

環境 DNA 調査について

1 調査の目的

河川・湖沼等の水を採取し、分析することによって生物の生息状況を知ることができる環境 DNA 調査について、5年に1回の大規模生物調査の代替・補完や毎年度実施している県民調査員による生物調査への導入を実現することを目的とする。

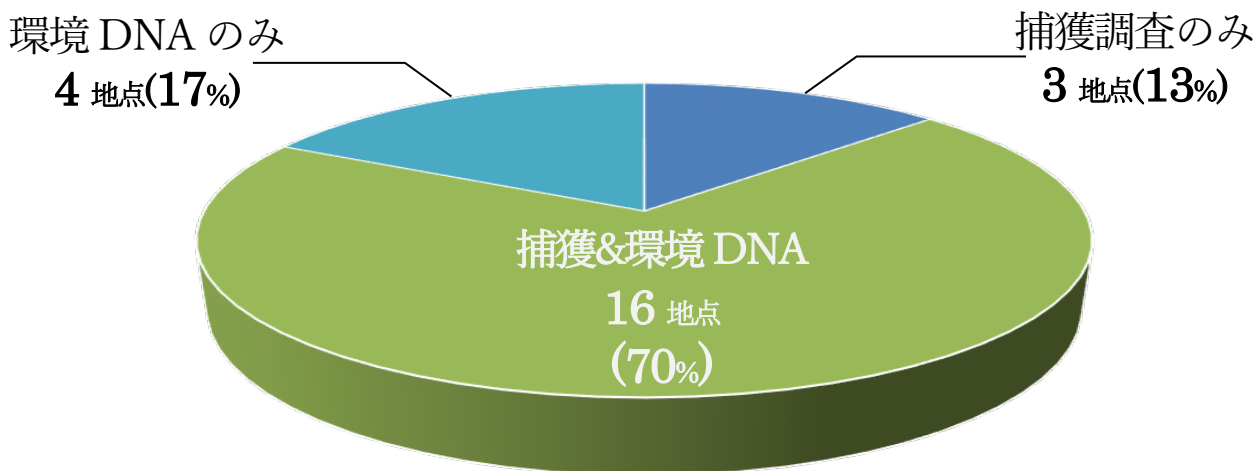
2 令和元年度調査の概要

調査対象種	サンショウウオ類 カワネズミ(試行調査)	魚類	底生動物
調査対象河川	相模川水系及び酒匂川水系 サンショウウオ調査地点	相模川水系及び酒匂川水系 生物調査地点	相模川水系及び酒匂川水系 生物調査地点の一部
調査回数・時期	サンショウウオ調査時に同時実施	夏季生物調査時に同時実施	夏季生物調査時に同時実施
調査内容	特定種の DNA の有無	魚類全体の網羅的調査	網羅的調査の試行 特定種の調査手法の開発

3 調査結果の概要

[ハコネサンショウウオ]

- ・サンショウウオ類の環境 DNA 調査のうち、ハコネサンショウウオについて相模川水系及び酒匂川水系での結果は下の図のとおりとなった。捕獲調査でも確認された地点が多く、環境 DNA 調査は、**補完的な調査**として有用と考えられた。
- ・さらに調査の結果、**繁殖シーズンには、河川中の環境 DNA 濃度が増加することが明らかになった**ことから、今後の調査では、繁殖シーズンを対象に、環境 DNA 調査を広域的に実施することで、捕獲調査以上の範囲と精度でハコネサンショウウオの生息地を把握できる可能性が考えられた。
- ・令和2年度は河川環境や周辺の森林環境との関係を明らかにするための環境 DNA を用いた広域的調査に着手している。



※ いずれかの手法でハコネサンショウウオを確認した 23 地点を基に割合を算出

[ヒガシヒダサンショウウオ]

- サンショウウオ類の環境DNA調査のうち、ヒガシヒダサンショウウオについては相模川水系及び酒匂川水系での結果は下の図のとおりとなった。
- 両水系の調査ではヒガシヒダサンショウウオが確認される地点が少なく、比較可能なデータが少ないが、環境DNAが3地点のいずれでも検出されておらず、補完的な調査として活用するにはまだ課題が残る状況となっている。
- 令和2年度はより調査精度を向上するため、ヒガシヒダサンショウウオの繁殖期に重点的な調査を実施している。



