

後志利別川における環境DNAを活用した魚類相 モニタリング

—新技術による調査の効率化・高精度化に向けた取り組み—

函館開発建設部 工務課

○三佐川 剛昌

鳥谷部 寿人

パシフィックコンサルタンツ(株)

上月 佐葉子

河川水辺の国勢調査の魚類調査では、普通種から希少種まで魚類を網羅的に把握する必要があるが、これまでのように一定の努力量で行われる捕獲調査では、現地の状況により把握が困難な魚種もあった。後志利別川では、このような課題への取組として、環境DNA技術を活用し、現地調査との種数の比較を行っている。本報告では、環境DNAを活用するメリットと、調査結果を評価する上での留意点について報告するものである。

キーワード：自然環境、河川水辺の国勢調査、環境DNA

1. はじめに

後志利別川は、その源を北海道瀬棚郡今金町の長万部岳(標高972m)に発し山間部を流下し今金町、せたな町2町の市街部を貫流し日本海に注ぐ、幹川流路延長80km、流域面積720km²の一級河川であり、全国一級河川の水質調査で、「水質が最も良好な河川」を幾度も獲得している清流河川である。源流から住吉付近の上流部は、渓谷から美利河ダムへ流入し、ダム下流は山間部を蛇行する、河川勾配約1/200～1/500の急峻な山地溪流である。河岸には自然河岸が多く残され瀬と淵が存在することから、サクラマスなどの産卵床が多数見ることができる。住吉付近から利別目名川合流点付近までの中流域はショートカットによる人工的な河道であったが、現在では河岸に植生が繁茂し、交互砂州に伴う瀬淵が形成され、アユなどの良好な生息環境が形成されている。利別目名川合流点付近から河口に至る下流部は、河床勾配約1/1,400～1/3,000と緩やかな流れとなり、カワヤツメの生息環境が形成され内水面漁業も行われている。流域は、サケの増殖事業が行われているほか、支川のメップ川は、サクラマスの資源維持培養を図る重要な河川として、保護水面に指定されている。

河川水辺の国勢調査は、「河川環境の整備と保全を適切に推進するため、河川の自然環境に関する基礎情報の定期的、継続的、統一的な収集整備を図るもの」として、全国の河川・ダム湖で実施されてきた¹⁾。これら河川水辺の国勢調査の成果は、整備計画の検討や改修工事をはじめとした河川事業における環境情報の活用のほか、河川環境データベース(<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/>)として公開されている。この公開情報は、生物多様性評価の地図化²⁾や、学術論文に利用されている。特に魚類調査の結果は河川環境とのかかわりが深いことから多くの活用があり^{3)～5)}、河川水辺



図-1 魚類調査地点位置図

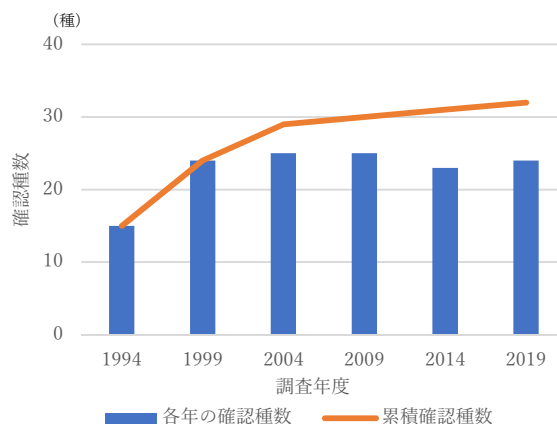


図-2 河川水辺の国勢調査による魚類の確認状況

の国勢調査の中でも重要な位置を占めている。

後志利別川では、直轄管理区間4地点および美利河ダム周辺の5地点での調査が行われている(図-1)。河川水辺の国勢調査としては、1994年から5年に1度の頻度で、6回の魚類調査が行われており、初回の調査である1994年は15種と少なかったものの、以降の調査からは23~25種程度、累計で32種の魚類が確認されている(図-2)。近年では新たに確認される種も限られ、魚類相はおおむね安定していると考えられており、今後継続的に調査を実施していくにあたり、調査地点や手法には効率化が求められる。一方で、近隣ではブラウントラウトの移入⁶⁾などに代表されるように、外来種の侵入も懸念されており、これらの侵入を早期に発見することは、河川管理上重要な役割となっている。これらのことから、河川の管理においては、効率性と精度の高さを両立した魚類の調査手法の開発が求められている。

