

環境DNAによる魚類の網羅的解析の河川水辺の 国勢調査への導入に関する検討

STUDIES FOR IMPLEMENTATION OF ENVIRONMENT DNA
METABARCODING INTO NATIONAL CENSUS ON RIVER ENVIRONMENT

内藤太輔¹・赤松良久²・都築隆禎³・横山良太⁴・畔上雅樹⁵・宮本健也⁶・乾隆帝⁷

Daisuke NAITO, Yoshihisa AKAMATSU, Takayoshi TSUZUKI, Ryota YOKOYAMA,
Masaki AZEGAMI, Kenya MIYAMOTO and Ryutei INUI

¹正会員 修(理) 山口大学大学院創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1)

²正会員 博(工) 山口大学大学院 教授 創成科学研究科
(〒755-8611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1)

³正会員 公益財団法人リバーフロント研究所 次長 (〒104-0033 中央区新川1丁目17-24)

⁴非会員 博(水) 株式会社建設環境研究所 環境部 主査研究員
(〒170-0065 豊島区東池袋2丁目23-2)

⁵非会員 株式会社建設環境研究所 環境部 主査研究員 (〒170-0065 豊島区東池袋2丁目23-2)

⁶正会員 前公益財団法人リバーフロント研究所 主席研究員 (〒104-0033 中央区新川1丁目17-24)

⁷正会員 博(農) 福岡工業大学 准教授 社会環境学部
(〒811-0295 福岡県福岡市東区和白東3丁目30-1)

In order to obtain basic information for the implication of environmental DNA (eDNA) analysis into the National census on river environment in Japan (NCRE), the eDNA metabarcoding of fish was conducted in conjunction with the fish survey in NCRE. The survey was carried out in 48 habitats (pools, riffles etc.) in 15 study areas of 4 rivers. Environmental DNA analysis was less consistent with fish surveys at the habitat scale (50~100m scale), but was highly consistent (>70% on average) with fish surveys at the study area scale (~1 km section) and riverwide. It is considered that eDNA analysis using water samples from several habitat categories then evaluating it at the scale of the study area would detect more than 70% of the species caught in the fish survey. In addition, eDNA analysis using samples from the bottom layer could detect benthic fish that may leak out of the sampling of surface water alone.

Key Words : *environmental DNA, metabarcoding, fish, river, national census on river environment*

1. はじめに

河川水辺の国勢調査(以下、水国調査)は、定期的に河川環境をモニタリングする調査として、平成4年より実施され、河川管理を行う上で重要な環境情報を蓄積してきた¹⁾。環境に配慮した河川管理を行うためには、これらのモニタリング調査を活かしつつ、新技術を用いて効率的により多くの環境情報を取得することが求められている。

水域における環境調査の新技術として、水中に存在する生物由来のDNAを分析して生息情報を得る環境DNA分析が、簡便かつ効率的な生物調査技術として注目されている²⁾。とくに、魚類の汎用プライ

マーMiFish³⁾を用いて生息する魚類を網羅的に検出する解析法(メタバーコーディング:以下、環境DNA調査)は、煩雑なデータ処理が自動化されていること、種判別に必要なDNAデータが日本産の淡水魚類の9割以上で網羅され充実していることから、特に日本の淡水魚類の調査において有効な手段の一つと考えられている⁴⁾。これらのことから、魚類の環境DNA調査は、日本の河川環境のモニタリング調査である水国調査への導入が期待されている¹⁾。

一方で、水国調査は、全国で統一された基準で調査され、膨大なデータが蓄積されていることから、環境DNA調査の水国調査への導入にあたっては、これまで蓄積してきたデータとの整合性、適切なデー

タを得るための統一した調査方法とその留意点などの検討が必要である。

環境DNA調査の水国調査への導入を念頭にした先行研究⁹⁾では、環境DNA調査は同一の調査地区で実施された水国調査（採捕による魚類調査）に比べて確認種数が多く有効な調査手法であることが示された一方で、環境区分（瀬・淵・ワンド等）ごとの確認種の構成が両手法で異なる場合があること、水国調査で確認された魚類（特に底生魚類）が環境DNA調査で確認されない場合があることなどが示された。

