

<報 文>

群馬県内河川における環境DNAを利用した魚類生息調査*

吉野 有希菜**・木村 真也***・塚越 博之**・今藤 夏子****

キーワード ①環境DNA ②魚種同定 ③MiFish法 ④生物調査

要 旨

群馬県に生息する水生生物に関して生態系保全に有用な情報を収集・更新するため、群馬県内の6河川について環境DNAを用いた網羅的な魚類生息調査を実施した。魚類の検出結果を1985年に実施した捕獲調査結果と比較したところ、神流川では捕獲調査で確認された全ての魚種が環境DNA調査においても検出され、4つの河川（利根川、片品川、烏川、渡良瀬川）においては捕獲調査と比較すると70%以上の魚種が検出された。また、魚種ごとに検出地点を解析することにより、外来魚の侵入経路や生息域の経年変化を把握することが可能となり、環境DNAの検出・解析が生態系調査の一助となり得ることが示唆された。

1. はじめに

近年、生物多様性という言葉に注目が集まっているが、その多様性を知り、保護するためには、生物調査により生息状況を把握することが必要となる。特に、水生生物調査においては実際に生物を捕獲する方法が一般的であるが、調査精度を向上させるために地点数を増やすと調査時間が増し、応じて調査に要する費用も高額となるため、調査の頻度や地点数はかなり制限される。群馬県では2017年に生物多様性ぐんま戦略が策定され、生物多様性に関する情報の整備を行うことを目標とするなど、生物調査に対する行政の関心が高まっている。しかし、上記の理由等により、1985年以降県内全域の水生生物に関する詳細な調査¹⁾が行われておらず、情報が更新されていないのが現状である。

近年では、環境中から採取した生物由来のDNA（環境DNA）を解析することで生息生物を推定する新たな手法が考案され²⁾、現行の生物調査手法を補完できるのではないかと期待されている。特に、水環境における環境DNAによる調査では採水のみで試料採取が完結するため、短期間で多くの地点を調査することが可能となる。また、直接生物に触れることがないため、生物の生息環境を荒らさない

といった利点も挙げられる。

そこで、従来の手法である捕獲調査に加え、環境DNA調査を利用して群馬県の生物相を推定できれば生物多様性の情報整備に資することができるのではないかと考え、ゲノムに関するデータベースの構築が比較的進んでいる魚類を対象に、群馬県内河川における環境DNA調査を実施した。また、本調査より得られた魚類の生息状況から、過去の捕獲調査結果と照らし合わせて生息域に関する解析を行ったので、その結果についても報告する。

2. 調査方法

2.1 サンプルング地点と調査方法

本調査では、次世代シーケンサ（NGS, Miseq: Illumina製）を用いた網羅的な定性手法（MiFish法）において環境DNA調査を実施した。

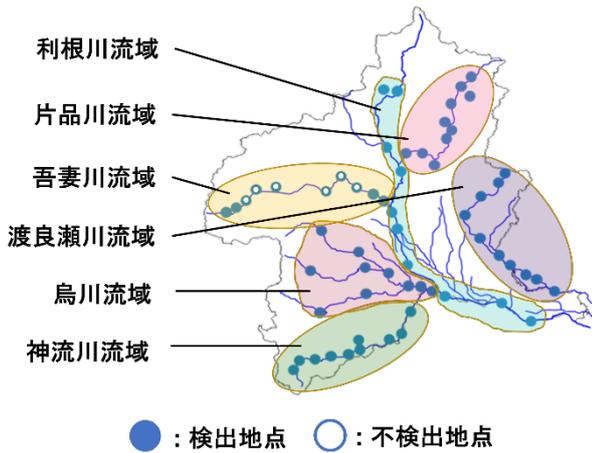
調査地点は、群馬県内の主要な6河川（利根川、片品川、吾妻川、烏川、神流川、渡良瀬川）より、各10地点（計60地点）を選定し（図1）、2019年6月から11月にかけて採水を実施した。各地点においてあらかじめ次亜塩素酸希釈水で滅菌処理を行ったポリ瓶に河川水を1L採水し、当日中にグラスファイバーフィルター（GF/F、