函館開発建設部では、このような課題に対して、近年着目されている新技術である環境DNAを活用し、効率的かつ精度の高い調査への取り組みを模索しており、これまでに得られた成果について紹介する。2章で環境DNAの特徴をはじめとした概略、3章で環境DNAと捕獲調査を比較した場合の精度の検証、4章で環境DNAを使用する上での留意点を示す。

2. 環境DNAの特徴

環境DNAとは、様々な生物に由来する水や土壌といった環境中に浮遊・存在しているDNA⁷⁾のことを指し、体表や排泄された糞などに含まれる細胞片に由来するものと考えられている。これら環境DNAを採集し、種に特有の領域を増幅し読み取ることで、その放出した生物種を推定することができる。

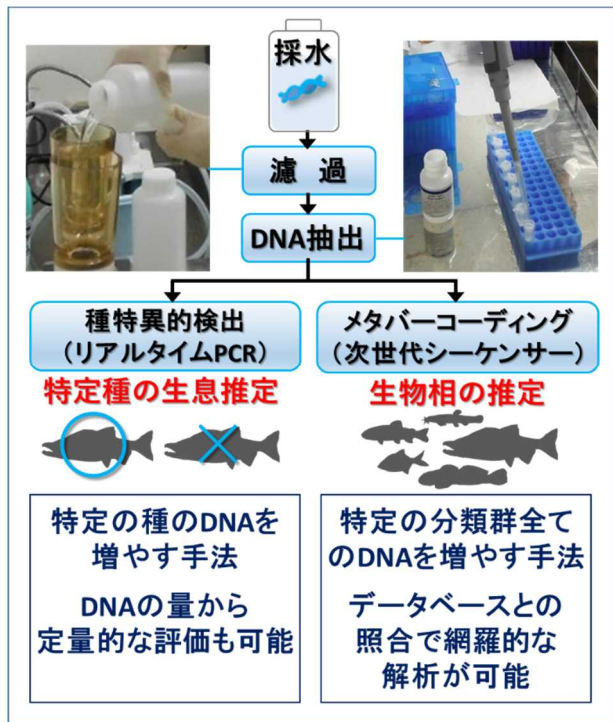


図3 環境DNA分析の種類と分析フロー

これまで多くの労力を必要とする捕獲調査によって魚類の網羅的な把握に努めてきたが、環境DNA分析を用いることで、以下のような点がメリットとしてあげられる。

1. 環境サンプルの採集のみとなるため、調査にかかる労力が低減される。
2. 調査者間の知識や技術による誤差を減らせることが期待できる。
3. 夜行性の種や石の隙間に隠れている種など捕獲が難しい種も確認が期待できる。
4. 捕獲を伴わないため、希少な種の生体や生息環境を損なわない調査が実施できる。

環境DNA分析には、特定の対象種のDNAを種特異的に検出するアプローチと、特定の分類群のDNAを網羅的に検出するメタバーコーディングと呼ばれるアプローチに大別される⁸⁾。両者は、採水からDNAの増幅までは概ね同様の処理工程で、特に現地で行う作業は採水による環境サンプルを収集するのみであり、その後異なる機器を用いた分析を行う(図-3)。種特異的なアプローチでは、特定の生物に特徴的なDNA配列を特異的に増幅しリアルタイムPCRを用いた分析を行う。網羅的な検出では、次世代シーケンサー(NGS)により

