

報告 (Note)

環境 DNA を用いた県内生物多様性調査手法の確立

長谷部 勇太, 濱邊 一弥, 武田 麻由子, 中山 駿一, *菊池 宏海, **勝呂 尚之
(調査研究部, *現在 大気水質課, **神奈川県水産技術センター内水面試験場)

Establishment of a method for surveying biodiversity in Kanagawa Prefecture using Environmental DNA
Yuta HASEBE, Kazuya HAMABE, Mayuko TAKEDA, Shunichi NAKAYAMA, Hiromi KIKUCHI, and
Naoyuki SUGURO

(Research Division,* currently Air and Water Quality Division, ** Fisheries Experimental Station of Kanagawa
Prefecture)

キーワード：環境 DNA, メタバーコーディング, 魚類, 生態系

1 はじめに

近年、開発や外来種の侵入、気候変動等の要因により世界的に生物多様性の劣化が報告されている。「生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学-政策プラットフォーム(IPBES)」の2020年3月の報告では800万の動植物種のうち100万種が絶滅の可能性があるなど、生物多様性の危機的な状況が明らかとなっている¹⁾。

生物多様性の保全に関しては、1992年に生物多様性条約が採択されて以降、2020年現在ではCOPI0で採択された生物多様性戦略計画2011-2020及びその中核をなす世界目標としての「愛知目標」に基づき、日本を含めた条約締約国において様々な取組が行われている。しかしながら2020年9月に国連は、20項目からなる愛知目標が「いずれも完全には達成できなかった」とする報告書を公表しており、生物多様性保全に向けて産官の連携や社会の関与など「努力のさらなる拡大」が必要とされている²⁾。

本県においても、2016年3月に「かながわ生物多様性計画」を策定し、多様な自然を有する本県の特性に応じた様々な生物多様性保全活動が実施されている。生物多様性を保全するには、まずは適切なモニタリングを行い、現状の生物相を把握することが重要となるが、河川等の水圏における生物モニタリングについては、例えば魚類の場合、相模川及び酒匂川においては、水源環境保全事業により定期的な調査が実施されているものの³⁾、県内全域の河川を対象とした調査は2010年を最後に実施されていない⁴⁾。

これらの要因の一つとして通常、生物調査は捕獲調査が一般的であり、これらを実施するには一定の経験、多くの人手及び適切な装備が必要となり、それらがボトルネックとなっていることが挙げられる。

一方で、水中に生息する生物の調査については、生物から排出され、環境中を漂う細胞片等に由来するDNA、いわゆる「環境DNA」を用いた生物調査手法が近年注目を集めている。河川や湖沼等に生息する生物からは糞や粘液等が環境中に放出されており、その中には当該生物における細胞由来のDNAが含まれている。環境DNA調査は、河川・湖沼等の水を採取し、その中に含まれるDNAを適切な手法で分析することにより、間接的に当該生物の存在を把握する手法であり、従来の捕獲による調査に比べ、現場での作業時間やコストの軽減、生息環境の攪乱の防止及び人が立ち入ることが困難な場所での調査が可能となる等の点で多くのメリットがあると報告されている⁵⁾。また、従来の捕獲調査と比較した研究においても、環境DNA調査は捕獲調査との間で種の出現に高い相関があることも報告されており⁶⁾、環境DNA調査は捕獲調査と概ね同程度かそれを上回る検出率があることが明らかとなっている。環境DNAによるマクロ生物の生体外DNAの存在を初めて報告したのは、2008年に報告されたフランスの研究であり⁷⁾、その後、国内外で様々

な研究が行われている。国内においては、2018年4月に一般社団法人環境DNA学会(以下「学会」という)が設立され、2019年4月25日に環境DNA調査・実験マニュアル(以下「学会マニュアル」という) ver. 2.1 が、2020年4月3日には学会マニュアル ver. 2.2 が公開されるなど、環境DNA技術の標準化に向けた取組が精力的に進められている⁸⁾。

また、環境省においても絶滅危惧種をはじめとした淡水魚類の全国的な分布情報の把握、希少種の保全及び外来種対策などの生物多様性保全施策への活用、さらには環境アセスメントにおける生物調査の迅速化及び効率化を目的として、調査手法が捕獲に限られていた淡水魚類について、手引きの作成、リファレンスの整備及びチェックリストの作成等の環境DNA調査の標準化、一般への普及及びデータの効果的・効率的な共有が進められており、2020年6月には「DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き第1版」を、2022年6月に第2版を公表しているところである⁹⁾。

上記の通り、環境DNA調査は、現場での作業が河川水を汲むだけという簡便さを特徴としつつ、魚類については調査手法のマニュアル整備や標準化が進んでおり、種の在又は不在という点においては捕獲調査と同等の結果を得ることができるようになってきている。

以上のことから、本研究では環境DNA調査手法を活用して、県内河川における魚類相を明らかにし、過去の捕獲調査結果と比較することで各河川の魚類相の経年変化を評価することを目的とした。

2 方法

2.1 調査地点と調査時期

本研究では、2008年から2010年にかけて実施した神奈川県内魚類調査の実施地点25河川181地点のうち、既に環境DNA調査が実施されている相模川水系寒川取水堰上流40地点と酒匂川水系40地点を除く、表1及び図1の101地点とした。

