



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の水圏調査等への実装に向けた技術体系の構築

リファレンス整備の推進と
排水流入に起因する偽陽性の検証



- ✓ 環境DNA分析技術は、現場作業の簡便性や生態系への非侵襲性から、河川水辺の国勢調査（以降、水国調査とする）への実装に向けた取り組みが進められている。一方で、環境DNA分析技術には、まだいくつかの技術的な課題が残されており、水国調査への本格的な実装段階の前に、可能な限り検証データを積み重ね、解決策を見出しておく必要がある。
- ✓ 本研究では、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うことを目的とした。

| 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) | <ul style="list-style-type: none">● 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) | <ul style="list-style-type: none">● 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)や死亡個体に由来する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 |

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

- ✓ 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、検出されたDNA配列に対して、国際塩基配列データベース（以降、データベースとする）に登録されているすべての参照配列の中から、それと最も似ている配列を検索することで種を同定する仕組みとなっている。そのため、データベースに登録されている配列情報の質や量が、種同定の精度に大きく影響する。
- ✓ 淡水魚類・両生類等の移動性が低い野生生物では、主に地理的隔離の効果により、同一種内であっても生息地域によって網羅的解析で対象とするDNA配列に違いをもつ集団が存在することがある（これを種内系統という）。
- ✓ 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。
- ✓ そこで、研究テーマ①では、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。



1. 生体標本の収集・捕獲

日本国内に生息する淡水魚類・両生類を対象に、標本となる個体を採捕した。希少種に該当する種の場合は、組織片だけを採取し、個体は放流した。

2. 組織片（ヒレ、筋肉）の採取

冷凍保存された標本から2mm角程度の組織片を採取した。

3. DNAの抽出

QIAGEN社製DNeasy Blood and Tissue Kitsを用いて、キット添付のプロトコルに従って組織片からDNAを抽出した。

4. PCR増幅

魚類は12S rRNA（MiFish領域を含む）、両生類は16S rRNA（Amph16S領域を含む）を増幅する既存のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。

5. DNA配列の取得

PCR産物を精製した後、Thermo Fisher Scientific社製SeqStudioを用いてダイレクトシーケンス法でDNA配列を取得した。シーケンスはForward及びReverse側の両方から行い、得られた配列をアライメントした。

6. DNA配列の登録

得られたDNA配列は、リファレンスとして日本DNAデータベース（DDBJ）に登録した。

- ✓ **魚類は55種、99個体**の標本を集め、12SrRNAデータのリファレンスを新たに取得し、データベースに登録した。
- ✓ これまで1種につき1つのデータしか登録されていなかったいくつかの種及び種内系統において、今回の整備でデータが追加されたことにより、種の同定精度の信頼性が補強された。

| 分類群 | 種名 | 新規登録数 |
|-----|-----------|-------|
| 魚類 | ギンブナ | 1 |
| | アブラボテ | 2 |
| | ヤリタナゴ | 1 |
| | カネヒラ | 2 |
| | ニッポンバラタナゴ | 2 |
| | カワバタモロコ | 2 |
| | オイカワ | 2 |
| | カワムツ | 1 |
| | ヌマムツ | 1 |
| | タカハヤ | 1 |
| | ウグイ | 2 |
| | モツゴ | 3 |
| | カワヒガイ | 1 |
| | ビワヒガイ | 1 |
| | ムギツク | 2 |
| | タモロコ | 2 |
| | ホンモロコ | 1 |
| | カマツカ | 6 |
| | ナガレカマツカ | 3 |

| 分類群 | 種名 | 新規登録数 |
|-----|----------------|-------|
| 魚類 | ツチフキ | 2 |
| | イトモロコ | 2 |
| | デメモロコ | 1 |
| | アジメドジョウ | 2 |
| | アリアケスジシマドジョウ | 2 |
| | オンガスジシマドジョウ | 1 |
| | ニシシマドジョウ | 1 |
| | ヒガシシマドジョウ | 1 |
| | エゾホトケドジョウ | 2 |
| | トウカイナガレホトケドジョウ | 1 |
| | ホトケドジョウ | 3 |
| | ドジョウ | 2 |
| | アリアケギバチ | 1 |
| | ビワマス | 1 |
| | ベニザケ・ヒメマス | 2 |
| | ミナミメダカ | 2 |
| | オヤニラミ | 1 |
| | ウツセミカジカ | 2 |
| | ハナカジカ | 1 |

| 分類群 | 種名 | 新規登録数 |
|-----|-----------|-------|
| 魚類 | ドンコ | 4 |
| | ウキゴリ | 1 |
| | スミウキゴリ | 1 |
| | イソミミズハゼ | 1 |
| | イドミミズハゼ | 2 |
| | ミミズハゼ | 1 |
| | ユウスイミミズハゼ | 1 |
| | オウミヨシノボリ | 3 |
| | オオヨシノボリ | 1 |
| | カワヨシノボリ | 1 |
| | ゴクラクハゼ | 1 |
| | シマヒレヨシノボリ | 6 |
| | シマヨシノボリ | 1 |
| | トウカイヨシノボリ | 1 |
| | トウヨシノボリ | 2 |
| | ビワヨシノボリ | 3 |
| | ヌマチチブ | 1 |

