

汽水域及び河川下流域における環境DNAの 空間分布把握とサンプリング法の検討

SPATIAL DISTRIBUTION AND SAMPLING METHODS OF ENVIRONMENTAL DNA
IN THE BRACKISH AND LOWER REACHES OF THE RIVER

平田 真二¹・白尾 豪宏¹・飯田 岳¹・赤松 良久²・乾 隆帝³
・中村圭吾⁴・村岡敬子⁴

Shinji HIRATA, Takehiro SHIRAO, Gaku IIDA, Yoshihisa AKAMATSU, Ryutei INUI,
Keigo NAKAMURA and Keiko MURAOKA

¹非会員 株式会社エコー 環境系事業部 河川・環境部 (〒110-0014 東京都台東区北上野2-6-4)

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

³正会員 農博 山口大学大学院特命助教 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)
(現所属 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3-30-1))

⁴正会員 国立研究開発法人土木研究所 水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6)

The brackish and lower reaches of the river are characterized by low flow velocity and large water depth. When environmental DNA metabarcoding surveys in these water area are carried out, it is predicted that DNA substances present in water are distributed in specific points due to settlement, advection and diffusion. Therefore, it may not be possible to accurately grasp the local aquatic biota by collecting water from the surface. In this study, water was collected by longitudinal, transversal and vertical direction in the lower reaches of the Tone River.

As a result, in the case of environmental DNA metabarcoding surveys in brackish and lower reaches of the river, it is thought that fish fauna can be efficiently identified by collecting 2 samples at the possible lower layer in the vertical direction near the riverbank in the survey area.

Key Words : lower reaches of the river, eDNA, Spatial distribution of eDNA, sampling method

1. はじめに

水中に存在する環境DNAから水域の生物相を把握する技術は近年急速に研究が進んでおり、河川における環境調査や自然再生事業等における効果検証への活用が検討されている。特に採水サンプルから当該水域に生息する魚類を網羅的に把握するメタバーコーディング手法¹⁾は従来の採捕調査の労力を軽減させる手法として期待されている。当該手法は海域での研究からはじまったが、河川におけるメタバーコーディング分析と採捕調査の比較研究事例^{2) 3)}でも実用性が確認されている。しかし、これら研究は中流域から上流域での事例が多く、河川汽水域及び下流域におけるメタバーコーディング手法による調査事例はあまり蓄積されていない。

河床勾配や潮位差により河川汽水域及び下流域においても様々な流速条件が生じるが、本研究では主に中上流域に対して相対的に流速が遅いことによる影響について

検討を行うこととした。低流速条件においては、水中に存在するDNA物質が沈降や移流・拡散により偏在することが予測され、通常推奨されている表層からの採水だけで周辺の水生生物相を正確に捕捉できない可能性がある。

そこで、本研究では利根川下流域をフィールドとして河川の縦断的・横断的位置別・水深別に採水を行い、メタバーコーディング分析を実施して、魚類相の把握を行った。この調査結果を検証することにより、河川汽水域及び河川下流域における環境DNAの空間分布の把握と効率的なサンプリング法を検討し、河川魚類調査の標準手法の確立に資することを目的としている。