調査は2020年6月15日から2020年9月28日にかけて実施した。

2.2 採水・ろ過及びDNA抽出

表1 調査地点一覧

水系	地点名	水系	地点名
多摩川	ニヶ領上河原堰堤上	引地川	中村橋
多摩川	新二子橋	引地川	石川橋
鶴見川	寺家橋	相模川	上栗原橋
鶴見川	千代橋	相模川	河原橋
鶴見川	堀の内橋	相模川	大黒橋
鶴見川	落合橋	相模川	新鶴峯橋
鶴見川	亀の甲橋	金目川	向山橋
鶴見川	大綱橋	金目川	養毛橋
鶴見川	井田公園脇	金目川	弘法橋
帷子川	大貫橋	金目川	滝沢キャンプ場上
帷子川	鶴舞橋	金目川	塚原橋
大岡川	氷取沢	金目川	南平橋
大岡川	日下橋	金目川	吾妻橋
宮川	市民の森入口	金目川	新霞橋
宮川	宮川橋	金目川	雲井橋
侍従川	金の橋	金目川	諏訪裏橋
侍従川	長島橋	金目川	神戸橋
平作川	池上神社入口	金目川	大畑橋
平作川	真崎橋	金目川	九沢橋
松越川	佐島橋	金目川	歌川橋
下山川	不動橋	金目川	青井橋
下山川	上山橋	葛川	上中橋
下山川	白石橋	葛川	大応寺橋
森戸川(葉山)	上の橋	葛川	下吉沢
森戸川(葉山)	大山橋	葛川	本郷橋
森戸川(葉山)	中町橋	中村川	高尾下
森戸川(葉山)	風早橋	中村川	富士見橋
田越川	沼間	中村川	清岩寺上
田越川	中原橋	中村川	坂呂橋
田越川	舞台橋	中村川	押切橋
田越川	丸川橋	森戸川(小田原)	新幹線下
田越川	逗子橋	森戸川(小田原)	曾我谷津
滑川	朝夷奈切通	森戸川(小田原)	親木橋
滑川	太刀洗川	山王川	下河原橋
滑川	明石橋	山王川	星山橋
滑川	延命寺橋	山王川	山王橋
神戸川	拾枚橋	早川	仙石原
神戸川	広町緑地	早川	紅葉ヶ丘下
神戸川	日坂橋	早川	旭橋
境川	小松橋	早川	須雲川橋
境川	大戸バス停脇	早川	弥栄橋
境川	二国橋	早川	三枚橋
境川	常矢橋	早川	早川橋
境川	鶴瀬橋	新崎川	幕山
境川	上和泉橋	新崎川	鍛冶屋
境川	戸塚カントリー下流	新崎川	吉浜橋
境川	青葉橋	千歳川	紅葉橋
境川	笠間大橋	千歳川	蛇態(あけじ)橋
境川	新川名橋	千歳川	落合橋
引地川	東名横	千歳川	中河原橋
引地川	草柳橋		

各調査地点において新品のポリプロピレン製ボトルを使用して表層水1Lの採水を行った。

採水後にDNAの分解を抑制するため、塩化ベンザルコニウムを終濃度0.01%となるように添加し¹⁰⁾、クーラーボックスで冷蔵保存の上48時間以内でろ過を行った。

ろ過はカートリッジ型のステリベクスフィルター(Merck & Co.,Inc., 孔径0.45μm)を使用した。ろ過の途中でフィルターが目詰まりした時点でろ過作業を終了した。ろ過の際は、コンタミネー