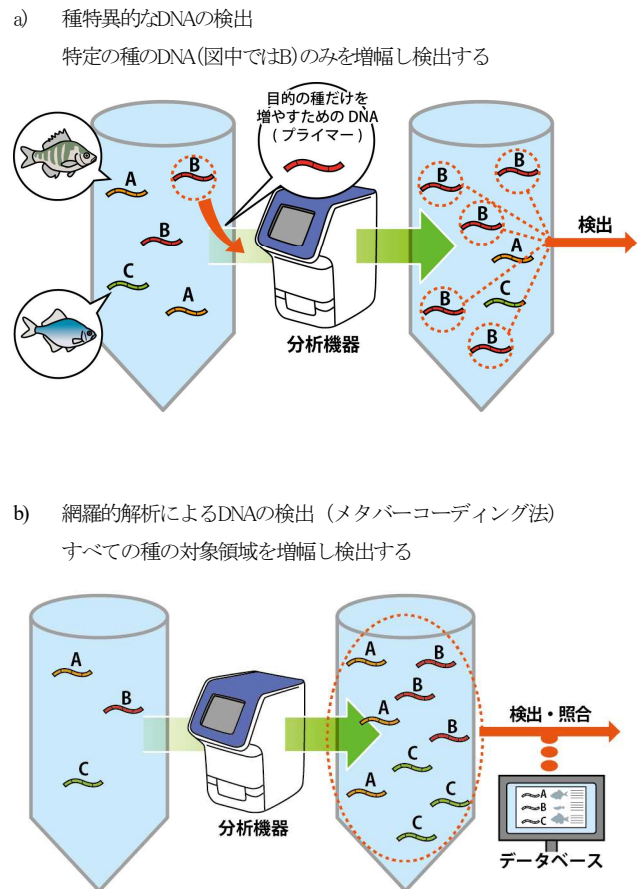


図4 アプローチの違いによる増幅・検出方法の違い

多種のDNAを同時並列で増幅するものである(図-4)。

今回の調査では、河川水辺の国勢調査における現地調査と精度の比較をすることを念頭としたことから、河川における魚類相の把握を行うために、メタバーコーディングの手法を適用した。

3. 環境DNA精度検証方法

3.1 現地調査の方法

環境DNAの精度検証を行うため、現地調査では採水による環境DNAの収集・分析結果と、「平成28年度版河川水辺の国勢調査マニュアル¹⁾」に基づいた捕獲調査結果を比較することとした。

調査地点は、河口部からダム湖を含む上流域にかけて広い範囲で精度を検証するため、河川水辺の国勢調査で設定された9の調査地点で実施し、河川環境縦断区分に従い、下流域、中流域、上流域、ダム湖、ダム湖流入河川に区分した。

採水方法は、基本的に環境DNA調査・実験マニュアル⁹⁾に基づいて実施した。環境DNAは感度が良いため、採水時に周囲からの混入を極力避ける必要がある。採水のタイミングは、捕獲調査による攪乱や混入を避けるため、捕獲調査に先立って行った。採水の方法は、調査地点の環境にかかわらず共通で、調査地点別に未使用のボトルを使用し、素手での採水は行わず、新しいラテックスグローブを使用し行った。採水箇所は、各調査地点で図-5に示すような平瀬等最も普通に見られる環境を選定し、該当環境の表層水を1Lを採水