*Fish Habitat Survey Using Environmental DNA in Rivers in Gunma Prefecture

**Yukina YOSHINO, Hiroyuki TSUKAGOSHI（群馬県衛生環境研究所）Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

***Shinya KIMURA（群馬県東部環境事務所）Gunma Prefectural Institute of Tobu Environmental Affairs Office

****Natsuko KONDO（国立環境研究所）National institute for Environmental Studies



● : 検出地点 ○ : 不検出地点
図1 調査地点 (計60地点)

47mm:Whatman) によるろ過を実施した。ろ過後にDNAが残留したろ紙を試料として、-80℃の環境下で保存した。次世代シーケンサで分析するまでの前処理については、「環境DNA調査・実験マニュアル」³⁾ (以降、環境DNAマニュアル) に基づき実施した。

また、各河川流域にトラベルブランク、操作ブランクを設定し、試料と同様の処理を行った。

2.2 魚類の検出及び同定

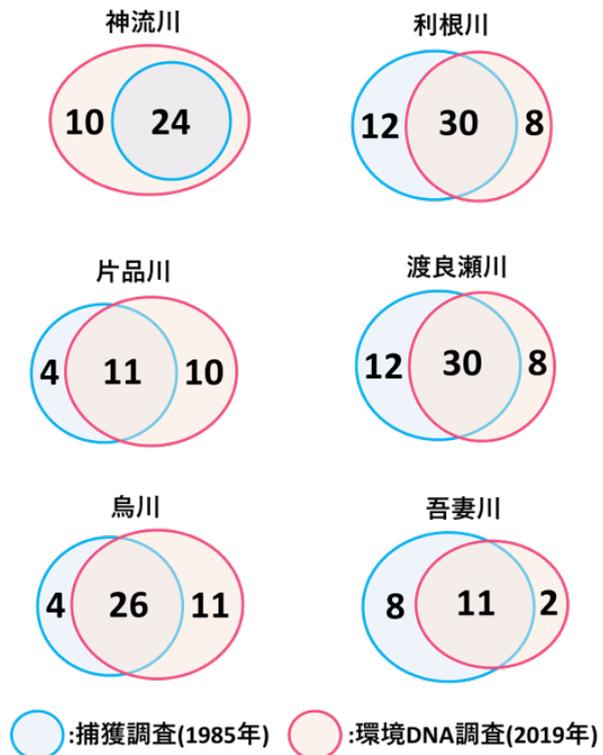
魚種解析は環境DNAマニュアルに基づき、次世代シーケンサの測定データから解析ソフトである「MiFish pipeline」(<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>) を用いて魚種の同定を行った。同定方法に関して、MiFish法で用いるプライマー間領域の塩基配列が複数の種と一致する場合、あるいは塩基配列の変異により別の種と判別される場合に、対象魚種は「識別に注意を要する種」とされる⁴⁾。こうした種については、環境省自然環境局生物多様性センターが編集する「MiFishによる種の識別に注意を要する淡水魚類の判定結果の一覧」と検出結果を照らし合わせ、精査した。

トラベルブランク、操作ブランクより試料と同程度の環境DNAが検出された場合は、コンタミネーションに由来するものとして対象魚種を解析結果から除外した。

3. 結果及び考察

3.1 環境DNAの検出結果

各調査地点における魚類の環境DNAの検出の有無を図1に、各河川における捕獲調査と環境DNA調査によって確認された魚種数を図2に示す。神流川流域では、今回の環境DNA調査で確認された魚種数(34種)が1985年の捕獲調査で確認された魚種数(24種)を上回り、捕獲した全ての魚種を検出することができた。また、神流川流域



● : 捕獲調査(1985年) ● : 環境DNA調査(2019年)
図2 各河川の検出魚種数

の捕獲調査で確認されていなかったニジマスが、今回の環境DNA調査では検出された。本調査の試料採取時期と神流川におけるニジマスの放流時期が合致していることから、神流川の環境DNA調査より得られた結果は捕獲漏れあるいは生息状況の変化を反映し、1985年の捕獲調査結果を補完していると考えられる。また、他4河川流域(利根川、片品川、烏川、渡良瀬川)においても、捕獲調査で把握した魚種のうち70%以上を環境DNA調査から検出でき、さらに生息情報等がありながら捕獲されていなかった魚種を環境DNA調査で検出できたことから、捕獲調査の補完方法として良好な結果が得られた。