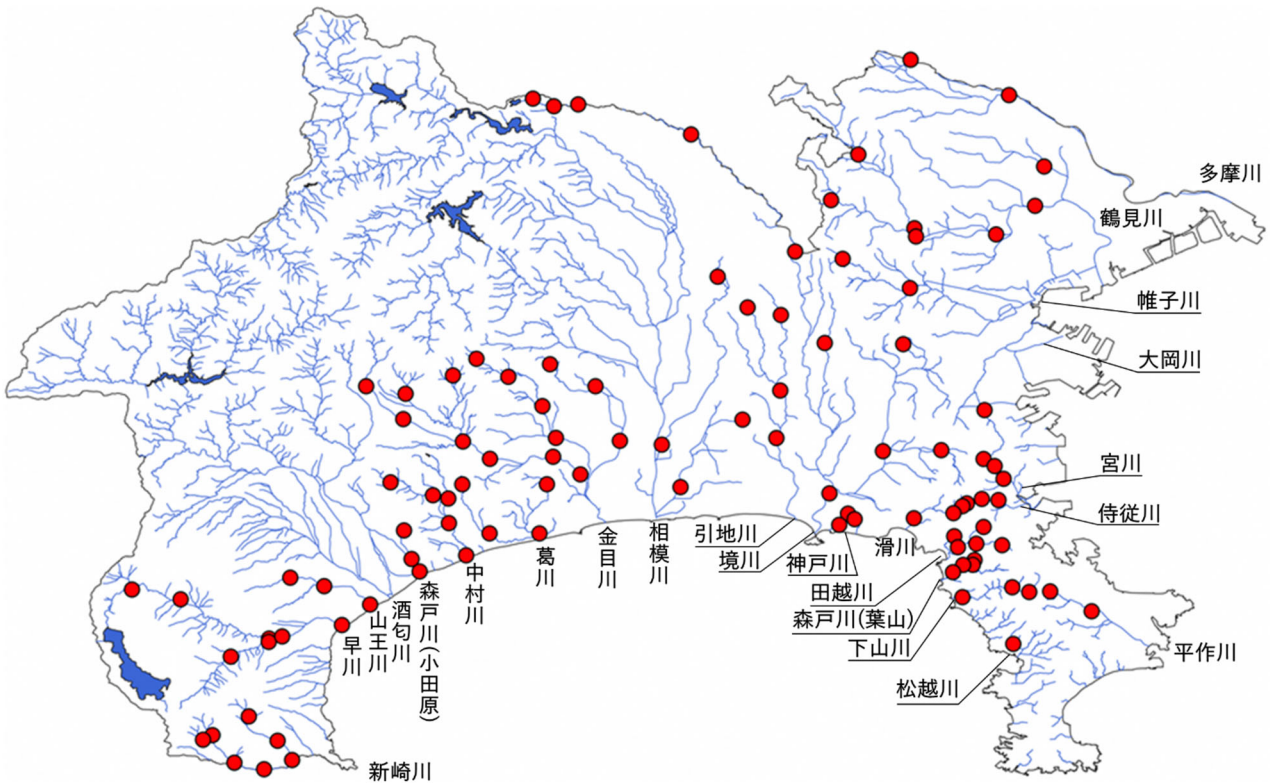


図1 調査地点図

シオン防止のため、試料に直接触れる部分はすべて使い捨てタイプの器具を使用した。ろ過後はカートリッジ内に RNAlater™ Stabilization Solution(Thermo Fisher Scientific)を約2mL 充填し、DNA 抽出作業を行うまで-20℃以下で保存した。

DNA 抽出は、学会マニュアルに従い、DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN)を用いて行い、Buffer AE 200 μL での溶出を行った。

2. 3 ライブラリー調整

得られた DNA 抽出液に対して MiFish プライマー¹¹⁾を用いてミトコンドリア DNA の 12S 領域の増幅を行った。

1st PCR のプライマーは、MiFish-U、キュウリウオ科用改変プライマー(以下、「Mifish-O」という)、及びスナヤツメ用改変プライマー(以下、「Mifish-L」という)をそれぞれ 4 : 1 : 1 のモル比率で混合したものを用いた。それぞれのプライ

マーの配列は表 2 のとおりであり、改変プライマーの下線太字は MiFish-U プライマーからの改変部分を示している。なお、Mifish-O-R については MiFish-U-R と同配列を使用している。

また、MiFish-U プライマー及び Mifish-O プライマーについては次世代シーケンサーによる分析の際の塩基多様度を高め、シーケンス精度を向上させることを目的に、プライマー配列と次世代シーケンサー分析用のアダプター配列の間に N を 0~5 個挿入した 6 種類のプライマーを等モル混合したものを用いている。スナヤツメ類については河川において優占種となるほどの生息密度となることが想定されないことから、N は挿入していない。

実験条件については、PCR 酵素に KOD FX Neo(東洋紡)を用いており、アニーリング温度については学会マニュアルに記載のとおり 65℃とし、その他の温度・時間及び PCR 溶液の組成の条

表 2 プライマー配列

プライマー名	配列
MiFish-U-F	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT(N0~5)GTCGGTAAA <u>ACTCGTGCCAGC</u> -3'
MiFish-U-R	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT(N0~5)CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'
MiFish-O-F	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT(N0~5)GTCGGT <u>IAA</u> TCTCGTGCCAGC-3'
MiFish-L-F	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG <u>CT</u> GGTAA <u>AC</u> CTCGTGCCAGC-3'
MiFish-L-R	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATAG <u>CG</u> GGGGTATCTAATCCC <u>G</u> GTTTG-3'

件については表3及び表4のとおりとした。

表3 PCRの条件設定

工程	設定温度	設定時間
Pre-denaturation	94°C	2min
Denaturation	98°C	10 sec
Annealing	65°C	30sec
Extension	68°C	30sec

38cycle

表4 PCR溶液の組成

1 反応総量	12 μL
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	6 μL
2 mM dNTPs	2.4 μL
プライマー-Mix(10 μM each)	1.36 μL
KOD FX Neo (1 U/μL)	0.24 μL
DNA 抽出溶液	2 μL

各試料については1反応 12 μL(2×PCR Buffer for KOD FX Neo:6 μL, 2 mM dNTPs:2.4 μL, 試料溶液 2 μL を含む)とし 8 個の複製を作成した。1stPCR 後, 8 つの複製をプールし, 溶液 2 μL を含む)とし, 8 個の複製を作成した。1stPCR 後, 8 つの複製をプールし, 磁気ビーズを用いてサイズセレクション及び精製を行った。

精製後の 1stPCR 産物の濃度を 4150 TapeStation システム(アジレント・テクノロジー株)を用いて測定し, 対象領域の濃度が 0.5ng/μL となるように希釈し, 2ndPCR に用いた。2ndPCR については PCR 試薬に KAPA-HiFi(Kapa Biosystems)を用いて, 実験条件については学会マニュアルに従い設定した。

2ndPCR 後, 各試料をプールし, 磁気ビーズによる精製を行い, 4150 TapeStation システム及び Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)により塩基長と濃度の定量を行った。

調整済ライブラリーは iseq 100 System (illumina)により, 2×150bp の条件でシーケンスを行った。

2. 4 シーケンスデータ解析

取得した生のシーケンスデータは, 2ndPCR で付与したインデックス配列により, 試料別のペアエンドシーケンスデータとして出力した。

次に出力データを USEARCH の denoising パイプラインを使用して処理を行った^{12,13)}。それぞれの処理の際の使用プログラム及び命令コマンドを表5に示した。

まず, ペアエンドデータを結合し, 次に低品質配列の除去を行った。

その後 python プログラムの cutPrimers.py (<https://github.com/aakechin/cutPrimers>)を使い, プライマー配列の除去を行った。

プライマー配列を除去した配列を, 同一配列を集計し, 読み取りノイズとキメラの除去を行い, あわせて同一配列数(リード)が7以下のものを除去し, zero-radius OUT(以下, 「ZOTU」という)を作成した。

