31.降雨時における環境DNAによる陸生種検出とその影響要因の検討

Chen XU[1]*・山口　圭介[2]・糠澤　桂[2]

[1]宮崎大学大学院工学研究科（〒889-2155 宮崎県宮崎市学園木花台西一丁目）

[2]宮崎大学工学部（〒889-2155 宮崎県宮崎市学園木花台西一丁目）

＊ E-mail:hh19054@student.miyazaki-u.ac.jp

近年利用が拡大する環境DNA手法を応用して，陸生種の調査ができることが報告されている．しかし，陸生種が水域にDNAを放出する機会が少ないことから，その検出手法は確立されていない．そこで本研究では，降雨時に表面流出によって陸域から河川に流入する環境DNAを対象として，陸生種の調査・検出を試みた．また，様々な降雨イベントを対象にすることで，環境因子（e.g., 降水量，濁度）が環境DNA検出に与える影響を検討した．結果として，降雨時調査において47 サンプル中42サンプルで陸生種のDNAが安定的に検出された．一般化線形モデルにより，環境DNA濃度に対して，降水量，濁度，森林の割合，市街地の割合が有意な正の効果，流入点 - 調査点が有意な負の効果を有していることが確認された．

Key Words : *Bos taurus , Environmental DNA , Pore size, Terrestrial species ,Turbid water*

1.　はじめに

生物多様性は生態系および人間社会の持続性を支えているため[1)]，気候変動等に伴う生物多様性の変化（文献１）を把握することは重要である。しかし，従来の生物調査においては直接捕獲や目視観察といった時間・労力を要するものであり，より効率的な生物モニタリング手法の確立が極めて重要な課題である．近年，環境DNA（eDNA）を用いた生物調査法が急速に発展している[2, 3)]．eDNAは，海や湖沼，土壌など環境中に含まれる生物の皮膚片，粘液，排泄物などに由来するDNAのことであり，この検出可否によって対象生物の在否を判定できる特長を有する．また，低コスト，短時間，非侵略的などのメリットが挙げられている[4)]．

eDNAを用いた生物調査（以下，eDNA法）はこれまで，魚類や両生類等の水生・半水性種を対象として研究が進展してきた[5)]．その一方，近年では陸生種が水源における水浴や排泄等に伴いそのDNAを水中に放出し，検出可能になることが報告されている[6)]．Ushio *et al.*（2017）は，哺乳類を標的とするプライマーによって，動物園のケージの中における水試料から，飼育されている哺乳類が多数検出されたことを報告している[7)]．Coutant *et al*（2021）は，アマゾン川流域において，eDNAによる多種網羅的検出手法（i.e., メタバーコーディング）が陸生種や半水生種に適用可能かを検証した[8)]．結果として，非水生種，水生種，半水生種が効率的に検出され，さらに，検出できた種の分布は既知の分布と整合していることが分かった．以上の研究報告は，eDNA法が水域のみならず，陸域生態系の調査にも活用し得ることを示唆している．しかし，これまでの陸生種に関する研究の課題として，陸生種が水域と接触する機会は少ないかつ不規則であるため，対象種が実際に存在していても，水域においてeDNAを検出できないことが挙げられる[9)]．加えて，水中のDNAがpH，水温，流下距離などの要因に応じて分解が促進されるため[10-12)]，検出はさらに困難になる．

Yang *et al*（2021）とCoutant *et al*（2021）は，降雨時の表面流出により陸域のeDNAが河川・水域に輸送されていると考察した[8,13)]．また，*Valentin et al*（2021）は異なる降水量および降雨状態が陸域におけるeDNAの流出に与える影響を検討した[14)]．結果として，降雨があればその多寡にかかわらず陸上植物表面にあるeDNAが迅速に除去されることが示された．この結果は，陸域におけるeDNAが降雨に伴う表面流出によって河川に輸送される機構が存在することを示唆している．そのため，降雨出水時における河川のeDNA調査によって，水域と接触する機会が少ない陸生種を迅速に検出できることが考えられる．しかし，降雨時の表面流出による侵食作用で砂泥が河川に流入し，水の濁度が高くなる傾向がある．よって，高濁度の水サンプルからeDNAを効率的に回収する工程が必要となる．

