

河道内で検出された海産魚類を指標とした 環境 DNA 含有物質の有効検出範囲の推定

ESTIMATION OF THE DETECTABLE RANGE OF ENVIRONMENTAL DNA
IN A RIVER CHANNEL USING ARTIFICIALLY-DERIVED
THE MARINE FISHES AS A TRACER

北川哲郎¹・村岡敬子²・天野 聡³・岡本祐司⁴・中村圭吾⁵

Tetsuro KITAGAWA¹, Keiko MURAOKA², Satoshi AMANO³, Yuji OKAMOTO⁴ and Keigo NAKAMURA⁵

¹非会員 博(農) 株式会社建設環境研究所 (〒170-0013 東京都豊島区東池袋2-23-2)
(研究当時: 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ)

²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1-6)

³非会員 国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課 (〒100-8918 東京都千代田区霞ヶ関2丁目1-3)

⁴非会員 国土交通省 中部地方整備局 三重河川国道事務所 調査課 (〒514-8502 三重県津市広明町297)

⁵正会員 博(工) 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1-6)

The detected pattern of environmental DNA (eDNA) in a river channel derived from unnatural marine fishes was verified by a regular interval metabarcoding (MB) assay to estimate the detectable range of eDNA-containing substances. Water samples were collected from 82 points in the Kumozu River, Mie, at 0.2 km intervals from the river mouth to 16.2 km. In the MB assay, 30/364 organizational taxonomic units (OTUs) of marine fishes, including two migratory fishes that do not live in the Kumozu River. The 30 OTUs were detected at 246 points and were divided into 74 clusters consisting of 1–28 points based on the continuity of the detection points. According to the frequency distribution, 5 clusters containing more than 11 points (> 2.2 km) were excluded as outliers, and 69 clusters of 1–8 points (0.2–1.6 km) were selected as the significant range ($p < 0.01$) based on the Smirnov–Grubbs test. Thus, the detectable range of an eDNA-containing substance from a single source is about 1.6 km in the lower reaches of the river. However, if a remarkable source exists upstream, the range would extend several kilometers.

Key Words: metabarcoding, fish fauna, tracking, artificial source, class A river

1. はじめに

環境 DNA (environmental DNA ; 以下, eDNA) 分析技術は, 水中や土壌中に存在する組織片等の遺伝情報を読み取り生物種の生息を推定する調査手法で, 現地で得られた少量のサンプルから生物の在・不在など様々なデータを得ることができる効率的かつ安価な調査手法として注目を集めている¹⁾²⁾. 本技術は, 目的とする生物の DNA を特異的に検出する種特異的解析と特定分類群の DNA 情報を網羅的に検出するメタバーコーディング解析 (以下, MB 解析) に大別される³⁾. 技術的な特性から, 水中のみで生活環を完結する大型動物である魚類については知見集積の進展が著しく⁴⁾⁵⁾⁶⁾, 学術団体や行政機関から主として魚類を対象とした調査マニュアル類が発行されるなど²⁾⁷⁾⁸⁾, 生物調査の手法として実用段階に近づきつつある。

eDNA 分析と直接採捕を主体とした従来の調査法とを組み合わせることで河川事業へ活用することができれば, 調査の効率化や精度の向上が見込まれるばかりか⁹⁾, 地理情報技術等との組み合わせによる生息適地モデル構築など, 緊密で精度高い環境評価への展開が期待できる¹⁰⁾¹¹⁾. しかし, eDNA 分析技術に関する研究分野はいまだ発展途上で, 調査手法として河川事業へ実装するまでには, 環境条件や対象生物の生態に応じた検出特性や eDNA 含有物質の動態など¹²⁾¹³⁾, 乗り越えるべき課題が残されている. そこで, 国土交通省は, 河川・ダム管理における eDNA 分析技術の活用へ向けた検討を目的として, 河川水辺の国勢調査の一環と位置付け, 「環境 DNA を用いた河川生物把握の可能性に関するテーマ調査」(以下, 水国テーマ調査) を令和元年度より開始し¹⁴⁾, MB 解析を中心とした活用事例の集積ならびに課題解決のための調査・検討を展開している¹³⁾.