一方で吾妻川流域では、目的のDNA領域を十分に増幅できた地点が少なく、1985年の捕獲調査で確認された魚種数の1/2程度の検出に留まった。吾妻川の生息魚種数の低下が疑われるが、実際に生息しているにもかかわらず試料より環境DNAが検出されていない可能性も考えられる。例えば表1において、アユは1985年の捕獲調査では確認され、2019年の環境DNA調査では確認されていないことが分かる。しかしながら、アユは例年吾妻漁業協同組合が放流事業を行っており、本調査の採水時期(6月~8月)に鮎釣りが解禁されていたことから、本調査時にアユが生息していなかったとは考えにくい。

また、環境DNAマニュアルによるとアユはMiFish法における増幅領域に変異を有する場合があります。増幅効率の低下が懸念される魚種とされているが、他河川の試料から

表1 吾妻川で捕獲(1985年)・DNA検出(2019年)された魚種

魚種名	捕獲調査	環境DNA調査
イワナ	●	●
ヤマメ	●	●
ウグイ	●	●
カジカ	●	●
ニジマス	●	●
カマツカ	●	●
ヨシノボリ	●	●
オイカワ	●	●
アブラハヤ	●	●
モツゴ	●	●
ホトケドジョウ	●	●
ウナギ	●	●
シマドジョウ	●	●
アユ	●	●
ブラウントラウト	●	●
コイ	●	●
ギンブナ	●	●
ギバチ	●	●
アカザ		●※
ハス		●※

※検出リード数が100未満

はアユのDNAが検出できていたことから、吾妻川特有の要因により環境DNAが検出されにくくなっていると推測できる。吾妻川は強酸性の源泉地域を支流として有しており、一部の酸性支流は流域途中で石灰により中和された後に吾妻川へ合流するものの、同じく酸性である万座川や遅沢川、四万川といった支流は特別な処理無しに直接吾妻川へ合流している⁵⁾ (図3)。これら河川の合流地点後に環境DNAが検出されなかった地点があることから、一般的に環境水中で阻害物質とされる成分が吾妻川試料に含まれる可能性の他、河川水のpHあるいは温泉等に含まれる成分といった吾妻川流域特有の水質が増幅効率の低下に関与している可能性が考えられる。そこで、これらの可能性について原因究明を試みた。

環境水中に一般的に含まれるPCR阻害物質は、植物由来の腐植物質であるフミン酸やクロロフィルが代表的である。環境DNAマニュアル中ではその対応として「試料の希釈」と「使用試薬の変更」が記載されている。本調査では、神流川流域より採水した1試料において増幅効率の低

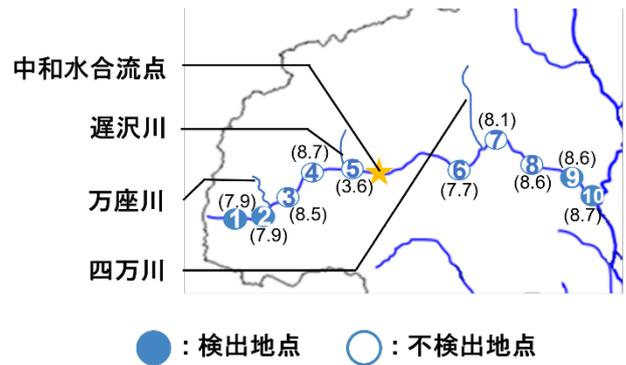


図3 吾妻川流域の調査地点と中和水・支流合流点 (括弧内は河川水pHの測定結果)