作成した ZOTU に対し, NCBI データベース検索用ソフトウェア BLAST を用いて各配列と相同性の高い種を検索した。

検索した結果は 97.5%以上の一致率となった ZOTU のみを有効データとした。

有効データの精査については, 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版で紹介された MiFish 法に係る誤同定チェックシートを用いて行った⁹⁾。なお, カワヨシノボリについては, カワヨシノボリ単一種として判断される DNA 配列を有する場合とシマヨシノボリなどを含む複数種が該当する DNA 配列を有する場合があるが, 県内調査においては前者の DNA 配列が検出されていることから, 後者についてはカワヨシノボリを除くヨシノボリ属(以下「ヨシノボリ属」という)として扱った。

精査した種あるいは分類群毎にリードの合算を行い, 各地点での全 ZOTU リードの合計値に対して, 0.1%未満となった種については, 結果の信頼性が低いと判断し, 以降の解析対象から除外し

表5 データ処理に使用したプログラム及び命令コマンド

処理	使用プログラム	命令コマンド
ペアエンドデータの結合	USEARCH	-fastq_mergepairs
低品質配列のフィルタリング	USEARCH	fastq_filter with -fastq_minlen 140 and -fastq_maxee 1.0
プライマー配列の除去	cutPrimers.py	-pr15(フォワードプライマー除去) -pr13(リバースプライマー除去)
読み取りノイズとキメラ除去	USEARCH	-unoise3 -unoise_alpha 2.0

た。

2. 5 捕獲データと環境 DNA データの整合

捕獲調査と環境 DNA 調査では調査手法が異なることから、種・属・系統群等の解像度が異なり、単純な比較はできない。

そのため、それぞれの調査手法で比較可能となるように、表 6 のとおり結果の整合処理を行った。

3 結果と考察

3. 1 現地採水結果

101 地点の現地調査の結果、危険が伴うために採水を実施できなかった引地川の東名横の 1 地点を除き、100 地点の採水を実施した。

表 6 捕獲データと環境 DNA データの整合

標記	環境DNA調査	捕獲調査
コイ	コイ (飼育型) / コイ (野生型)	コイ
フナ属	ギンブナ / キンブナ / オオキンブナ / ニゴロブナ / キンギョ / フナ属の1種 (琉球列島)	ギンブナ/キンブナ/キンギョ/フナ属の一種
モツゴ	モツゴ / モツゴ属の一種[海外種]	モツゴ
タモロコ属	タモロコ / ホンモロコ	タモロコ/ホンモロコ
カマツカ	カマツカ/スナゴカマツカ	カマツカ
ニゴイ	ニゴイ / コウライニゴイ	ニゴイ
スゴモロコ	スゴモロコ / デメモロコ / コウライモロコ	スゴモロコ
ドジョウ	ドジョウ (大陸系統) / ドジョウ (在来系統)	ドジョウ
ナマズ	ナマズ / イワトコナマズ / タニガワナマズ / ナマズ属の一種 [海外種]	ナマズ
アメマス類	アメマス / ニッコウイワナ / ヤマトイワナ / ゴギ	ニッコウイワナ
サクラマス類	サクラマス (ヤマメ) / サツキマス (アマゴ) / タイワンマス [海外種]	ヤマメ/アマゴ
オオクチバス	オオクチバス/フロリダバス	オオクチバス
クロダイ	クロダイ / ミナミクロダイ	クロダイ
カジカ	カジカ / カジカ中卵型	カジカ
チチブ属	チチブ / スマチチブ / ナガノゴリ	チチブ/スマチチブ
ミミズハゼ	ミミズハゼ / ミナミヒメミミズハゼ	ミミズハゼ
ヨシノボリ属 (カワヨシノボリ除く)	トウヨシノボリ / クロヨシノボリ / オオヨシノボリ / カズサヨシノボリ / オウミヨシノボリ / ビワヨシノボリ / シマヨシノボリ / シマヒレヨシノボリ / ルリヨシノボリ / キバラヨシノボリ / ケンムンヒラヨシノボリ / ヤイマヒラヨシノボリ / アヤヨシノボリ / アオバラヨシノボリ / オガサワラヨシノボリ / クロダハゼ	シマヨシノボリ/クロヨシノボリ/トウヨシノボリ

3. 2 次世代シーケンサーの解析結果

ライブラリー調整で PCR の増幅がみられなかった滑川の朝夷奈切通, 境川の上和泉橋及び早川の紅葉ヶ丘下の 3 地点を除く 97 地点のサンプルを次世代シーケンサーで分析し, USEARCH による解析により精度の低いデータを除去した結果, 合計 11,374,003 リード, 1 サンプルあたりの平均 117,258 リードを得た。

なお, リード数が 10,000 未満となった一部の調査地点については, 再分析を実施し, 両方の結果を合算した結果を用いている。

これらの結果から, BLAST 解析とチェックリストを用いた魚種の分類及び各地点の総リードの 0.1%未満の魚種の除去により, 全リード数の 93.3%にあたる 10,611,215 リード, 1 サンプルあたり平均 109,394 リードの有効データを得た。

3. 3 環境 DNA 調査の結果

環境 DNA 調査の結果, 別表のとおり 54 種の魚が確認され, 重複を含めて 97 地点で延べ 989 種の生息データが得られた。

これらのうち, 最も確認された地点が多かった種は, ヨシノボリ属の 23 河川 80 地点であり, 次いでコイの 23 河川 73 地点, アブラハヤの 22 河川 73 地点, オイカワの 21 河川 64 地点, スミウキゴリの 23 河川 50 地点及びドジョウの 17 河川 50 地点と続いた。

