況

2. 実証調査

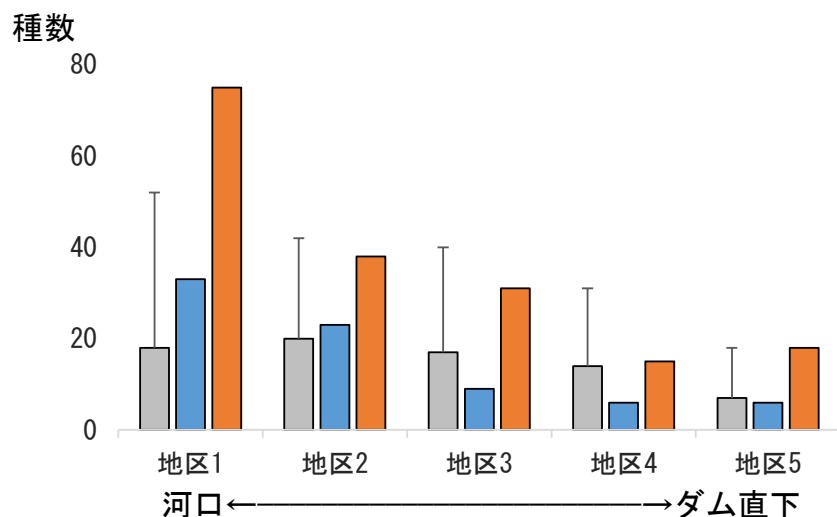
2-1 砂礫河川での事例(庄川)



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

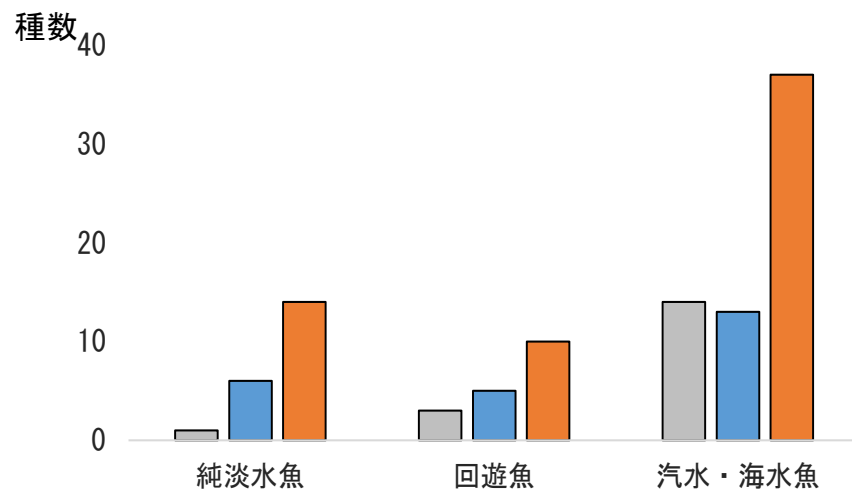
研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

- ✓ 地区別の環境DNAでの確認結果を、河川水辺の国勢調査結果と比較した。地区1～5のすべてでPS法の確認種数が採捕、採水法を上回った。
- ✓ P S法で検出されなかった種はオオクチバス、ブルーギルやカムルチー等、止水域や緩流の生息種が含まれており、ワンド等他で実施したP S法の結果を加えることで概ねカバーされることも確認している。



T 採捕 (全6回の合計)
 採捕 (令和4年度)
 採水
 パッシブサンプリング (PS法)

図2-1-1 地区別の確認種数



採捕 (令和4年度)
 採水
 パッシブサンプリング (PS法)

(地区1：河口部)

図2-1-2 調査方法別・生活型別の確認種数

2. 実証調査

2-1 砂礫河川での事例(庄川)



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

- ✓ 夜行性及び重要種（環境省RL及び富山県RLに該当する種）について、調査方法別での確認種数を整理ところ、PS法で良好な結果が得られた。
- ✓ ニホンウナギ等の採捕で確認確率が低い種についても良好な検出結果であった。