注1) 黄色い網掛けは、今回の整備でデータが追加されたことにより、種の同定精度の信頼性が補強されたものを示した。

注2) 登録データのアクセッション番号は、LC742158～LC742232、LC754321～LC754327、LC835949～LC835963である。

- ✓ **両生類では20種、45個体**の標本を集め、16SrRNAデータのリファレンスを新たに取得し、データベースに登録した。
- ✓ 新規にデータが登録された**6種**に加え、いくつかの種内系統データが追加されたことにより、種の同定精度の信頼性が補強された。

| 分類群 | 種名 | 新規登録数 |
|-----|---------------|-------|
| 両生類 | イワキサンショウウオ | 1 |
| | トウキョウサンショウウオ | 1 |
| | ヒダサンショウウオ | 3 |
| | ハコネサンショウウオ | 2 |
| | ホムラハコネサンショウウオ | 1 |
| | アカハライモリ | 14 |
| | ニホンヒキガエル | 1 |
| | アズマヒキガエル | 2 |
| | ヒガシニホンアマガエル | 2 |
| | タゴガエル | 1 |
| | ニホンアカガエル | 1 |
| | ネバタゴガエル | 1 |

| 分類群 | 種名 | 新規登録数 |
|-----|-------------|-------|
| 両生類 | ツチガエル | 1 |
| | ムカシツチガエル | 1 |
| | トウキョウダルマガエル | 2 |
| | ナゴヤダルマガエル | 3 |
| | トノサマガエル | 3 |
| | ヌマガエル | 1 |
| | シュレーゲルアオガエル | 2 |
| | カジカガエル | 2 |

注1) 黄色い網掛けは、今回の整備でデータが追加されたことにより、種の同定精度の信頼性が補強されたものを示した。

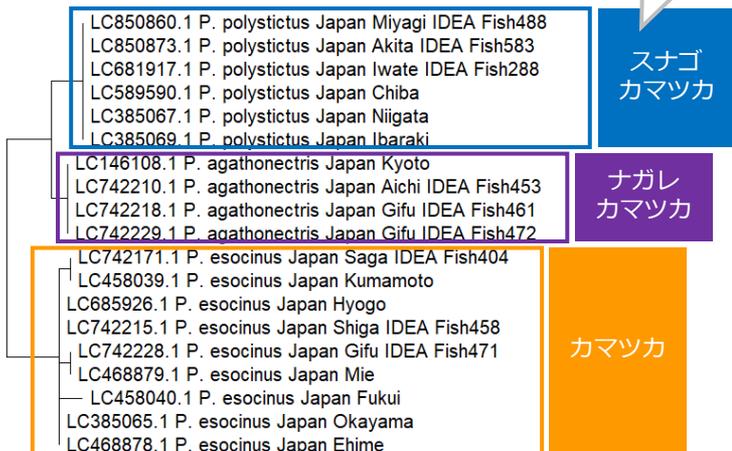
注2) 登録データのアクセッション番号は、LC727152～LC727157、LC742233～LC742246、LC744032～LC744036、LC835969～LC835989である。

