

環境 DNA を用いた河川生物モニタリングの現状と今後の展開

山口大学大学院創成科学研究科 赤松良久

1. はじめに

国土交通省では平成2年より一級河川を対象として、「多自然型川づくり」や「河川水辺の国勢調査」を開始している。さらに、平成9年の河川法の改正によって、「河川環境の整備と保全」が内部目的とされ、治水・利水・環境の調和した河川管理が求められてきた。しかし、治水や利水に関しては明確な管理目標がある一方で、河川環境に関してはその管理目標に設定が難しい。水質が劇的に改善している多くの一級河川では、河川の生物生息場の回復が河川環境改善のための管理目標とされることが多い。したがって、全国の一級河川を対象として5年に一回の頻度で行われている水辺の国勢調査から得られる生物相や個体数のデータは極めて重要なデータであるといえる。近年ではこのビックデータを活用して、全国の一級河川の河川環境を俯瞰的に把握・評価しようとする試みも進められている。しかし、水辺の国勢調査において、河川内の魚類、底生動物の調査は多大な労力をかけて実施されている。特に魚類に関しては基本的にはたも網・投網を中心に行い、必要に応じてはえなわや潜水目視などを用いることとなっており、実施者の経験値や能力次第ではあるもののかなりの努力量が必要である。これに対して、近年、水中に浮遊するDNAの分析によって、生物の在・不在やバイオマスを推定する生物モニタリング手法の開発が急速に進んでいる。この手法は環境DNA (environmental DNA: eDNA) 分析と呼ばれており、採水したサンプル中の対象となる生物に由来するDNA断片を分析する。環境DNA分析では水(数ミリリットルから数リットルほど)を採取して、その中のDNA情報を調べるだけで、これまで多大な労力をかけていた水域の生物調査を行える可能性がある。ここでは、河川内の魚類量を推定する方法を中心に、環境DNAを用いた河川生物モニタリング手法に関する研究の現状と今後の展開に関して概説する。

2. 環境 DNA 研究の動向

図1に近年の環境DNA分析を用いた生物モニタリングに関する論文発表数の推移を示す¹⁾。環境DNAに関わる研究は2014年以降急激に増加し

国際誌に掲載された実験や調査に関する環境DNA論文数(本)

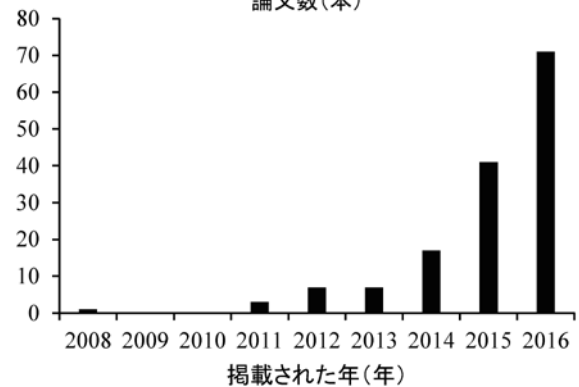


図1 環境DNA研究に関する論文発表の経年推移(高原ら¹⁾にデータを追加)

ており、環境DNA研究が極めて注目度が高いことがわかる。環境DNAに関する研究は主に生物の在・不在に関するものが多く、特に採捕などが困難である希少種を対象とした研究が盛んにおこなわれている。日本国内ではオオサンショウウオやカワバタモロコを対象として、その実用化が検討されている^{2,3)}。また、この手法は外来種の侵入をいち早く検出するのにも有効である。さらに、環境DNA分析は魚類に限らず、軟体動物、甲殻類、爬虫類、水生植物などの様々な分類群に適用可能であり、今後さらに多くの生物種に対して、環境DNAを用いた在・不在の調査が可能になると考えられる。

近年、生物の在・不在に加えて、採水した水サンプル中に含まれる環境DNA濃度を用いて、生物のバイオマス・密度を推定する研究も進められている。その多くは魚類を対象としたものであり、水槽や湖沼などの閉鎖性の高い水域のコイやザリガニを対象とした研究がおこなわれている^{4,5)}。また、Doi et al.⁶⁾によって、河川内のアユを対象としたバイオマスや密度の推定に関する研究も進められており、この結果に関しては3章において詳細を紹介する。