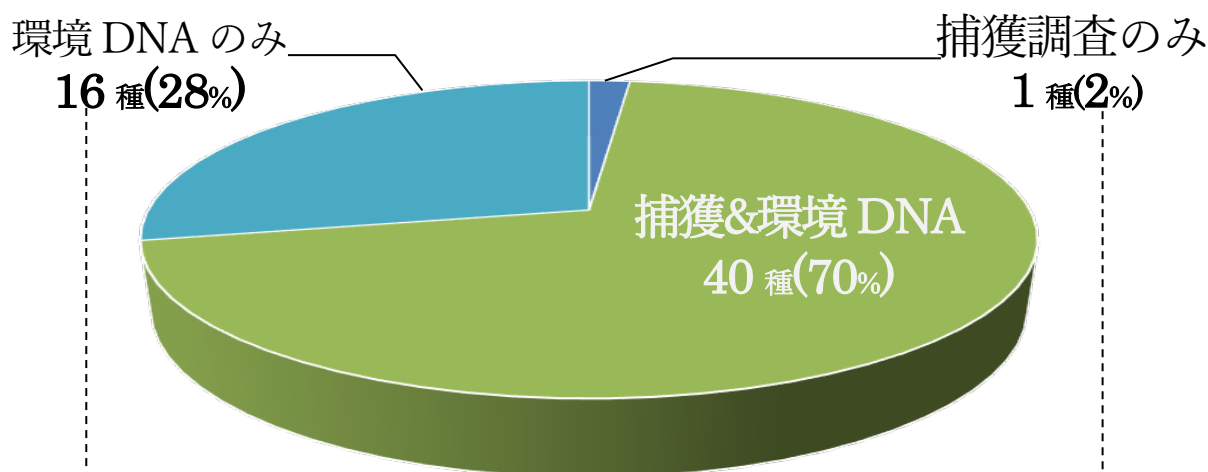
※ いずれかの手法でヒガシヒダサンショウウオを確認した3地点を基に割合を算出

[カワネズミ]

- カワネズミについては、水源事業において捕獲調査は実施していないが、渓流域に生息する希少種であることからサンショウウオ調査地点で採水したサンプルを用いて、環境DNAの検出の可否について試行的に調査を実施した。
- その結果、相模川水系で1地点、酒匂川水系で7地点の計8地点で微量のDNAが検出された。過去に東京農業大学の藤本氏が丹沢で捕獲調査した結果と比較すると、酒匂川水系ではカワネズミが捕獲された世附川と河内川でDNAが検出されるという結果となったが、相模川水系では捕獲された水系ではDNAは検出されなかった。
- カワネズミは夜行性が強いとされ、採水時間が昼間であったことなどが結果に影響を与えた可能性が考えられた。

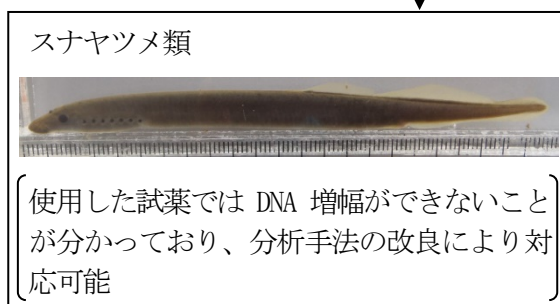
[相模川水系の魚類]

- 相模川水系の魚類の環境 DNA 調査では、平成 30 年度の夏季の生物調査時に同時にサンプリングした試料を用いた。
- その結果、下の図のとおり捕獲調査で確認されたほとんどの種を環境 DNA 調査でも検出することが可能であった。
- また、個別の種に着目した場合でも、特定外来生物であるコクチバスが捕獲調査では 3 地点で確認できたのに対し、環境 DNA では 9 地点で検出され、県の絶滅危惧種 IB 類のホトケドジョウについても捕獲調査での確認 3 地点に対し、8 地点で検出される等、環境 DNA の確認種数はいずれの地点でも捕獲調査の確認種数を上回っており、**捕獲調査を補完・一部代替する手法としては、環境 DNA 調査は非常に有用**であることが明らかとなった。
- 一方で環境 DNA のみで確認された種 16 種については、管理釣り場由来の魚類からの DNA や上流の湖沼由来の DNA を検出したと思われる種も多く、慎重な評価が必要と考えられた。
- なお、捕獲調査のみでしか確認できなかった種はスナヤツメ類であり、今回採用した手法ではスナヤツメ類が検出できないことはすでに明らかとなっており、酒匂川での調査からはスナヤツメ類を検出可能な手法に改良して調査を実施している。