2. 方法

(1) 対象河川

本研究は千葉・茨城県境を流れる利根川下流域を対象とした。利根川下流域は河床勾配が1/6,400から1/81,300

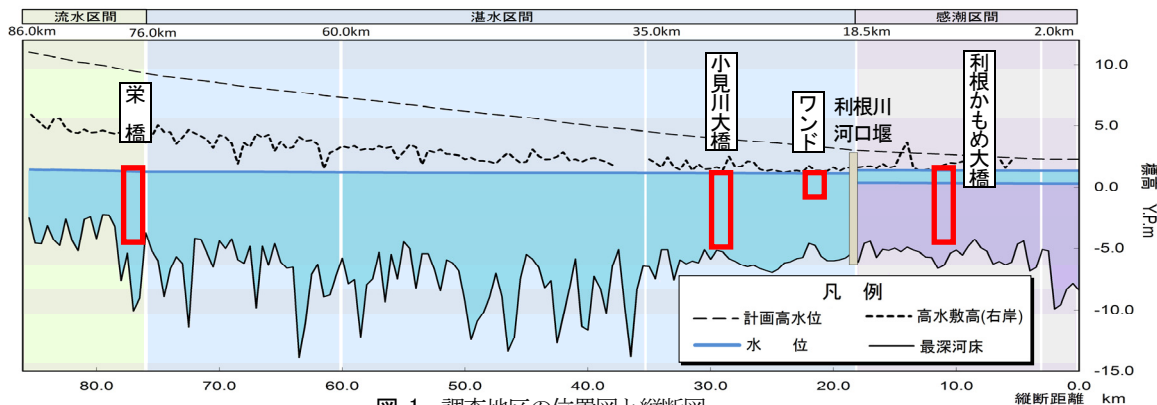
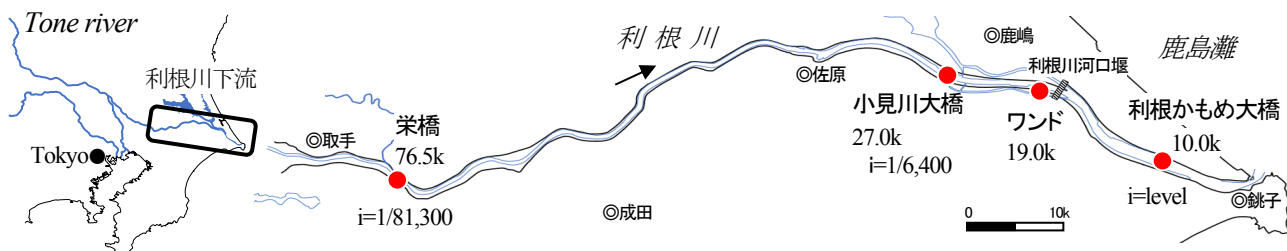