- ✓ 今回のリファレンス整備による効果が特に大きかった種については、p.7-8の分子系統樹で示した。

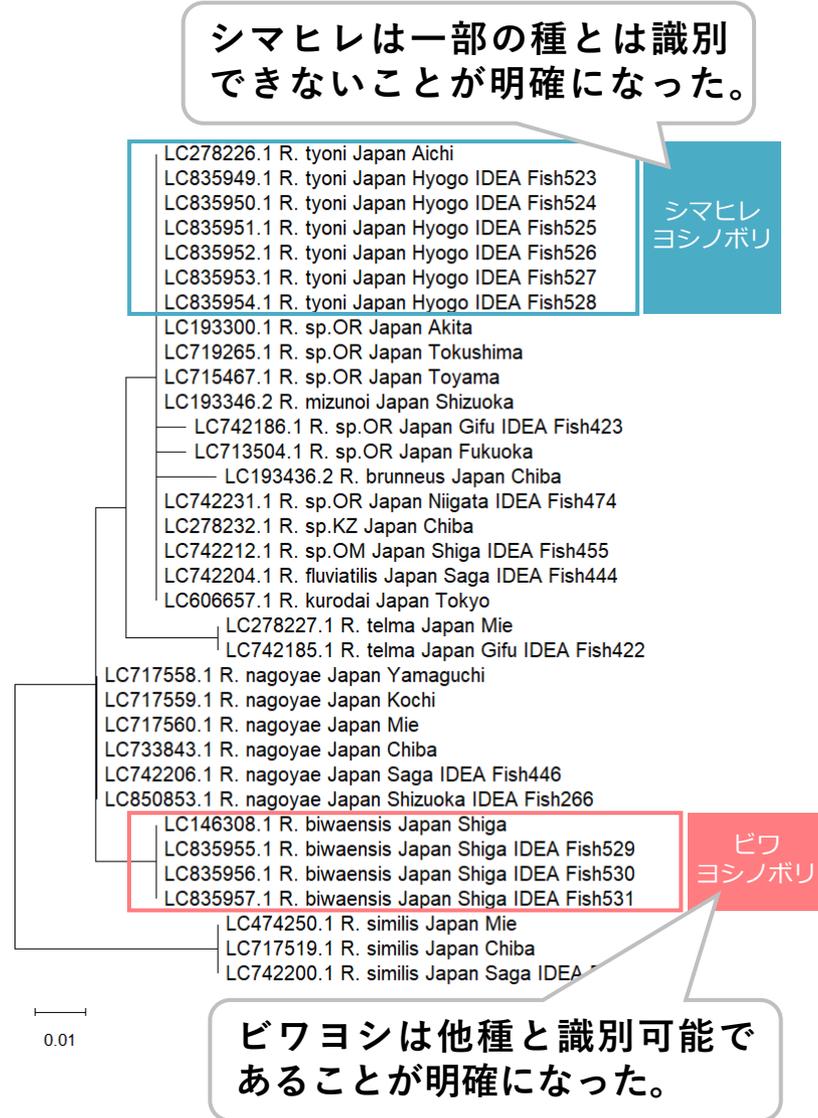
ホトケドジョウ属



カマツカ属



ヨシノボリ属



トノサマガエル属



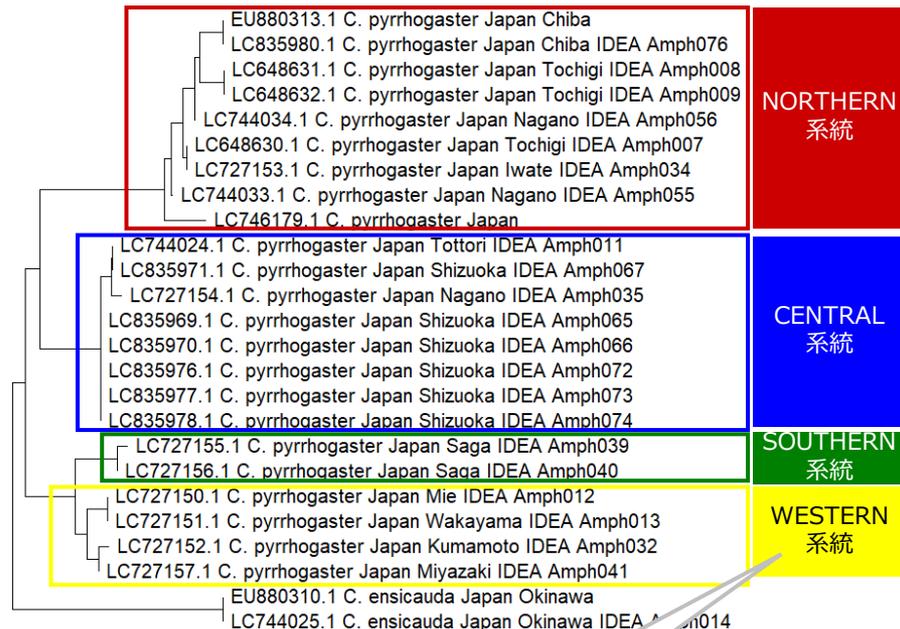
0.01

国内のトノサマガエル属3種が識別可能になった。



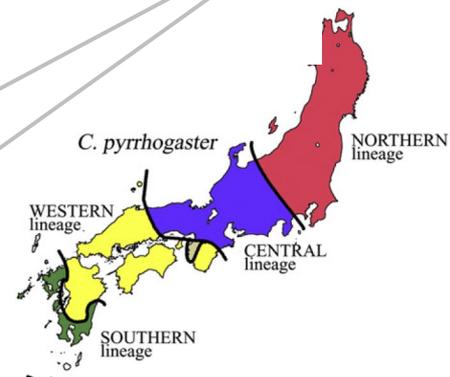
[図の出典]公益社団法人日本動物学会HP
https://www.zoology.or.jp/news2/index.asp?page_no=725

アカハライモリ



0.02

アカハライモリのすべての種内系統が一致率97%以上で検出可能になった。



[図の出典] Tominaga et al. (2013)
 Molecular Phylogenetics and Evolution, 66(3): 654-667.

テーマ② 排水流入に起因する偽陽性の検証

- ✓ 環境DNA分析は、調査地点で採水した試料に含まれるDNAの配列情報から、調査地点周辺の生物相を間接的に調べる技術である。そのため、調査地点に流入する人為排水等に由来するDNAが採水試料に混入することによって、「実際には調査地点に生息していない種」が試料から検出されてしまうことが知られている（＝偽陽性）。
- ✓ 一級河川に流入する人為排水には、一般家庭からの生活排水、食品工場・水産市場・飲食店等の商業施設排水、養殖場からの排水、道路側溝や農業水路からの排水等があるが、河川流量に占める比率が最も大きいものは下水処理場からの排水と考えられる。
- ✓ 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。
- ✓ そこで、研究テーマ②では、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。

✓ 令和4(2022)年度調査では、浄化センターから放流されている処理水にどの程度の環境DNAが残存しているのかという実態把握を行った。【残存状況調査】

- 調査対象：一級河川に放流されている浄化センターの処理水
- 調査地：福岡、愛知、静岡の3県からそれぞれ3か所の浄化センター（●●）を選定（※採水は浄化センターの敷地外で行った）
- 採水地点：1地点（処理水原水）
- 採水頻度：年3回（6月、9月、12月）
- 分析検体数：9か所×1地点×3回=27検体
- 分析項目：🐟 魚類（MiFish）、🦀 甲殻類（MiDeca）