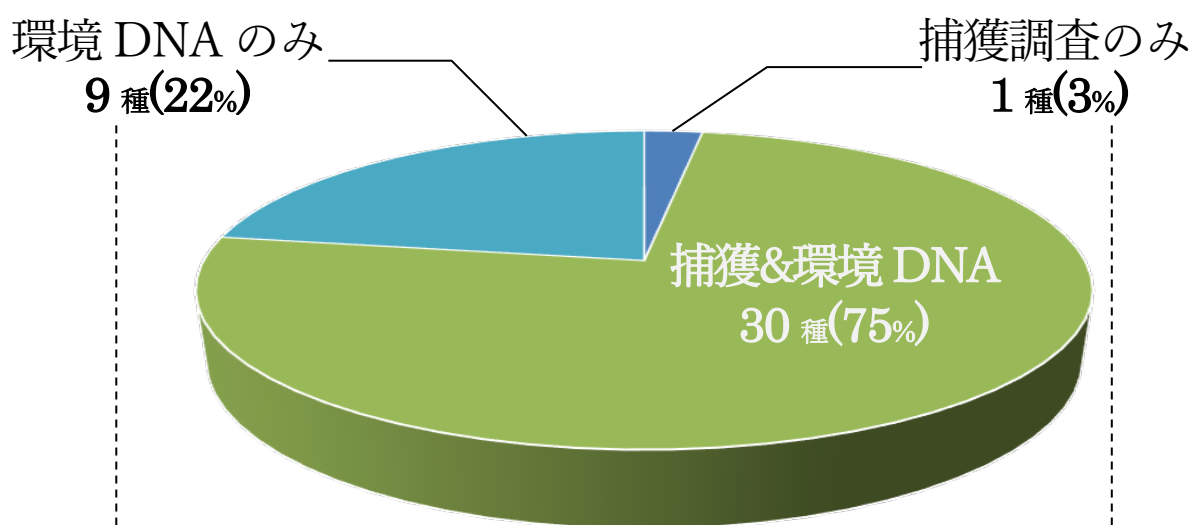
※全調査地点で確認された種数を基に割合を算出
 ※種の分類については環境 DNA での分類と整合をとっている
 (例: ヨシノボリの仲間で分類できないものは 1 種としている)

- | | |
|---------------------|----------|
| <過去に捕獲記録のある種> | |
| ・マルタ | ・ゲンゴロウブナ |
| ・スゴモロコ属 | ・ホンモロコ |
| ・ワカサギ | ・イトモロコ |
| ・ブルーギル | ・ハス |
| ・ワタカ | |
| <管理釣り場由来と考えられる種> | |
| ・イトウ | ・ブラントラウト |
| ・カワマス | |
| <上流の池由来と考えられる種> | |
| ・ソウギョ | |
| <捕獲記録はないが生息が想定される種> | |
| ・キチヌ | ・カラドジョウ |
| ・ヒメドジョウ | |



[酒匂川水系の魚類]

- 酒匂川水系の魚類の環境 DNA 調査では、令和元年度の夏季の生物調査時に同時にサンプリングした試料を用いた。
- その結果、下の図のとおり相模川と同様に捕獲調査で確認されたほとんどの種を環境 DNA 調査でも検出することが可能であった。
- また、個別の種に着目した場合には近年新種登録されたキタドジョウが一部の水系で検出され、確認種数もいずれの地点でも捕獲調査と同等あるいは上回る結果となっており、**捕獲調査を補完・一部代替する手法としては、環境 DNA 調査は非常に有用**であった。
- 一方で相模川水系での調査と同様に環境 DNA のみで確認された種 9 種のうち、管理釣り場由来の魚類からと考えられるニジマスやブラントラウトの DNA 等も多数検出していることから慎重な評価が必要と考えられた。
- なお、捕獲調査のみでしか確認できなかった種はマハゼであり、酒匂川の最も下流の調査地点で 1 個体しか捕獲されていなかったことから、環境中の DNA が低濃度であったことが原因と考えられた。