一般的に，水サンプルからeDNAを濃縮する際は，回収率を向上させるために孔径が小さいフィルター

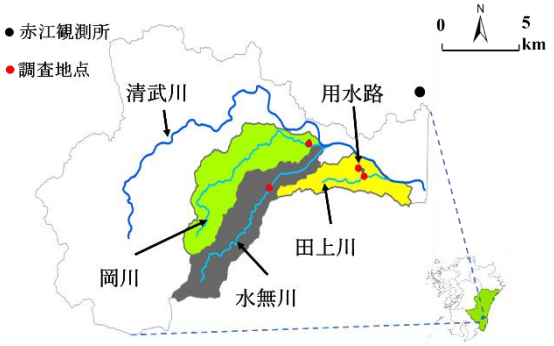


図-1　調査領域である清武流域

を使うことが提案されている[15,16]．しかし，調査対象が濁水の場合は，ろ紙の目詰まりが発生することに加えて，eDNAが懸濁物質に吸着して粒度が大きくなることが報告されている[17]．このため，高濁度の水域を対象にeDNA法におけるろ過・濃縮手法の適用可否を検討し[18]，eDNA検出可否に及ぼす環境要因の検討を行う必要があるが，そのような研究事例は極めて限定的である．降雨時における濁水からeDNAを検出できる条件が理解され，その回収手法が確立されれば，流域における水生種・陸生種の双方を一斉にモニタリングすることも視野に入る．Staley et al（2018）は降雨後において河川，河川と繋がる雨水の排水口，海岸のeDNAを解析した[19]．結果として，排水口において，主に魚類および人間を検出し，河川において，降雨後に非人間哺乳類のDNAが増加した．しかし，検出された陸生哺乳類の放出源は不明瞭であり，人間の排泄物から検出された可能性が否定できないと考察している．また，eDNAの検出に影響を及ぼす環境条件は不明である．

そこで本研究では，畜産動物として宮崎市内に高頻度で分布するウシ（*Bos taurus*）を対象として，複数の降雨イベント時において河川水からeDNAを解析し，検出可否に影響する要因を検討した．宮崎市の年間降水量は日本全国において上位であり，多様な降雨形態における評価が可能となる．また，対象種をウシに設定した理由として，宮崎において，ウシは広汎的に分布していてその生息位置（i.e., eDNA放出源）も明瞭であり，近縁種がいないため偽陽性のリスクが極めて低いことが挙げられる．よって，本研究により，陸生種の検出に影響を及ぼす環境条件が整理される．

2．　材料と方法

(1)　調査領域と調査日

調査河川は，宮崎市内を流下し，集水域に牛舎が存在する清武川水系の3河川（水無川，岡川，田上川）および田上川に接続する用水路とした（**図-1**）．調査時期は2021年9月～2023年6月の降雨直後（赤江観測所により3時間合計雨量0~39 mm）において3～5回実施した．各調査においては，1 L の採水を2反復で実施した．2021年，2023年調査と2022年5月調査においては，降雨後調査の2時間後に2回目の調査を実施した．また，環境項目の測定のために250mlの採水を実施した．

(2)　eDNA濃縮と抽出

eDNA濃縮に使用したろ紙は，孔径0.7 μm（GF/F；ワットマン社）と2.7 μm（GF/D ；ワットマン社）のものを使用した． DNA抽出は，eDNA濃度の定量において変動性が小さいと報告されているEichmiller *et al.*（2016）の手法に倣い行った[20]．まず，滅菌した鋏とピンセットを用いて，クリーンベンチで約1×3 mmに切断した．その後，DNeasy PowerSoil Kit（QIAGEN社）を用いて切断したろ紙から既定のプロトコルに従いDNAを抽出した．

(3)　eDNA 定量とデジタル PCR の実施条件

ミトコンドリアのシトクロム b（Cytb）領域を標的とするプライマーおよびプローブ[21]を使用し，Forward primer=Reverse primer450 nM，Probe=125 nMの濃度で96°C で 10 分，60°C で 2 分間の変性，98°C で 30 秒間の伸長を 50 サイクルの条件により P を実施した．陽性と陰性のウェルを区別する蛍光強度の閾値は，Quant Studio 3D Analysis Suite（Applied Biosystems 社）のデフォルトの設定を採用した．ただし，陽性ウェルのプロットの蛍光強度が低く，陰性ウェルのプロットと蛍光強度により明瞭に分離されていない場合には，陰性であると判断した[22]．

