

## Contents

## 環境DNA特集号

- 06 種特異的な環境DNA検出法を用いた希少種の分布調査
- 04 環境DNA調査による魚類相の網羅的把握
- 02 環境DNA分野に関するいでの取り組み

- 10 環境DNA調査の普及に向けた新たな取り組み
- 08 環境DNA調査の海域への展開



人と地球の未来のために——

いであ株式会社

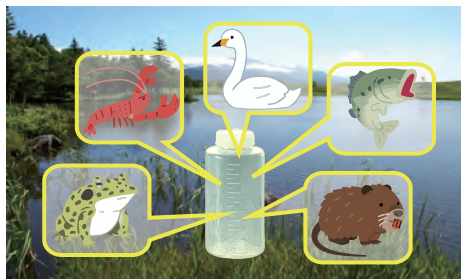
## Column

## 環境DNA\*分析技術の最新動向

2019年5月、世界132か国が参加する「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)は、人類の活動によって約100万種以上の動植物が絶滅の危機に瀕しているという調査報告書を公表しました<sup>1)</sup>。現在の種の絶滅速度は、地球規模では過去1000万年の平均よりも数十倍から数百倍早くなっており、さらに加速しているとして、生物多様性の低下を危惧しています。

日本国内においても、持続可能な開発目標(SDGs)および愛知目標(2016年に名古屋市で開催されたCOP10で採択された行動目標)の達成に向け、絶滅危惧種の保護や侵略的外来種への対策などさまざまな生物多様性の保全に関する取り組みが行われています。そうした生物多様性の保全に関する政策を進めるうえで、「生物種の分布生息情報」は最も基本となるものです。

環境DNA分析技術は、生物の生息状況を把握するための画期的な調査手法として注目されています。特に、淡水域および海域に生息する水生生物を対象とした分析技術は、ここ3~4年の間で飛躍的に向上しました。わずか1Lその場所の水(環境水)を汲むだけで、水に含まれる環境DNAの網羅的な配列情報から、その場所にいた魚類<sup>2)</sup>、鳥類<sup>3)</sup>、哺乳類<sup>4)</sup>、エビ・カニ類<sup>5)</sup>など複数の分類群ごとの生物相を調べることが可能になっています。



環境DNA分析技術による生態系調査イメージ

また、調査対象に選んだ生物種の環境DNA濃度を測定することで、その種の現存量を推定することができます。さらに、水槽実験や潜水観察調査等により環境DNA濃度と生息個体数との関係式を導き、環境DNAの生成・分解・拡散に関する物理モデルと統合することで、現場の環境DNA濃度から生息個体数を推定することも将来的には可能になると考えられます。

そのほかにも、核DNAおよびミトコンドリアDNA由来の2種類の環境DNA濃度を測定し、その検出比率から繁殖期や繁殖場所を推定したり<sup>6)</sup>、種内の遺伝的な違いを検出することで在来型と人為移入型の分布状況を調べたり<sup>7)</sup>と、環境DNA分析技術の応用の可能性がますます広がっています。さらには、生物の生理反応を反映するRNAを環境中から回収して調べる環境RNAの研究も始まっており、将来は環境水を汲むだけで、そこに生息する生物のストレス度や生殖腺成熟度のような「状態」を調べることができるようになるかもしれません。

英国スコットランドのネス湖では、あの有名な未確認生物「ネッシー」の探索を目的として、2018年からオタゴ大学による環境DNA調査が始まりました。まさに「捕まえずに存在を調べられる」という環境DNA分析技術の利点を生かした調査であり、どのような結果が出るのか非常に興味深いところです。

本号は「環境DNA特集」として、当社の取り組みやこの技術を用いた調査についてご紹介します。

※2ページ 環境DNA分析の概要 参照

## 【参考資料】

- 1) IPBES (2019) Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services Advance unedited version, 6 May 2019.
- 2) Miya *et al.* (2015) R. Soc. open Sci. 2:150088.
- 3) Ushio *et al.* (2018) Sci. Rep. 8:4493.
- 4) Ushio *et al.* (2017) Mol. Ecol. Res. 17:63-75.
- 5) Komai *et al.* (2019) Metabarcoding and Metagenomics 3:e33835.
- 6) Bylemans *et al.* (2017) Methods Ecol. Evol. 8:646-655.
- 7) Uchii *et al.* (2016) Mol. Ecol. Res. 16:415-422.