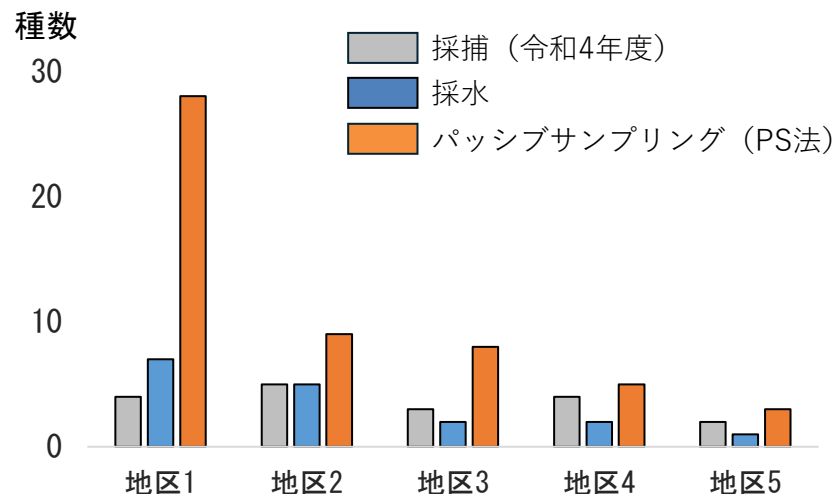


図2-1-3 夜行性種の地区別・調査方法別の確認種数

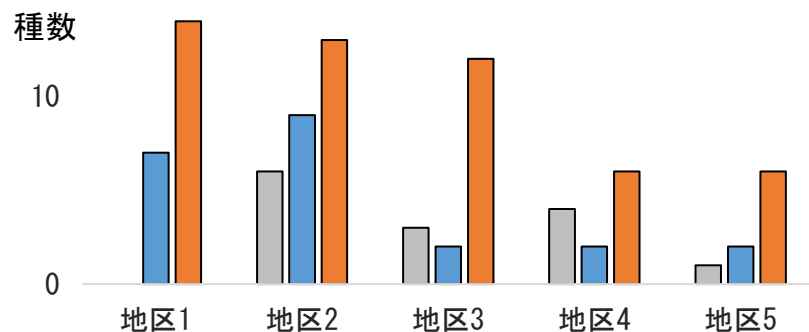


図2-1-4 重要種の地区別・調査方法別の確認種数

表2-1-1 ニホンウナギの確認状況

調査方法		地区1	地区2	地区3	地区4	地区5
河川水辺の 国勢調査 (採捕)	1997					
	2002	●				
	2007			●		
	2012					●
	2017			●		
	2022					
採水法						
パッシブサンプリング法		●	●	●	●	●

PS法で、採捕と比較しても十分、採水法とも差別化できる時間累積的な成果を得ることができた。

2. 実証調査

2-2 泥干潟での事例(白川・緑川)



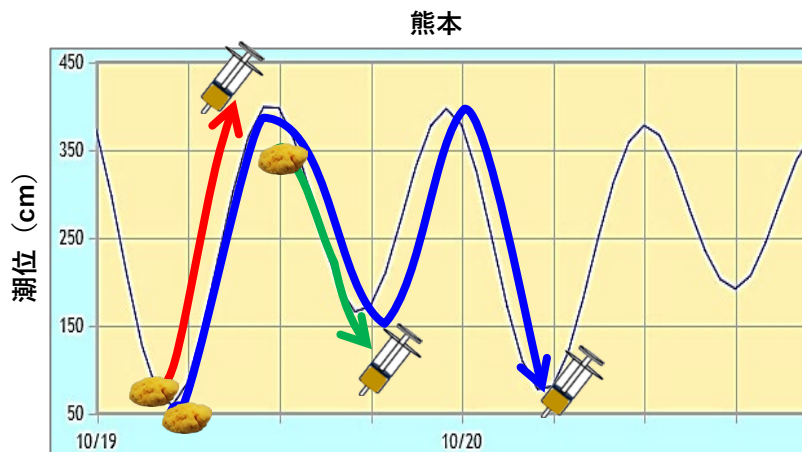
環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

