

# 淡水魚類の生息場評価に対する環境DNA分析の有効性

北川哲郎・村岡敬子・中村圭吾

## 1. はじめに

環境DNA（environmental DNA；以下「eDNA」という。）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、効率的かつ安価な調査手法として注目を集めている。特に魚類については知見集積の進展が著しく、学術団体や行政機関から調査マニュアル等が公表されるなど、実用段階に達しつつある<sup>1),2)</sup>。eDNA分析を河川事業へ活用することができれば、従来法からの大幅な効率化が見込まれる<sup>3)</sup>ばかりか、近年発達する測量技術や地理情報技術との組み合わせによる、緊密で精度の高い環境評価へのさらなる展開が期待できる。

eDNA分析は、目的生物の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」という。）という2手法に大別される<sup>3)</sup>。とりわけMB解析によって得られる生物リストは、対象とする魚類や鳥類といった分類群ごとに設計されるユニバーサルプライマーを用いたメタバーコーディング法で取得される遺伝情報を、生物名と遺伝情報とが結び付けられた既知のデータベースと照合することで構築される。生物の形態情報に基づく同定作業を経て生物リストを構築する直接採捕をはじめとした従来手法とは大きく異なり、たったひとつのサンプル（例えばコップ一杯の河川水）から当地に生息する多様な生物の検出を期待できる反面、調査（解析）精度は対象とする遺伝領域の変異状況や照合するデータベースの登録情報に依存するといった特性を持つ。すなわち、生息場評価に対する直接採捕とeDNA分析とが有する検出対象へのアプローチは根本的に異なり（図-1）、eDNA分析の有効性を明らかにするためには、直接採捕との一致率ばかりでなく、採水地点に見られる生息場などの環境条件との整合性に着目した検証を行っていく必要がある。

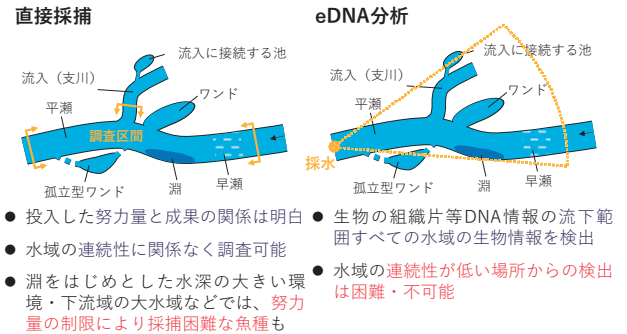


図-1 直接採捕とeDNA分析による魚類の検出イメージ

本稿では、土木研究所河川生態チームの調査研究で集積されたeDNA分析に関する知見を一部紹介したうえで、淡水魚類の生息場評価に対する調査手法としての有効性について論ずる。

## 2. 環境変化に対するeDNA分析の応答性

### 2.1 河川間での環境特性の変化に対する応答性

eDNA分析によって得られる魚類リストから採水地点の環境特性を説明し得る傾向が検出されるか否かを検証するため、北海道函館湾周辺へ注ぐ12の中小河川を調査地として10の河川水サンプルを用いたMB解析および環境調査（採水時の目視調査および文献情報から河口位置、河床・岸際材料、流路形状、河口砂州の発達、河口プール[河口砂州の影響などで生ずる汽水性の滞留水域]・ダムの有無、周辺土地利用を記録）を実施した<sup>4)</sup>。

調査の結果、MB解析により人為由来と見られる16種類を含む57種類の魚類が検出された（4～29種類/河川）。魚類の検出傾向として、流路が長く平野部を流れる川では淡水魚類が、市街地周辺の川では人為由来とみられる魚類が、それぞれ多くなった（図-2）。さらに、複数の変数（次元）を含むデータの類似度を低次元化し相対距離として表現することができる非計量多次元尺度法（以下「NMDS」という。）によって各河川の環境特性ならびに魚類リストの特性を序列化した。その結果、環境情報では、⑨石川と⑩小田島川とで形