そこで、本研究では、水国調査の魚類調査に合わせて、魚類の環境DNA調査を行い、先行研究で課題とされた、環境DNA調査の結果が反映する生物情報の範囲（魚類調査との確認種の整合性が高い範囲）、および底生魚類を検出する方法を検討した。以上から、本技術の水国調査への導入のための基礎情報を取得することを目的とした。

2. 調査方法

(1) 調査対象河川

近年、河川水辺の国勢調査（魚類調査）を実施した河川の中から、鵠川、木津川（以上、平成29年度）、石狩川、および木曽川（以上、平成30年度）を対象河川とした（表-1）。本研究では淡水区間を主な対象としたため、魚類調査が上流域に限定された、あるいは汽水域の区間が短い河川を選定した。なお、鵠川および木津川は既往調査結果⁹⁾を用いた。

(2) 調査の概要

環境DNA分析に供する検体は、各河川の国土交通大臣直轄管理区間に設定されている河川水辺の国勢調査（以下、魚類調査）の調査地区から採水した。

採水は、魚類調査の作業前（直前から1週間程度前）に実施した。いずれの河川の調査においても、採水作業と魚類調査の間に大きな出水はみられなかった。

調査地区のさまざまな環境に生息する魚類を把握するために、魚類調査および採水は、調査地区内の主要な環境区分である、早瀬、平瀬、淵、ワンド・たまり、支川等で行った。

魚類調査は、平成28年度版河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版]（魚類調査編）⁶⁾に従い、投網、タモ網、サデ網、刺し網、定置網、地曳網、セルビン、はえ縄、電撃捕獲器、および潜水目視など、環境区分や魚類の特性に応じた調査方法により実施した。

環境DNA調査に供する検体の採水については、各環境区分の表層水を1L採水した。また、底生魚類を効果的に確認する方法を検討するために、石狩川および木曽川では、淵において、表層および底層で採水を行い、結果を比較した。

(3) 環境DNA分析

採水検体は、塩化ベンザルコニウム10w/v%水溶

表-1 調査対象河川

河川	幹川流路 延長(km)	直轄管理区間の 延長(km)	調査地区 の数	調査環境 区分の数
石狩川_上流	268	119	4	8
鵠川	135	河口～42.9	3	12
木曽川_上流	229	23.0～70.4	4	12
木津川_上流	210	43.4	4	16
計			15	48