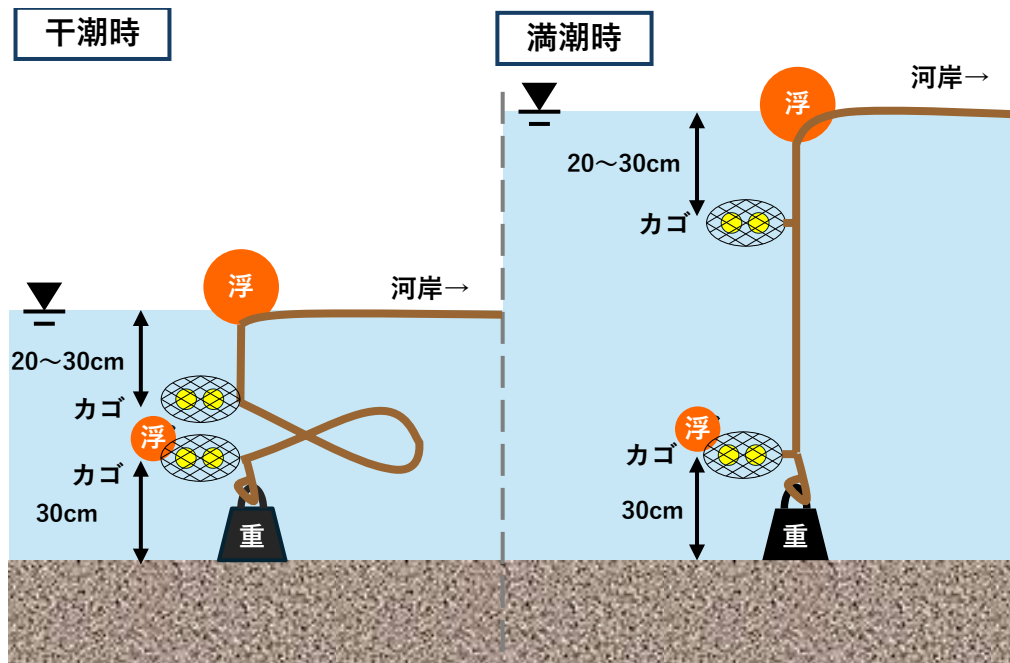
- ✓ 調査は令和5年夏季（7月18～20日、27～28日）秋季（10月19～20日）に実施した。
- ✓ 調査対象範囲は白川・緑川の直轄管理区間とした。
- ✓ 環境DNA調査としてパッシブサンプリングツールを一昼夜設置・回収を実施した。河口域では一昼夜(上層)、一昼夜(下層)、上げ潮、下げ潮の4パターンを試行した。一部、検証用に採水も実施した。
- ✓ 試料はDNA抽出後に、MiFish法にて分析した。
- ✓ 基本的に流水部の左右岸で実施した1～2地点のサンプルを採用した。
- ✓ 比較データとして、河川水辺の国勢調査（魚類）の令和5年度夏季、秋季調査結果を利用した。（九州地方整備局 熊本河川国道事務所よりデータを借用）

■河口域の潮汐に合わせたサンプリング時間

■一昼夜	⇒ 約24時間
■下げ潮	⇒ 約4時間（日中）
■上げ潮	⇒ 約4時間（日中）



■河口域の潮汐に対応した海綿設置方法



2. 実証調査

2-2 泥干潟での事例(白川・緑川)