成される小クラスタ (A) とその他10河川からなる大クラスタ (B) が、検出魚類では、①大釜谷川～④下町沢川までの区間に含まれる4河川からなるクラスタ (C) と⑥戸切地川、⑦大野川、⑧久根別川、⑪亀田川からなるクラスタ (D) が、それぞれ確認された (図-3)。⑤宗山川、⑨石川、⑩小田島川、⑫松倉川における検出魚類は、それぞれ固有性が高くクラスタを形成しなかった (E～H)。また、NMDSに対して有意な適合性を示す変数として、環境情報では砂州の発達、河口プールの有無、礫質の河床材料、河口の位置、埋立地に開口、の5項目が、検出魚類では海産魚類のニシン、純淡水魚類のコイ、ドジョウ、回遊性のカンキョウカジカ、エゾハナカジカ、回遊性か純淡水性の陸封型か判断できないブラウトラウト、ニジマス、サケ属の1種の、計8種類が、それぞれ抽出された。これらの類型結果を平面上に図化したところ (図-3)、NMDS2については明瞭な傾向が読み取られなかったが、NMDS1においては環境情報あるいは検出魚類に基づく河川の配置に類似傾向が見られた (NMDS1、2: 各河川の検出魚類リストと環境情報とが有する情報を低次元化することで得られた相対距離の軸)。すなわち、I. 環境情報では「河口砂州の発達」・「河口プール形成」・「礫質の河床材料」が負の方向、「埋立地に開口」が正の方向を指したことで「下流域における自然性の低さ」と解釈できる、II. 検出魚類では両側性回遊魚類である2種類のカジカ属や両側性回遊性に含まれる可能性のあるサケ属の1種が負の方向を指したことで「両側性回遊魚類の有無」と解釈できるベクトル分布が、それぞれ得られた。

以上の結果は、河口の人為環境化が回遊性魚類の生息に悪影響を及ぼすと報告した既往知見に合致するもので<sup>4)</sup>、MB解析を用いた魚類調査は、調査地の環境評価に活用可能な精度を備えたリストの構築が期待できる調査手法と示唆された。

## 2.2 同一河川内での環境変化に対する応答性

河川水をサンプルとしたeDNA分析では、採水地点の上流域で排出されたDNAを網羅的に検出するため、対象範囲の特定が非常に難しい。また、支川や水田地帯など周辺水域からの影響を受け、本川区間の環境が有する特徴が希釈されることも想定される。他方で、河川事業として実施される

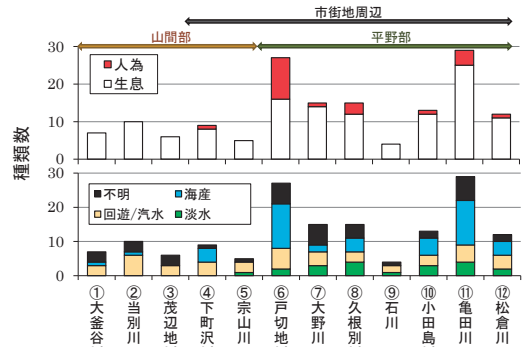


図-2 函館湾周辺に注ぐ12河川でのMB解析で検出された魚類の特性 (北川ほか<sup>4)</sup>から作図)

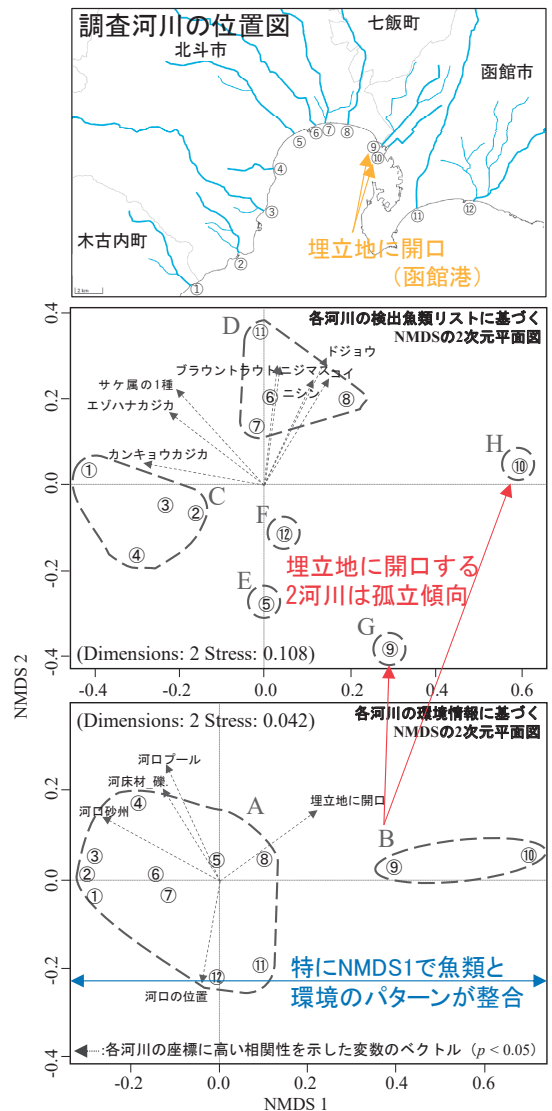


図-3 12河川の下流域の位置図 (上) ならびに、魚類リスト (中) と環境情報 (下) の特徴をNMDSで展開した結果の対比図 (北川ほか<sup>4)</sup>から作図)