※全調査地点で確認された種数を基に割合を算出
 ※種の分類については環境 DNA での分類と整合をとっている
 (例: ヨシノボリの仲間で分類できないものは 1 種としている)

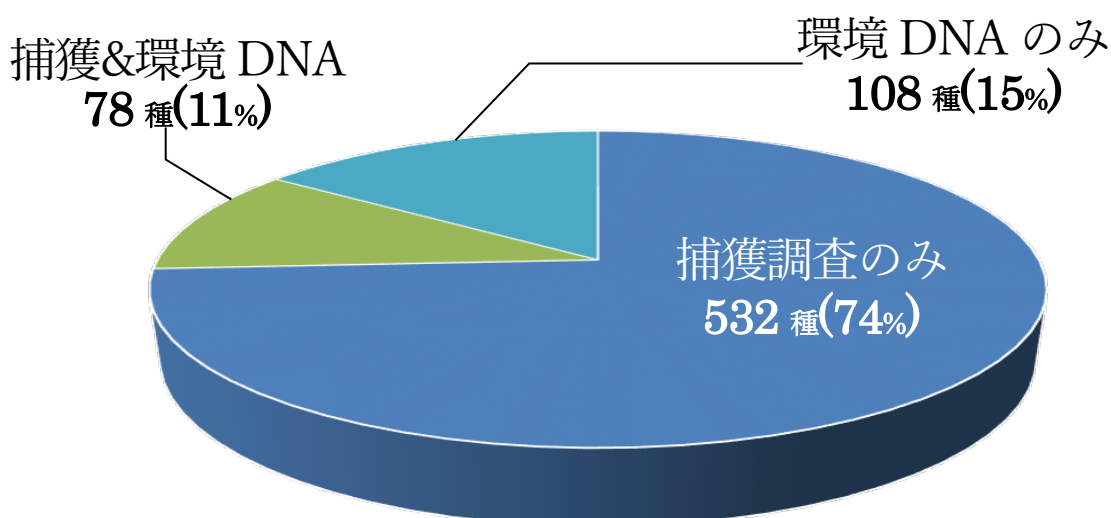
- <過去に捕獲記録のある種>
 - フナ属
- <管理釣り場由来と考えられる種>
 - ブラントラウト
- <捕獲記録はないが生息が想定される種>
 - タイリクバラタナゴ
 - キタドジョウ
 - カラドジョウ
 - ブルーギル
 - オオクチバス
 - ドンコ
 - ミミズハゼ

マハゼ

〔 1 地点 1 個体だけの捕獲であったため、環境中の DNA 濃度が低かったためと考えられた。〕

[底生動物]

- 底生動物に関する環境 DNA の取組としては、魚類調査と同様に一度の分析で多くの種を網羅的に把握する手法(以下「網羅解析手法」という。)を用いて、令和元年度の酒匂川水系の夏季の生物調査時に同時にサンプリングした試料を試行的に調査した。
- また、平成30年度までの調査結果を整理し、大学の専門家を始めとして生物調査に詳しい方々に意見を伺い、今後の県民調査を実施するにあたって指標となる種を選定し、それらの種に関して特異的に環境 DNA 調査が可能な手法(以下「特定種調査手法」という。)の開発を行った。
- 網羅解析手法の結果については下の図のとおりとなった。捕獲調査で捕獲された数が多い種は DNA が検出される傾向にあるものの、環境 DNA の検出率はかなり低く、課題の残る結果となった。
- この理由として、環境中の DNA 濃度の低さや参照するデータベースの情報不足、使用した試薬では DNA を十分増幅できないといった複数の要因が考えられた。
- 令和2年度は、網羅解析について上記の要因を解決し、より精度よく調査が可能な手法を構築するための取組を実施中。