(4)　環境因子

降雨時における河川水からの陸生種の検出可否は，陸域に存在するeDNAの水域への流出機構および輸送途中の分解・沈降に関わるパラメータに左右されると考えられる．このため，本研究ではeDNA検出可否に与える環境変数を選定し，eDNA濃度との関係性を評価した．表面流出の発生に影響すると考えられる環境変数として，降雨強度の指標である3時間合計雨量と流域土地利用の割合（ALOS 100 m解像度）を採用した．また，輸送途中の分解・沈降に影響すると考えられる環境変数として，河川に流入すると想定される点から調査地点までの河道距離（以下，流入点－調査点距離）と調査地点に近傍の牛舎から河川までの直線距離（以下，放出源－河川距離）を採用した．さらに，降雨に伴い河川水の濁度が高くなり，濁水からのeDNA回収は困難となる[23]ため，濁度（PT-200-TROAM，朝日サイエンス社）を選定した．土地利用について，ALOSから10項目の土地利用を森林，農地，市街地，その他，4項目にまとめた．その結果，調査河川流域の土地利用は水無川が森林78.2%，農地12.2%，市街地5.4%，岡川が森林47.9%，農地29.5%，市街地16.1%，田上川が森林16.7%，農地35.3%，市街地27.8%であった．表面流出の発生に関係が深い点を考慮し，森林の割合と市街地の割合を採用した．なお，放出源－河川距離と流入点－調査点距離はそれぞれ，水無川まで

表-1　環境項目測定結果と雨量情括弧内は 2 回目調査の結果，「-」は未観測を示

、	調査日	濁度(ppm)	電解度(μS/cm)	pH(-)	水温(℃)	降水量(mm)	放出源－河川距離(m)	流入点－調査点距離(m)
水無川	2021.11.22	55.20(5.78)	111.6(119.3)	7.37(7.37)	-	1.5(0)	144	260
	2022.5.12	19.30（25.38）	53.6(61.1）	7.96（7.91）	14.9（17.7）	14.5		
	2022.11.29	45.12	98.20	7.87	18.00	6.50		
	2023.6.2	285.82(110.31)	-(56.6)	7.72(6.16)	17.9(18)	30.5(14.5)		
田上川	2021.11.22	6.72（4.07）	119.4(126.6)	7.25(7.27)	-	0.5(0)	313	497
	2022.9.13	16.72	67.30	7.11	24.20	4.00		
	2022.11.29	138.54	39.80	7.18	19.00	42.00		
	2023.6.2	12.77(7.43)	-(76.7)	6.9(5.98)	21(21)	39.5(8.5)		
岡川	2022.5.12	174.52(46.73)	76.7(71.3)	7.44(7.18)	19.7(18.4)	12(7.5)	30	186
	2022.9.13	63.25	55.70	7.70	21.60	4.00		
	2023.6.2	314.34(112.33)	-(67.1)	7.47(6.09)	20.9(21)	36(14.5)		
用水路	2021.11.22	0.96(0.45)	164.7(166.2)	7.181(7.082)	-	0.5(0)	5	150
	2022.11.29	189.94	25.80	7.33	19.00	30.50		

約144 mと260 m，岡川まで約30 mと186 m，用水路まで約5 mと150 m，田上川まで約313 mと約497 mである．

(4) データ解析

陸生種の検出可否に影響を及ぼす要因の分析のために，eDNA濃度を目的変数，3時間合計雨量，濁度，放出源－河川距離，流入点－調査点距離，森林の割合，市街地の割合，ろ紙の種類を説明変数としたポアソン分布に基づく一般化線形モデルを構築した(glmTMBパッケージ，R4.3.1)．この際，未検出のについてはeDNA濃度を0とした．なお，2021年9月サンプルは濁度が未観測のため，欠損とした．