下が見られた。この採水地点では水中に藍藻類が多く含まれていたため、クロロフィルによりDNA増幅が阻害されたと考え、試料を希釈し再分析したところ増幅効率が改善した。そこで吾妻川の試料においても、フミン酸やクロロフィルが含まれている可能性を考慮し①から⑩まで全ての採水地点試料に希釈操作を追加したものの、DNAの増幅効率に変化は見られなかった。また、DNA増幅に使用した試薬 (KAPA HiFi HS ReadyMix : KAPA Biosystems社製) について、環境DNAマニュアル中に阻害物質からの影響を受けにくいと記載されている試薬 (KOD FX Neo : 東洋紡製) に変更し同試料の再分析を行ったが、やはり増幅効率は回復しなかった。

さらに、増幅効率の低下要因を詳しく探るため、試料採取地点①~⑩の河川水のpHを測定したところ、図3中の結果が得られた。遅沢川と吾妻川の合流点である地点⑤はpHの値が低下していたものの、その他の地点ではpHの低下が見られなかった。このことより、吾妻川試料における増幅効率の低下に対し河川のpHが直接要因となっている可能性は低いと考えられる。ただし、この地域の源泉に含まれる何らかの成分がDNA増幅を阻害している可能性は高く、原因の解明とその対策については今後の課題である。

3.2 魚類生息域の変化

環境DNA調査により現在も群馬県内河川に多くの魚種が生息していることが判明した一方、特定の魚種に注目し捕獲調査結果と環境DNA調査結果を比較することで、生息域の経年変化についても把握することが可能となった (図4)。

ウキゴリについて過去の調査結果 (群馬県動物誌: 1985年, 河川水辺の国勢調査⁶⁾ : 2009年) と本調査を時系列で並べて図4上部に示す。MiFish pipelineの魚種同定において、ウキゴリは識別に注意を要する種とされているものの、2009年の捕獲調査とほぼ同地点で検出されている