※全調査地点で確認された種数を基に割合を算出

- 特定種調査手法については、県内において比較的広域に確認される種であるウルマーシマトビケラ、河川の連続性を指標するモクズガニ、現状では県内には生息が少ないが、今後県内においても分布を拡大する可能性がある外来種のアメリカナミウズムシの3種を選定し、これらの DNA を特異的に増幅可能な試薬(プライマー、プローブ)を開発した。
- 試薬と当該種及び近縁の種から抽出した DNA を用いて、分析を行ったところいずれも当該種を特異的に検出することが可能であった。
- 令和2年度以降、県民調査の中に環境 DNA 調査を組み込むためのマニュアル改正や講習会の準備等を行い、導入可能な調査手法から順次導入を進めていく。



ウルマーシマトビケラ



モクズガニ



アメリカナミウズムシ

4 次年度以降の環境 DNA の調査について

4-1. 魚類の定量網羅解析手法の開発

令和2年度はサンショウウオ類、底生動物について環境 DNA 調査手法を開発中であるが、令和3年度以降コロナの感染状況によっては調査員に対し、十分な講習会が実施できない状況が続くことも想定し、**魚類についても環境 DNA 調査手法を導入**することとした。なお、魚類については網羅的解析手法(一度の分析で全ての魚種の在不在を判別する手法)はマニュアル化されているが、定量可能な網羅的解析手法については未開発のため、**JAMSTEC(国立研究開発法人海洋研究開発機構)と共同で定量網羅解析手法の開発**を行う。

当該手法については、県民調査への導入に加え、第4期に実施予定の動植物等調査においても従来の魚類捕獲調査の代替・補完手法として活用する予定としている。

4-2. 高頻度・広範囲調査による河川物理環境と生物応答の因果推定手法の開発

令和2年度に実施している「環境 DNA 技術の効果的な活用手法検討」については、東北大学・近藤教授(環境 DNA 学会代表理事)に依頼し、過去の捕獲調査結果から河川物理環境と生物生息状況の相関について検証を進めるとともに、その結果を基に環境 DNA 調査の効果的な活用手法について提案してもらう予定としている。

また、東北大学からの提案による試行的な取り組みではあるが、サンプリングが非常に簡便であるという環境 DNA の特徴を生かし、従来の捕獲調査では為しえなかった高頻度生物調査と広域的生物調査も併せて開始しているところである。

この調査を実施することにより、**河川物理環境(河川の水質等)と生物応答の相関関係にとどまらず、因果関係まで推定することが可能**とされており、例えば「河川・水路における自然浄化対策の推進」事業において、事業効果による生物応答をより正確に評価できると期待されている。

令和2年度は試行的に実施しているところであるが、令和3年度以降についても、引き続き東北大学と連携し、「河川・水路における自然浄化対策の推進」事業が行われる河川において高頻度調査を実施する等して、事業効果の評価につなげていく。

環境 DNA 調査の実用化に向けた今後のスケジュール

年度 対象	第3期		第4期
	令和2年度	令和3年度	
サシウナ類	<p>センター内での分析体制の整備</p> <p>調査計画の策定</p>	<p>丹沢山地の広域的なスクリーニング調査</p> <p>水源林整備箇所と連動した重点的な調査の実施</p>	
底生動物	<p>底生動物の DNA データベースの構築</p> <p>河川試料での底生動物検出率の検証</p> <p>構築した DNA データベースを基にした分類群別ユニバーサルプライマーの開発</p>	<p>DNA データベースの補完作業</p> <p>↓</p> <p>県民調査への試行的導入・結果の検証</p>	<p>県民調査への本格導入</p>
<u>魚類</u>		<p><u>定量網羅解析手法の開発</u></p>	<p><u>県民調査への本格導入</u></p> <p><u>動植物等調査の代替・補完として活用</u></p>
環境 DNA 技術全般	<p>環境 DNA 調査計画への助言及び調査上の課題の解決手法の提案</p>	<p><u>環境 DNA の高頻度・広範囲調査による因果推定手法開発</u></p>	<p><u>環境 DNA 調査を活用した事業効果の検証</u></p>