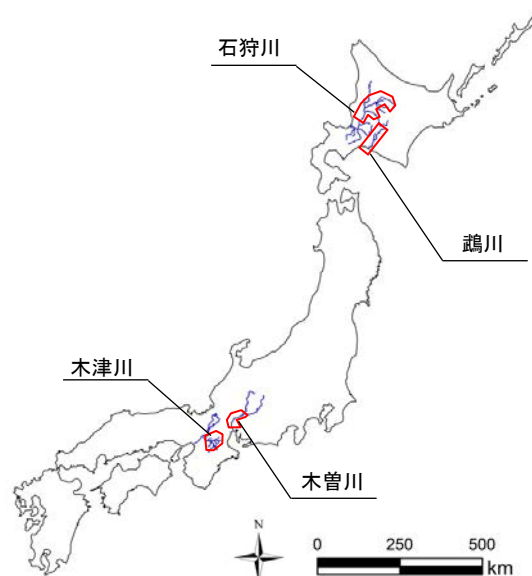


図-1 調査対象河川の位置図

液を0.1%になるように添加、クーラーブランク（純水、1L）とともに遮光・冷蔵状態で実験室に運搬した。

以後のろ過・分析については、基本的に環境DNA調査・実験マニュアルver2.1⁷⁾に準拠した。

検体をろ過したフィルター（ワットマンGF/Fフィルター）からDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを魚類のユニバーサルプライマーMiFishで増幅し、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) により塩基配列を決定した。塩基配列データは、MiFishパイプライン⁸⁾により解析した。得られた解析結果（配列の相同性97%まで確認）は、公開されているデータベース (DNA Data Bank of Japan) ⁹⁾に照合して種を確定した。なお、100リード以下のデータは、潜在的なコンタミネーションや不十分な反応を含むものとして、以後の解析から除外した。さらに、淡水域で検出された海産魚については、コンタミネーションや生活排水等の人間活動の影響と判断し、データから除外した。

種の同定にあたっては、“MiFish による種の識別に注意を要する淡水魚類リスト¹⁰⁾”を参照し、種判別が困難な種は、属までの同定（例：ヨシノボリ属）とした。種名は、基本的に河川水辺の国勢調査のための生物リスト（令和元年度版）¹¹⁾に従った。

(4) 魚類調査と環境DNA調査の結果の比較

環境DNA分析に基づく魚類リストは、魚類調査の

結果と比較し、検出力（確認種数等）および精度（魚類調査の結果との整合性）等の評価した。

環境DNA調査と魚類調査の結果は、以下の考え方および方法で比較した。

a) 環境DNA調査の結果が反映する生物情報の範囲の検討

環境区分ごとの確認状況：環境DNA調査は魚類が利用している環境を反映しているかを把握するために、同一調査地区内の同一環境区分（50～100m程度の範囲）での結果を比較した。

調査地区ごとの確認状況：環境DNA調査により、調査地区の範囲（約1km程度区間）の魚類の生息状況を把握できるかを検証した。

河川全体での確認状況：環境DNA調査により、河川全体の魚類生息状況を把握できるかを検証した。

b) 底生魚類を効率的に検出する方法の検討

底生魚類が生息している河川の淵において底層の河川水を採水し、表層での結果と比較した。なお、対象は、石狩川、木曽川の2河川とした。

c) 魚類調査と環境DNA調査の結果の比較方法

魚類調査と環境DNA調査の結果の比較では、環境DNA調査でのみ確認された種数、魚類調査でのみ確認された種数、および両方の手法で共通して確認された種数を集計した。

これらの集計から、魚類調査の確認種数に占める両手法での共通確認種数の割合（整合率）¹²⁾を求めて評価した（式1）。整合率は、魚類調査による確認種が環境DNA調査によって、どの程度検出できるのかを示す指標であり、整合率が高ければ魚類調査に対する環境DNA調査の代替性が高いと考えられる。

$$\text{整合率} = \frac{\text{魚類調査と環境DNA調査の共通確認種数}}{\text{魚類調査の確認種数}} \quad (1)$$

3. 結果と考察

(1) 環境DNA調査および魚類調査で確認された種

石狩川と木曽川における環境DNA調査および魚類調査の結果（種のリスト）を付録に示す。なお、鵡川と木津川の結果は、既往調査結果⁵⁾を用いた。

(2) 調査地区内の環境区分ごとの比較

各河川に設定された調査地区内の環境区分（瀬、淵、ワンド・たまり等）ごとの確認種数について、魚類調査と環境DNA調査の結果を比較したものを図-2に示す。

全48件中38件で環境DNA調査の方が魚類調査よりも確認種数が多かった。木曽川を除く3河川では、環境DNA調査の確認種数が魚類調査のもの上回る件数の方が多く、特に木津川では16件すべてで、鵡川でも調査地区4の支川1件を除く11件で、環境DNA調査の方が多かった。一方、木曽川では、環境DNA調査の確認数の方が多かったのは、12件中4件で、魚類調査の方が確認種数で上回る環境区分が多かった。

