環境DNA調査による底生魚（アカザ）の不検出要因と採水方法の検討

松浦　崇裕[1]・坂口　幸太[2]・五十嵐　公太[3]・大島　正憲[4]・
小野　直哉[5]・高橋　隆一[6]・奥泉　楓[7]

[1]八千代エンジニヤリング株式会社（〒111-8648 東京都台東区浅草橋 5-20-8 CS タワー）
E-mail：tk-matsuura@yachiyo-eng.co.jp
[2]八千代エンジニヤリング株式会社九州支店（〒810-0073 福岡県福岡市中央区舞鶴 3-9-39 福岡舞鶴スクエア）
E-mail：yt-sakaguchi@yachiyo-eng.co.jp
[3]八千代エンジニヤリング株式会社（〒111-8648 東京都台東区浅草橋 5-20-8 CS タワー）
E-mail：kt-igarashi@yachiyo-eng.co.jp
[4]正会員　八千代エンジニヤリング株式会社（〒111-8648 東京都台東区浅草橋 5-20-8 CS タワー）
E-mail：ms-oshima@yachiyo-eng.co.jp
[5]新潟県柏崎地域振興局地域整備部ダム建設課（〒943-8551 新潟県柏崎市三和町 5-55）
E-mail：ono.naoya@pref.niigata.lg.jp
[6]新潟県柏崎地域振興局地域整備部ダム建設課（〒943-8551 新潟県柏崎市三和町 5-55）
E-mail：takahashi.ryuichi@pref.niigata.lg.jp
[7]新潟県柏崎地域振興局地域整備部ダム建設課（〒943-8551 新潟県柏崎市三和町 5-55）
E-mail：okuizumi.kaede@pref.niigata.lg.jp

鵜川ダムは新潟県鵜川水系に位置する建設中のダムであり，今後試験湛水予定である．試験湛水に伴い，平成28年度～令和3年度に行った環境調査をもとに環境影響評価を行い，底生魚であるアカザへの影響が大きいと予測された．そのため，移殖等による環境保全措置を実施し，生体への不可がない環境DNA調査をモニタリング手法として実施した．令和3年度から移殖とともに環境DNA調査を実施していた．しかし，令和3年度では，複数個体のアカザが捕獲されたが，環境DNAでは検出されなかった．令和4年度は既往文献等をもとに採水条件のパターン別に複数検討した．その調査結果をもとに，アカザの不検出要因と希少種のモニタリングにおける環境DNAの採水方法を検討した．

Key Words : *environmental DNA, quantitative PCR, Liobagurs reini, non-detection factors, monitoring survey*

1. はじめに

(1) 調査地区と環境影響評価の概要

鵜川ダムは，新潟県鵜川水系上流に位置する建設中のダムであり，今後試験湛水を予定である（**図-1**）．試験湛水実施に伴い，平成28年度～令和3年度に行った環境調査結果をもとに環境影響評価を実施した．その結果，ダム湛水予定区域内に複数個体のアカザ（環境省レッドリスト：VU，新潟県レッドリスト：NT）が確認され，試験湛水実施による生息環境及び産卵環境への影響が大きいと予測された．アカザの環境保全措置の一つとして，ダム湛水予定区域内から流入支川への移殖を令和3年度から実施した．また，移殖先におけるアカザの定着の有無のモニタリング手法の一つとして，生体への負荷がない環境DNAによる調査を採用した．

(2) 令和3年度のアカザに関する調査結果の概要

令和3年度のアカザに関する調査概要を**表-1**に示す．捕獲調査方法は，平成28年度～令和3年度の環境調査で捕獲個体数の多い手法（主に定置網）で実施した．環境DNA調査は，「環境DNA調査・実験マニュアルver2．2」[注1)]に準拠した．環境DNAの分析手法は，DNA Data Bank of Japanのデータを基に作成したアカザに特異的に反応