３．結果と考察

(1) 基礎環境項目

表-1に各河川における基礎環境項目を測定した結果を示す．水温は，5月12日の水無川サンプルと9月13日の田上川サンプル以外，調査日及び河川間において大きな差は見られず，17.9℃～21.6℃であった．pHの測定結果は，2023年6月2日の2回目のサンプルはやや低い（pH：5.98～6.16）が，それ以外は全体的に中性(pH：6.9～7.96)であり，水無川が高い値を示した．電解度の測定結果は，25.8 μS/cm～166.2 μS/cmの範囲であり，各河川における調査日間において大きな変動があった．2021年11月22日の結果は，地点に共通して他の調査日より大きい値を示した．濁度の測定結果については，流域の土地利用と降水量に応じて，大きな差が見られた（0.45 ppm～314.34 ppm）．降水量の増加により，濁度が高くなる傾向が見られた．市街地の割合が大きく，周辺に農地がある田上川と用水路において，雨量の増加に伴う濁度の増加幅が大きいことが分かる．

(2) eDNA 定量結果

図-2に降雨時における eDNA 定量結果を示す．47 サンプルのうち 42 サンプルにおいて eDNA が検出された．調査期別では，eDNA 濃度としては，2021 年 9 月期に 855～8267 Copies/L，11 月期に 0～1350 Copies/L，2022 年 5 月期に 250～3801 Copies/L，9 月期に 0～2934 Copies/L，11 月期に 4807～399185 Copies/L，2023 年 6 月期に 0～1040 Copies/L の範囲であった．よって，全調査地点において，降雨時における河川水試料から，安定的に陸生種を検出・定量できることが分かった．なお，降水量が多い 2022 年 11 月 29 において，高濃度のウシ DNA が検出されたのに対して，降水量が少ない 2021 年 11 月において，低濃度または非検出のサンプルが多かった．未検出の 5 サンプルのうち，水無川が 3 サンプルを占めた．よって，水無川においては相対的に陸域 eDNA が河川に流入しにくいことが示唆された．

ろ紙別の検出結果として，全体的に GF/F が多くの eDNA を回収できる傾向を示した．4 サンプルのみ GF/D のほうが多くの eDNA を回収したことを示した．これらのサンプル取得時における濁度は極めて高い傾向を有していた．よって，高濁度の水域から eDNA を回収する際には，GF/D が回収率において優位であることが示唆された．

各地点において，同流域にある用水路と田上川はすべての調査時期に渡って，最も安定的に検出できる結果となった．その理由として，これら地点から放出源までの距離が短いことが挙げられる．実際に，降水量が少ない時期（2021 年 11 月）においても検出ができている．これら地点を比較すると，同調査時期において，田上川に比べて用水路において高濃度で eDNA が検出される傾向が確認された．その理由として，田上川において，流入点－調査点距離が長く，下流まで輸送 される途中に eDNA が微生物による分解や物理的な作用（e.g., 沈降）を受けたことに加えて，支流の合流によって eDNA が希釈されたことが挙げられる．