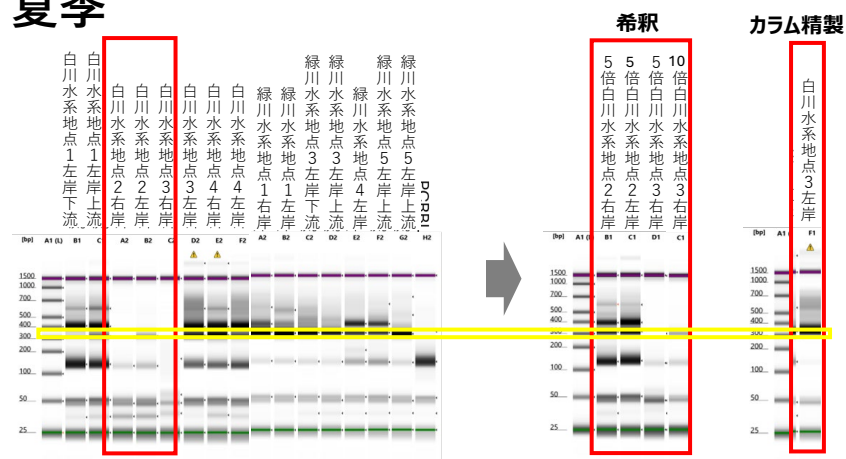


環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

- ✓ 泥干潟や河口部では、著しいPCR阻害を起こすサンプルがみられた。
- ✓ PCR阻害対策としては、カラム精製 (Qiagen : Dneasy PowerClean Pro Cleanup kit) により1stPCR状況の改善がみられた。
- ✓ 希釈では、5倍希釈、10倍希釈でも十分な増幅がみられないサンプルがあった。