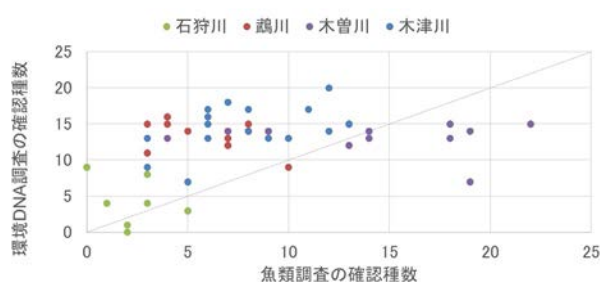


図-2 魚類調査と環境DNA調査の確認種数の比較（環境区分スケール）

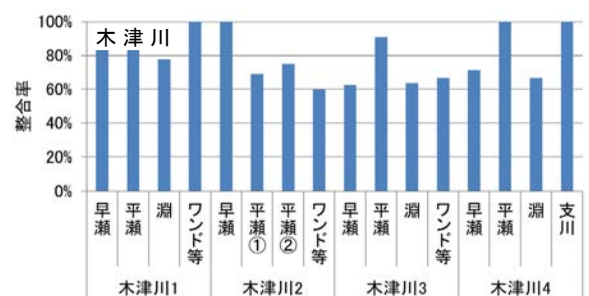
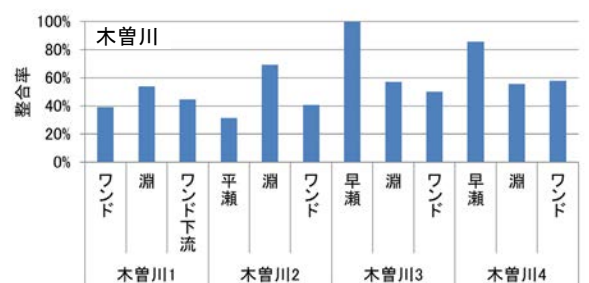
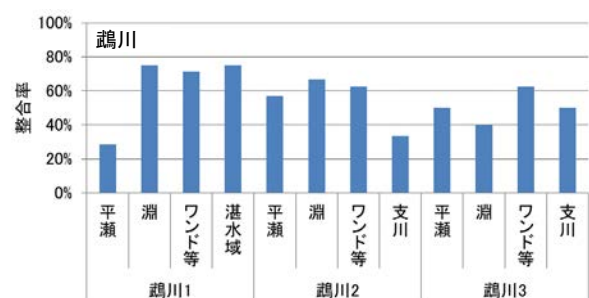
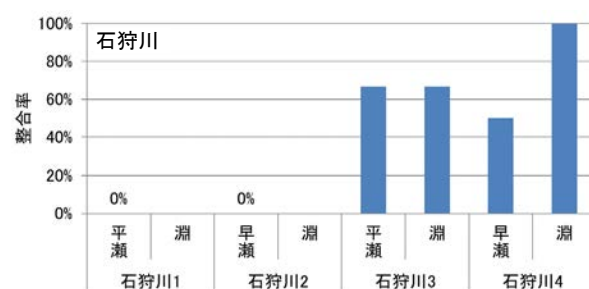