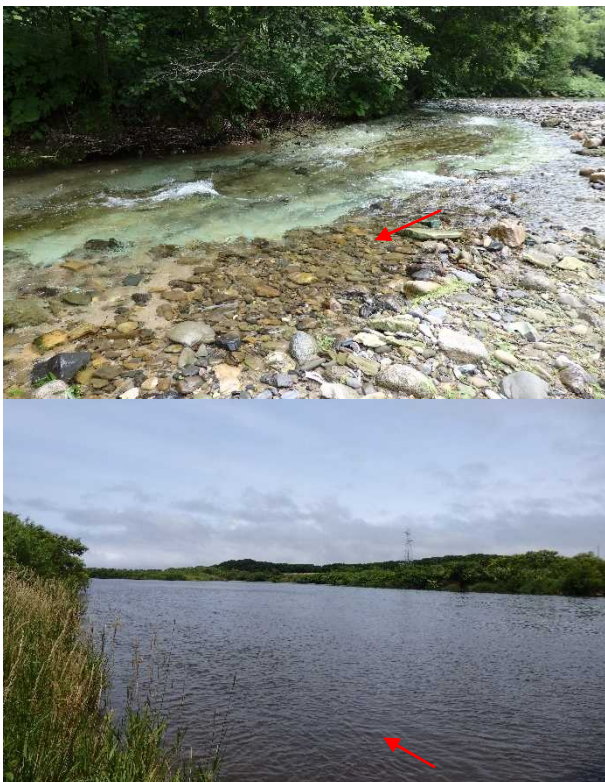


図-5 代表的な採水環境

上：ダム流入河川、下：下流域、矢印は流向を示す

した。長靴等装備品からのDNAの混入を避けるため、水中には立ち入らず、極力水に触れないように行った(図-6)。採水検体は、バクテリアによるDNAの分解を防ぐため、塩化ベンザルコニウム10w/v%水溶液を0.1%になるように添加し、転倒混合を十分に行ったあと、温度変化を避けるため、保冷剤を入れたクーラーボックスに低温保存し、陰性対象として蒸留水を用いたクーラーボックスとともに、遮光・冷蔵状態として冷蔵便で実験室に運搬した。



図-6 採水の状況

捕獲調査は、平成28年度版河川水辺の国勢調査マニュアル¹⁾に基づき、調査地点の環境に応じて、投網、たも網、電撃捕魚器、小型定置網、刺し網、かご網を併用した調査を実施するとともに、調査時の気温、水温、流速等、現地調査時の状況の記録を行った。

調査時期は、河川水辺の国勢調査で行う魚類調査と合わせて行い、春季、夏季、秋季の3回実施し、それぞれ2019年6月17～21日、7月29日～8月2日および10月7～9日に実施した。

3.2 ろ過・分析

採水検体はステリバックス(マルクミリポア/0.22 μm)でろ過し、そのフィルターからDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAはMiya et al. による魚類のユニバーサルプライマー¹⁰⁾で増幅し、次世代シーケンサー(MiSeq, Illumina)とMiSeq Reagent Kit 3(600サイクル, Illumina)を用いて、2x300bpの条件でシーケンシング解析を行った。シーケンシング解析結果は、MiFishパイプラインにより代表配列を決定し、それぞれの代表配列を公開データベースからBLAST検索を行い、種の推定を行った。MiFishの解析領域では種判別が不能(同じ配列を持つ種がある等)であった種(カワヤツメ属、フナ属、ドジョウ属、カジカ属、ヨシノボリ属)については、属どめとした。

3.3. 精度の検証

採取した河川水に含まれる環境DNAのメタバーコーディング法による分析の結果27種、捕獲調査により26種、合計28種の魚類の生息が推定された(表-1)。環境DNAで確認された種には過去の捕獲調査で確認されていない種であるスミウキゴリが夏季調査に含まれており、その後本種の生息に留意することで秋季の捕獲調査から捕獲確認することができた。確認種数では、過去に行われた河川水辺の国勢調査結果では15~25種の確認であり、単年度の調査では最も多くの種数が確認できた。

今回の捕獲調査では確認されず、環境DNAのみで確認された種は、ジュウサンウグイ、ボラおよびヌマチチブの3種であった。いずれも汽水域を主な生息場とする魚類で、後志利別川では過去に少数が確認されていた種であった。今回の調査時においても、一時的に利用していたものの個体数が少なく捕獲調査ではとらえられなかったものが環境DNAにより補足されたものと考えられる。一方、捕獲調査では確認されたものの環境DNAが検出されなかった種は、スナヤツメ北方種、カワヤツメ、ギンブナの3種であった。これらの種はDNAの配列が近似した種が存在し、メタバーコーディング法による網羅的な解析では区別ができない種であり、スナヤツメ北方種、カワヤツメ及びシベリアヤツメ(ただし後志利別川水系では未確認)は区別がされずカワヤツメ属の一種、ギンブナはフナ属の一種(ギンブナと区別がされない)として検出されたものである。