魚類調査では、調査区間内における縦断的な連続性の有無や縦断的な環境変化に応じた魚類相の変遷を捉えることが重要な目標の一つに数えられている<sup>5)</sup>。そこで当チームは、eDNA分析によって得られる魚類リストの組成が河川の縦断的な環境

変化を反映しているかを検証するため、国内最大規模の環境調査である河川水辺の国勢調査（以下「水国調査」という。）のテーマ調査の一環として、魚類を対象としたMB解析の活用事例を収集・分析した<sup>6)</sup>。

事例収集の結果、2016年4月～2019年9月までに実施されていた水国調査から23例のeDNA活用事例が得られた（MB解析：21例、種特異解析：2例）。そのうちMB解析と直接採捕の結果が比較可能であったのは76地区を含む16例で、MB解析と直接採捕とで得られた魚類リスト（在・不在）に有意な正相関が認められたのは全体の88.2%にあたる67地区であった（ $p < 0.05$ 、無相関検定；図-4）。大部分の地区で正相関が認められたことから、MB解析は直接採捕に匹敵する検出精度を持った調査手法であることが示唆された。さらに本研究では、縦断的な環境変化に対するMB解析の応答性を精査するため、環境の異なる多数の地区を含む4事例（天塩川、淀川、遠賀川、大淀川）を対象に、最上流～下流域における環境の変化と魚類相の変化の関係性の検出を試みた。本分析では、物理環境ならびにMB解析ないし直接採捕で得られた魚類のリストという質の異なるデータを比較するため、河川の物理的な環境変化とNMDSによる序列化で求めた魚類リストの変遷とについて、最上流～最下流地点間の物理的な距離と魚類リストに見られた地区間の違い（距離）とを0～1の範囲で標準化し図化した（図-5）。分析の結果、とりわけ遠賀川の地点②～④や大淀川の地点②～④では、MB解析において、河川環境の変化と関連付けられる<sup>8)</sup>主要な物理的イベント（河川形態の変化、支川流入、横断工作物）を挟んだ地区間の変化幅が大きく評価され、物理的

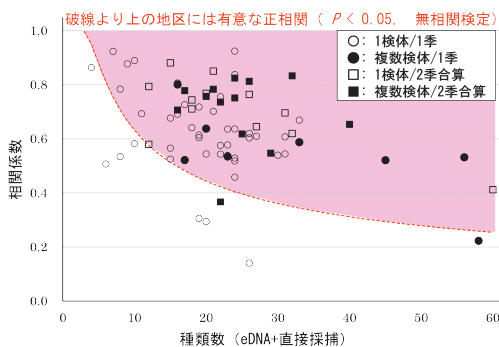


図-4 水国調査eDNA活用事例中の各地区に見られたMB解析と直接採捕結果の相関関係。記号は各事例における比較方法の違い（北川ほか<sup>6)</sup>から作図）

イベントの影響を強く受ける傾向にあると確かめられた。以上により、水国調査など数km～数十km程度の隔たりを経て調査地区が設定されるケースでは、MB解析によって地区間の縦断的な環境変化を反映したリストの構築が可能と推察された。ただし、本研究内でリストアップされた魚類を生活型（海洋性/汽水性、回遊性、淡水性、不明）・遊泳型（遊泳性・底生）の別に集計したところ、海洋性/汽水性魚類には直接採捕と比較して検出率が低下する傾向が見られ（図-6）、当該魚類が頻出する河川汽水域においては、適切なMB解析の利用条件を精査していく必要があると考えられた。

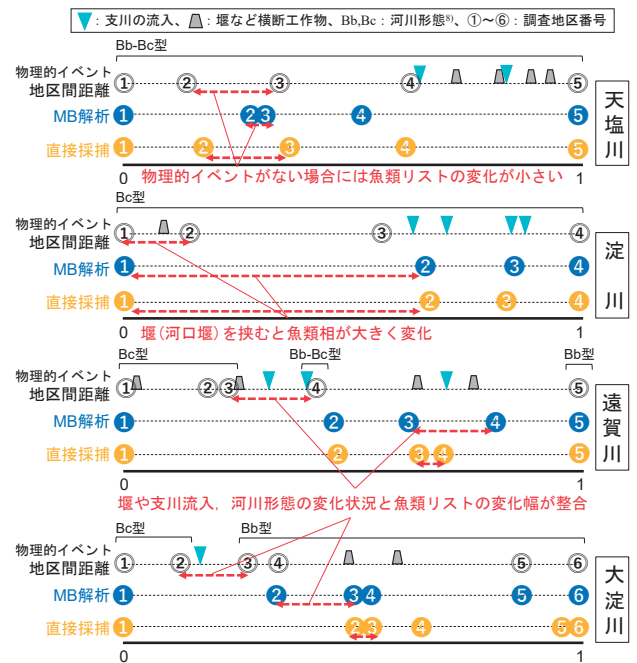


図-5 調査地区間の距離および物理的イベントとMB解析・直接採捕で得られた魚類リストの地区間変化。地区間変化の量（距離）は、NMDSに基づく序列化の結果から算出した（北川ほか<sup>6)</sup>から作図）