図-3 環境区分ごとの整合率
※ワンド等：ワンド・たまり

環境区分ごとの整合率を図-3に示す。なお、石狩川の調査地区1, 2の淵では、魚類が採捕されなかったことから、整合率は算出されなかった。

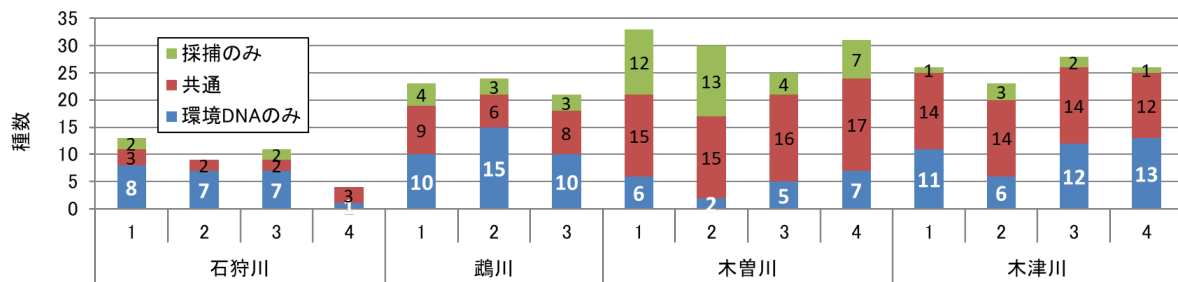


図-4 調査地区ごとに集計した調査手法別の確認種数

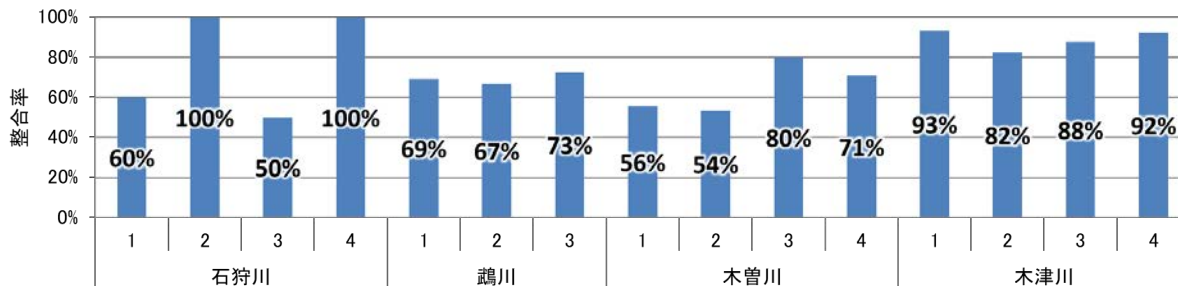


図-5 調査地区ごとの整合率

整合率は、4河川全体では0～100%（平均63%，標準偏差23），石狩川で0～100%（平均47%），鵜川で29～75%（平均56%），木曽川で32～100%（平均57%），木津川で、60～100%（平均79%）となり，すべての河川で環境区分ごとのばらつきが大きかった。木津川では，すべての環境区分において魚類調査での確認種の6割以上が環境DNA調査により確認できた。

以上から，瀬，淵，ワンド・たまり等の環境区分のスケール（50～100m程度の区間）では，環境DNA調査と魚類調査で確認種数の大小，整合（整合率）は河川ごと，環境区分ごとのばらつきが大きく，一定の傾向は見られなかった。

各環境区分で1Lずつ採水する環境DNA調査では，水国調査における環境区分スケールの魚類の生息状況を必ずしも反映していない可能性が考えられた。

(3) 調査地区ごとの比較

4河川15調査地区における調査手法ごとの確認種数を図-4に，整合率を図-5に示す。

調査地区のスケールでは，15件中13件で，環境DNA調査の確認種数が魚類調査のものと同等もしくはそれを上回った。環境DNA調査の確認種数が魚類調査を下回った2件はいずれも木曽川（調査地区1，2）であった。

これは，木曽川での環境DNA調査では，とくにワンド・たまりにおける確認種数が魚類調査に比べて少なかったためであると考えられる。今回採水した木曽川のワンド・たまりは，100m～数百m程度の比較的大きなものが多かった。止水域で水の循環に乏しいワンド・たまり内では，場所ごとの違いが大きく，分析した1箇所の検体だけでは，生息する魚類の情報を捕捉できなかった可能性が考えられる。

整合率でみると（図-5），4河川では，調査地区

ごとの値は54～100%（平均76%，標準偏差16）であった。河川別では，木曽川および石狩川において，それぞれ2つの調査地区で6割以下となる低い整合率となった。ただし，石狩川については，母数となる魚類調査の確認種数が他河川と比較して少なく，魚類調査の確認種のうち，環境DNA調査で確認できなかった種は，該当調査地区1，3いずれにおいても2種のみであった。一方で，木曽川では，該当調査地区1，2において，魚類調査の確認種のうち，環境DNA調査で確認できなかった種は，それぞれ12種，13種であり，他の調査地区と比較しても多かった。これら4調査地区を除く11調査地区では，魚類調査の確認種の7割程度を環境DNA調査で確認できた。