水国テーマ調査における主要課題のひとつに、eDNA 含有物質の有効検出範囲の把握が挙げられる。eDNA 分析技術は、流下してくる物質から生物の存在を検出するという技術的特性から、個体を直接採捕する従来法とは異なり、対象生物の生息範囲を特定することが困難である。しかし、個別の河川事業の効果・影響評価への活用には、高精度な検出範囲の推定が不可欠と言え、河川中での eDNA 含有物質の動態に関する知見集積ならびに推定手法の確立が求められる。eDNA 含有物質の流下様式については、特定の種・個体由来する eDNA の検出状況を指標とした流下範囲の追跡や、検出魚類と直接採捕結果の相関性に基づく推定などが実施されているが⁴⁾⁵⁾¹²⁾、各事例で取り扱われる比較例数の少なさと河川内における魚類の分布範囲の不確実性などから、検出範囲の精度高い推定には至っていない現状にある。

MB 解析においてしばしば検出される河川外由来の eDNA (以下、河川外 eDNA)、とりわけ純淡水域に生息し得ない海産魚類等に由来する eDNA は、堤内地からの排水や廃棄物などを供給源として、それぞれ単一あるいは少数の限られた地点から流下・拡散していると考えられる。すなわち、河川外 eDNA の検出範囲を特定することで、複数のトレーサーを用いた追跡実験に相当する成果が得られる可能性があり、eDNA 含有物質の有効検出範囲の推定に向けた新たなアプローチとなり得る。そこで本報では、令和 2 年度に水国テーマ調査の一環として実施された、三重県を流れる一級河川雲出川での定間隔採水サンプルを用いた MB 解析結果に基づき、河川外 eDNA の検出状況に関する検討を行い、eDNA 含有物質の有効検出範囲の推定を試みた。

2. 材料・方法

(1) 現地作業

採水作業は、2020 年 11 月 2–6 日の期間中、9:00–17:00 までの時間帯に、雲出川の河口 0.0 km から上流 16.2 km までの区間で実施した。本研究では、対象区間を 0.2 km 間隔で 82 のブロックに分割し、各ブロックの右岸側下流端の岸際から表層水各 1ℓ を採水して MB 解析に用いる検体とした。採水作業に際するコンタミネーションを確認するため、採水時には毎作業日に対して 1 検体ずつ、イオン交換水を用いた陰性対照を作成した。採水後の検体は、DNA の劣化を予防するため塩化ベンザルコニウム溶液を終濃度 0.01 % となるよう添加した後、冷暗環境を保った状態で実験室へと移送した。採水に際しては、環境情報として採水地点の水温 (°C)、pH、濁度 (NTU)、流速 (cm/s) を記録した。水温と pH は携行測定器 WM-32EP (東亜 DKK 社) を、濁度は携行測定器 TB-31 (東亜 DKK 社) を、流速はプロペラ式流速計 CR-11 (コスモ理研社) を、それぞれ用いて測定した。また、物理環境に関わる付帯情報として、雲出川の河川維持管理計画から諸元情報を参照した¹⁵⁾。

(2) メタバーコーディング解析

各ブロックで採水した検体をメンブレンフィルター (ADVANTEC 社、孔径: 0.45 μm) で全量濾過し、DNeasy Blood Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いてフィルタリングされた残渣物から DNA を抽出した後、抽出物を OneStep PCR Inhibitor Removal kit (ZYMO RESEARCH 社) で精製した。精製後の DNA は、MiFish-U/U2/E/L を 4:2:2:1 の比率で混合したプライマーセットを用いた Two-step tailed PCR 法によって対象領域を増幅し⁶⁾⁷⁾、Fragment Analyzer/dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies 社) で解析試料としての品質を確認した後に MiSeq/MiSeq reagent Kit v3 (2×300 bp, illumina 社) による超並列シーケンシングへ供した。対象領域の増幅に際しては、1st PCR 時に 8 回の反復区を設け、得られた PCR 産物を混合して 2nd PCR へと供した。