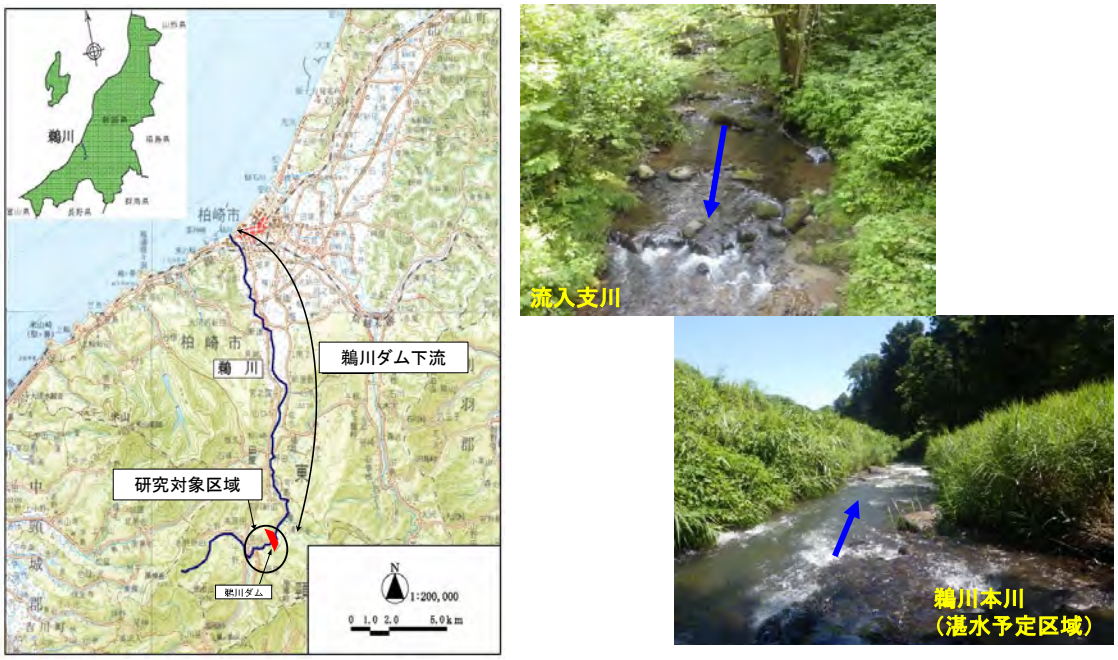

図-1 調査位置と現地の環境

表-1 令和３年度の調査結果

No.	調査実施時期	アカザの捕獲数	採水量	採水場所	採水時間	DNA 濃度（copies/ml）
1	9 月上旬	16	1L	水脈筋（瀬環境）で採水	日中のみ	未検出
2	9 月下旬～10 月上旬	6				
3	11 月上旬	0				

するプライマーを用いた種特異的な定量PCRを実施した．

令和3年度調査では，第1回（9月上旬）と第2回（9月下旬～10月上旬）調査では，アカザが複数個体捕獲されたが，環境DNAでは検出されなかった．

本研究では，令和3年度の調査結果及び手法を踏まえて，令和4年度の環境DNA調査は採水方法・採水地点について複数条件で実施し，アカザの不検出要因の検討を行った．また，本検討の内容と既往文献をもとに，一般的に環境DNAでの検出が難しい底生魚[1,2]に関する採水条件について検討した．

2. 調査方法

(1) 調査対象河川

調査地点は鵜川ダム湛水区域内及びアカザの移殖先である流入河川で実施した．なお，本論文内においてアカザ保全の観点から調査位置は明記せず，湛水予定区域と流入河川と表記する．

令和4年度調査時期は捕獲調査及び環境DNA調査ともに8月下旬，9月下旬及び11月上旬の合計3回調査を実施した．

(2) 捕獲調査方法

捕獲調査は，令和3年度の調査でほとんどの個体が定置網で捕獲された結果を踏まえて定置網のみを実施した．調査地点は，湛水予定区域と流入河川でそれぞれ実施した．

湛水予定区域で捕獲されたアカザは移殖先である流入河川で放流した．

(3) 環境DNAの採水方法

環境DNAの採水方法は**表-2**に示すとおりである．

採水量は全調査時期で4Lとした．これは，メタバーコンディング法による検出種数は採水量が増加するにつれて増加傾向にあること[注2)]や採水量とサンプル中に含まれるDNAの総量[1,2]が比例関係にあることを踏まえて，アカザの検出確率の期待値をあげるためである．