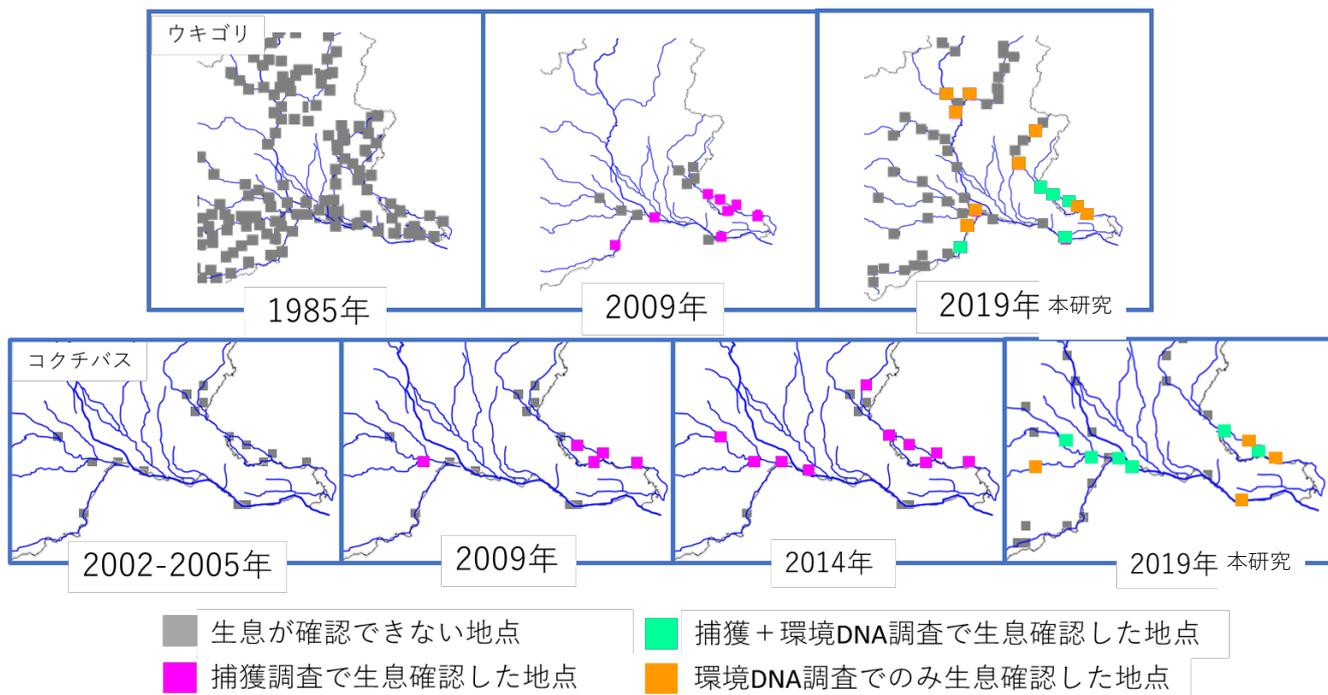


図4 ウキゴリとコクチバスの生息域変化

ことから、信頼できる検出結果であると考えられる。さらに県中北部地域において、1985年の調査ではウキゴリの生息が見られなかったのに対し、2019年の本調査では生息を確認できたことから、生息域の変遷把握に関して環境DNA調査の有用性が伺える。

また、国外からの移入種であるコクチバスが県内へ侵入している状況も、図4下部に示すとおり既存資料を用いた経年変化を見ることにより明らかとなった。コクチバスは1925年頃に国内へ移植された特定外来生物であり⁶⁾、固有種を捕食対象とするため国内全域で注視されている。コクチバスは1997年から2005年にかけて群馬県内湖沼でのみ確認される魚種であったが⁷⁾、2009年の生物調査から群馬県内の河川でも確認されるようになった。今回の環境DNA調査においては、生息域が県南西部へ拡大していることが判明し、定期的な調査結果を図示することで生息域の変遷を可視化することができた。

さらに今回の解析により、ウキゴリとコクチバス共に、過去の捕獲調査で生息が確認できなかったものの環境DNA調査で生息が確認された地点があることが判明した。これらは解析の一例であるが、地域生態系保全の実施に際して、より簡便な環境DNA調査を交えながら定期的に調査を行うことの有用性が示唆された。

4. まとめ

MiFish法による環境DNA調査は、網羅的に魚種を推定でき、従来の調査方法を補完し得ると考えられる。しかしながら、吾妻川のような増幅効率が低い試料においては、

河川特有な阻害物質の有無を確認し増幅効率を改善するために、試料採取時やDNA抽出時等の操作行程へ今後も検討を重ねていく必要がある。

また、MiFish法により国外から移入した魚種の生息情報を把握できることから、環境DNA技術の生態系保全への活用が見込まれる。魚類以外の水生生物についても、対象生物のゲノムに関するデータベースの整備により本調査で使用した試料を用いて検出・解析が可能となり得る。当所では底生生物に関する環境DNA調査の実施も検討しており、生物学的な水質判定への活用が期待できることから、魚類以外の生物に関するデータベースの早期構築が望まれる。

5. 文献

- 1) 群馬県高等学校教育研究会生物部会「群馬県動物誌」編集委員会：群馬県動物誌，1985
- 2) Minamoto T., Yamanaka H., Takahara T., Honjo M.N., Kawabata Z. : Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, **13**, pp.193-197, 2012
- 3) Minamoto T., Miya M., Sado T., Seino S., Doi H., Kondoh M., Nakamura K., Takahara T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Iwasaki W., Kasai A., Masuda R., Uchii K. : An illustrated manual for environmental DNA research : water sampling guidelines and experimental protocols.

- Environmental DNA*, **3**, pp. 8-13, 2021
- 4) 環境省自然環境局生物多様性センター：環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き第2判, 2021
 - 5) 国土交通省関東地方整備局：吾妻川上流総合開発事業（実施計画調査），p. 3, 2011
 - 6) 国土交通省：河川環境データベース, <http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/> (2021. 12. 7アクセス)
 - 7) 国立研究開発法人国立環境研究所：侵入生物データベース, <https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/> (2021. 12. 7アクセス)
 - 8) 群馬県：群馬県のコクチバスの現状と対策について, <https://www.pref.gunma.jp/06/f2210023.html> (2022. 1. 25アクセス)