夏季



- ✓ カラム精製と希釈による検出状況を比較すると、サンプルのDNA濃度が薄いためかサンプルごとにばらつきが大きくなった。

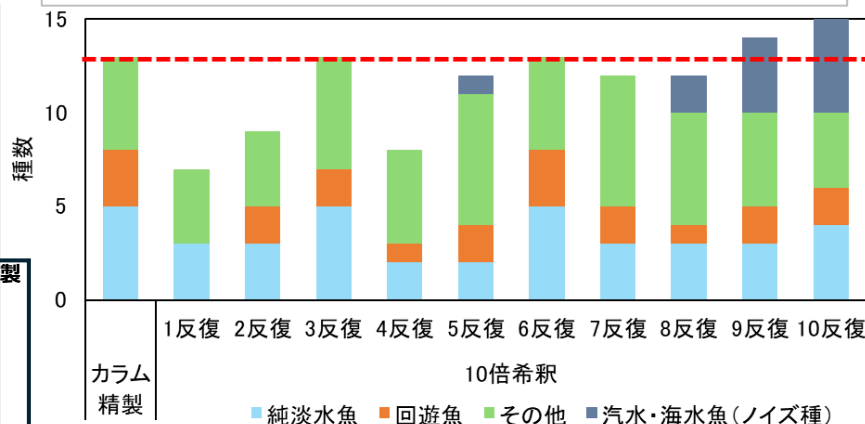


図2-2-2 阻害対策による確認種数の比較

秋季

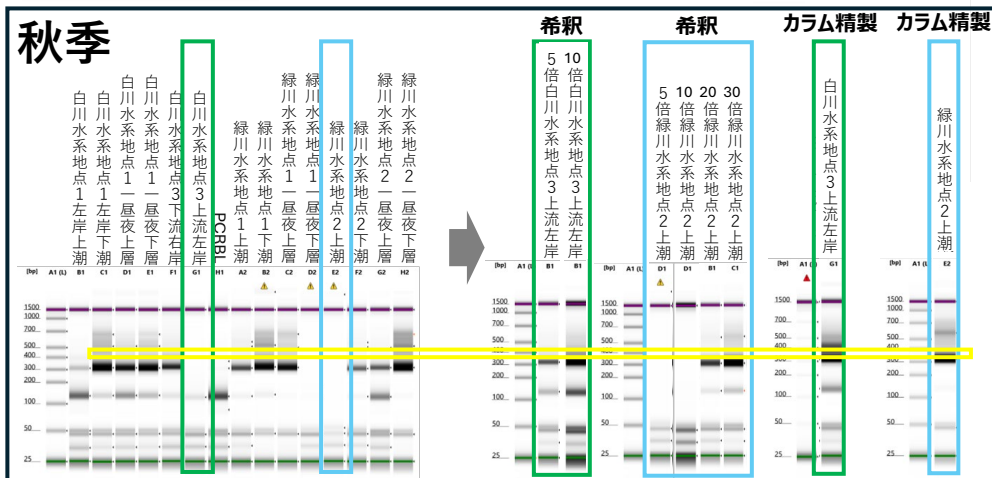


図2-2-1 電気泳動結果 (1stPCR産物)

PCR阻害対策としては、希釈よりカラム精製の方が手戻りの可能性もなく、結果もばらつきが小さくなる可能性が高い。

2. 実証調査

2-2 泥干潟での事例(白川・緑川)



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

- ✓ 河口部等の下流域では、採捕調査より環境DNA調査の方が多くの種数を確認できた。
- ✓ 最も多くの種を確認したのは緑川、白川ともにPS法(図中★)であったが、上げ潮、下げ潮で確認種数の差が顕著であった。
- ✓ 特に、白川においては下げ潮時のみ多くの種を確認できたが、一昼夜や上げ潮時の種数は採捕を下回った。
- ✓ 回収時のサンプルの状況から、上げ潮時等の濁りによる目詰まりの影響が大きいことが考えられた。