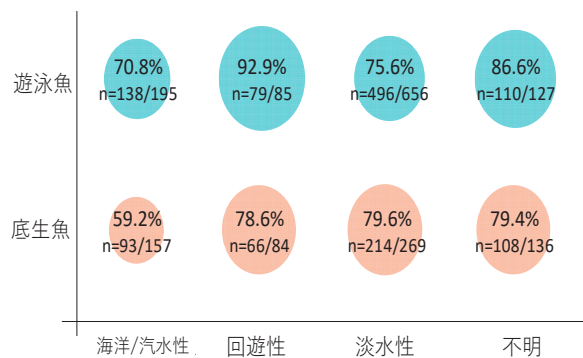


図-6 生活型・遊泳型別に見た検出状況（eDNA/eDNA+直接採捕、北川ほか<sup>6)</sup>から作図）



### 3. 今後の展開

ここまでの調査研究で得られた知見から、eDNA分析とりわけMB解析は、河川の環境特性の違いや縦断的な環境の変化を捉えた淡水魚類のリストを構築し得る手法であると推察された。本成果は、MB解析の結果と河川環境との整合性を示すもので、eDNA分析が淡水魚類の生息地評価や、定性的なモニタリングに対して有効な調査手法であると示唆している。

他方で、eDNA分析技術については、頻繁な流況変化など特有の環境を呈する河川汽水域ではMB解析と直接採捕の結果が乖離する傾向にあること<sup>6)</sup>、検出精度が高く最も一般的に利用されるMiFish系プライマーでも解析領域上の制約から詳細な識別が難しい分類群が残されることなど<sup>2),7)</sup>、実務展開を目指した解析に関わる諸条件の定式化に向けて議論すべき課題が残されている。また、河川中におけるeDNA含有物の検出（流下）範囲に関する実証的な検証事例はいまだ少なく、採水条件に応じた想定検出範囲の変化に関する判断基準の策定や精度高い拡散モデルの確立には達していないことから、精緻な定量評価が求められるケースについては、eDNA分析技術の適用は難しい現状にあると言える。

そこで今後は、河川環境中におけるeDNA含有物の動態解明や、分析条件の高精度化ならびに定式化へ向けた検討を進めると同時に、eDNA分析という手法そのものが有する技術的制約の把握に努めていく必要がある。さらに、直接採捕など従

来型の調査手法との効果的な併用方法の検討に不可欠な、多様な環境下・流況下における分析事例を集積しeDNA分析に見られる検出特性を見極めていくことも、河川事業への展開を図るうえで重要なステップになると考えられる。

#### 参考文献

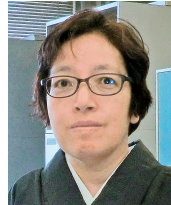
- 1) 環境省：「MiFishによる種の識別に注意を要する淡水魚類リスト」について、[http://www.biodic.go.jp/edna/edna\\_top.html](http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html)、2019
- 2) 環境DNA学会：環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.2、<https://ednasociety.org/#manual>、2020
- 3) 村岡敬子、中村圭吾：河川における環境DNAの実用化に向けた土木研究所の取り組み、土木技術資料、第61巻、第1号、pp.38～41、2019
- 4) 北川哲郎、村岡敬子、中村圭吾：環境DNAメタバーコーディングによって検出された函館湾周辺の中・小河川群における魚類の出現傾向、日本生物地理学会会報、Vol.75、pp.9～17、2020
- 5) 国土交通省：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】、<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/manual.htm>、2016
- 6) 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解析の試行事例分析、河川技術論文集、Vol.26、pp.319～324、2020
- 7) Collins, A.R., J. Bakker, O.S. Wangensteen, A.Z. Soto, L. Corrigan, D.W. Sims, M.J. Genner and S. Mariani: Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI, *Methods in Ecology and Evolution*, <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13276>
- 8) 国土交通省：河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル、<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/manual.htm>、2016

北川哲郎



研究当時 土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム交流研究員、現 (株)建設環境研究所環境部、博士(農学)  
Dr. KITAGAWA Tetsuro

村岡敬子



土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム 総括主任研究員  
MURAOKA Keiko

中村圭吾



土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム 上席研究員、兼 自然共生研究センター長、博士(工学)  
Dr. NAKAMURA Keigo