図-1 調査地区の位置図と縦断図

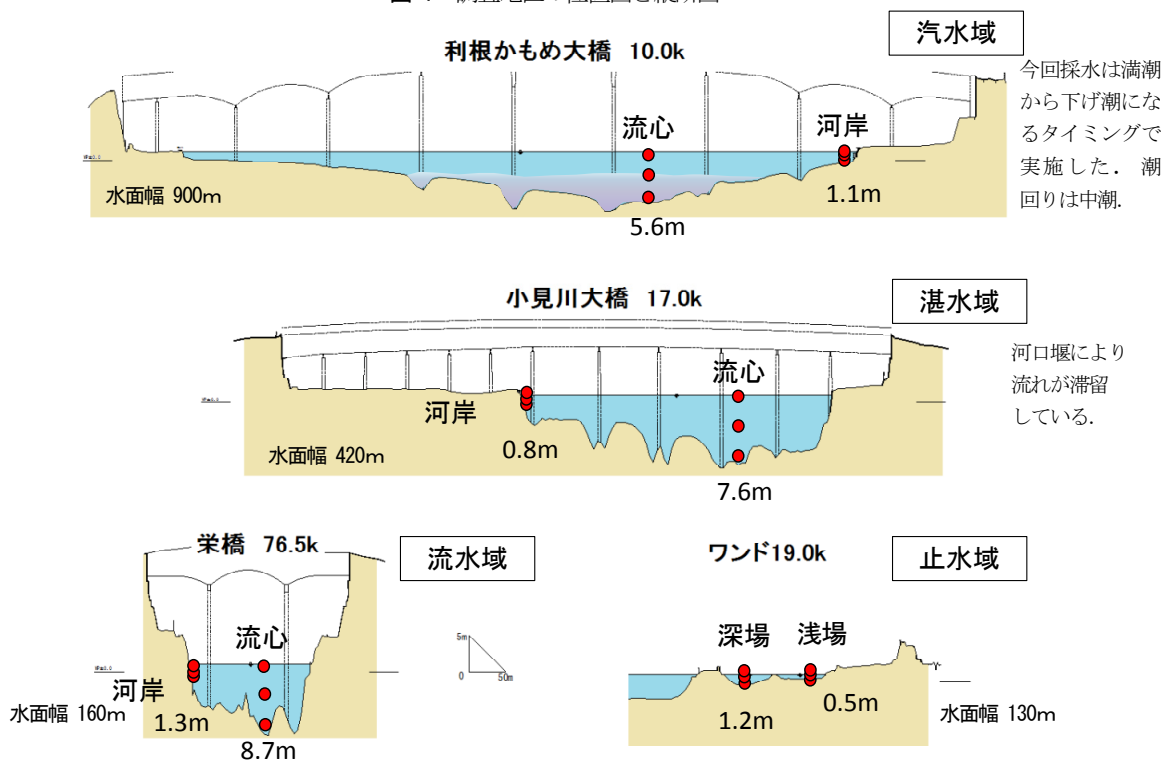


図-2 調査地区の断面図と採水地点

表-1 調査地区の水深、流速条件等

調査地区	水域区分	採水場所	水深(m)	水温(°C)	塩分(PSU)	流速(cm/s)
栄橋 河口から76.5km	流水域	流心	8.7	28.2	0.13	2.3~11.8
		河岸	1.3	28.7~28.8	0.13	2.5~3.6
小見川大橋 河口から27.0km	堰湛水域	流心	7.6	25.8~27.3	0.13	1.8~4.0
		河岸	0.8	27.8~27.9	0.12	5.6~5.7
利根かもめ大橋 河口から10.0km	汽水域	流心	5.6	17.4~23.8	19.2~31.4	7.9~22.4
		河岸	1.1	24.1~24.2	20.0~20.1	0.9~1.8
ワンド 河口から19.0km	止水域	深場	1.2	26.5~26.6	0.28~0.29	1.0~2.3
		浅場	0.5	26.7~26.8	0.25~0.26	1.7~2.5

と極めて緩く、低水路の川幅(水面幅)は160mから900m、流心部の水深は平均5mを越えている。また、河口から18.5kmの位置に利根川河口堰があり、そこから下流が汽水域、上流は76kmまでが堰の湛水区間、その上が緩やかな流水区間となっている。このように、川幅と水深が大きい汽水域・下流域の河川においては、採水する地点や深さによって得られる環境DNA調査結果のばらつきが大きいことが予測され、本研究の対象地として適している。

(2) 調査方法

対象河川における調査地区は図-1に示す通り、縦断方向に水理特性が異なる区間から、河口堰下流の汽水域(感潮区間)、河口堰の湛水域、湛水域の直上に連続する流水域、高水敷上の止水域(ワンド)の4地区を設定した。

採水は図-2に示した各断面で最も水深がある流心部と河岸部の2箇所を実施した。流心部は表層、中層(5割水深)、下層(河床から30cm程度上)の3層から採水し、河岸部は表層、下層(流心と同じ)、底層(河床表面付近)の3層から採水し、合計4地区×6検体の計24検体を得た。各地区の流速条件等は表-1に整理した。

また、現地濾過と室内濾過の差を把握するための水サンプルを流心の中層から2地点、河岸の下層から4地点の計6検体採水し、調査全体で30検体を得た。

調査は2018年7月4日から5日の2日間で実施した。採水方法は、流心においては図-3に示すとおり橋梁上からハイロート式採水器を投入して、所定深度の水を1検体あたり2,000ml採水した。河岸においては図-4に示すとおり、表層はポリエチレンの手袋を装着した上で河川下流側からの徒手による直接採水、下層・底層はハイロート式採水器を使用した。ハイロート式採水器はあらかじめブリーチ処置をしたポリエチレン瓶を順次交換しながら採水することが可能であるため、バンドーン式採水器に比べコンタミネーション防止の点において優れている。