以上から，環境区分のスケール（50～100m程度）では，魚類調査と環境DNA調査の整合性はばらつきが多かったものの，調査地区のスケール（1km程度の区間）では，魚類調査とよい整合がみられた。

(4) 河川ごとの比較

河川単位で集計した調査手法別の確認種数を図-6に，整合率を図-7に示す。

確認種数では，石狩川，鵜川，木津川で環境DNA調査の方が多く，木曽川では魚類調査の方が多くなった。今回の調査結果では，魚類調査と環境DNA調査を併用した場合，魚類調査単独で行うよりも，6～13種（15～90%），確認種数が増加した。

整合率は，4河川の平均で74%，最も小さい鵜川で61%，最も大きい木津川で88%となった。

(5) 採水層の影響

石狩川および木曽川の淵において，表層に加えて底層で採水を行い，表層の結果と比較した（図-8）。

石狩川では，調査地区2以外では，底層の検体の方が確認種数は多かった。調査地区2の底層で反応

が得られなかった理由は濁りによるPCR反応の阻害等が考えられるが、詳細は不明である。

木曽川では、調査地区4を除き、底層と表層の検体の分析から得られた種数はほとんど同じであったが、底層から採取した検体からは、同じ箇所の表層からは検出されなかったシマドジョウ属、ナマズおよびチチブ属等の底生魚が検出されていた。

以上から、底層での採水は、種数には大きく差がでないものの、表層だけの採水では漏れる可能性のある底生魚が検出できる場合があると考えられた。

4. まとめ

4河川15調査地区48環境区分で魚類調査と環境DNA分析を比較した。確認種数については、環境区分スケールでは、48件中38件で、調査地区のスケールでは、15件中13件で、河川全体では、4河川中3河川で、環境DNA調査の結果が魚類調査の結果と同等もしくはそれを上回った。

環境DNA調査の結果は、環境区分スケール（50～100m程度）では、魚類調査の結果との整合性は、ばらつきが大きく、整合率の低いケースも見られたが、調査地区のスケール（1km程度）および河川全体では、おおむね魚類調査と高い整合性がみられた（整合率、4河川平均70%以上）。

以上のことから、環境DNA調査は、様々な環境区分で採水した上で、調査地区スケールで評価することで、魚類調査の確認種の7割以上をカバーし、より多くの魚種の生息を把握できる可能性が示された。

謝辞：環境DNA調査の実施および魚類調査結果の使用にあたり、国土交通省北海道開発局室蘭開発建設部、旭川開発建設部、近畿地方整備局木津川上流河川事務所、および中部地方整備局木曽川上流事務所にて配慮をいただいた。ここに厚く御礼を申し上げる。