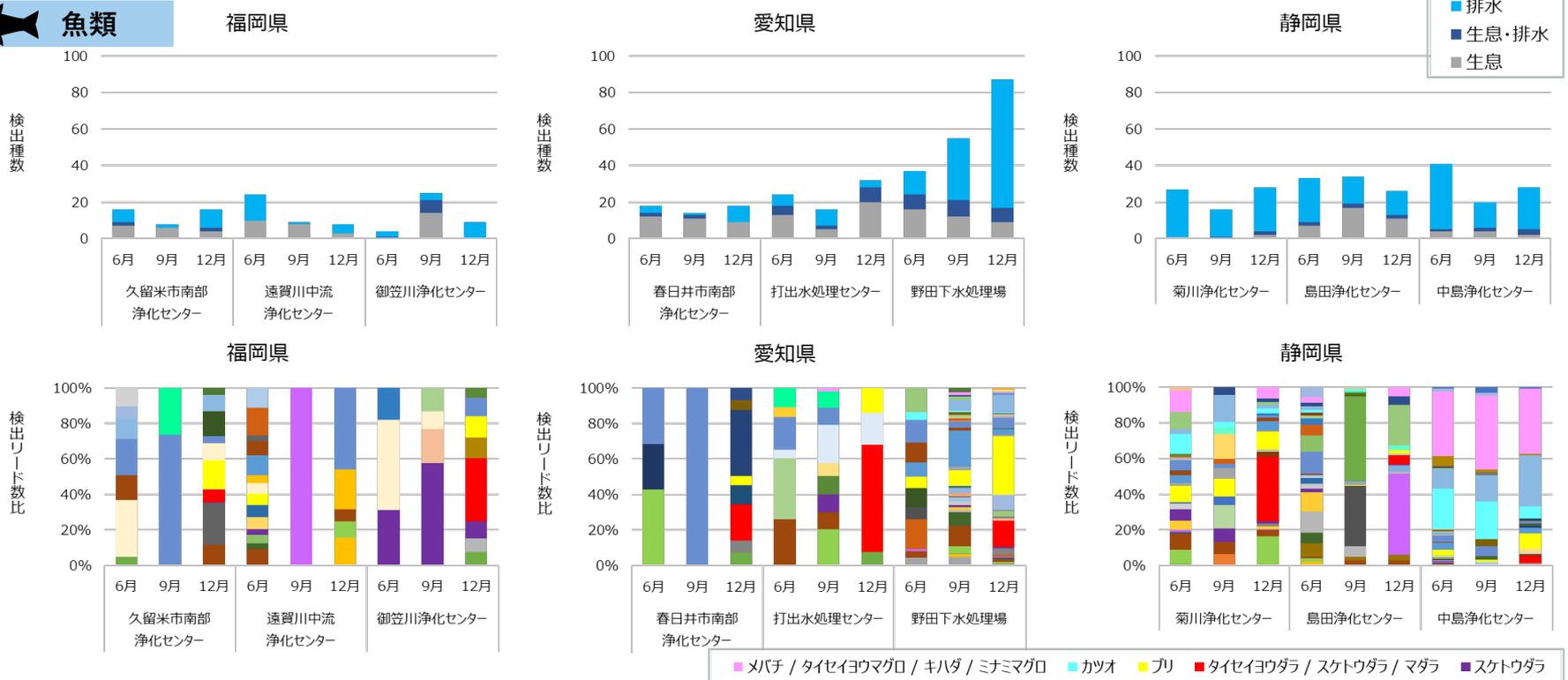
結果 **テーマ②** 残存状況調査



- ✓ 9か所の浄化センターの処理水から検出された魚類は、合計種数（3回の平均）が12.7～60.0、排水由来の種数（3回の平均）が4.7～39.0であった。
- ✓ 本研究では海産魚（ボラやスズキのような周縁性淡水魚を除く）を排水由来と判断したが、排水由来の魚種はいずれも食用利用されることがある種であった。また、検出された排水由来の魚種には、季節性や地域性がみられた。
- ✓ これらのことから、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魚類の環境DNAが残存しており、偽陽性の原因となりうるということが明らかとなった。