採水地点は，川岸の淵環境とした．既往文献より，川岸の方が水脈筋より検出確率が高いこと[注2),3)]が示されているため，令和3年度の採水地点から変更した．

採水時間は，アカザが夜行性であり，夜間の方がより活発に動きDNAが検出しやすくなる可能性を検証するために，日中と夜間の両方で採水を行った．

また，アカザなどの底生魚は移動性が低く地域個体群

毎に遺伝的分化が進んでいる可能性があり，作成したプライマーではPCR反応が起こらない可能性がある．そのため，捕獲したアカザのヒレを用いたプライマーの検証も実施した．第1回調査（9月上旬）に捕獲されたアカザの個体からヒレを採取し，本分析で使用しているプライマーによるDNAの増幅の有無を確認した．

(4) 環境DNA分析方法

採水サンプルは，塩化ベンザルコニウムを採水1Lに対して約1mlの比率で添加し，クーラーボックスに入れ遮光・冷却状態で実験室に運搬した．サンプルのろ過・分析については，基本的に「環境DNA調査・実験マニュアルver2．2」[注1)]に準拠した．

サンプルをろ過したフィルターからMPure Bacterial DNA Extraction Kit を用いてDNAを抽出した．抽出したDNAはDNeasy PowerClean Pro Cleanup Kitを用いてPCR阻害物質の除去を行った．抽出・精製したDNA溶液はそれぞれ4つのサンプルに分注して以下の作業を実施した．抽出・精製したDNAはquantitative PCR（qPCR）で蛍光シグナルを測定した．qPCRをおこなう際に用いたアカザ特異的なプライマーとTaqMan蛍光プローブの配列はDNA Data Bank of Japanのデータを基に作成した．使用したプライマー，TaqMan蛍光プローブについては超純水を使用して同様にqPCRをおこない，蛍光シグナルが生じないことを確認した．

また，標準試料として，PCRごとにプラスミドによってクローニングされたアカザの人工DNAを47， 470，4700， 470000 copiesについて測定し，それらの結果から検量線を作成することによりサンプルの定量化をおこなった．

3. 調査結果

捕獲調査結果及び環境DNA調査結果を**表-2**に示す．9月下旬の調査結果ではアカザのDNAが検出された．また，9月下旬の流入河川では捕獲調査では確認されなかったが，環境DNA調査の方で検出されたことから，生息している可能性が高い．一方で，8月下旬では，湛水予定区域内で，48個体確認されたが，DNAでは検出されなかった．

なお，11月中旬は水温も低くなり，アカザの活動が鈍くなり捕獲調査でも，アカザは確認されなかった．

また，現地で捕獲されたアカザのヒレを用いたプライマーの検証では，PCRによるDNAの増幅が確認された．このことから，本分析で使用しているプライマーは鵜川に生息するアカザのDNAに反応することが確認された．

4. 考察

(1) 不検出要因の検討と対応策

令和4年度の調査結果と令和3年度の調査結果を比較して，令和3年度のアカザの不検出要因は以下の2点であると考えられる．

① アカザから放出される細胞片の量
② 採水地点の瀬淵環境

アカザは底生魚であり，体長約10cm～15cmの小型魚である．そのため，他の遊泳魚や中型～大型魚等と比較して，放出される細胞片の量が微量であることが，環境DNAによる不検出要因であると考えられる．これに対する対応策として，採水量を増やすことが挙げられる．採水量が増えることにより，採水サンプル中に含まれるDNAの総量が増え，河川中に微量でしか存在しない魚種も検出しやすくなると考えられる．類似の傾向として，メタバーコンディング法による検出種数と採水量の関係がある[注2)]．これは採水量の増加に伴い，サンプル内のDNAの総量が増加し[2)]，濃度が低い種も検出できることに起因している．

採水地点の瀬淵環境については，本調査の結果からは淵環境の方が検出する可能性が高いと考えられる．これは，流速が遅い場所の方が，魚類の細胞片が長時間浮遊していることが多く，検出しやすくなると考えられる．