「環境省レッドリスト 2020(以下「RL」という)」及び「神奈川県レッドデータ生物調査報告書 2006(以下「県 RDB」という)」の掲載種(以下「重要種」という)については 17 種確認されており, 最も確認地点数が多かったのは県 RDB 準絶滅危惧種のアブラハヤの 22 河川 73 地点であり, 次いで県 RDB 準絶滅危惧種のスミウキゴリの 23 河川 50 地点, 県 RDB 準絶滅危惧種のボウズハゼの 16 河川 35 地点及び RL 絶滅危惧 II 類のニホンウナギの 17 河川 33 地点と続いた。ニホンウナギについては, 産業上重要な種であり, その資源量が危機的状況にあると報告されているが¹⁴⁾, 少なくとも県内の河川においては多くの地点で生息している可能性が示された。

逆に最も確認地点数が少なかったのは県 RDB 注目種のウロハゼの 1 河川 2 地点であり, 次いで RL データ不足のキタドジョウの 1 河川 2 地点, 県 RDB 情報不足のミミズハゼの 3 河川 4 地点及び RL 準絶滅危惧種及び県 RDB 絶滅危惧 II 類の

カジカの1河川7地点と続いた。キタドジョウについては、2017年に和名が提唱され、別種として扱われることとなったため¹⁵⁾、生息地に関する情報が不足しており、今回の結果は環境DNAを用いた県内のキタドジョウの生息に関する初めての報告となる。

国外外来種については5種確認されており、最も多かったのはニジマスの4河川14地点であり、次いでカムルチーの3河川5地点及びオオクチバスの2河川5地点と続いた。ニジマスは生態系被害防止外来種リストにおける産業管理外来種に位置づけられており、県内においても管理釣り堀り等で養殖されていることから、今回の確認された地点については当該施設等からの排水が河川に流れ込んでいる可能性も考えられた。

3. 4 各地点における捕獲調査結果との比較

過去に実施した捕獲調査では63種の魚が確認され、重複を含めて97地点で延べ789種の生息データが得られているが、今回の環境DNA調査ではその73%にあたる579種が一致する結果となった。

捕獲調査のみで確認された種は、コノシロ、タイクバラタナゴ、カラドジョウ、カダヤシ、グッピー、イッセンヨウジ、テングヨウジ、マゴチ、

カマキリ(アユカケ)、コトヒキ、シマイサキ、コボラ、ニクハゼ、ヒナハゼ及びコモンフグの計15種であった。これら15種のうち1地点のみで確認された種は9種であり、また汽水域や海域に生息する種が多いことが特徴としてあげられる。

環境DNAは生物から放出された細胞片やミトコンドリアなどの微粒粒子に由来する可能性が高いと考えられており^{16,17)}、河川汽水域・下流域の調査では表層よりも下層で採水を行うことで海水魚の検出が良くなることも報告されている¹⁸⁾。今回環境DNAのみが不検出となったのは、県内の生息が稀であることと表層水の採水であったため周縁魚等の海水魚の検出が悪かったことが要因と考えられた。

一方でカマキリ(アユカケ)については、環境DNA調査で不検出となった種のうち、最も過去の捕獲調査での確認地点数が多く、RL絶滅危惧II類、県RDB絶滅危惧IA類に指定されており、県内において絶滅が危惧されている種である。今回の環境DNA調査が当該種の生息域の減少を反映したものか、引き続き定期的な調査を実施していく必要があると考えられた。