魚類



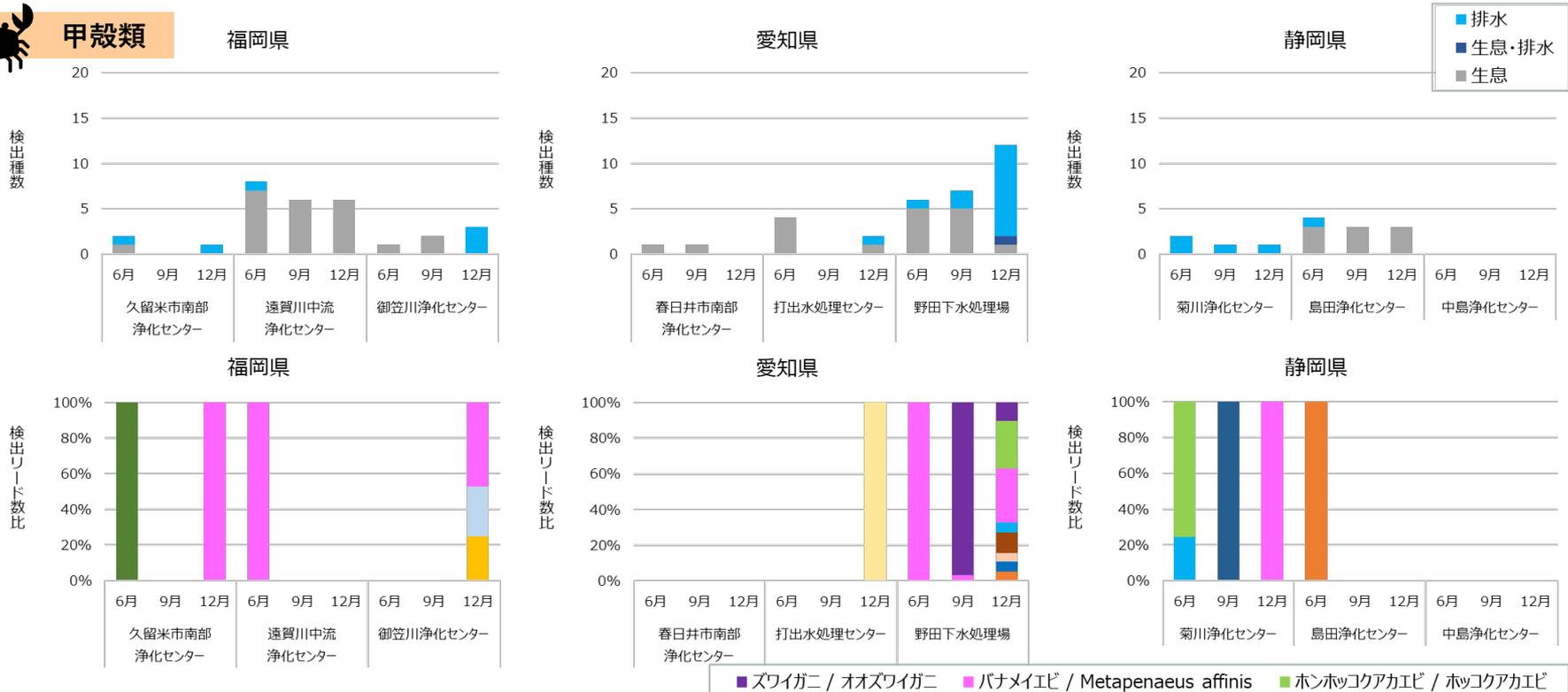
結果 **テーマ②** 残存状況調査



- ✓ 9か所の浄化センターの処理水から検出された甲殻類は、合計種数（3回の平均）が0~8.3、排水由来の種数（3回の平均）が0~4.3であった。
- ✓ 本研究では国外種や海産種（汽水域には出現しないもの）を排水由来と判断したが、排水由来の甲殻類はいずれも食用利用されることがある種であった。
- ✓ これらのことから、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甲殻類の環境DNAが残存しており、偽陽性の原因となりうるということが明らかとなった。

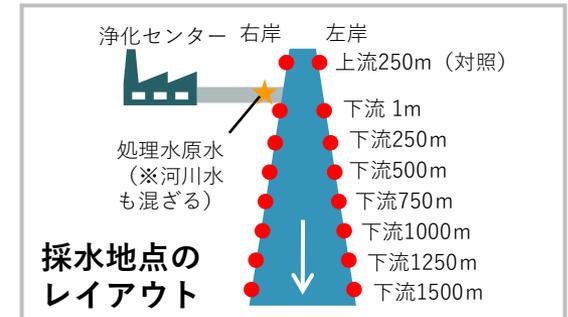


甲殻類



✓ 令和5(2023)年度調査では、令和4年度に調査を行った浄化センターのうち、各県1か所を選び、直轄河川に流入した下水処理水由来の環境DNAがどの程度下流側まで拡散しているのかを検証した。【拡散範囲調査】

- 調査対象：一級河川に放流されている浄化センターの処理水及び放流先の河川水
- 調査地：福岡、愛知、静岡の3県からそれぞれ1か所の浄化センター（●）を選定（※採水は浄化センターの敷地外で行った）
- 採水地点：17地点（処理水原水、処理水放流箇所から上流側250m[対照]、下流側1, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500m×左右両岸 ※右の図を参照）
- 採水頻度：年2回（夏季、冬季）
- 分析検体数：3か所×17地点×2回=102検体
- 分析項目：魚類（MiFish）
- 環境測定項目：水温、pH、電気伝導度、流速、水面幅、水深、処理水放流量