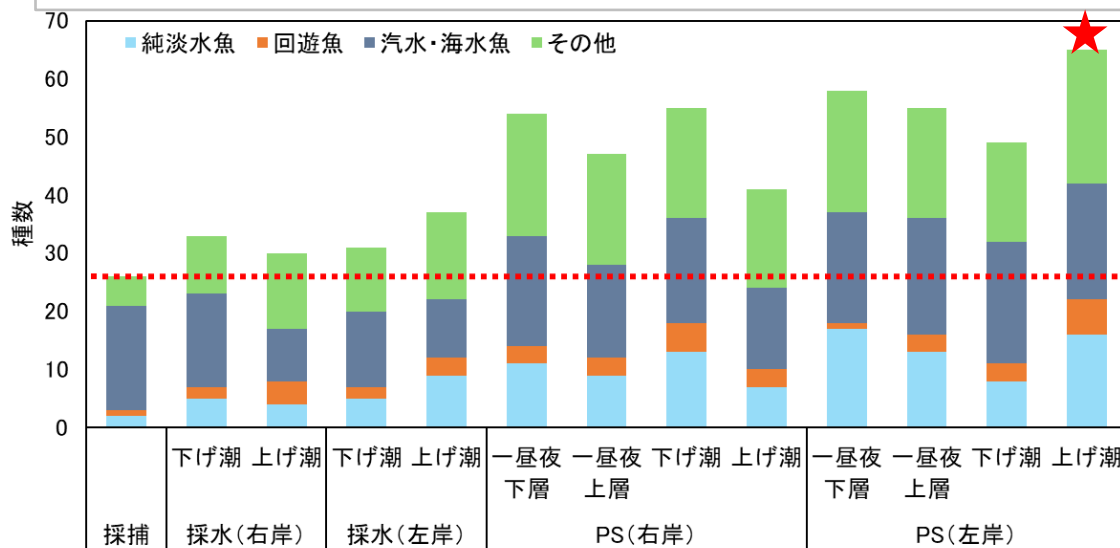


R5夏季：白川



R4秋季：庄川

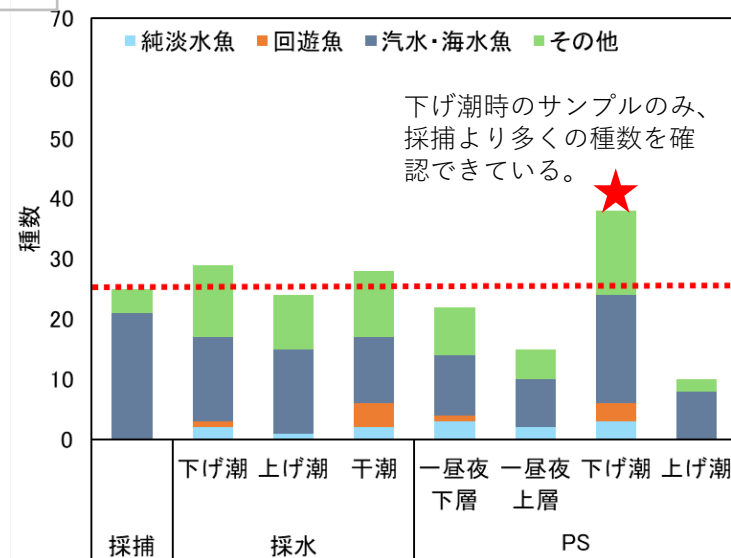
図2-2-1 回収時の海綿の様子



注1) 属止めの種等、生活型が不明瞭な種は「その他」とした。

注2) ★は最も種数が多く検出できたサンプル。

図2-2-3 設置方法別・生活型別 確認種数
(R5秋季：緑川河口部)



下げ潮時のサンプルのみ、
採捕より多くの種数を確
認できている。

注1) 属止めの種等、生活型が不明瞭な種は「その他」とした。

注2) ★は最も種数が多く検出できたサンプル。

図2-2-4 設置方法別・生活型別 確認種数
(R5秋季：白川河口部)

2. 実証調査

2-2 泥干潟での事例(白川・緑川)



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

- ✓ 海綿の目詰まりが著しかった白川河口部のサンプルについて、沈着物の分析を行った。結果、海綿からはあまり種数が確認できなかったサンプルについても多くの種を確認することができた。
- ✓ 沈着物での確認種のうち夜行性の種に限ってみると、一昼夜や上げ潮時に多い傾向にあった。下げ潮時の調査は日中であったため、ニホンウナギやナマズ等の夜間は潜んでいる種については確認されなかった可能性がある。

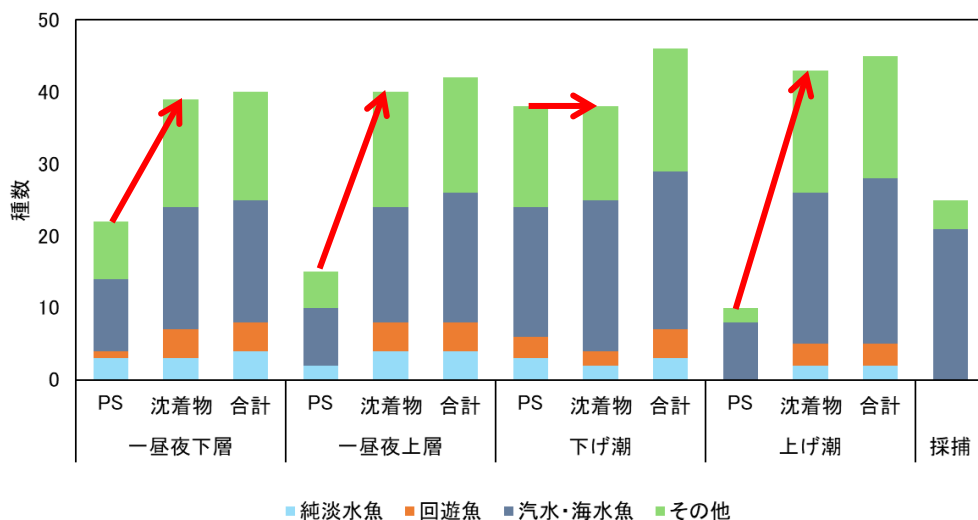


図2-2-5 沈着物の分析結果 (白川河口部)