解析によって得られた DNA 配列群は、Fastx toolkit (ver. 0.0.14) ならびに Qiime 2.0 (ver. 2020.8) の dada2 プラグインを用いた代表配列 (以下、OTU) の抽出を行った後¹⁶⁾、データベース MitoFish との照合により配列の相同性 98 % 以上となる taxon (分類学上有意な集まりであることを示す単位、複数: taxa) を特定し、さらに DNA Data Bank of Japan の登録配列と照合して該当 taxon の妥当性を精査したうえでリスト化した¹⁷⁾¹⁸⁾。

(3) 有効検出範囲の推定

MB 解析によって構築された魚類リストから、中坊 編 (2013) に従い¹⁹⁾、外洋性海産魚類や純淡水区間 (3.4–16.2 km) における海産魚類など生理的機能から雲出川の河道内に生息し得ない、もしくは日本国内および近海での確認記録がない海産 taxon と判定された OTU を抽出し、河川外 eDNA 含有物質由来する OTU として選定した (以下、非生息 OTU)。選定に際しては、PCR 時の増幅エラーなど解析過程に生じるエラーの影響を最小化するため、単一地区のみで検出され、かつ地区内における総リード数に占める割合が 1% に満たない OTU を選定対象から除いた。

選定した非生息 OTU を単一の供給源に基づく可能性が高いと判断される検出区間 (以下、在区間) に区分し、それぞれの在区間に含まれる検出ブロックの上流端から下流端までの距離を eDNA 含有物質の流下範囲と判定することで、有効検出範囲の推定を行った。在区間は、1 回の MB 解析における偽陰性率を約 25 % と仮定した時に偽陰性率が約 1% 未満に達すると推算できる 4 回連続の未検出が確認される事例、すなわち直上流の 4 ブロックで非生息 OTU が未検出となった区間を、単一供給源からの連続性が途切れる“不在区間”と規定することで区分した。偽陰性率の仮定値は、同一地点における直接採捕と MB 解析との比較結果に基づく eDNA 検出率として北川ほか (2020) が示した 76.9 ± 17.1 % (平均 ± 標準偏差) ならびに内藤ほか (2020) が示した 79.3 ± 19.3 % を参考値として設定した¹³⁾²⁰⁾。

なお、感潮区間 (0.0–3.2 km) における汽水性 / 沿岸性海産魚類の検出事例ならびに、末端が調査対象区間の上・下流端ないし解析不調による欠測ブロックに該当したことで在区間の範囲が特定できなかった場合には、検討対象から除外した。

3. 結果・考察

(1) 環境情報

現地での採水を実施した5日間のうち、河口0.0–1.6 kmと5.0–6.4 km地点での採水を実施した11月2日にのみわずかな降水が見られた。水質項目においては、水温では最下流域で最も高く上流方向に対して漸減していく傾向が、濁度では最下流の0–1 km区間および6–8 km区間で部分的な上昇傾向が、それぞれ確認された一方で、pHには全区間を通じた特定の変化傾向は生じなかった (図-1)。

MB解析における解析精度ならびに読み取りリード数と降水ないし水質項目に見られた傾向との直接的な関連性は検出されなかった。

各採水地点における流速の全区間平均値は 9.8 ± 19.1 cm/sであった。全体的な変化傾向として、勾配が1/1,000より急な河口約7 km以上の区間において流速の値が大きくなった一方で、より上流域で勾配が急な12 km以上の区間では再び低下していた。流速と勾配の変化は相関関係になく、本研究の採水条件における流速のパラメータは、水際環境や流路形状といった、勾配以外の要因から強い影響を受けたと考えられた。

(2) 魚類の検出状況

解析対象とした82検体のうち79検体から正常濃度のDNA抽出物ならびに解析用Libraryが得られ、魚類の配列情報として12,388–24,424リードが読み取られた (最小–最大; 図-2)。そのうち魚類と判定された配列は364 OTUであった。各ブロックにおける検出数は35–71 OTU (図-2) で、総じて勾配が小さい下流区間で多くの検出数が得られた。解析不調となった3検体は、それぞれ河口から0.0,