3. 環境 DNA を用いた魚類量推定

実験水路および実河川において、環境DNA濃度を用いた流水中での魚類量推定の可能性について検証を行った結果を紹介する。

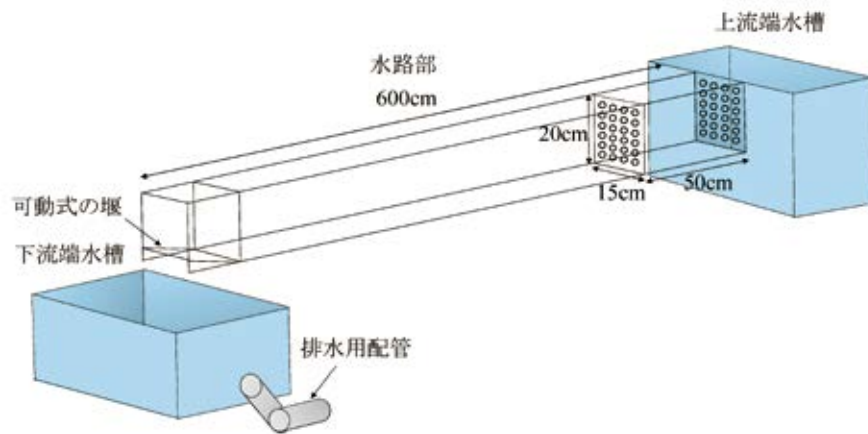


図2 実験に用いた水路 (Akamatsu et al. 未発表)

(1) 水路実験による検証

水路実験では河川性遊泳魚の中で、採集および飼育が容易であるカワムツを対象とした。最新の河川水辺の国勢調査の結果、カワムツは西日本全の一級河川において生息していることが明らかとなっており、西日本において代表的な純淡水遊泳魚であると言える。

実験水路の概略図を図2に示す。実験水路は上流端水槽、水路部、下流端水槽で構成されている。上流端水槽と水路部は連結されており、水路部は長さ600cm、幅15cm、高さ20cmの亚克力製の直線水路となっている。また、実験魚が上流端水槽、下流端水槽へ入り込まないように、水路部の上流端、上流端から50cm地点に亚克力製の多孔質の仕切り板を設置し、実験中のカワムツの遊泳区間とした。実際にカワムツが遊泳している様子を写真1に示す。なお、本実験で使用した水はカワムツのDNAを含む分泌物や排泄物を含んでいるため、再利用が不可能である。そのため、下流端水槽に排水用の配管を取り付け、実験で使用した水は常時排水を行えるようにした。

実験は下流の仕切り板から15cm下流の位置で流速が約0.2(m/s)となる流れの条件で行った。この条件で、カワムツを流水中に投入してから15分後以降は、流水に流されたり逆らったりする遊泳行動はとらなくなり、写真1のようなほぼ静止した遊泳行動をとることが確認された。したがって、カワムツが十分に水路に馴致した流水開始から30分後に、下流の仕切り板から15cm下流の位置で、採水を行った。採水したサンプルに対する環境DNA分析の大まかな流れを図3に示す。採取した1Lのサンプル水を粒子保持径 $0.7\mu\text{m}$ (GF/F)のガラスフィルターでろ過することによって、DNAを濃縮する。次に、ろ紙表面に吸着されたろ過残留物を用いてDNAを精製し、リアルタイムPCRに



写真1 遊泳するカワムツの様子

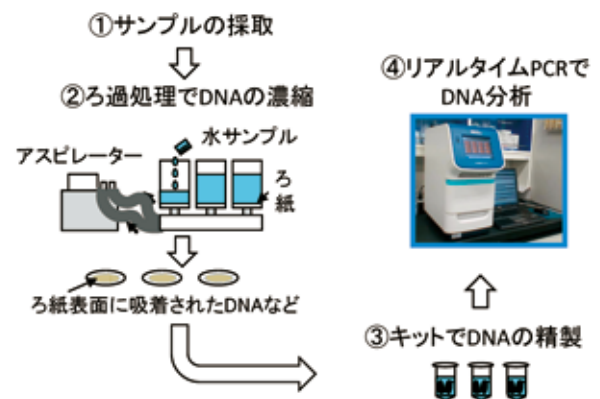


図3 環境DNA分析の手順

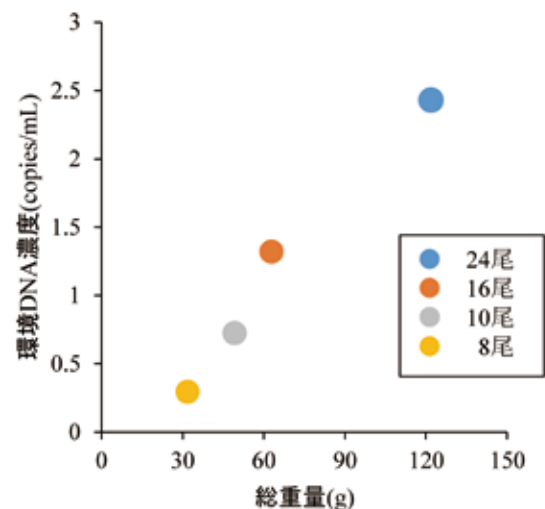


図4 環境DNA濃度と総重量の関係 (Akamatsu et al. 未発表)