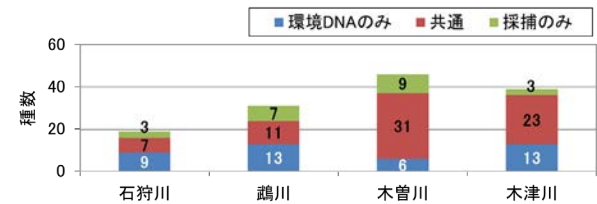


図-6 河川ごとに集計した調査手法別の確認種数

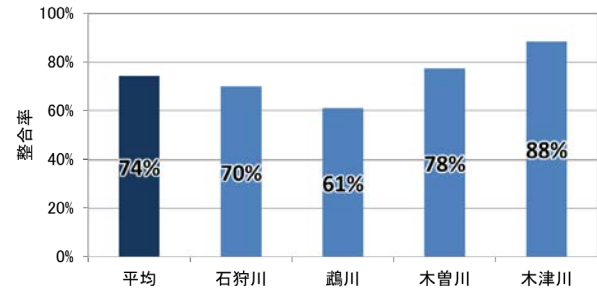


図-7 河川ごとの整合率

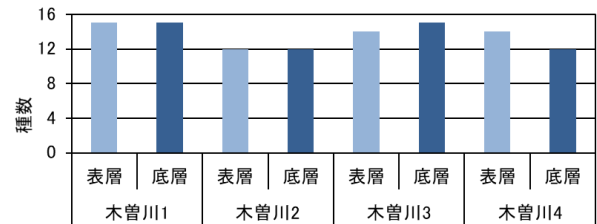
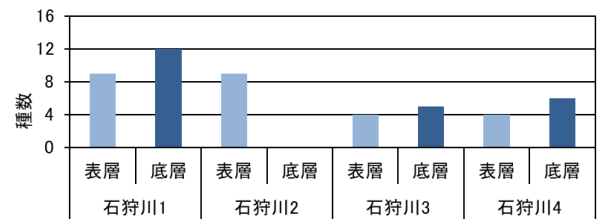


図-8 淵における表層と底層での確認種数
(上段：石狩川，下段：木曽川)

付録

付録-1 石狩川における魚類調査および環境DNA調査の結果

No.	目名	科名	和名	石狩川1				石狩川2				石狩川3				石狩川4			
				平瀬		淵		早瀬		淵		平瀬		淵		早瀬		淵	
				魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA
1	ヤツメウナギ目	ヤツメウナギ科	カワヤツメ属	●								●							
2	コイ目	コイ科	コイ		●		●				●				●				●
3			タイリクバラタナゴ		●		●				●								
4			ウグイ	●			●												
5			エゾウグイ				●				●							●	
6			ウグイ属	●			●						●						
7			モツゴ		●														
8		ドジョウ科	ドジョウ				●						●		●				
9		フクドジョウ科	フクドジョウ	●			●	●		●		●	●	●	●	●		●	●
10		サケ科	アメマス																
11			オシロコマ										●						●
12			サケ				●				●								
13			ニジマス				●				●				●		●	●	●
14			サクラマス類				●						●		●			●	●
15			ブラウントラウト										●						
16	ダツ目	メダカ科	ミナミメダカ				●												
17	スズキ目	サンフィッシュ科	ブルーギル								●								
18	トゲウオ目	トゲウオ科	トミヨ属				●						●		●				
19		カジカ科	ハナカジカ	●			●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●
20		ハゼ科	ヨシノボリ属				●				●								
環境区分ごとの確認種数				4	3	0	9	12	2	0	0	9	0	3	8	3	4	5	2
調査地区の確認種数				採集: 4, 環境DNA(表層): 11, 環境DNA(表層+底層): 14				採集: 2, 環境DNA(表層): 9, 環境DNA(表層+底層): 9				採集: 4, 環境DNA(表層): 9, 環境DNA(表層+底層): 9				採集: 3, 環境DNA(表層): 4, 環境DNA(表層+底層): 7			

