

環境影響評価における新しい調査手法の試み - 環境 DNA を用いたイタセンパラ生息の推定 -

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員 上月佐葉子
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 渡部 健
 神戸大学大学院人間発達環境学研究所 源 利文
 (地独)大阪府立環境農林水産総合研究所 上原 一彦
 (地独)大阪府立環境農林水産総合研究所 山本 義彦

1. はじめに

環境影響評価法では、開発事業を実施する際に、生物の生息環境への影響を可能な限り回避または低減することが義務づけられている。一般的に環境影響評価のためには、まず現地調査によって生物の分布調査が行われる。たとえば魚類であれば従来は投網や定置網、たも網等で個体を捕獲して生息種を確認してきた。この手法では調査精度のバラツキや対象生物への負荷という課題があった。近年、環境中に浮遊・存在している生物由来のDNA（環境DNA：Environmental DNA）を用いた魚類や両生類の調査手法の開発が進められている^{1,2)}。本稿では、希少種であるイタセンパラ (*Acheilognathus longipinnis*) の環境DNA検出を試行し、環境影響評価における生物調査への適用について考察を行うものである。

2. 環境DNAで生物種を検出する方法

環境DNAとは、生物から環境中に糞や粘液などを介して放出されたDNAの総称である。環境DNAによる生物種検出は、動植物に共通する縮退プライマーを作り「水」をはかることで生息する種類を調べる技術や¹⁾、特定の種の環境DNA量からその種のバイオマスを推定する技術である³⁾。

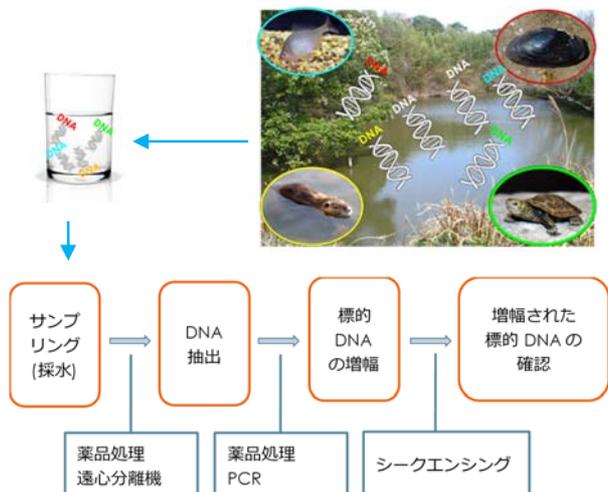


図1 環境DNAの主要分析手順と使用機器

3. イタセンパラとは

イタセンパラはコイ科タナゴ亜科に属し、琵琶湖淀川水系・濃尾平野・富山平野に分布している。天然記念物や国内希少野生動植物種（種の保存法）に指定されている。大阪府内では淀川のワンドに分布しているが、近年個体数が激減し絶滅の危機に瀕しており、大阪府水生生物センターでは、施設内への保存池の設置や飼育個体の淀川への野生復帰など保護に取り組んでいる。



4. 実験手法

大阪府水生生物センターにおいて下記3種類の飼育水槽および飼育池から採水しイタセンパラ環境DNAの検出を試みた。

1) 採水方法 採水日：2015.2.6

各1リットル以上の水を採取（プラスチックボトル）し、運搬中は冷却ボックス内にて保存した。

<p>① 室内水槽 サイズ：1.8m³ イタセンパラ数：約15個体 生息密度：約8個体/ m³</p>	
<p>② 野外コンクリート池 サイズ：60m³ イタセンパラ数：約250個体 生息密度：約4個体/ m³</p>	
<p>③ 野外自然池 サイズ：120m³ イタセンパラ数：約250個体 生息密度：約2個体/ m³</p>	

注) 個体数：貝の中の個体は含めていない。

キーワード：環境影響評価、環境 DNA、PCR、イタセンパラ、モニタリング

発表者連絡先：大阪府大阪府中央区安土町 2 丁目 3 番 13 号 TEL:06-4964-2326、FAX:06-4964-2327

2) 分析方法

試料水500mlをガラスフィルターGF/Fでろ過し、フィルター上の試料からDNeasy Blood & Tissue KitでDNA抽出した。イタセンパラに特異的なプライマー・プローブセット（源ら未発表データ）を用いてStepOnePlus リアルタイムPCRシステムによりDNAを増幅し、イタセンパラDNAの存在判定を行った。