次に環境DNA調査のみで確認された種はヌマムツ、イトモロコ、キタドジョウ、ドジョウ属の一種、ドンコ及びカムルチーの6種であった。これ

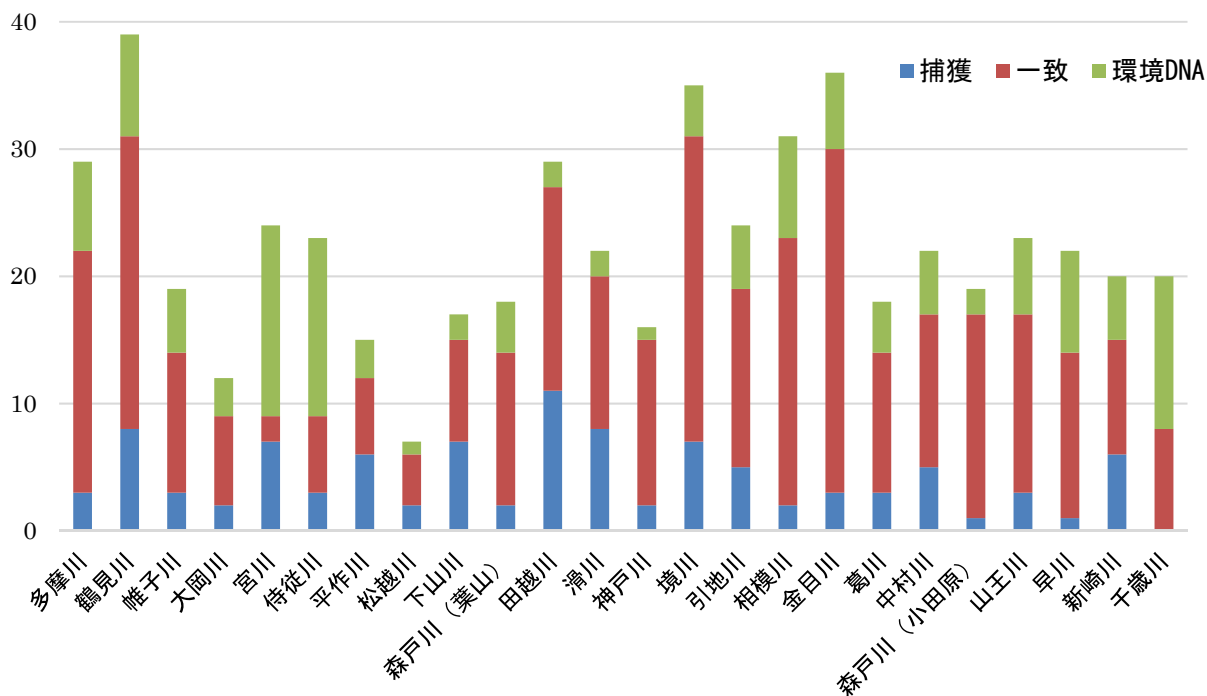


図2 河川ごとの各調査手法の比較

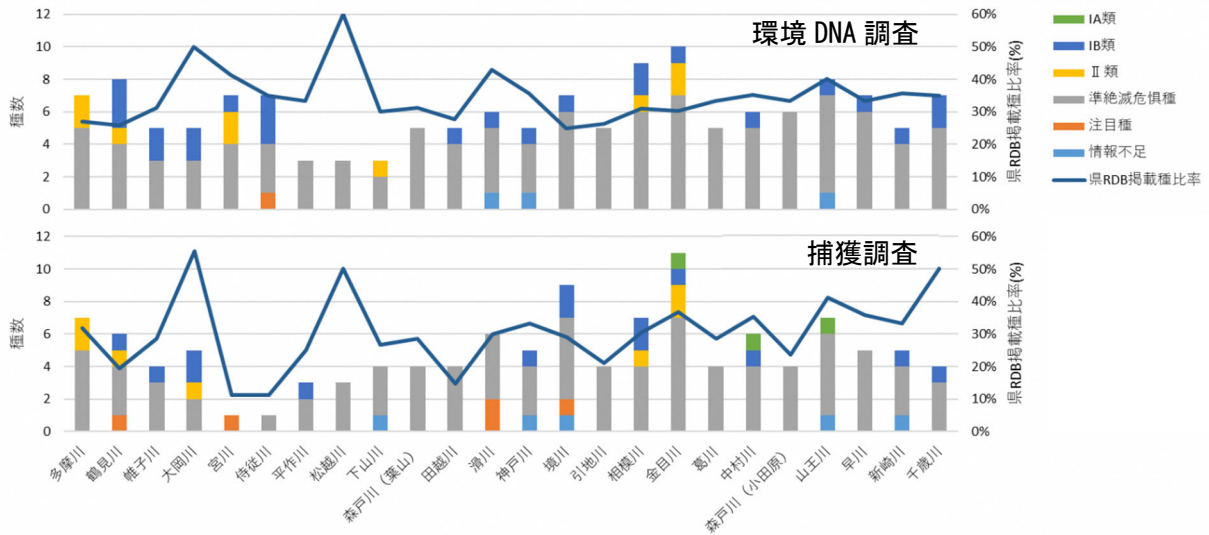


図3 河川ごとの県 RDB 掲載種確認状況

ら 6 種は比較的河川の淵等の緩流域や止水域を好み、キタドジョウ及び由来不明であるドジョウ属の一種を除いた 4 種が外来種であることが特徴としてあげられる。捕獲調査は深さのある淵等、人が立ち入ることができない環境の場合、調査が投網のみとなってしまう、例えばカムルチーのように昼間は淵等でそれほど活発に動かない種については捕獲が難しいこと、環境 DNA は調査地点の河川だけでなく、上流側で当該河川に流れ込んでいる用水路等に生息する種も検出することが要因と考えられた。環境 DNA 調査で新たに確認された種に外来種が多かったことは、県内の河川において外来種の侵入が進んでいる可能性を示唆しており、重要種の減少と併せて、引き続き定期的な調査を実施していく必要があると考え

られた。

3. 5 各河川における捕獲調査結果との比較

両手法の調査結果を河川ごとにまとめ、それぞれ捕獲調査のみで確認された種、両手法で確認され、結果が一致した種及び環境 DNA 調査のみで確認された種に分類し、グラフ化したものを図 2 に示す。

多くの河川において、両調査手法の結果が一致した種の割合が多く、環境 DNA 調査でも河川ごとの生態系の特徴を把握できていることが明らかとなった。全体的な傾向として河川規模の大きい多摩川、鶴見川、境川及び金目川等で確認種数が増える傾向が確認された。