調査地域別に確認状況を比較すると、春季のダム湖や下記のダム湖流入河川のように、個々の調査では捕獲確認が

上回る場合もあったが、3回の調査を通じては、いずれの地域でも捕獲確認に比べ環境DNAでの検出結果が上回った(図-7)。特に、下流域・中流域では差が大きい傾向が見られたが、これは前述のジュウサンウグイ、ボラ、ヌマチチブといった、一時的に本地域を利用する種が環境DNAでのみ確認されたことに加え、ニジマス、アメマスらサケ科魚類が捕獲では確認されなかったことによる。回遊魚については、その生活史の中でなんらかの形で本地域を利用していることが明らかである一方、ニジマスのような純淡水魚については、本地域に生息していた可能性のほか、より上流に生息している個体から放出されたDNAが下流で検出された可能性も考えられる。そのため環境DNAのみで確認された種の当該地域の利用状況は、捕獲による確認が必要といえる。

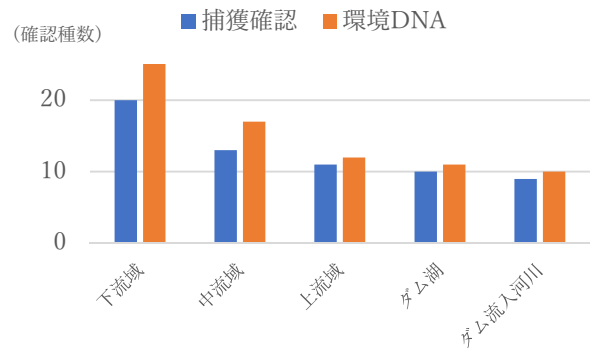


図-7 調査地域ごとの確認状況

表-1 捕獲による調査と環境DNAによる確認状況 (捕獲のみの確認種を赤枠、環境DNAのみの確認種を青枠で示した)

No.	科名	種名	生活型	下流域			中流域			上流域			ダム湖			ダム流入河川																	
				春季	夏季	秋季	春季	夏季	秋季	春季	夏季	秋季	春季	夏季	秋季	春季	夏季	秋季															
				捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA														
1	ヤツメナギ	スナヤツメ北方種	純淡水魚																														
2		カワヤツメ	回遊魚																														
3		カワヤツメ属	不明																														
3	コイ	ギンブナ	純淡水魚																														
		フナ属	純淡水魚																														
4		コイ	純淡水魚																														
5		ジュウサンウグイ	回遊魚																														
6		エゾウグイ	純淡水魚																														
7		ウグイ	回遊魚																														
		ウグイ属	不明																														
		コイ科	不明																														
8	ドジョウ	ドジョウ属	純淡水魚																														
9	フナドジョウ	フナドジョウ	純淡水魚																														
10		エゾホトケドジョウ	純淡水魚																														
11	アユ	アユ	回遊魚																														
12	サケ	アメマス	回遊魚																														
13		サケ	回遊魚																														
14		ニジマス	純淡水魚																														
15		サケマス(ヤマメ)	回遊魚																														
16	トガウオ	ニホンイロ	回遊魚																														
17		トヨ鱒淡水型	純淡水魚																														
18	ボラ	ボラ	汽水・海水魚																														
19		メナダ	汽水・海水魚																														
		ボラ科	回遊魚																														
20	カジカ	カンキョウカジカ	回遊魚																														
21		ハナカジカ	純淡水魚																														
		カジカ属	不明																														
22	ハゼ	アシシロハゼ	回遊魚																														
23		ヨシボリ属	回遊魚																														
24		ウキゴリ	回遊魚																														
25		シマウキゴリ	回遊魚																														
26		スミウキゴリ	回遊魚																														
27		ジュズカケハゼ	純淡水魚																														
28		ヌマチチブ	回遊魚																														
	10科	28種		15種	22種	10種	21種	17種	21種	11種	16種	11種	15種	13種	15種	9種	10種	7種	12種	7種	10種	6種	5種	7種	10種	8種	8種	7種	8種	8種	7種	9種	7種