1.2, 4.8 km地点からの採水物であった。なお、今回の解析では、11月3, 4日に作成された陰性対照から8 OTU (4–798リード)の擬陽性が生じたため、当該OTUについてはコンタミネーションが生じたものとして集計対象から除外した。

(3) 非生息 OTU の判定

集計対象とした356 OTUのうち、汽水 / 海産魚類と特定された配列は113 OTUで、そのうち28 OTUまでが外洋性あるいは純淡水区間での検出例を含む海産魚類と特定された。さらに、海産魚類には該当しないが、国内での分布記録がなく生理機能的に雲出川には生息し得ないタイセイヨウサケ *Salmo salar* とギンザケ *Oncorhynchus kisutch* に該当する2 OTUを加えた、計30 OTUを非生息 OTUと判定し、有効検出範囲の検討に用いた (図-3)。

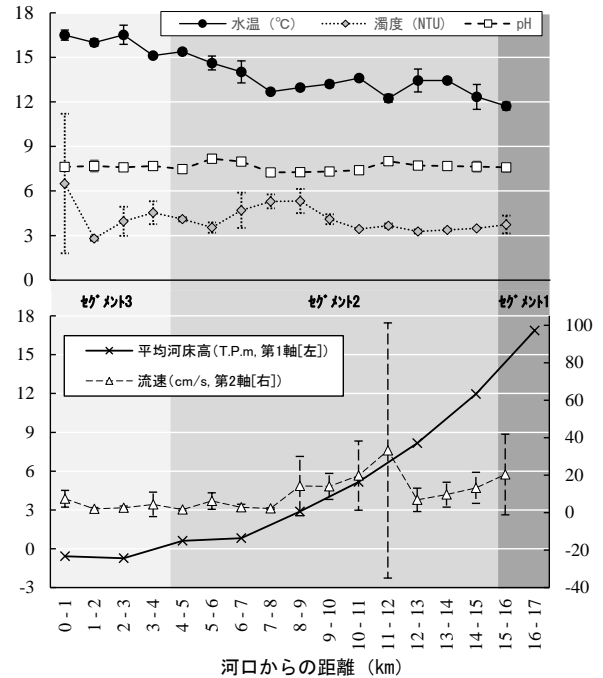