なお、採水した水サンプルは、DNAの分解抑制のために塩化ベンザルコニウムを最終濃度0.01%となるよう添加し、氷を充填したクーラーに保管した。

(3) 環境DNA分析

得られた検体を対象にメタバーコーディング分析を用いて、水に含まれる全魚類種のDNAの同定を行った。分析の手法は次の通りである。

採水した水サンプルをローラポンプとステリベクス(メルクミリポア/0.22 μ m)を用いて濾過を行った。30検体のうち6検体は現地での濾過、24検体は回収後に分析室で室内濾過を行った。今回採水した検体には不純物が多く含まれたため、全検体に対しGF/Cフィルター(粒子保持能:1.2 μ m)を挟み、1,000mlまで濾過を行った。

DNAの抽出はMiya et al.(2016)⁹⁾を参考とし、精製はMPure Bacterial DNA Extraction Kit(MP Bio社製)を用いて

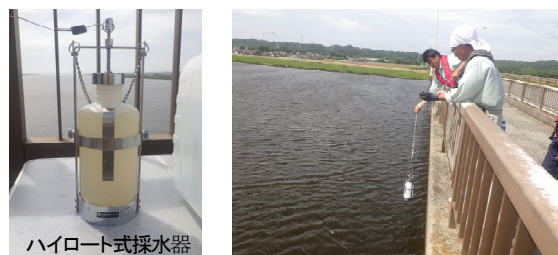


図-3 流心部の採水方法

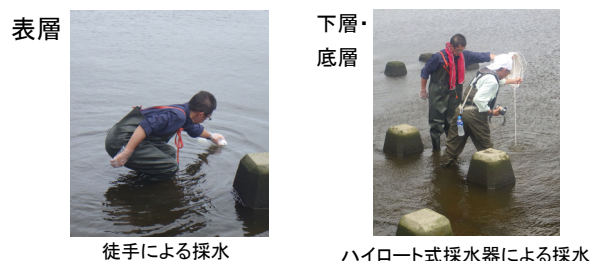


図-4 河岸部の採水方法

行った。ライブラリー作製は2step tailed PCR法を用い、シーケンシング解析はMiSeq(Illumina社製)とMiSeq eagent Kit v3(600サイクル, Illumina社製)を用いて2×300bp条件で行った。

一次解析では、Fastx toolkitを用いて配列の読み始めが使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出し、配列正確性が99%未満の配列を取り除き、配列長180塩基を目安に調整してOTUを作製した。

高次解析では、得られた各OTUの代表配列が、どの生物種の配列に由来するのかを、配列相同性検索プログラム(BLAST)を用いてMiFishデータベースと比較し、塩基の相同性が97%以上合致するものから、利根川での生息記録等を考慮して魚種を特定した。また、種を特定出来なかったOTUに関しては、属レベルまでの同定にとどめた。

3. 結果と考察

(1) 種の検出状況

環境DNAのメタバーコーディング解析により、4地区合計30検体の水から、37種の魚類が検出された。得られた魚類リストを表-2に示す。縦断的な調査地区に対する出現傾向は過去の河川水辺の国勢調査結果における分布記録や、各確認種の生態特性を考慮して、おおむね妥当な結果と判断された。また、国土交通省が利根川下流河川事務所管内で2014年度に実施した直近の河川水辺の国勢調査(魚類調査)及び2014年~2016年度に実施されたワンドの魚類調査結果では7地区×2季節の調査で47種が得られている。今回の調査は4地区×1季節の実施で37種の記録となっており、調査地区数・調査季節数を考慮すれば、河川水辺の国勢調査と同等の確認種が環境DNA調査で記録できている。