※確認種のうち、種までの同定がされていないものについては、同一の分類群に属する種がリストアップされていた場合は種数に計数していない。

表-2 捕獲と環境DNAの種ごとの確認状況の比較

	DNA検出	DNA非検出
捕獲あり	163	42
捕獲なし	109	—

季節別地点別に、捕獲で確認された種と環境DNAで検出された種ごとの一致状況を表-2に示す。捕獲及び環境DNAで確認が一致した例は163、DNAが検出されなかったものの捕獲された例は42、捕獲されなかったがDNAが検出された例は109であった。捕獲で確認された種のうち環境DNAが検出された種の数79.5%と高く、環境DNAが高精度であることが示唆された。一方、捕獲されたものの環境DNAは検出されなかったものは、前述のDNAによる判別ができないものを除けば、環境中に含まれるDNAが少なく(≒生息数が少ない)、分布が局所的であった、分析の阻害となる要因(PCR反応においてDNAの増幅反応を阻害する物質(主に腐食酸)の存在)があった等、なんらかの要因による偽陰性であることが想定される。また、捕獲調査で確認されず環境DNAのみで確認された場合では、本来なら当該箇所に生息しないものが検出された偽陽性であることと、捕獲調査-環境DNA間の調査精度の差を区別した評価が必要である。偽陽性では、河川水への混入(排水の流入、上流からの流下、死体からの放出など)や調査時の混入(採水道具や服装や飛沫からの混入など)および分析段階でのエラーにより、当該地域には存在しないDNAが検出される場合がある。捕獲により確認されなかった場合については、これらの偽陽性の可能性を検討したのち、当該地点で生息があったかを推測する必要がある。今回の調査では、当該地域で未知の種が検出されなかったこと、陰性対象で魚類のDNAが検出がなかったことから、河川調査時に川の外部からの混入はなかったものと考えられ、捕獲による調査に比べ環境DNA調査では、多くの魚類を把握できる可能性を示唆する結果となった。一方で、上述の中下流域でのニジマスのように、調査地点の上流から入ったDNAが検出された可能性といった、河川内での混入については可能性が残った。

また、後志利別川で確認される回遊魚のうち、河川全域を利用する魚類である、アメマス、サケ、アユについて、捕獲での確認状況と環境DNAでの確認状況を表-3に示す。アメマス、サケでは主な河川の利用環境が異なることから確認状況は異なるが、いずれも環境DNAが広い範囲で確認された。アユは捕獲、環境DNAのいずれも同様の結果であった。比較的長期間にわたり河川を利用するアユでは、捕獲でも十分確認が可能である一方、一時的な利用を行うアメマス、サケでは、環境DNAによる確認の方が優れていることが示唆される結果であった。

表-3 主な回遊魚の確認状況

	アメマス		サケ		アユ	
	捕獲	環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲	環境DNA
下流部		○	○	○	○	○
中流域		○		○	○	○
上流域	○	○			○	○
ダム流入河川	○	○			○	○

4. 環境DNAを利用する上での留意点

環境DNAにより単年度の捕獲調査と同程度の確認種数が得られたことは、環境DNA分析が、調査対象河川全体を評価する上では、捕獲調査を補うには十分な調査精度を持つ手法であることを示唆した。特に、汽水域に回遊してくる魚類のように、河川内の限られた時期に一時的に生息するような、現地調査では確認が難しい種の生息を推定することに優れていると考えられる。このことは、特に事前調査の段階で環境DNAによる確認を行うことが、現地調査の精度や効率を高められることにつながるという。今回の調査では、各地点で代表的な1箇所での採水にとどめたが、淵やワンド・細流など多くの環境で採水することで、より精度を高められる可能性がある。

環境DNA分析は捕獲による生体の確認を必要としないことが大きなメリットである一方で、DNAの検出が必ずしもその種の生息を意味しないことには留意をする必要がある。偽陽性の検討には、河川の外部からの混入として、汚染源となりうる要因(排水の有無、市街地との距離、河川利用者の状況等)、河川内部での混入として、調査地点上流からの流入があげられた。これらの評価には陰性対象の設定といった、従来の生物調査とは異なった点での精度管理が重要となる。現地調査において、偽陽性となる要因について、どのような手法や記録を行っていけばよいか、今後検討していく必要がある。また、特定の調査地点や環境を対象とするような調査を行う場合には、検出された種が生息しているものかを判断しなければならず、可能な限り捕獲調査による確認を併用する必要がある。