図-1 採水地点の環境情報。水温・濁度・pH・流速は1 km区間中の平均値 ± 標準偏差で、平均河床高は2 km区間中の平均値で、それぞれ示した。

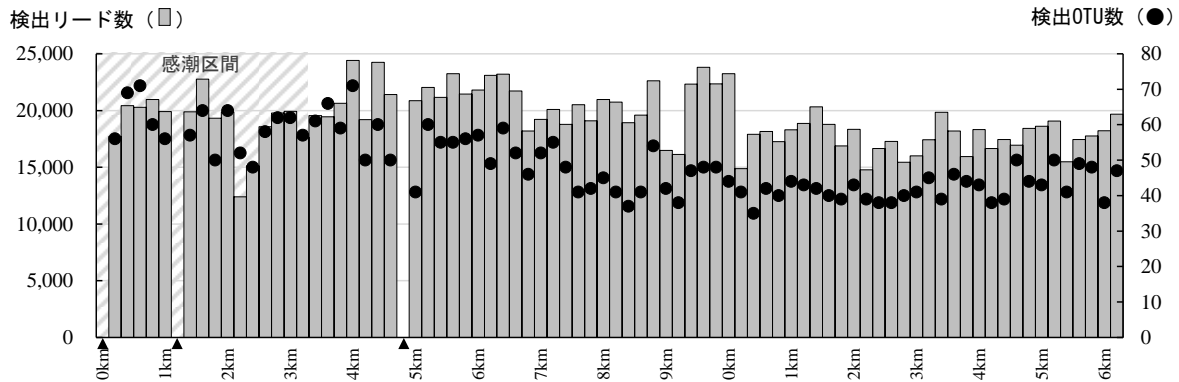


図-2 雲出川の河口から0.0–16.2 kmで実施した魚類MB解析において検出されたリード数と検出OTU数の分布。▲: 解析不調による欠測ブロック。

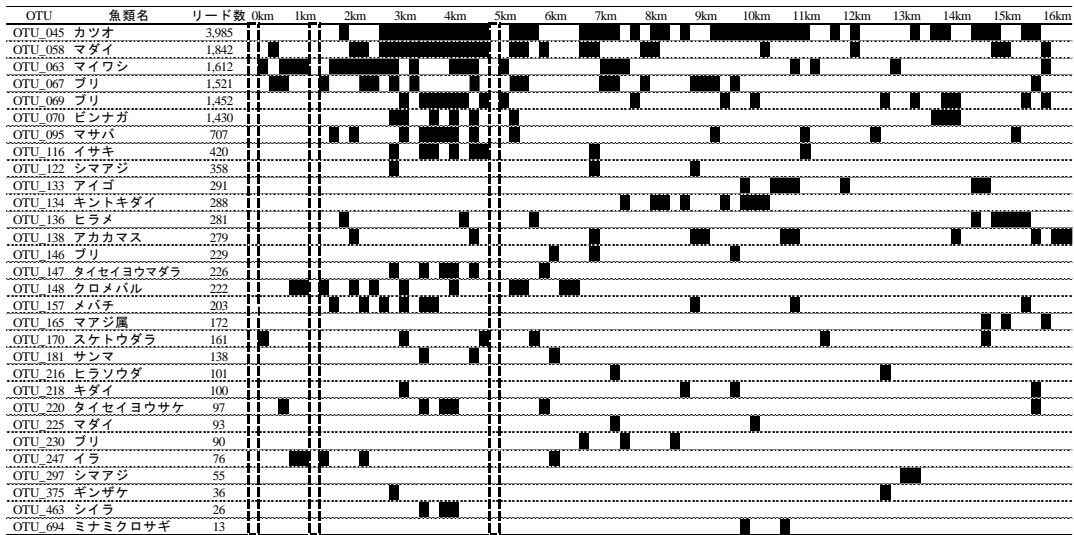


図-3 調査区間内で検出された非生息 OTU の分布。■ : 検出ブロック, □ : 解析不調。

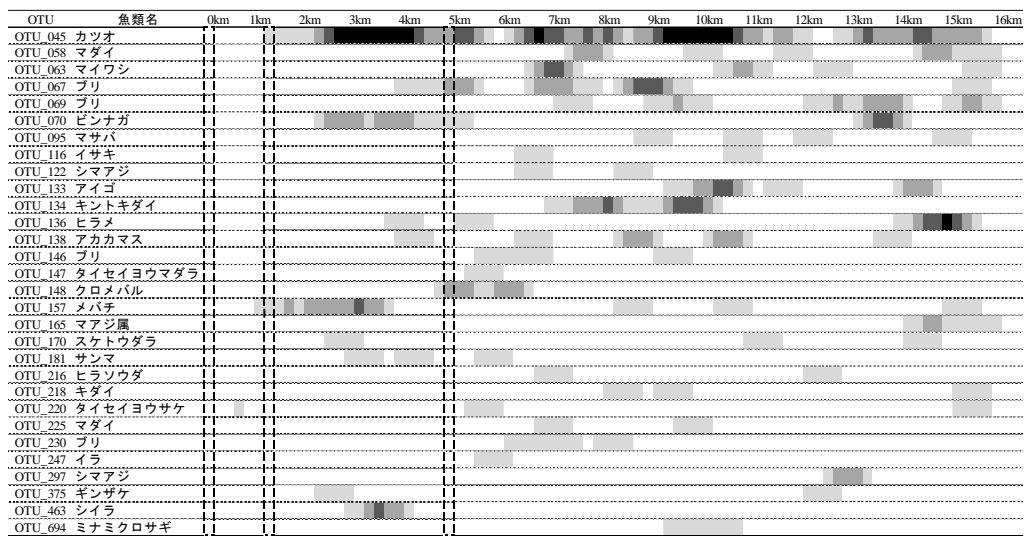


図-4 調査対象区間における非生息 OTU のヒートマップ。各配色は、“在区間” (■: 上流 4/4 ブロックで検出, ■: 3/4 ブロックで検出, ■: 2/4 ブロックで検出, ■: 1/4 ブロックで検出), ないし“不在区間” (□: 上流 4 ブロックで未検出) を示す。□ : 解析不調。