表-2 環境DNA調査によって得られた種の一覧

種別	種名	栄橋 流水域 76.5k	小見川大橋 堰湛水域 27.0k	ワンド 止水域 19.0k	利根かめめ大橋 汽水域 10.0k
汽水域のみに出現 8種	マイワシ				24,938
	コバンロ				21,761
	マサバ				19,126
	カタクチイワシ				1,581
	クロダイ				1,129
	アカエイ				654
	マアジ				558
	コチ属				395
汽水域と淡水域の双方に出現 10種	マハゼ			3,013	53,152
	ピリンゴ			4,736	6,141
	ニホンウナギ			249	181
	アシシロハゼ		255		174
	ボラ	75,013	59,882	179,496	107,596
	チチブ属	9,606	1,877	2,325	33,231
	スズキ	1,188	9,992	2,340	19,045
	ウグイ属	344	1,020	2,067	16,070
	ゲンゴロウブナ	28,195	24,191	32,587	1,038
	コイ	543	6,905	723	35
淡水域に広く出現 12種	ハクレン	346,422	138,213	15,267	
	ウキゴリ		3,567	10,138	
	チャネルキョウトフィッシュ	2,121	2,921	3,337	
	オオタナゴ		5,008		
	タイリクバラタナゴ		2,617		
	ニゴイ	3,118		9,391	
	ヨシノボリ属	18,354	3,052	8,029	
	モツゴ		1,974	3,111	
	ギンブナ	1,271	35	11	
	カワアナゴ	729	967		
	ツチフキ	716		16,786	
	タモロコ	408		800	
淡水の流水域にのみ出現 7種	オイカワ	5,053			
	オオクチバス	3,162			
	アオウオ	2,428			
	ワタカ	1,737			
	ドジョウ	1,167			
	ミナミメダカ	350			
	ワカサギ	54			
合計	37種	21種	17種	18種	18種

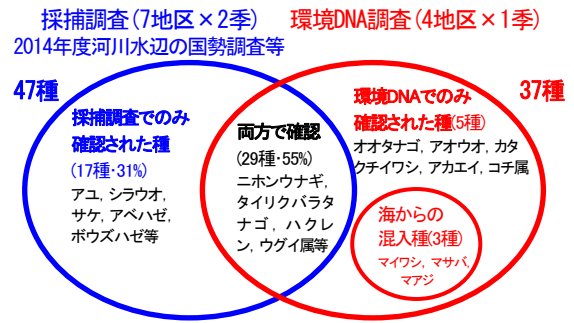


図-5 河川水辺の国勢調査等確認種との比較

表-3 地区別の確認状況の比較

記録状況	栄橋 流水域	小見川大橋 堰湛水域	利根かめめ大橋 汽水域	ワンド 止水域
河川水辺の国勢調査等のみ	9種	17種	14種	11種
共通	13種	11種	11種	15種
環境DNAのみ	8種	6種	7種	3種
	チチブ属 ウグイ属 ハクレン ヨシノボリ属 カワアナゴ アオウオ ドジョウ ワカサギ	アシシロハゼ スズキ コイ ハクレン タイリクバラタナゴ オオタナゴ	コイ アカエイ カタクチイワシ マアジ マサバ マイワシ	ピリンゴ スズキ ゲンゴロウブナ
確認種合計	30種	34種	32種	29種

図-5に示した内訳を見ると河川水辺の国勢調査等でのみ確認された種は17種、環境DNA調査のみ確認された種は8種であった。8種のうち6種は汽水域の魚類であり、特に3種(マイワシ、マサバ、マアジ)は汽水域の下層(遡上した海水層)を中心に記録されており、最下流部にある銚子漁港の水揚げ魚から流出したDNAの可能性もある。河川水辺の国勢調査等でのみ確認された種にはアユ、サケ、シラウオなど今回調査を行った7月には確認できない通し回遊魚が多く含まれた。

表-3に調査地区別に河川水辺の国勢調査と環境DNA調査での確認種を比較したが、環境DNAのみで確認された種について特定の傾向は窺えなかった。

(2) 横断的な採水位置別の検出状況

各調査地区の環境DNAによる確認種数を流心と河岸(ワンドの場合は深場と浅場)に分けて確認種数を合計した結果を図-6に示す。流心で確認された種は4地区合計で24種(n=14)であったものに対し、河岸は合計33種(n=16)と河岸の方が多かった。河岸のみで検出された種は合計13種であったが、流心だけで検出された種はマアジ、アオウオ、ワタカ、ドジョウの4種のみであった。これら4種はその生態的特性から流心部だけ利用する種とは言えず、流心からの採水でなければ検出不可能な種はこの中に含まれていないと整理出来る。