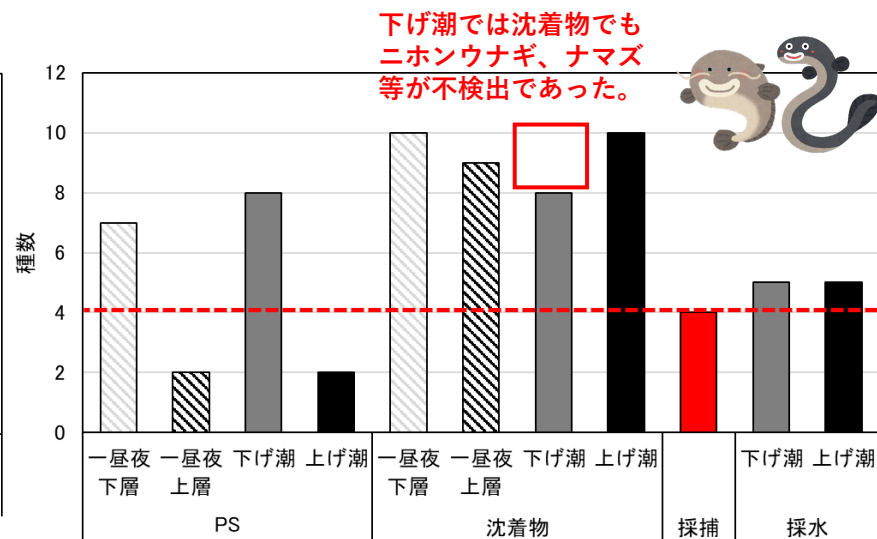


図2-2-6 夜行性種の確認種数 (白川河口部)

濁り等により海綿に十分な環境DNAが捕捉できなかった場合には、沈着物を分析することで多くの種を確認できる可能性がある。

下げ潮時に実施すると濁りの影響は小さくなるが、限られた時間となるため時間累積的な効果は小さくなる。

2. 実証調査

2-2 泥干潟での事例(白川・緑川)



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目1 環境DNAの水国実装に向けた技術体系の構築

<補足検討>

- ✓ カラム精製では、その過程でDNAの一部がカラム内に残留しDNAの数10%が減少するといわれている。
- ✓ 多少の手間がかかるものの、回収量が少ない場合のトラブルシュート法としてマニュアルに記載されている方法を試し、カラム精製の影響を確認した。
 - ※サンプルは、一昼夜の下層と上層、下潮と上潮とをそれぞれ混合し濃縮したサンプルを使用した。
 - ※分析は、深読み（30,000リード平均→100,000リード平均）とし、分析に供したサンプル内のDNAは、なるべく多く検出できるようにした。
 - ※分析は2反復とした。
- ✓ カラム精製でも著しい種数の違いはなかった。また、深読みでも数種の追加種はあったものの大きな違いはなかった。