宮川及び侍従川では環境 DNA 調査で検出された種の割合が多いが、これは上流側の調査地点にお

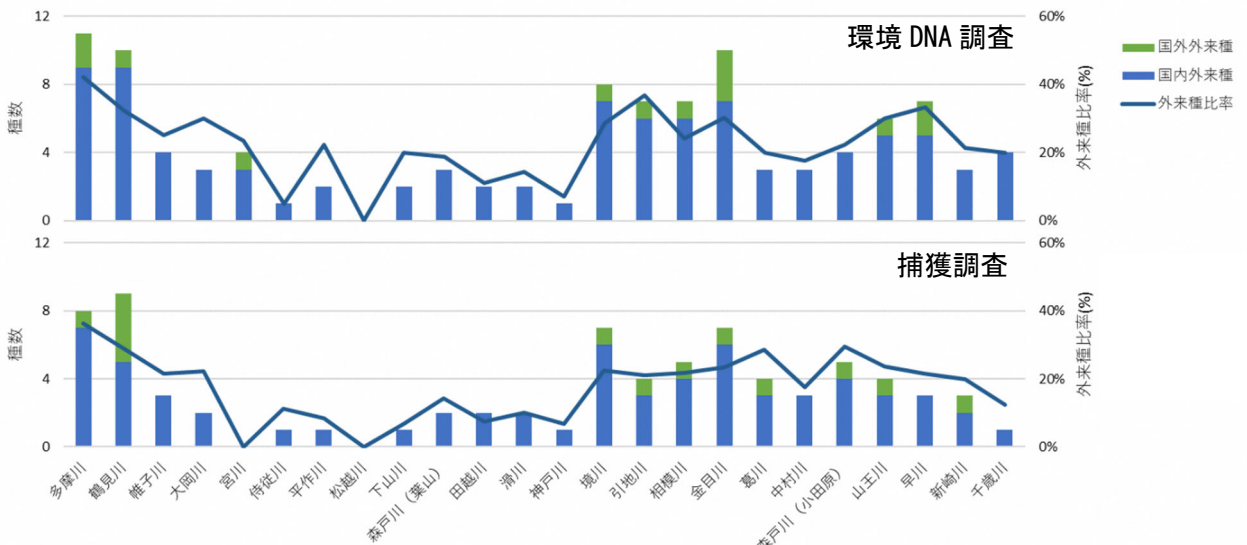


図4 河川ごとの外来種確認状況

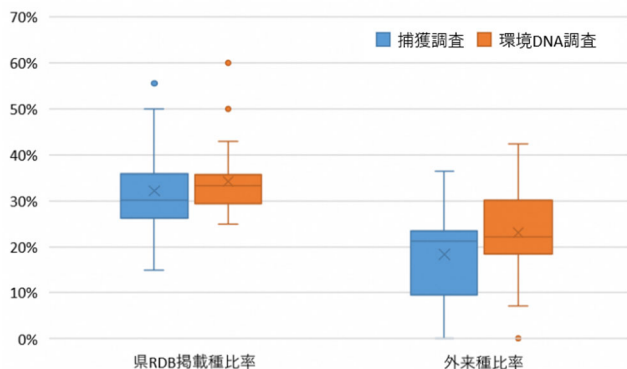


図5 県RDB掲載種比率及び外来種比率の変化

いて、捕獲調査では魚が確認されなかったものの環境DNA調査では多くの魚種が検出されたため、他の水系からの流れ込みやコンタミネーションの可能性も考えられるため、以後の解析からは除外することとした。

次に県RDB掲載種について、河川ごとにまとめるとともに、全確認種に対する比率を算定したものを図3に示す。上段が環境DNA調査の結果、下段が捕獲調査の結果を示している。比率については全体的としては両調査に大きな違いはなく、河川規模が小さく、確認種数が少ない河川は高くなる傾向が確認された。

一方で、RDBの分類区分毎にみても、3.3でも触れているとおり、捕獲調査では3河川で確認されていたIA類に該当しているカマキリ(アユカケ)が、環境DNA調査では確認されないなど、河川環境が悪化している可能性が考えられた。

続いて外来種について、河川ごとにまとめるとともに、全確認種に対する比率を算定したものを図4に示す。上段が環境DNA調査の結果、下段が捕獲調査の結果を示している。比率については環境DNA調査、捕獲調査のいずれも多摩川が最も高い結果となり、鶴見川も両調査とも高い比率を示していた。一方で、三浦半島周辺の小河川、例えば松越川等では比率が低かった。また、引地川や早川では環境DNA調査で大きく比率が上昇

しており、10年間での外来種の侵入が明らかとなった。

続いて河川ごとの県RDB掲載種比率及び外来種比率について、捕獲調査と環境DNA調査の間で図5のとおり箱ひげ図を作成した。この結果からも全体的な傾向として県RDB掲載種については大きな変化がない一方で、外来種比率については上昇していることが確認された。

この傾向について有意な変化であるか確認するため、全調査地点における確認種を合算し、両調査における県RDB種比率及び外来種比率の差の検定をZ検定で行った結果を表7に示す。この結果から県RDB掲載種比率については有意な変化は確認されなかった一方で、外来種比率については環境DNA調査の方が有意($p < 0.01$)に上昇していることが明らかとなった。

4 まとめ

県内24河川100地点において採水を実施し、PCR増幅ができなかった3地点を除く97地点で環境DNA調査を実施し、その結果を2010年に実施した魚類捕獲調査の結果と比較して、経年的な変化を評価した。

その結果、県RDB掲載種の比率は変化がなかったものの、RL絶滅危惧II類、県RDB絶滅危惧IA類に指定されているカマキリ(アユカケ)の確認河川が3から0に減少するなど、河川環境の悪化が生じている可能性が明らかとなった。

また、外来種比率については、県内河川全体として上昇傾向がみられ、10年間で外来種が侵入している実態が明らかとなった。

謝辞

本論文の作成にあたり、分析に関する助言をいただいた神戸大学大学院人間発達環境学研究科国際人間科学部源教授、東北大学大学院生命科学研究科田邊助教、分析結果の解析手法に関する助言をいただいた一般財団法人九州環境管理協会環境部大井主席研究員にこの場を借りて感謝の