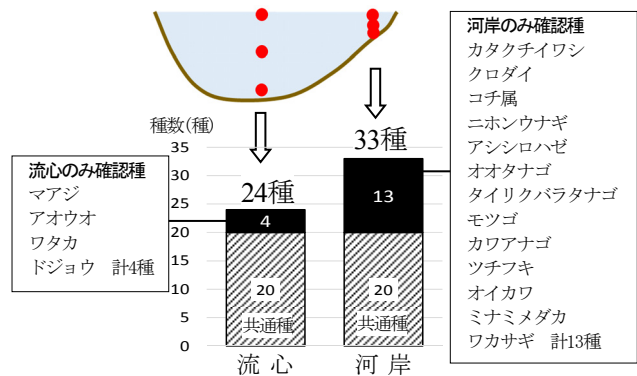


図-6 河岸と流心での確認種の比較

以上の整理から流心と河岸の検出種の比較では河岸の確認種数が多い結果が得られた。これは魚類が流心部の表層から中層よりも、河岸部の方をより利用しているという一般的な知見と合致する。

(3) 鉛直方向の採水位置別の検出状況

鉛直方向に採水したサンプルの検出種を集計したところ、表層検出種が25種(n=8, 平均7.0種)、中層15種(n=6, 平均5.7種)、下層33種(n=12, 平均10.1種)、底層9種(n=4, 平均2.8種)であり、検体数に違いがあるが下層における検出種数が多かった。