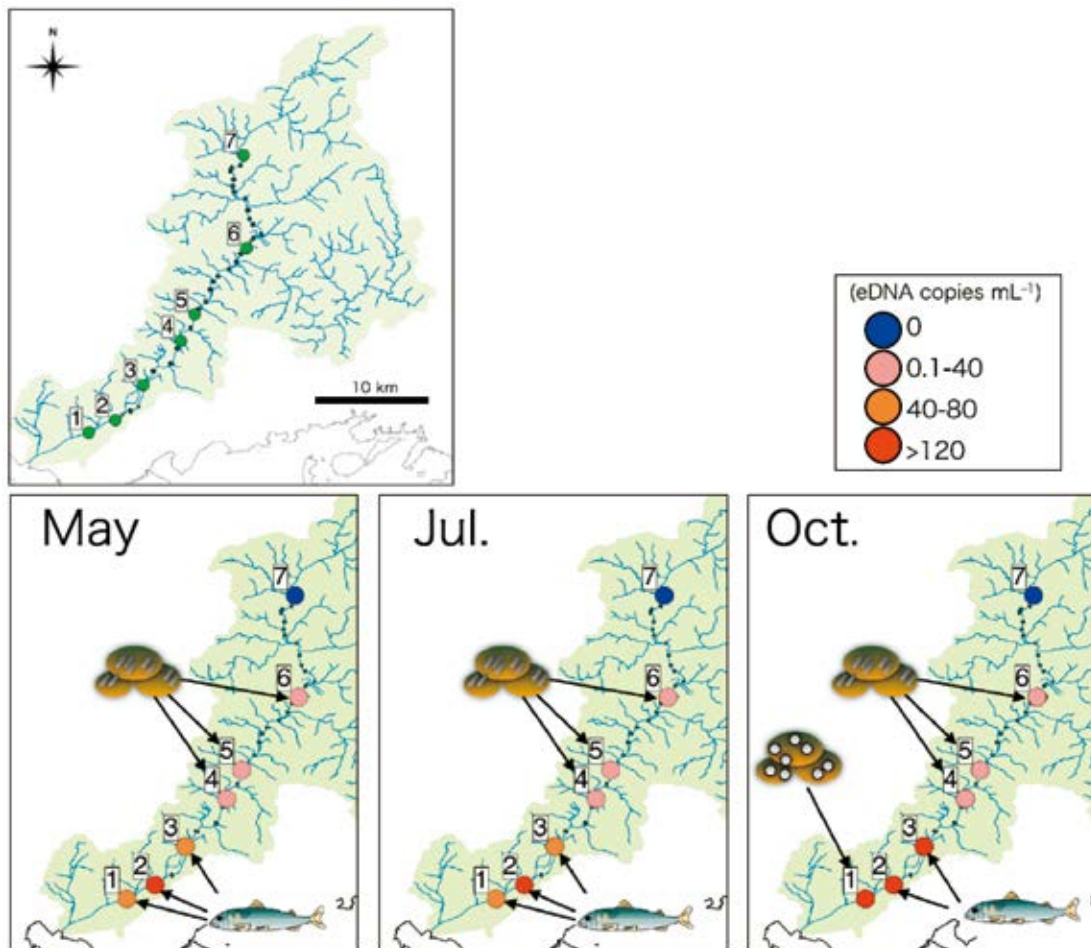


図5 佐波川におけるアユの環境 DNA 濃度の空間分布⁶⁾
(図中の石の上の白線はアユのはみ跡, 白丸はアユの卵, 黒丸は堰・ダムを示す)

よる計測を行うという流れとなる。環境 DNA の分析法についての詳細は高原ら¹⁾を参考にされたい。

実験はカワムツの尾数を 8, 10, 16, 24 と変化させて 4 ケース行った。環境 DNA 分析から得られたサンプルの環境 DNA 濃度と各ケースで用いたカワムツの総重量の関係を図 4 に示す。これらの結果から、環境 DNA 濃度とカワムツの総重量には高い正の相関があることがわかる。この結果は流水中でも環境 DNA 濃度が魚類のバイオマスや密度を高精度に反映する指標であることを示唆している。

(2) 実河川での検証

実河川を対象とした検討では全国の一級河川に広く分布し、水産有用種でもあるアユを対象とした。山口県の一級河川である佐波川の 7 地点を対象に、2015 年 5 月、7 月、10 月の 3 回調査を行った。各地点ともに、瀬を含む縦断方向約 80m の調査範囲を定め、約 15m 間隔で横断方向に 6 ラインを設定し、潜水目視調査を行った。また、密度 (n/m^2) とアユの平均体重 (g/n) を乗ずることで現存量 (g/m^2) を算出した。さらに、潜水目視調査をおこな