遠賀川中流浄化センター



打出水処理センター（庄内川）

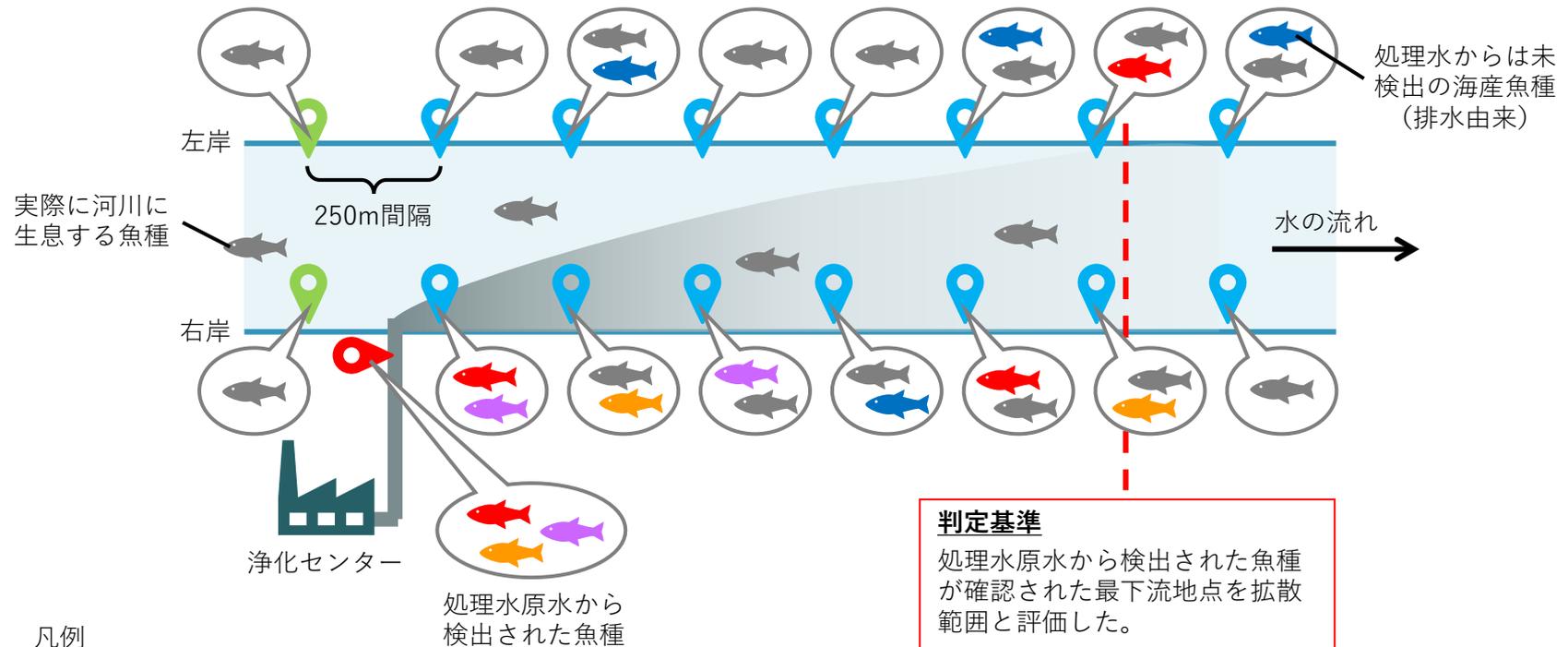


菊川浄化センター



注) 遠賀川と庄内川の処理水は、放流口直近で採水したが、採水試料にはある程度の河川水が混入している。

- ✓ 本調査では、一級河川に処理水を放流している浄化センターを対象としており、それらはいずれも河川の中～下流部に位置していた。そのため、浄化センターよりもさらに上流側から流入した排水由来DNAの影響を排除することが難しい。
- ✓ そこで、処理水原水の試料から検出された排水由来魚種（具体的にはブリ、サバ類、タラ類など）のみを拡散範囲を評価するためのトレーサーとした。



判定基準
 処理水原水から検出された魚種が確認された最下流地点を拡散範囲と評価した。

凡例

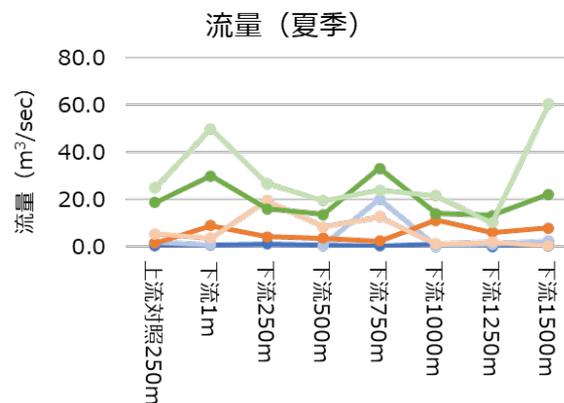
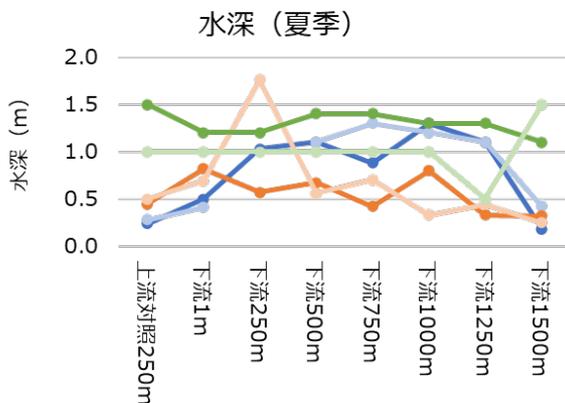
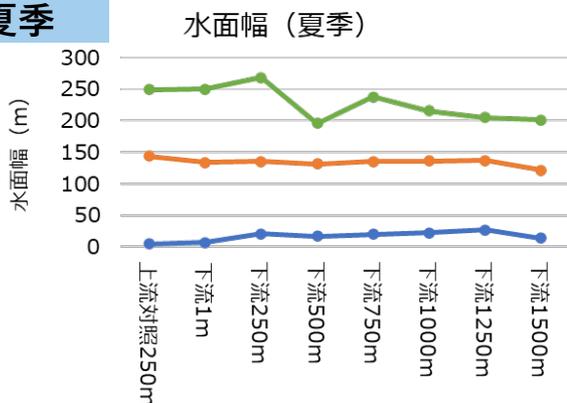
- 📍 採水地点：処理水原水
- 📍 採水地点：河川水（対照）
- 📍 採水地点：河川水（処理水の影響をみる地点）
- 🐟 網羅的解析（MiFish）の検出結果

結果 **テーマ②** 拡散範囲調査

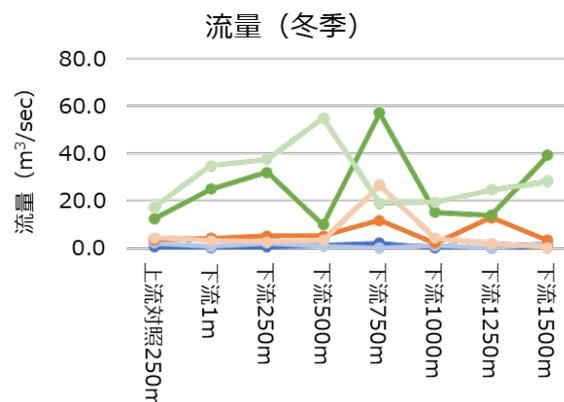
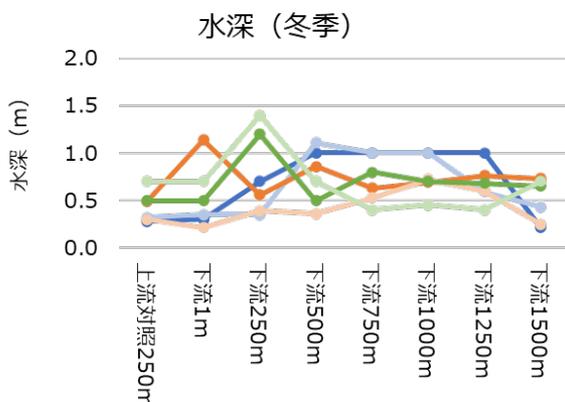
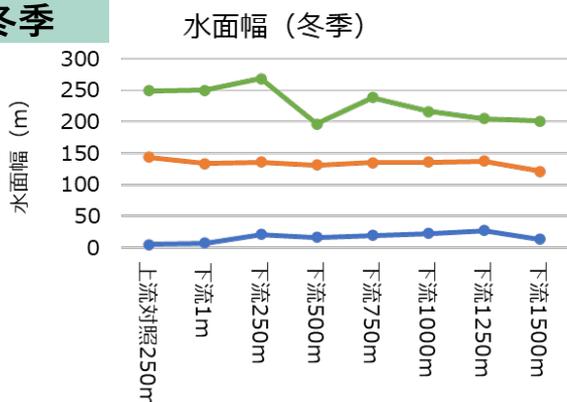