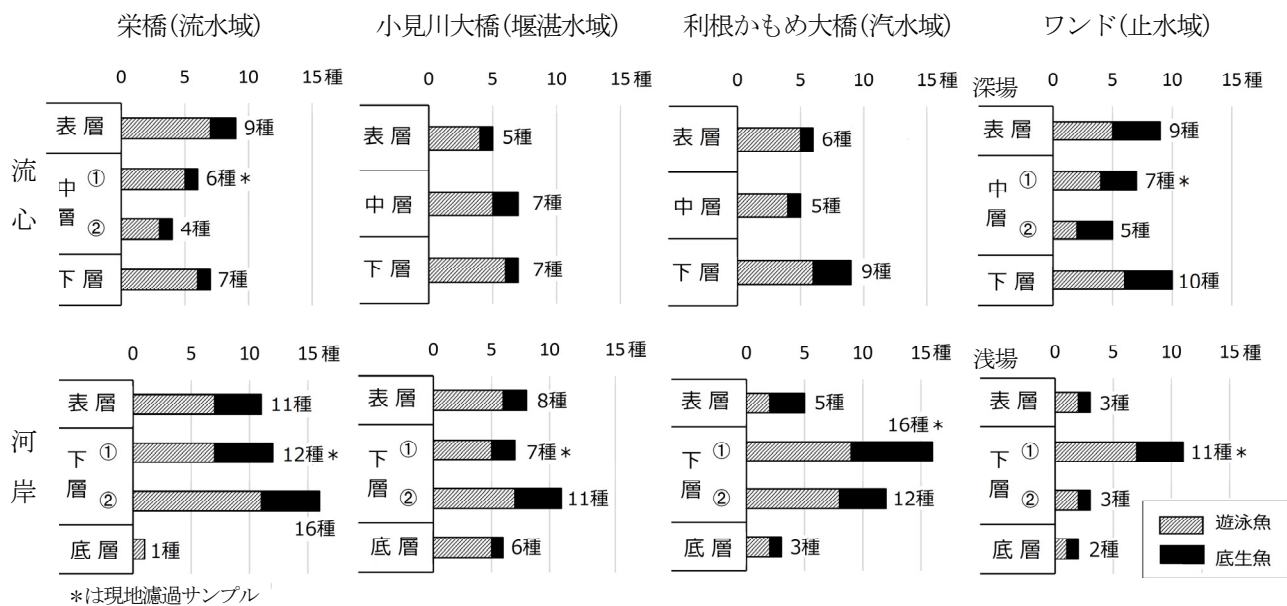


図-7 採水サンプル別の確認種数と魚類生活形の割合

表-4 特定層にのみ確認された種の一覧

種別	流心	河岸	全体
表層のみ 検出種 n=8	オオタナゴ カワアナゴ* オイカワ アオウオ ワタカ ドジョウ* 計6種	該当なし	アオウオ ワタカ ドジョウ* 計3種
下層のみ 検出種 n=12	マアジ タモロコ *は底生魚 計2種	マイワシ ウキゴリ* タイリクバラタナゴ ギンブナ タモロコ アカエイ* カタクチイワシ クロダイ ワカサギ コチ属 ニホンウナギ* アシシロハゼ* ウグイ属 計16種	マアジ カタクチイワシ クロダイ コチ属* ニホンウナギ* アシシロハゼ* タイリクバラタナゴ タモロコ ミナミメダカ ワカサギ 計10種

また、特定層にのみ確認された種を整理した表-4によれば、表層から採水したサンプルからのみ検出された種は3種、下層のみ確認された種は10種であり、下層での検出効率が高い傾向が見られた。河岸の底層（河床表面付近）から採水した検体からは検出種1~6種と少なく、確認種は利根川では普通種となるコイ、ゲンゴロウブナ、ウグイ属、モツゴ、ツチフキ、チャネルキャットフィッシュ、ボラ、スズキ、マハゼであった。

図-7に各採水層で確認された種を一般的な生態から遊泳魚と底生魚に区分して比較した。その結果、底生魚であっても一定割合で表層サンプルからもDNAが検出されており魚類の生活形態と鉛直方向の採水層別の検出種との関係性は不明瞭であった。

以上の整理から、鉛直方向の検出種の比較では、表層より下層での検出効率が高い結果が得られた。水中の環境DNAは糞や粘液の形で浮遊していると考えられているため、当該地区のように流速が遅く水深が大きな水域では、沈降作用が働き、下層のDNA濃度が高くなったと考えられる。また、底層表面のDNA検出率が悪い

表-5 現地濾過と室内濾過による検出種の差

採水地区 手法	栄橋 流水域		小見川大橋 堰湛水域	利根かもめ大橋 汽水域	ワンド 止水域	
	流心・ 中層	河岸・ 下層	河岸・ 下層	河岸・ 下層	深場・ 中層	浅場・ 下層
現地濾過	6種	12種	7種	16種	7種	11種
室内濾過	4種	16種	11種	12種	5種	3種

理由としては、底泥による吸着作用が影響している可能性が考えられる。

(4) 現地濾過と室内濾過による検出精度の比較

表-5に示した現地濾過と室内濾過の検体における検出精度の比較では、検体毎の種検出数に差が見られたが、現地濾過・室内濾過のどちらの検出種が多いとは言えず、採水地点や採水層による特定の傾向も見られなかった。

現地濾過と室内濾過で一定の傾向が確認できなかった理由としては、採水から濾過までの時間経過によるDNAの分解よりも、採水したサンプル中に含まれるDNA濃度のばらつきの影響が大きいという事象を示唆していると考えられる。現地での濾過作業は1サンプル10分以上かかることもあり、天候・場所等の制約も多いことから実務上適切な調査手法ではないと考えられる。

(5) 河川汽水域・下流域における効率的なサンプリング法の検討

今回の調査対象地とした利根川の汽水域・下流域では流速が0.9~22.2cm/sと遅く、水深も流心で5m以上と大きい場所となっている。このような場所で環境DNA調査のための採水を行う場合、どのポイントで実施するかが重要となる。