付録-2 木曽川における魚類調査および環境DNA調査の結果

No.	目名	科名	和名	木曽川1				木曽川2				木曽川3				木曽川4															
				ワンド(上流)		ワンド(下流)		平瀬		ワンド		早瀬		ワンド		早瀬		ワンド													
				魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA	魚類調査	環境DNA												
1	ヤツメウナギ目	ヤツメウナギ科	スナヤツメ類																												
2	ウナギ目	ウナギ科	ニホウナギ																												
3	コイ目	コイ科	コイ																												
4			ゲンゴロウブナ																												
5			フナ属																												
6			ヤリタナゴ																												
7			カネヒラ																												
8			タナゴ属																												
9			タイリクバラタナゴ																												
10			その他タナゴ類																												
11			オイカフ																												
12			カウムツ																												
13			アブラハヤ																												
14			タカハヤ																												
15			ウグイ																												
16			モツゴ																												
17			ヒギイ類																												
18			タモロコ																												
19			ゼゼラ																												
20			カマツカ																												
21			ツチフキ																												
22			ニゴイ属																												
23			イトモロコ																												
24			スゴモロコ類																												
25		ドジョウ科	ドジョウ																												
26			シマドジョウ属																												
27			スジシマドジョウ属																												
28	ナマズ目	ギギ科	ギギ																												
29		ナマズ科	ナマズ																												
30		アカザ科	アカザ																												
31	サケ目	アユ科	アユ																												
32		サケ科	サクラマス類																												
33	ボラ目	ボラ科	ボラ																												
34	カダヤシ目	カダヤシ科	カダヤシ																												
35	ダツ目	メダカ科	ミナメダカ																												
36	スズキ目	サンフィッシュ科	ブルーギル																												
37			オオクチバス																												
38		カジカ科	カジカ																												
39			ウツセミカジカ(回遊型)																												
40		ドンコ科	ドンコ																												
41		ハゼ科	チチブ属																												
42			カウヨシノボリ																												
43			ヨシノボリ属																												
44			ウキゴリ																												
45			ウキゴリ属																												
46		タイワンドジョウ科	カムルチー																												
環境区分ごとの確認種数				18	15	13	15	15	18	13	19	7	13	12	12	22	15	4	13	14	14	15	16	13	7	14	9	14	12	19	14
調査地区の確認種数				魚類調査: 27, 環境DNA(表層): 21, 環境DNA(表層+底層): 24				魚類調査: 28, 環境DNA(表層): 18, 環境DNA(表層+底層): 19				魚類調査: 20, 環境DNA(表層): 21, 環境DNA(表層+底層): 25				魚類調査: 24, 環境DNA(表層): 24, 環境DNA(表層+底層): 25															

参考文献

- 河川環境データベース: 国土交通省.
<http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo>
- 源 利文: 種特異的な環境DNA検出によるマクロ生物の生態調査, 水環境学会誌, Vol.41(A), pp.123-127, 2018.
- Miya, Sato, Fukunaga, Poulsen, Sato, Minamoto, Yamamoto, Yamanaka, Araki, Kondoh, 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, 2:150088, 2016.
- Nakagawa, H., Yamamoto, S., Sato, Y., Sado, T., Minamoto, T., Miya, M. Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. Freshwater Biology 63: 569-580, 2018.
- 赤松, 都築, 横山, 舟橋, 太田, 畔上, 内藤, 乾 (2018) 河川水辺の国勢調査による魚類相調査と環境DNA メタバーコーディング解析の比較検討. 土木学会論文集 B1(水工学) Vol.74 : I_415-I_420.
- 河川環境データベース: 平成28年度版河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版](魚類調査編). 国土交通省. <http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/mizukokuweb/system/manual.htm>
- 環境DNA学会 (2019) 環境DNA調査・実験マニュアル ver2.1 http://ednasociety.org/eDNA_manual_ver2_1_3.pdf.
- Sato, Miya, Fukunaga, Sado and Iwasaki. 2018. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. Molecular Biology and Evolution, 35, 1553-1555. (2018)
- Kodama, Y., Mashima, J., Kosuge, T., Kaminuma, E., Ogasawara, O., Okubo, K., Nakamura, Y., Takagi, T. DNA Data Bank of Japan: 30th anniversary. Nucleic Acids Res. 4; 46(D1): D30-D35, 2018.
- 環境省 (2020) MiFish による種の識別に注意を要する淡水魚類リスト.
http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html
- 河川環境データベース: 河川水辺の国勢調査のための生物リスト. 国土交通省.
<http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/mizukokuweb/system/seibutsuListfile.htm>
- Fujii, Doi, Matsuoka, Nagano, Sato, Yamanaka. 2019 Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. PLoS ONE 14(1): e0210357.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210357>.

(2020. 4. 2受付)