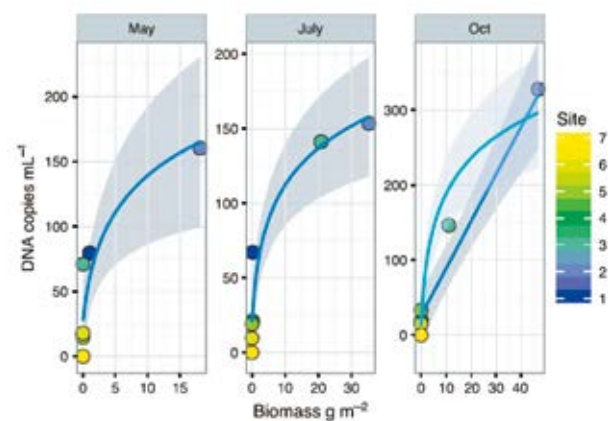


図6 アユの環境 DNA 濃度とバイオマスの関係⁶⁾

う直前に、調査範囲に含まれる瀬の下流側で表層水の採水 (1L) を行った。

図 5 に佐波川でのアユの環境 DNA 濃度の空間分布を示す⁶⁾。Site.4, 5, 6 では潜水目視によるアユの存在は確認できなかったが、アユのはみ跡が確認できた地点であり、環境 DNA 濃度では低濃度ではあるがアユの存在が確認できる。また、アユが産卵のため降下を始める 10 月には下流域の環境

DNA 濃度が高くなっている。

図 6 に Site.1~7 におけるアユの環境 DNA 濃度と各地点の採水地点直上の 3 ラインの平均のバイオマスの関係を示す⁶⁾。図中の青い線は最適な回帰線をグレーで囲んだ部分は 95% 信頼区間を示している。10 月の結果に関しては、最適な回帰線に加えて、対数回帰曲線を水色の線で示しており、その 95% 信頼区間は薄紫で囲んだ部分である。最適な回帰線の R² 値は 5 月では 0.915, 7 月では 0.824, 10 月では 0.961 となり、すべての月で高い値を示している。このことから、アユの環境 DNA 濃度とバイオマスには高い相関があることが明らかとなっている。

4. 環境 DNA を用いた生物モニタリングの展望

河川における環境 DNA を用いた生物量の推定は可能であることが明らかにされつつある。しかし、河川内のある地点で採水を行った際に、その地点の環境 DNA 濃度がどのぐらい上流の範囲の影響を受けているかについては明確にされていない。海域では採水地点から半径 200m 程度の範囲の影響を受けているとの報告もあるが⁷⁾、河川では DNA のソースである細胞片、糞、粘液等の物質の動きは流れの影響を強く受けるため、反映する範囲は流量や水温によって大きく変化することが予想される。環境 DNA は 1km 以上上流の生物の影響を反映しているとは考えにくい、正確な河川内の生物量の定量化には DNA のソースとなる物質の動態に関する検討が必要不可欠である。

また、採水した水サンプルに含まれる DNA 情報から、その場にいる魚類を網羅的にする方法が Miya et al.⁸⁾ によって開発されている。この手法を沖縄の美ら海水族館から得た水試料に適用したところ、DNA 情報から 180 種の魚種のうち 168 種もの魚種 (59 科 123 属) を特定可能であることが報告されている。環境 DNA を用いた生物量の推定と同様に、この水槽で確認された手法が河川でも適用できる可能性は高い。

環境 DNA を用いた生物モニタリングは、完成された手法との言えないものの、その有用性は十分に示されており、今後は水辺の国勢調査にも取り入れられていくことが期待される。

参考文献

- 1) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井 喜美子: 環境 DNA 分析の手法開発の現状 ~淡水域の研究事例を中心に~、日本生態学会誌, Vol. 66, No. 3, pp.583-599, 2016.
- 2) S. Fukumoto, A. Ushimaru and T. Minamoto :A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan, Journal of Applied Ecology, Vol.52, pp.358-365, 2015.
- 3) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文: 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立, 日本生態学会誌, Vol. 66, No.3, pp.613-620, 2016.
- 4) T. Takahara, T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi H and Z. Kawabata :Estimation of fish biomass using environmental DNA. PLoS ONE, 7, e35868, 2012.
- 5) H. Doi, K. Uchii, T. Takahara, S. Matsushashi, H. Yamanaka and T. Minamoto :Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. PLoS ONE, 10, e0122763, 2015.
- 6) H. Doi, R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara, T. Minamoto : Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, Freshwater Biology, Vol.62, pp.30-39, 2017.
- 7) S. Yamamoto, K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, et al. :Environmental DNA as a 'Snapshot' of Fish Distribution: A Case Study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan, PLoS ONE11(3):e0149786, 2016.
- 8) M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki : 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, DOI: 10.1098/rsos.150088, 2015.