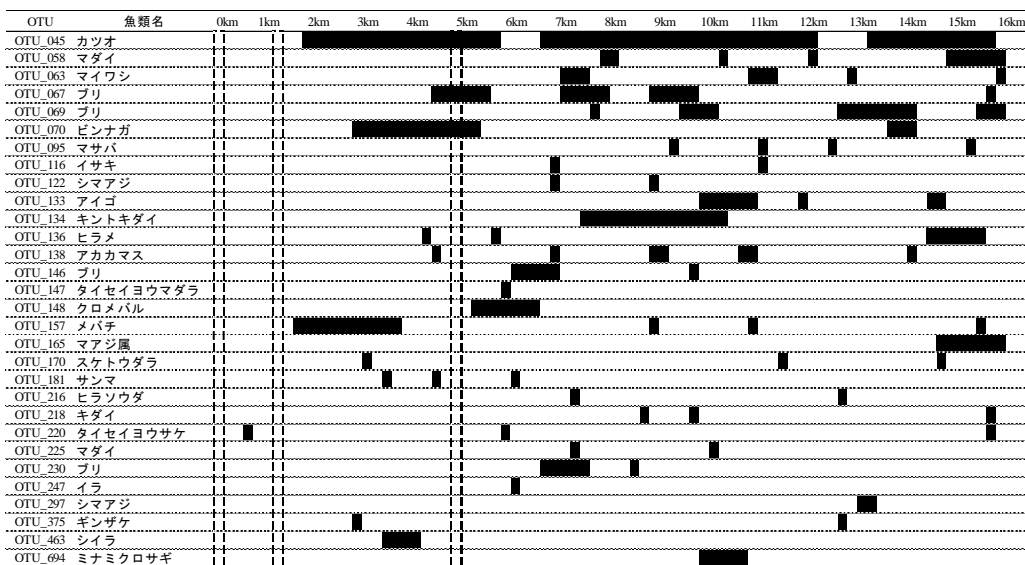


図-5 各“在区間”に含まれる検出ブロックの連続性に基づく非生息 OTU の推定検出範囲。■ : 検出区間, □ : 解析不調。

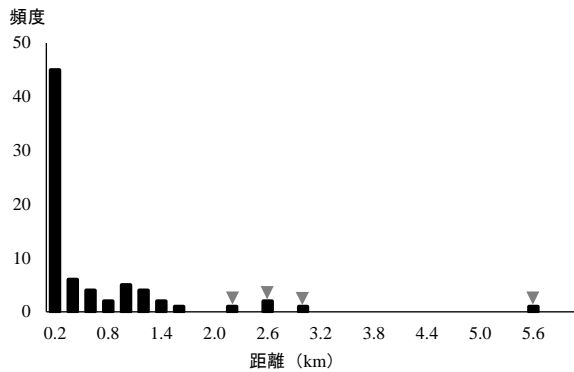


図-6 非生息 OTU の推定検出範囲の頻度分布。▼：外れ値と判定された範囲 ($p < 0.01$; Smirnov-Grubbs test)。

(4) 有効検出範囲の推定

非生息 OTU の検出例のうち、検討対象とする条件を満たした検出例は延べ 246 ブロックで得られ (2–43 [8.9 ± 9.0], 最小–最大 [平均 ± 標準偏差]; 図-3, 4), 不在区間を境界とした連続性の判定に基づき 74 の在区間に分割された (図-5)。各在区間に含まれる検出ブロックの連続性に基づいて推算された eDNA 含有物質の流下範囲は 1–28 ブロックであった (0.2–5.6 km; 図-5, 6)。推定流下範囲の頻度分布を見ると、全体の 60.8 %にあたる 45 / 74 例までが 1 ブロックのみ (<0.2 km) での検出例であった (図-6)。また、Smirnov-Grubbs test によって頻度分布内における外れ値の検定を実施したところ、1–8 ブロック (0.2–1.6 km) からなる 69 の検出区間が 99%信頼区間に含まれる範囲として抽出され、11 ブロック (2.2 km) 以上を含む 5 つの検出区間は外れ値として除外された ($p < 0.01$)。