- ✓ 拡散範囲調査を行った3河川はそれぞれ規模が異なり、遠賀川は水面幅196~268m、流量9.8~60.3m³/秒と大きい、菊川は水面幅5~27m、流量0.13~20.2m³/秒と小さい。庄内川は両者の中間的な規模の河川である。
- ✓ 水深はいずれの河川も0.2~1.5m程度であり、冬季にやや低下する傾向がある。

夏季



冬季



● 菊川 ● 庄内川 ● 遠賀川

● 菊川 右岸 ● 菊川 左岸 ● 庄内川 右岸
● 庄内川 左岸 ● 遠賀川 右岸 ● 遠賀川 左岸

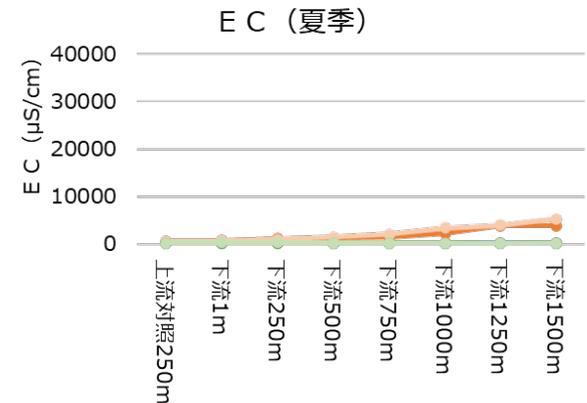
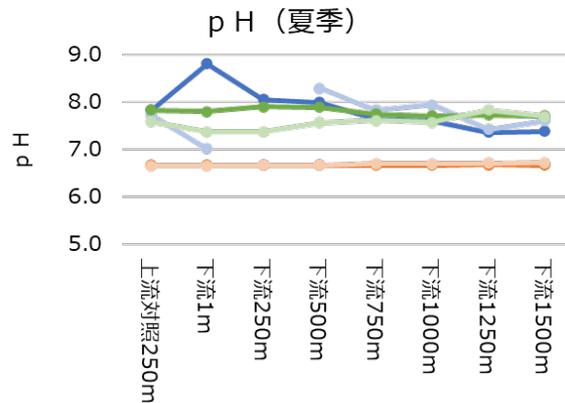
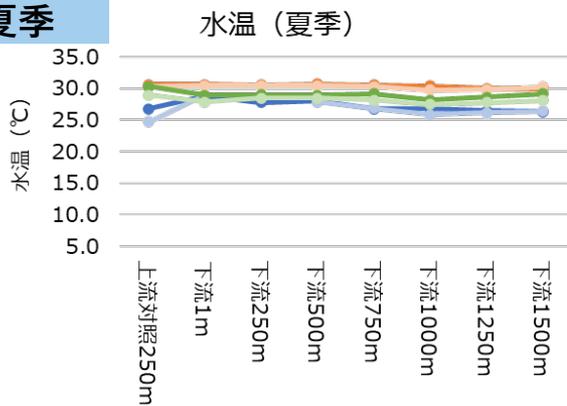
● 菊川 右岸 ● 菊川 左岸 ● 庄内川 右岸
● 庄内川 左岸 ● 遠賀川 右岸 ● 遠賀川 左岸

結果 **テーマ②** 拡散範囲調査

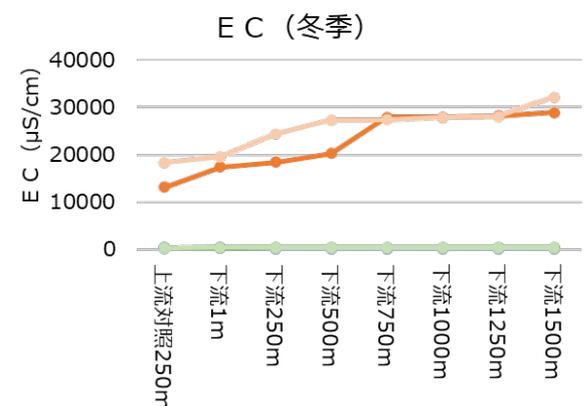
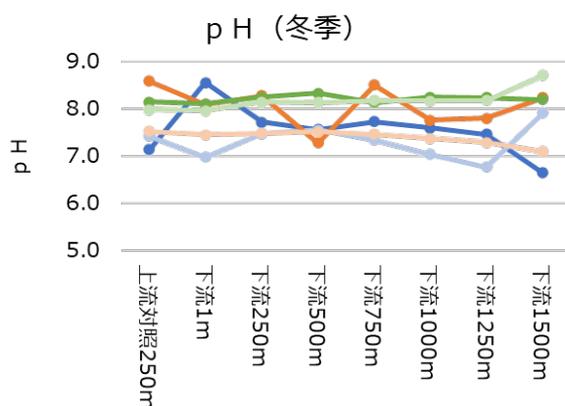
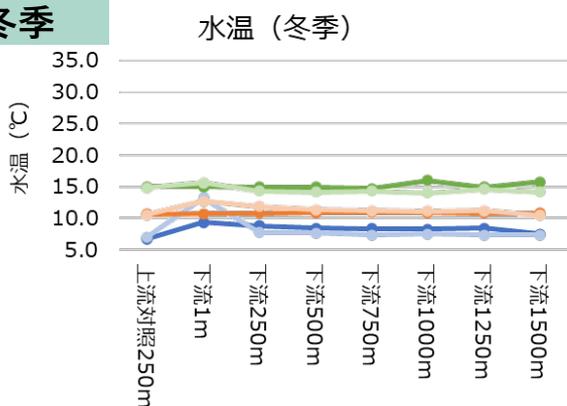