新たに確認された種は、
純淡水魚：ナマズ
回遊魚：カワアナゴ
汽水・海水魚：
クルマサヨリ、ヒラスズキ、
ムツゴロウ、トビハゼ等



通常分析でも、ある程度の
精度は確保できる

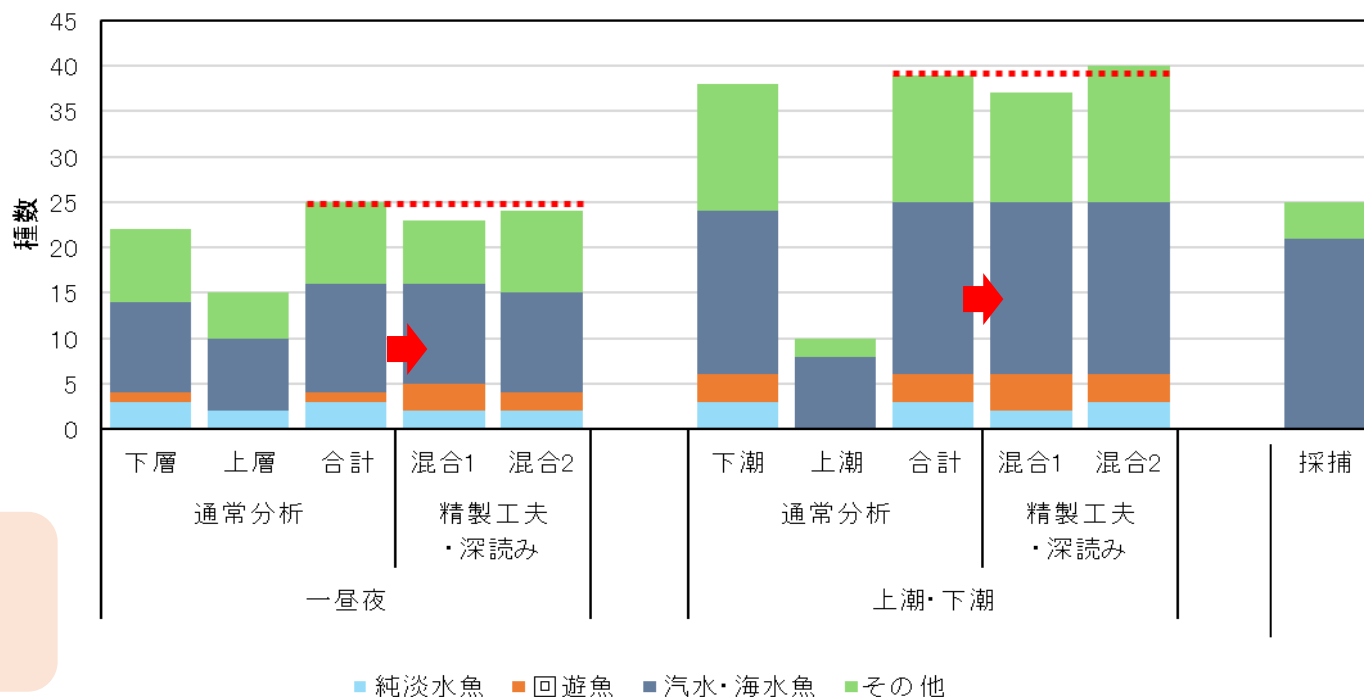


図2-2-7 多くの種数を検出するための工夫の結果

3. 課題と活用の方向性

【研究目的】

- ✓ PS法で、採水時間以外に活動が活発化する種（夜行性の種等）の検出効率は向上するのか。
- ✓ 採水法では検出率が低下する感潮域等の環境下で、PS法は有効な調査手法となるか。

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を得られた。

干潟等（白川・緑川）での結果

- 干潟等ではPCR障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法の活用の場面

- 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法は時間累積的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。

1. 北川哲郎ほか. (2020) 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., et al. (2019) Sponges as natural environmental DNA samplers. *Current Biology* 29, R395–R402.
3. Kirtane A., et al. (2020) Design and validation of passive environmental DNA samplers using granular activated carbon and montmorillonite clay. *Environ. Sci. Technol.* 54, 11961–11970.
4. Verdier, H., et al. (2022) Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers. *Mol. Ecol. Resour.* 22, 2158–2170.

山口大学大学院創成科学研究科流域環境学研修室 赤松良久教授、中尾遼平准教授（特命）、福岡工業大学社会環境学部社会環境学会 乾隆帝教授には、調査実施、結果整理等においてご指導いただきました。深謝いたします。

また、北陸地方整備局富山河川国道事務所様、九州地方整備局熊本河川国道事務所様には、河川水辺の国勢調査結果の提供とともに、調査実施においてご尽力いただきました。関係者の方に深謝いたします。