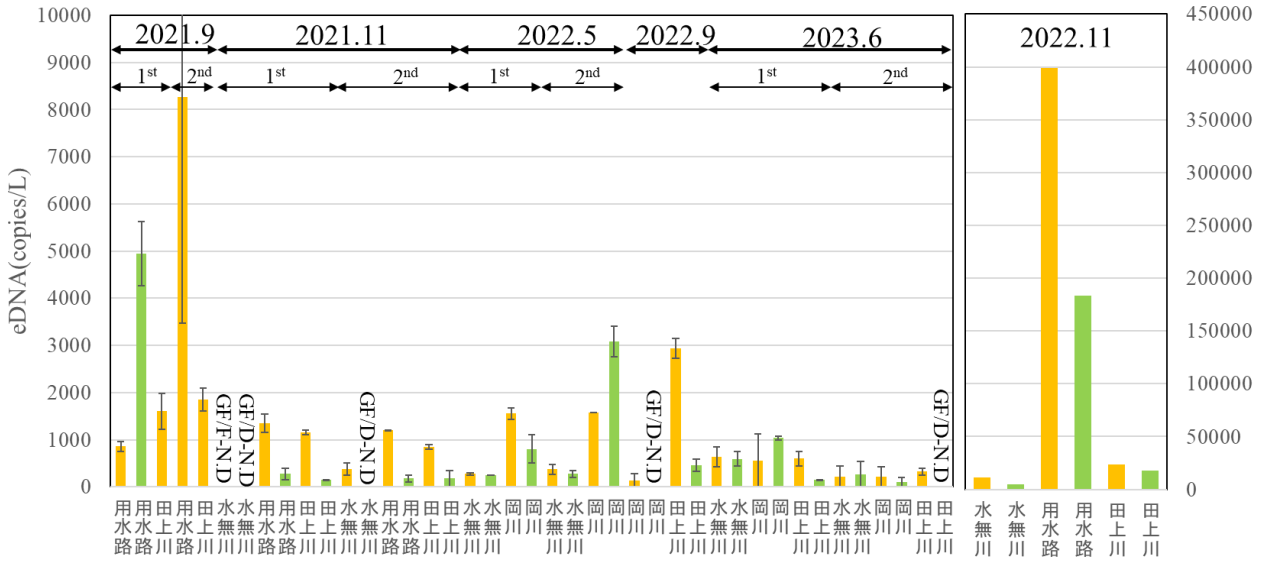


図-2　降雨時における eDNA の検出結果

3)　eDNA 濃度と各環境因子との相関

一般化線形モデルの結果を表-2 に示す．eDNA 濃度に対して，3 時間合計雨量，濁度，森林の割合，市街地の割合が有意な正の効果，流入点-調査点距離が有意な負の効果を有していた．これにより，降水量が多い条件において， eDNA の陸域から河川への流出・輸送が促進されることが示唆された．高濁度条件下において eDNA 濃度が高まる傾向が見られたが，これは濁度が降水量と相関を有していることも原因と思われる．流入点-調査点距離が長い条件において eDNA 濃度が低下する傾向は，陸域から河川に流入した eDNA が輸送に伴い生化学的な分解や沈降により減衰し，検出しにくくなることを示唆している．

4.　まとめ

本研究では，eDNA 手法を用いて，降雨時における河川から 2 種類の孔径の ろ紙を用いて，畜産動物として飼育されるウシを対象に陸生種の検出可否を検討した．また，eDNA 検出に影響する環境因子について回帰モデルによって評価した．得られ た主要な結果を以下に示す．

1)　宮崎市内の 3 河川を対象に，降雨時におい て計 10 回の eDNA 調査を実施した，結果として，強度の高 くない降雨イベント時も含めて，47 サンプル中 42 サンプルで eDNA が検出された．よって， 降雨時において河川から陸生種の DNA が安定的に 検出可能であることが示された．

2)　ろ紙別の eDNA 濃度の全体的な傾向として，孔 径の小さいろ紙（GF/F）の方が高い値を示した．しかし，高濁度条件下においては，孔径の大きいろ紙 （GF/D）において回収率が高まるケースも確認さ れた．よって，高濁度条件においては， GF/D を使用することが有益であることが考えられ る．

3)　一般化線形モデルにより，降雨時における陸生種の eDNA 濃度に対して降水量，濁度，森林の割合，市街地の割合が正の効果を有することが確認された．よって，降水量の増加は陸域の DNA の河川への輸送を促進することが示唆された．

表-2　一般化線形モデルの結果

Intercept	Estimate	Std. Error	z value	Pr(>|z|)
雨量	0.08458	0.000487	173.57	<0.05
濁度	0.006625	7.29E-05	90.93	<0.05
ソース源 - 河川距離	0.02277	0.01447	1.57	0.1155
流入点 - 調査点距離	-0.03005	0.01284	-2.34	<0.05
森林割合	3.146	0.4504	6.99	<0.05
市街地割合	8.819	1.21	7.29	<0.05
フィルター—GF/F	0.7426	0.00263	282.33	<0.05

参考文献

1)　Razgour, O., Kasso, M., Santos, H., Juste, J.: Up in the air:Threats to Afromontane biodicversity from climate change and habitat loss revealed by genetic monitoring of the Ethiopian Highlands bat, *Evolutionary Applications*, Vol114,pp794-806,2021

2)　Levin, SA. : Ecosystems and the Biosphere as Complex Adaptive Systems. *Ecosystems*, Vol.1, pp.431-436, 1998.

3)　Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P0. : Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, Vol.4, pp.423-425, 2008.

4)　Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, MN., and Kawabata, Z. : Surveilance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, Vol.16, pp.147-153, 2012.

5)　Darling, J. A. and Mahon, A. R. : From molecules to management : adopting DNA-based methods for

monitoring bio-logical invasions in apuatic environments. *Environmental Research*, Vol.111, No.7, pp.978-988, 2011 .

6) Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, Claude., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, GH., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J. M., Peroux, T., Crivelli, AJ., Olivier, A., Acqueberge, M., Brun, M. L., Møller, PR., Willerslev, E. and Dejean,T. : Next-gemeration monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, Vol.25, No.4, pp.929-942, 2015.