表-2 令和４年度の調査結果概要

年度	調査実施時期	採水地点	アカザの捕獲数	採水量	採水場所	採水時間	DNA 濃度 (copies/ml)
R4	8 月下旬	湛水予定区域内	48	4L	川岸（淵環境）で採水	日中と夜間の両方実施	未検出
		流入河川	—※1				
	9 月下旬	湛水予定区域内	19			日中のみ	1．8
		流入河川	0				0．7
	11 月中旬	湛水予定区域内	—※2				—※2
		流入河川	0				未検出

※1：令和４年度第１回の調査のため，移植先である流入河川では捕獲調査は実施していない．

※2：令和４年度第３回調査は移殖先である流入河川での定着の有無を確認する調査のため，湛水予定区域内では捕獲調査・DNA 調査は実施していない．

表-3　本研究結果と既往文献の比較

No.	文献名	対象種	採水量	瀬淵環境	採水時間帯	周辺環境	採水地点数	備考
1	本研究	アカザ	●	●	×	—	—	
2	Takahara et al., (2022)[4]	ネコギギ	—	×	×	—	—	
3	篠原ら（2022）[3]	多種	—	●	—	—	●	
4	渡部ら(2021)[注2]	多種	●	●	—	—	—	
5	Jerde et al., (2016)[5]	多種	—	—	—	●	—	河床材
6	Jane et al., (2015)[6]	多種	—	—	—	●	—	落葉の有無
7	Santas et al., (2013)[7]	サンショウウオ	●	—	—	—	—	
8	Tréguier et al., (2014)[8]	アメリカザリガニ	—	—	—	—	●	
9	Piaggio et al., (2014)[9]	アメリカザリガニ	—	—	—	—	●	
10	Muha et al., (2019)[10]	多種	●	—	—	—	—	

※●：影響あり，×：影響なし，—：未検討

表-4　底生魚に関する環境 DNA の採水条件（案）

項目	内容
採水量	4L
採水地点の瀬淵環境	淵環境
採水時間帯	大きな影響は及ぼさない
採水方法	海綿を使用したサンプリング

一方で，採水時間帯による影響は本調査では確認されなかった．これは，アカザが日中瀬環境に隠れている習性があるためだと思われる．日中は瀬環境に生息しているため，アカザの活動量に関わらず細胞片は流下しやすく，環境DNAの検出確率には大きな差は確認されなかったと考えられる．

(2) 底生魚に関する環境DNAの採水条件（案）

本研究の調査結果と既往文献を整理したものを表-3に示す．本調査を含めて，他の多くの既往文献から採水量や瀬淵環境は検出確率に影響を及ぼすことが示唆された．一方で，採水時間帯による検出確率に影響があると示されている論文は少ない．

以上のことを踏まえて，底生魚に関する環境DNAの採水条件（案）を考案する（表-4）．また，最新の研究では、従来のポリビンやバケツ等による河川水の採水方法より，海綿を河川に設置し，海綿からDNAを抽出する方法がより多くのDNAをサンプリングできると考えられる[11]．従来のポリビンやバケツ等による採水は採水した瞬間に周辺に存在しているDNAのみを分析する．一方で，海綿を利用したサンプリング方法では，海綿を設置している間の積分値賭してDNAを分析することができる．そのため，低濃度のDNAを分析する際には適していると考えられる．

一方で，この採水条件が全ての場合で最も効率のよい手法である可能性はない．山中ら（2016）[12]でも指摘してるようにその現場特有の条件や対象種の特性も存在するため，表-4に示した採水条件を一つの指標として，現場環境や対象種の特性を考慮して採水条件を設定することがよいと考えられる．

謝辞：本稿に示した調査・解析については新潟県柏崎地域整備部の発注業務の一部として実施したものを含んでいる．ここに記して御礼申し上げる．

NOTES

注1) 一般社団法人環境 DNA 学会：環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver2.2, 2020

注2) 渡部 健, 真木 伸隆, 池田 幸資, 小菅 敏裕, 岡田 泰明. : (2021) 環境 DNA 分析における採水量の最低木化及び中小河川流域の魚類相評価の検討. 国立研究開発法人 土木研究所 流域生態チーム公表資料

REFERENCES

1) Muha T.P., Robinson C.V., Garcia de Leaniz C., Consuegra S. : (2019) An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. PLoS One. 14(7):e0219218.