- ✓ 調査実施時の水質は、水温が夏季24.7～30.7℃、冬季6.7～16.0℃であった。
- ✓ 電気伝導度ECは、処理水原水はいずれも500 μ S/cm程度なのに対して、菊川・遠賀川の河川水は平均250 μ S/cmであった。庄内川の河川水は、海水の影響により特に冬季でECが高く、塩分に換算すると1.7～11.8 PSUであった。

夏季



冬季



● 菊川 右岸 ● 菊川 左岸 ● 庄内川 右岸 ● 庄内川 左岸 ● 遠賀川 右岸 ● 遠賀川 左岸

● 菊川 右岸 ● 菊川 左岸 ● 庄内川 右岸 ● 庄内川 左岸 ● 遠賀川 右岸 ● 遠賀川 左岸

● 菊川 右岸 ● 菊川 左岸 ● 庄内川 右岸 ● 庄内川 左岸 ● 遠賀川 右岸 ● 遠賀川 左岸

結果 **テーマ②** 拡散範囲調査



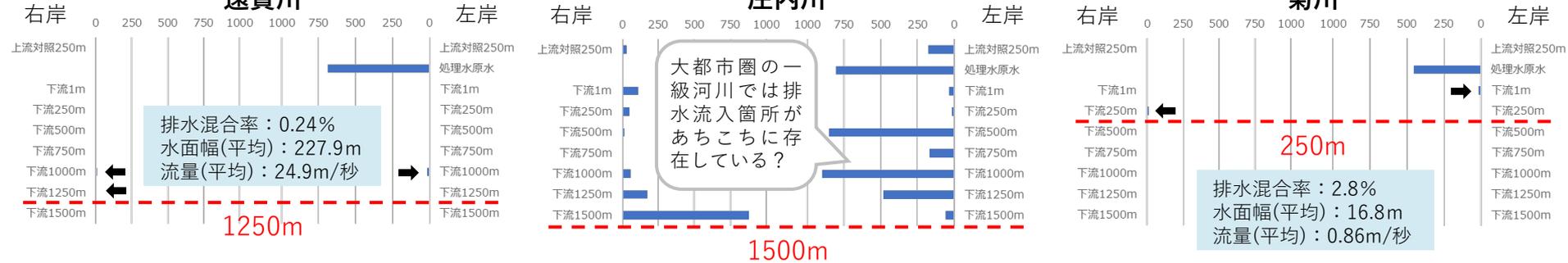
- ✓ 排水由来の環境DNAは、処理水放流口から1.0~1.5km程度（1.5km以上の可能性もある）拡散することが明らかとなった。なお、庄内川は想定外の流入排水または潮汐（海水）の影響を受けていると判断されたため、評価から除外した。
- ✓ 左岸側から放流された処理水は、拡散しながら右岸側まで到達していた。
- ✓ 夏季の菊川では、拡散距離が250mまで減少しており、高水温・低流量条件による環境DNAの分解促進が生じていたものと推測された。

夏季

遠賀川

庄内川

菊川

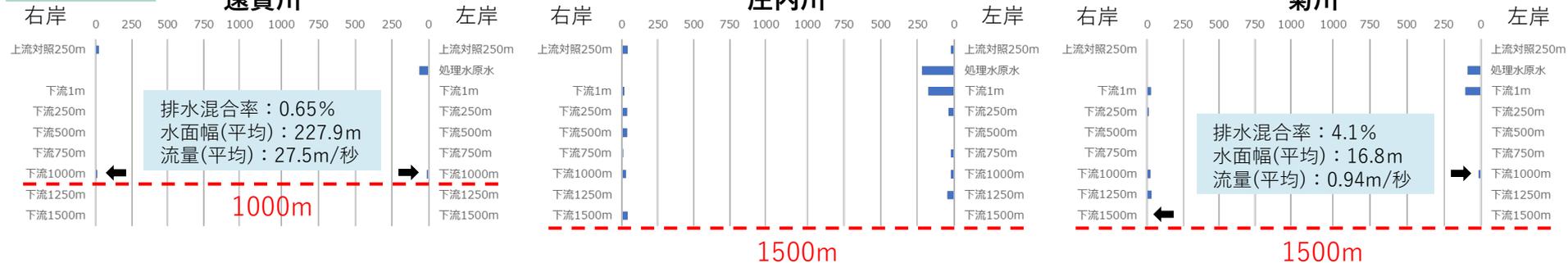


冬季

遠賀川

庄内川

菊川



注1) グラフの横軸はcoverageベースのrarefactionにより平準化したリード数を、黒い矢印はごく低リードで検出されたことを、赤い点線はリードが検出された最も下流側の調査地点までの距離 (= 拡散距離) を示した。

注2) 排水混合率(%)は処理水の流量 ÷ 河川平均流量 × 100 とした。

- ✓ 研究テーマ①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。
- ✓ 研究テーマ②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てしまうと、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。**

1. 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.