本研究で得られた流下範囲の頻度分布に対する類似例として、山口ほか (2018) は、小河川におけるアユの浸漬実験から、eDNA 含有物質は排出源から 80 m 下流までの区間で半数未満まで減耗し、1 km 下流では 10–20 %程度となり、2 km 下流では検出されなくなったと報告している⁹⁾。異なる流況下で得られたデータに類似パターンが確かめられたことから、供給源の直下で生じる大きな減耗は、eDNA の検出傾向における一般的な現象と推測された。また、eDNA 含有物質の最大流下範囲について、Pont et al. (2019) は、微粒子有機物の沈降モデルに基づく検討により、中・大規模河川における流下範囲は平均流速と水深に依存し約 10–100 km に達し得ると報告している¹²⁾。しかし、本研究においては連続検出区間が 10 km に達する OTU は確認されず、既往知見との相違傾向が示された。本研究において eDNA 含有物質の検出区間が短く推定された要因としては、調査区間が緩流域を多く含む河川下流域に設定されたことで、流下範囲が短距離に止まった可能性が挙げられる。他方で、平田ほか (2019) は²¹⁾、利根川下流域での MB 解析結果から、一般的に魚類の利用が盛んな岸際環境で流心部よりも多くの魚類が検出されることを示し

ている。すなわち、中・大規模河川の下流域における eDNA 含有物質は横断方向に対して不均質に存在すると考えられ、鉛直方向のみに着目した Pont et al. (2019) では¹²⁾、eDNA 含有物質の流下範囲が過大に評価されている可能性が示唆されたが、河道内における eDNA 含有物質の横断方向に対する拡散傾向を示した知見はなく、妥当性の精査には至らなかった。

以上、MB 解析によって検出された非生息 OTU の出現傾向から、大部分がセグメント 2 ないし 3 に該当する雲出川の下流域においては (図-1)²²⁾、単一の供給源に由来する eDNA 含有物質の有効検出範囲は 1.6 km 程度に達する一方で、供給量が少ない場合には 0.2 km 程度で検出されなくなる可能性が高いと示された。また、非生息 OTU の推定検出範囲の頻度分布および既往知見から一部の eDNA 含有物質については 5.0 km 以上の範囲にまで到達し得ることが確かめられたが (図-6)、それらの OTU は全体検出数に占める頻度の低さから、有効検出範囲には含まないことが妥当と判断された。

4. 結論

本研究で得られた成果により、eDNA 含有物質の有効検出範囲ならびに流下パターンに関する一知見が得られた。これらの情報は、eDNA 分析技術を活用した河川環境のモニタリング調査や資源量の少ない絶滅危惧種あるいは外来生物の不在性を確認するための生息調査に際する、調査区間設定の指標としての活用が期待できる。ただし、本研究で示された推定範囲は河川下流域での流況下のみに基づき、中・上流域への展開については更なる検証が不可欠である。さらに、本研究で推定された eDNA 含有物質の有効検出範囲は、水理学的手法に基づく既往の推定流下範囲に対して大きな過少傾向を示した¹²⁾。いずれも一次元的な検討に基づく両手法に生じた相違は、有効検出範囲の推定に対する手法的限界を暗示している。そこで今後は、より精度高い有効検出範囲の推定を達成するため、異なる流況下での知見を集積すると同時に、河川規模に応じた eDNA 含有物質の横断的な拡散傾向についても検討を進めていくべきと考えられた。

謝辞：本研究の遂行にあたり、相島芳江氏、雨貝則子氏をはじめとする土木研究所河川生態チームの諸氏からは、解析作業に対する技術的協力を得た。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) Ruppert, K., M., R. J. Kline and M.S. Rahman: Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA, *Global Ecol. Conserv.*, Vol.17, e00547, 2019.
- 2) Minamoto, T., M. Miya, T. Sado, S. Seino, H. Doi, M. Kondoh, K.