表7 県RDB種比率及び外来種比率の差の検定結果

	捕獲調査	環境DNA調査
総確認種数	789	989
県RDB種数	228	321
県RDB種比率	28.9%	32.5%
母比率の検定	有意差なし	

	捕獲調査	環境DNA調査
総確認種数	789	989
外来種数	172	282
外来種比率	21.8%	28.5%
母比率の検定	有意に上昇	

意を表します。

参考文献

- 1) IPBES: Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany., 1148 pages (2019)
- 2) Secretariat of the Convention on Biological Diversity (2020) Global Biodiversity Outlook 5. Montreal, <https://www.cbd.int/gbo5>(参照;2020.8)
- 3) 神奈川県：河川のモニタリング調査, <https://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/suigen/top.html>(参照 ; 2022.8)
- 4) 神奈川県：神奈川県内の魚類, <https://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/kankyougakushu/suiseisiryu.html>(参照 ; 2022.8)
- 5) Darling JA, Mahon AR.:From molecules to management:adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments, *Environmental Research*,111:978-988(2011)
- 6) Cilleros K, Valentini A, Allard L, Dejean T, Etienne R, Grenouillet G, et al.:Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes,*Molecular Ecology Resources* [Internet],(2018)
- 7) Ficitola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P. :Species detection using environmental DNA from water samples,*Biol. Lett.* 4, 423–425(2008)
- 8) Minamoto, Miya, Sado, Seino, Doi, Kondoh, Nakamura, Takahara, Yamamoto, Yamanaka, Araki, Iwasaki, Kasai, Masuda & Uchii:An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, *Environmental DNA*, 3: 8-13(2021)
- 9) 環境省自然環境局生物多様性センター: https://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html (参照;2022.8)
- 10) Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., ... Kondo, A.:A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant,*Limnology*, 18(2), 233– 324(2017)
- 11) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W:MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species,*R Soc Open Sci*2:150088,(2015)
- 12) Edgar RC:Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST,*Bioinformatics.*, 2010 Oct 1;26(19):2460-1(2010)
- 13) Edgar, R. C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. Preprint at bioRxiv,(2016)
- 14) 海部健三, 水産庁, 環境省自然環境局野生生物課, 望岡典隆, パルシステム生活協同組合連合会, 山岡未季, 黒田啓行, 吉田丈人:日本におけるニホンウナギの保全と持続的利用に向けた取り組みの現状と今後の課題, *日本生態学会誌*,68 : 43 – 57(2018)
- 15) 中島 淳, 内山りゅう:日本のドジョウ 形態・生態・文化と図鑑, 山と溪谷社, 東京(2017)
- 16) Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM, Gilbert M:Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA , *Methods in Ecology and Evolution*, 5:676-684(2014)
- 17) Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Lowe WH, Schwartz MK : Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) , *Conservation Genetics Resources*, 7:639-641(2015)
- 18) 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*, 第25巻, pp. 417-422,(2019)

別表 環境 DNA 調査確認魚種・属一覧

和名	学名
ニホンウナギ	<i>Anguilla japonica</i>
コイ	<i>Cyprinus carpio</i>
ゲンゴロウブナ	<i>Carassius cuvieri</i>
フナ属	<i>Carassius</i> sp.
オイカワ	<i>Zacco platypus</i>
カワムツ	<i>Zacco temminckii</i>
ヌマムツ	<i>Nipponocypris sieboldii</i>
アブラハヤ	<i>Phoxinus lagowskii steindachneri</i>
タカハヤ	<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>
マルタ	<i>Tribolodon brandti</i>
ウグイ	<i>Tribolodon hakonensis</i>
モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>
ムギツク	<i>Pungtungia herzi</i>
タモロコ属	<i>Gnathopogon</i> sp.
イトモロコ	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>
スゴモロコ	<i>Squalidus chankaensis biwae</i>
カマツカ	<i>Pseudogobio esocinus esocinus</i>
ニゴイ	<i>Hemibarbus barbuis</i>
ドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>
キタドジョウ	<i>Misgurnus</i> sp. Clade A
ヒガシシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type C
ドジョウ属の一種	<i>Misgurnus</i> sp.
ホトケドジョウ	<i>Lefua echigonia</i>
ナマズ	<i>Silurus asotus</i>
アユ	<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>
アメマス類	<i>Salvelinus leucomaenis</i>
ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
サクラマス類	<i>Oncorhynchus masou</i>
ミナメダカ (ヒメダカを含む)	<i>Oryzias latipes</i>
カジカ	<i>Cottus pollux</i>
スズキ	<i>Lateolabrax japonicus</i>
ユゴイ	<i>Kuhlia marginata</i>
ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>
オオクチバス	<i>Micropterus salmoides</i>
コクチバス	<i>Micropterus dolomieu</i>
クロダイ	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>
ボラ	<i>Mugil cephalus cephalus</i>
ドンコ	<i>Odontobutis obscura</i>
カワアナゴ	<i>Eleotris oxycephala</i>
ボウズハゼ	<i>Sicyopterus japonicus</i>
ミミズハゼ	<i>Luciogobius guttatus</i>
スミウキゴリ	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>
ウキゴリ	<i>Gymnogobius urotaenia</i>
ピリンゴ	<i>Gymnogobius breunigii</i>
ウロハゼ	<i>Glossogobius olivaceus</i>
マハゼ	<i>Acanthogobius flavimanus</i>
アシシロハゼ	<i>Acanthogobius lactipes</i>
アベハゼ	<i>Mugilogobius abei</i>
ゴクラクハゼ	<i>Rhinogobius giurinus</i>
カワヨシノボリ	<i>Rhinogobius flumineus</i>
ヨシノボリ属(カワヨシノボリ除く)	<i>Rhinogobius</i> sp.
チチブ属	<i>Tridentiger</i> sp.
カムルチー	<i>Channa argus</i>
クサフグ	<i>Takifugu niphobles</i>