分析数としては、1検体あたりサンプル水2回繰り返し×PCR3回繰り返し=6回繰り返し検出した。PCRのネガティブコントロールとしてサンプルDNAの代わりに超純水を鋳型とするチューブを3回繰り返し用意し、サンプルと同様にPCRを行った。

3. 結果

全サンプルについて3回繰り返しのPCRを行い、すべてポジティブ反応であった。また、ネガティブコントロールは増幅しなかった。リアルタイムPCR検出結果を図2に示す。

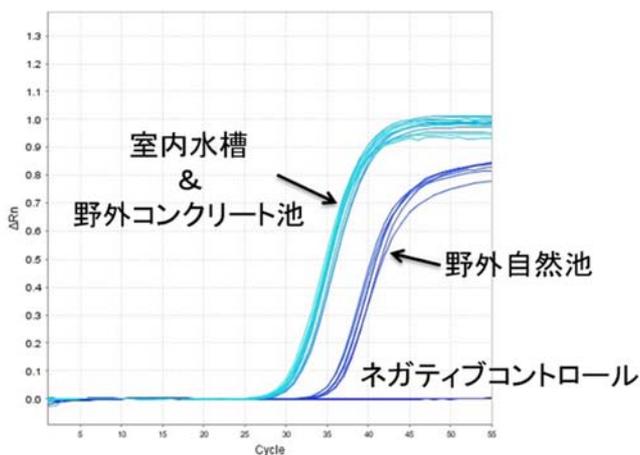


図2 環境DNAの検出結果

＜リアルタイムPCRの結果（Ct値）＞

- ・室内水槽：Ct=31.3±0.25（平均±標準偏差）
- ・野外コンクリート池：Ct=31.8±0.40
- ・野外自然池：Ct=37.0±0.48

Ct値の数字が小さいほどDNA量が多いことから、室内水槽と野外コンクリート池におけるDNA濃度は野外自然池より高いことが確認された。

4. 考察

生息密度が高い室内水槽と野外コンクリート池でDNA量が同じ程度だった要因としては、室内水槽は水槽水のフィルターろ過を行っているのでフィルター

にDNAがトラップされていたことが考えられる。

野外自然池でDNA量が少なかった要因は、生息密度が低かったことや自然の水底であるために環境DNAが分解されやすい環境であったことなどが影響していると考えられる。

また、今回の採水は、冬季に実施したものであるが、繁殖した成魚の多くが秋季に死滅するため、個体数は少ない時期であり、水温が低いため活動も不活発な時期であることから、個体から放出される環境DNAの量は少ない時期と考えられる。今回はこのような条件下で環境DNAの検出に成功した。

5. 今後の課題と研究

今回の実験は、管理された閉鎖水域からの採水であった。環境影響評価等の生息分布調査に環境DNAの手法を導入するには、野外で採水したときの検出精度が求められる。

イタセンパラの野生生息地は、河川のワンドなど完全な閉鎖水域ではなく、水域の規模も大きく、その他の生物の影響も格段に大きい環境である。また、水中の環境DNA量は生物からの供給と分解のバランスで決まると考えられ、季節変化も大きいと考えられる。

以上より、野外の生息地において、環境DNAの検出に効果的な方法を確立するために、今後は季節を通じて野外で調査を実施し、最適な採水時期や方法を検討する方針である。

参考文献

- 1) Minamoto T., Yamanaka H., Takahara T., Honjo M. N., Kawabata Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13(2), 193-197.
- 2) Fukumoto S., Ushimaru A., Minamoto T. (2015) 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* 52 (2) 358-365.
- 3) Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE*, 7 (4), e35868.
- 4) 川那部浩哉,水野信彦,細谷和海(編・監修), (2001) 日本の淡水魚(山溪カラー名鑑)改訂版,株式会社山と溪谷社,370.