- Nakamura, T. Takahara, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, W. Iwasaki, A. Kasai, R. Masuda and K. Uchii: An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols, *Environ. DNA*, <https://doi.org/10.1002/edn3>. 121, 2020.
- 3) 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土井秀幸・内井喜美子:環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. 日本生態学会誌 Vol.66, pp.583-599, 2016.
 - 4) Nakagawa, H., S. Yamamoto, Y. Sato, T. Sado, T. Minamoto and M. Miya: Comparing local -and regional- scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods, *Freshw. Biol.*, Vol.63, pp.569-580, 2018.
 - 5) 山口皓平・赤松良久・乾 隆帝・後藤益滋・河野誉仁:河川における環境 DNA 含有物質の動態に関する基礎的研究, 土木学会論文集 B1 (水工学) Vol.74, No.5, pp.I_409-I_414, 2018.
 - 6) Miya, M., R. O. Gotoh and T. Sado: MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples, *Fish. Sci.*, Vol.86, pp.939-970, 2020.
 - 7) 環境 DNA 学会:環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver2.1, URL: <http://ednasociety.org/manual>, 2019年5月8日取得, 2019.
 - 8) 土木研究所河川生態チーム: 環境 DNA 情報_報告書記載様式_案_Ver_1.2.1, URL: https://www.pwri.go.jp/team/rt/topic/2020/201211_01.html, 2020年12月11日取得, 2020.
 - 9) 村岡敬子・中村圭吾:河川における環境 DNA の実用化に向けた土木研究所の取り組み. 土木技術資料 Vol.61, pp.2-5, 2019.
 - 10) 遠山貴之・鬼倉徳雄・光益慎也・齋藤康宏:一級水系流域における魚類分布予測モデルの構築と多自然川づくり支援システムの開発, 河川技術論文集 Vol.25, pp.363-368, 2019.
 - 11) 中村圭吾:グリーンレーザーを用いた航空レーザー測深(ALB)による河川調査の現状と可能性, 水環境学会誌 Vol.42, pp.174-178, 2019.
 - 12) Pont, D., A. Valentini, M. Rocle, A. Maire, O. Delaigue, P. Jean and T. Dejean: The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches, *J. Fish Biol.*, Vol.2019, pp.1-13, 2019.
 - 13) 北川哲郎・村岡敬子・山田拓也・中村圭吾:河川水辺の国勢調査(魚類)における環境 DNA メタバーコーディングの試行事例分析, 河川技術論文集 Vol.26, pp.319-324, 2020.
 - 14) 河川環境データベース:環境 DNA を用いた河川生物把握の可能性に関するテーマ調査の実施について, URL: http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/kankyoDNA_200110.pdf, 2020年1月20日取得, 2020.
 - 15) 三重県河川国道事務所:雲出川河川維持管理計画, URL: <https://www.cbr.mlit.go.jp/mie/river/plan/maintenance.html>, 2021年2月26日取得, 2020.
 - 16) Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. P. Holmes: DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nature Methods*, Vol.13, 581-583, 2016.
 - 17) Sato, Y., M. Miya, T. Fukunaga, T. Sado and W. Iwasaki: MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding, *Mol. Biol. Evol.*, Vol.35, pp.1553-1555, 2018.
 - 18) Ogasawara, O., Y. Kodama, J. Mashima, T. Kosuge and T. Fujisawa: DDBJ Database updates and computational infrastructure enhancement. *Nucl. Acids Res.*, Vol.48(D1), pp.D40-D50, 2020.
 - 19) 中坊徹次 (編): 日本産魚類検索 全種の同定, 第III版, 東海大学出版会, 2013.
 - 20) 内藤太輔・都築隆禎・蔭山一人・宮本健也・赤松良久・乾 隆帝: 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, リバーフロント研究所報告 Vol.31, pp.9-16, 2020.
 - 21) 平田真二・白尾豪宏・飯田 岳・赤松良久・乾 隆帝・中村圭吾・村岡敬子: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, 河川技術論文集 Vol.25, pp.417-422, 2019.
 - 22) 山本晃一: 沖積河川学—堆積環境の視点から, 山海堂, 1994.

(2021. 4. 2 受付)