また、今回用いた網羅的解析では、複数の種と一致する配列がある場合、同種であるが配列に変異がある場合あるいはデータベースの登録名称が誤っている場合など、種によって判定を行わなければならなかった。このような、判定が困難である種については、環境省が注意を要する淡水魚類リストを公表するなど、情報の共有化が進められている¹¹⁾。環境DNA分析は、全ての魚種が一定の精度で検出されるものではないことから、これらの情報に加え、検出結果については、魚類の生態なども踏まえた上で結果の評価を行う必要がある。また、判定が困難な種を区別することが重要である場合は、必要に応じて、環境DNA分析の種特異的解析あるいは捕獲調査を併用していくことが望ましいといえる。

以上のことから、環境DNA分析は間接的な確認の記録であり、これを確実な記録とするためには当面は現地調査を併用する必要があるものの、魚類相を把握するには十分な精度を持つ手法であることを示した。本論文では、網羅的解析により魚類の生息の有無を対象としたが、網羅的解析により生物の量を推定する技術の開発なども進められている。環境DNAを用いた観測技術を用いることにより、魚類相の把握が簡略化していく条件は整いつつある。今後、本研究の留意点や環境DNA分析の手順を整理し、モニタリングの精度を維持しつつ、より低コストに実施していくための手法の確立を進めていく。

5. まとめ

後志利別川で河川水辺の国勢調査結果と環境DNA調査の網羅的解析の結果を比較することで、環境DNAの魚類相把握手法としての有効性の評価を行った。その結果、以下の点があげられた。

- 1) 環境DNA調査による網羅的な分析により、捕獲調査を上回る高い精度を持つことが示されるとともに、環境DNAが検出された種について留意して捕獲調査を行うことで、新たな種の確認がされ、捕獲調査の精度を向上させる効果もあった。
- 2) 中下流域に生息する回遊魚のように、河川の利用が一時的または少数であることから捕獲が困難な種の確認については、環境DNAによる確認が優れており、このことは、回遊魚の遡上範囲の把握で特に効果的であった。
- 3) 環境DNAによる確認は、間接的な確認であり、特に河川の上流から混入してくる可能性は常に残ることから、特定の調査地点や環境における魚類の生息の有無を評価する場合など、確実な確認が必要である場合は、捕獲調査を併用する必要がある。
- 4) 網羅的解析では、種の判別ができない場合や誤判定される場合があることから、識別に注意を要する魚類や、生態に留意した判定を行う必要がある。

謝辞

本報告を行うにあたり、本地域の魚類の分布や生態について多くのご助言を頂いた北海道栽培漁業振興公社顧問眞山紘博士に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課 (2016) 「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]」
- 2) 環境省「生物多様性」
<http://www.biodic.go.jp/biodiversity/activity/policy/map/>
- 3) 天野 邦彦, 望月 貴文 (2011) 河川水辺の国勢調査結果を利用した魚類及び底生動物の水質・水質への依存性評価. 河川技術論文集, 17:513-518
- 4) 鬼倉 徳雄, 川本 朋慶 (2013) 九州北部の一級水系における水質と純淡水魚類の出現との関係. 水環境学会誌, 36:99-106
- 5) 佐合 純造, 永井 明博 (2003) 河川水辺の国勢調査結果を用いた全国河川の魚類種の特性とその評価手法. 土木学会論文集, 727:49-62
- 6) 下田和孝, 青山智哉, 坂本博幸, 大久保進一, 畑山 誠, 竹内勝巳 (2017) 北海道の10河川におけるブラウントラウトの成長と性成熟(資料), 北水試研報 92, 65-77
- 7) Taberlet, P., Bonin A., Zinger L., Coissac E. (2018) Environmental DNA For Biodiversity Research and Monitoring, Oxford University Press, New York, 253pp
- 8) 源 利文 (2018) 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
- 9) 一般社団法人環境DNA学会 (2009) 環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.1
- 10) Miya, M., et al. (2016) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine
- 11) 環境省 (2019) 「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