2) 土居秀幸, 近藤倫生：（2021）環境 DNA 生態系の真の姿を読み解く. 共立出版. [Doi, H. and Kondoh, M. : Enviromental DNA Deciphering the True Nature of Ecosystems, Kyorithu Syuupan. 2021.]

3) 篠原 隆佑, 村岡 敬子, 菅野 一輝, 天羽 淳, 中村 圭吾. : (2022) 環境 DNA 分析の河川の魚類調査への適用に向けた最適な採水地点の検討. 河川技術論文集. 第 28 巻. 181-186. [Shinohara T., Muraoka K., Sugano K., Amou J., and Nakamura K. : Investgation of water sampling sites for application of environmental DNA to fish surveys in rivers. Advances in river engineering. Vol. 28, pp. 181-186, 2022.]

4) Takahara T., Doi H., Kosuge T., Nomura N., Maki N., Minamoto T. and Watanabe K. : (2022) Effective environmental DNA collection for an endangered catfish species: testing for habitat and daily periodicity, Ichthyological Research, https://doi. org/10. 1007/s10228-022-00900-2

5) Jerde C. L., Olds, B.P., Arial J. Shogren., Elizabeth A. Anderuszkiewicz., Anderw R. Mahon., Diogo Bolster., and Jennifer L. Tank. : (2016) Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. Environmental Science & Technology, 50, 8770-8779

6) Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Schwartz MK, Lowe WH, Letcher BH, Whiteley AR : (2015) Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. Molecular Ecology Resources, 15:216-227
7) Santas AJ, Persaud T, Wolfe BA, Bauman JM : (2013) Noninvasive method for a statewide survey of Eastern Hellbenders Cryptobranchus alleganiensis using environmental DNA. International Journal of Zoology, 2013, 17456
8) Tréguier A, Paillisson JM, Dejean T, Valentini A, Schlaepfer MA, Roussel JM : (2014) Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish Procambarus clarkii in freshwater ponds. Journal of Applied Ecology, 51:871-879
9) Piaggio AJ, Engeman R, Hopken MW : (2014) Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. Molecular Ecology Resources, 14:374- 380
10) Muha T.P., Robinson C.V., Garcia de Leaniz C., Consuegra S. : (2019) An optimised eDNA protocol for detecting fish in lentic and lotic freshwaters using a small water volume. PLoS One. 14(7):e0219218.
11) Cai W., Harper L. R., Neave E.F., Shum P., Craggs J., Arias M. B., Riesgo A., and Mariani S. : (2022) Environmental DNA persistence and fish detection in captive sponges. Molecular Ecology, 22, 2956–2966. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13677
12) 山中 裕樹, 源 利文, 高原 輝彦, 内井 喜美子, 土居 秀幸 : (2016) 環境 DNA 分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, 66:601-611. [Yamanaka Y., Minamoto T., Takahara T., Uchii K., and Doi H. : Environmental DNA analysis in field research. Japanese Journal of Ecology. Vol 66, pp. 601-611, 2016]

(Recieived June 13, 2023)
(Accepted August 21, 2023)

STUDY OF NON-DETECTABLE FACTORS AND WATER SMAPLING METHODS OF BENTHIC FISH (LIOBAGRUS REINI) BY ENVIRONMENTAL DNA SURVEY

Takahiro MATSUURA, Yuta SAKAGUCHI, Kota IGARASHI,Masnori OSHIMA, Naoya ONO,Ryouichi TAKAHASHI, And Kaede OKUIZUMI

The Ukawa Dam, located in the Ukawa River system in Niigata Prefecture, is under construction and is scheduled to be flooded in the future. With the test flooding, an environmental impact assessment was conducted based on environmental surveys conducted from 2018 to 2021, and it was predicted that there would be a significant impact on the benthic fish, *Liobagrus* reini. Therefore, we carried out environmental preservation measures such as relocation of the fish, and considered an environmental DNA survey as a monitoring method that is not harmful to the fish. Since 2021, we have been conducting environmental DNA surveys as well as translocations. However, in 2021, several *Liobagrus* reini were captured, but were not detected by environmental DNA. In 2022, we examined several patterns of water sampling conditions based on previous studies. Based on the survey results, we examined the factors of non-detection and the method of environmental DNA sampling for monitoring rare species.