7) Rodgers, TW. and Mock, KE. : Drinking water as source of environmental DNA for the dentection of terrestrial wildlife species. *Conservation Genetics Resources*, Vol.7, pp.693-696,2015.

8) Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., Nikaido, M., Sado, T., Sato,Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M. and Miya, M. : Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, Vol.17, No.6, pp.e63-e75, 2017.

9) Coutant, O., Richard-Hansen, C., De Thoisy, B., Decotte, J . B., Valentini, A., Dejean, T., Vigouroux, R., Murienne, J. and Brosse,S. : Amazonian mammal monitoring using aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, Vol.21, No.6, pp.1875-1888, 2021.

10) Harper, LR., Handley, L. L., Carpenter, AI., Ghazali, M., Muri, C. D., Macgregor, CJ., Logan, TW., Law, A., Breithaupt, T., Read, DS., McDevitt, AD., and Hänfling, B. : Environmental DNA(eDNA) metabarcoding of pond water as tool to survey conservation and management priority mammals.*Biological Conservation,* Vol.238, 2019.

11) Seymour, M., Durance, I., Cosby, BJ., Ransom-Jones, E., Deiner, K., Ormerod, SJ., Colbourne, JK., Wilgar, G., Carvalho, GR., Bruyn, M. D., Edwards, F., Emmett, BA., Bik, HM. and Creer, S. : Acidity promotes degradation of multispecies environmental DNA in lotic mesocosms.*Communications Biology*, Vol.1, No.4, 2018.

12) Strickler, KM., Fremier, AK. and Goldberg, CS. : Quantifying effects of UV-B,temperature,and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms, *Biological Conservation*,Vol.183, pp.85-92, 2015 .

13) Mauvisseau, Q., Harper, LR., Sander, M., Hanner, RH., Kleyer, H. and Deiner,K. : The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about Their Presistence in Aquatic Environments, *Environmental Science & Technology*, Vol.56, No.9, pp.5322-5333, 2022.

14) .Valentin, R.E, Kyle, K., Allen, M.C., Welbourne, D.J. and Lockwood, J.L. : The state, transport, and fate of aboveground terrestrial arthropod eDNA, *Environmental DNA*,Vol.3, No.6, pp1081-1092,2021

15) Kumar, G., Farrell, E., Reaume, AM., Eble, JA. and Gaither, MR. : One size does not fit all:Tuning eDNA protocols for high-and low turbiduty water sampling, *Environmental DNA*, Vol.4, No.1, pp.167-180, 2022.

16) Minamoto, T., Naka, T., Moji, K. and Maruyama, A. : Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction, *Limnology*, Vol.17, pp.23–32, 2016.

17) Barnes , AM., Christopher, Lindsay. W., Jerde, L. C., Mahon, R. A., Turner, R. C., Lodge, M. D. : Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems, *Envitomental DNA*, Vol.3, No.3, pp.643-653, 2020.

18) 糠澤桂，深川柊，鈴木祥広：高濁度水への eDNA 法の適用に向けたろ過・濃縮方法の基礎的検討．土木学会論文集 G（環境）,Vol.76, No.5, pp.I_19-I_26, 2020.

19) Staley, ZR., Chuong, J. D., Hill, SJ., Grabuski, J. Shokralla, S., Hajibabaei, M., Edge, TA.:Fecal source tracking and eDNA profiling in an urban creek following an ectreme rain event, *scientific reports*, 8, 14390, 2018

20) Eichmiller, JJ., Miller, LM., and Sorencen, PW. : Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish, *Molecular Ecology Resources*, Vol.16, No.1, pp. 56-68, 2016.

21) Dooley, J. J., Paine, E. Kelly., Garrett, D. S. and Browna, M. Helen. : Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays, *Meat Science*, Vol.68, No.3, pp.431-438, 2004.

22) Nukazawa, K., Akahoshi, K., Suzuki, Y. : Are bacteria potential sources of fish environmental DNA? , PLoS ONE, 2020.

23) Kakuda, A., Doi, H., Souma, R., Nagano, M., Minamoto, T.and Katano, I. : Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, Trachemy scripta elegans, in pond and the influence of water quality,*BIODIVERSITY AND CONSERVATION*,2019