これまでの結果の分析により、流心より河岸、表層よ

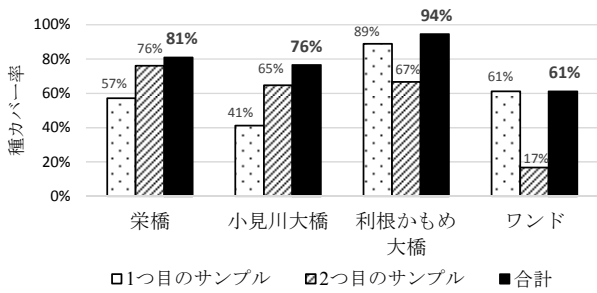


図-8 河岸下層から採水した検体の種カバー率

り下層での検出率が高いことが確認できている。図-8に河岸下層の2検体に対する当該地区検出種のカバー率を計算したグラフを示した。その結果、河岸下層で採水した2検体合計の検出種は流心を含めた当該地区全検出種の61～94%を占め、効率的な魚類相把握に適した採水位置であると考えられた。ワンドのカバー率がやや低いが、これは流心として集計したワンド深場の水深が1.2m程度と浅く、河岸との環境の差が小さかった影響が考えられる。また、各検体の検出種数には差が見られるため、1箇所でのサンプリングは2検体以上実施することが望ましい。

4. まとめ

本研究では、流速が遅く水深が深い利根川の汽水域及び下流域で横断方向及び鉛直方向に採水位置を変化させて採水を行い、メタバーコーディング法による環境DNAの全種解析を行って環境DNAの空間分布を把握した。その結果、次のような知見が得られた。

- ・環境DNAで検出された種は既存の採捕等による調査結果と同等な種が確認され、河川縦断方向の魚類相分布とも一致する結果が得られた。
- ・横断的な採水位置は、流心よりも河岸の検出数及び検出効率が高いことが確認された。また、流心部でなければ検出出来ないという種はなかった。
- ・鉛直方向の採水は表層よりも下層での検出種数が高く河川下流域では環境DNAの沈降の影響を考慮する必要があることが確認された。
- ・底泥表面付近の水からはDNAを効率的に検出することが出来なかった。

また、河川汽水域・下流域のサンプリング方法については、次のような知見が得られた。

- ・現地濾過と室内濾過の比較では有意な差はみられなかった。調査効率を考慮すると、室内分析を原則とする方が良いと考えられた。
- ・河川汽水域・下流域での魚類相を環境DNA調査で把握しようとする場合、河岸の下層から2検体以上採水することが効率的であると考えられた。

これら得られた知見を生かし、さらに課題の解決を図ることで、河川下流域・汽水域における環境DNA調査手法の標準化に寄与すると考えられる。

なお、本研究は2018年度から3ヶ年計画で国立研究開発法人土木研究所と民間企業による「環境DNAの河川事業への適用を目指した共同研究」の一環として実施されたものであり、その中間成果と位置づけている。

今回分析の対象として整理出来なかった今後の課題としては、汽水域における潮汐と採水タイミングによる確認種増減の評価、不純物が多い河川下流域のサンプルに対する効率的な濾過手法の確立、植物プランクトンによるPCR阻害の有無とその対策方法等が残されている。これらの検討課題について引き続き調査・検討を進め、環境DNAを用いた環境調査の精度を確保され、かつ、簡便となる手法について研究を進める予定である。

謝辞：本研究にあたり、河川区域内での調査の便宜を図って頂いた国土交通省利根川下流河川事務所、現地の採水作業及び環境DNA分析調査手法検討の協力を頂いた(株)生物技研の皆さまに御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen JY, Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M., Iwasaki W. 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, 2015.
- 2) 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 (6), 569-580, 2018.
- 3) 赤松良久・都築隆禎・横山良太・舟橋弥生・太田宏宗・畔上雅樹・内藤太輔・乾隆帝、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Vol.74, No.5, I_415-I_420, 2018.
- 4) Miya M., Minamoto T., Yamanaka H., Oka S., Sato K., Yamamoto S., Sado T., Doi H. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA, *Journal of Visualized Experiments* (117) e54741, 2016.
- 5) Turner C.R., Barnes M.A., Charles C.Y. Xu, Jones S.E., Jerde C.L. and Lodge D.M: Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA, *Methods in Ecology and Evolution*, Vol.5, Issue 7, 2014.

(2019. 4. 2受付)