Point

水や土壌などの試料に含まれているDNAを検出することにより、現場で捕獲や観察を行わずに生息している種を把握することができます。また、特定の種のDNA濃度を測定して生息量を推定することができます。生物多様性の保全や環境影響評価などさまざまな生物調査への活用が期待されている環境DNA分析技術について、当社の取り組みをご紹介します。

## 環境DNA分野に関するいでの取り組み

環境創造研究所 遺伝子解析室

### 環境DNA分析の概要

環境DNAとは、水や土壌といった環境試料中に含まれるDNAの総称です。環境DNAには、バクテリアや菌類のような目に見えない微生物の生体内にあるDNAと、魚類や両生類など比較的大型の生物に由来する生体外のDNAが含まれます。魚類の場合、エラや表皮から剥がれ落ちた細胞片や、糞や粘液、繁殖行動時に放出された精子などに由来するDNAが環境DNAとして検出されます。

近年、水域の生体外DNAを対象とした調査・研究が注目されています。さまざまな活用が期待されている環境DNA分析の概要と、当社の取り組み・実績についてご紹介します。

#### (1)長所と短所

環境DNA分析の最大の長所は、現場の作業が水を汲むだけでよいという簡便性と迅速性です。一方短所は、検出感度が非常に高いがゆえに、採水時および分析時のコンタミネーション(試料汚染:試料への外部DNAの混入)による誤検出が生じることです。そのため、この技術を実用化するにはコンタミネーションの防止に十分な配慮が必要です。

以下に環境DNA分析の長所と短所をまとめました。

#### 長所

- 1) 現場での作業は水を汲むだけ
- 2) 捕獲の必要がないため、生物を傷つけない
- 3) 捕獲や観察で見つけにくい生物が確認できる
- 4) 調査員は生物に関する高度な専門知識が不要
- 5) 広域・多地点・高頻度な調査に展開しやすい
- 6) アクセスが困難な深海域や放射線量の高い地域などの調査が可能

#### 短所

- 1) コンタミネーション防止に十分な配慮が必要
- 2) 偽陽性\*もしくは偽陰性\*を生じることがある
- 3) DNAデータベースに登録されていない生物は検出できない
- 4) 分析やデータ解析には分析機器や専門知識が必要  
\*偽陽性とは、本来はDNAが「ない」のに、誤って「ある(陽性)」と判定されること、偽陰性とはその逆に、本来はDNAが「ある」のに、誤って「ない(陰性)」と判定されることを指します。

#### (2)分析の流れ

まず始めに、河川や海域などの現場から環境水を採水します。採水量は調査目的や環境条件によって変わりますが、河川、湖沼などの淡水域では1L、海域では1~

10Lが標準的な量とされています。採水した試料から環境DNAを回収し、調査目的に応じた処理をした後、分析機器を用いて検出を行います(図1)。



図1 環境DNA分析の流れ

検出された環境DNAの配列情報を国際DNAデータベースに登録されている情報と比較検証することにより、環境水に含まれている生物種の網羅的なリストを得ることができます。また、特定の生物種の生息確認や生息量推定を目的とする場合は、その種のDNAを対象として濃度を測定する手法があります。

### 社内体制

#### (1)組織・人員

当社では2014年から環境DNA分析業務に取り組んできました。分析は、環境創造研究所(静岡県焼津市)および食品・生命科学研究所(大阪府大阪市)において対応しています(写真1)。



写真1 環境創造研究所および食品・生命科学研究所

#### (2)分析施設・機器

当社は、次世代シーケンサーやリアルタイムPCR装置など環境DNA分析に必要なすべての分析機器を所有しています(写真2)。また、環境DNA分析ではコンタミネー



ションへの対策が非常に重要であり、この対策が不十分であると、生息していない生物を検出するなど誤った調査結果を導いてしまう恐れがあります。そのため、環境創造研究所では、環境DNA分析を行う実験室を複数確保し、汚染が生じやすい分析工程(DNA抽出やPCR調整)をそれぞれ物理的に隔離された室内空間で実施することで、コンタミネーションの防止対策を行っています。さらに2019年春には、超高性能クリーンゾーン生成装置を導入し、環境DNA分野における国内最高レベルの分析精度を目指しています。



写真2 環境DNA分析に使用する機器

## 当社の実績

### (1)近年の主な受注業務

【業務名】平成30年度絶滅危惧種分布重要地域抽出のための環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の標準化・一般化検討業務

【発注者】環境省 自然環境局 生物多様性センター

【業務内容】二次的自然に生息する絶滅危惧種(淡水魚類)の分布を調査する手法として環境DNA分析技術の活用を検討しました。全国7か所で試行的な環境DNA調査を実施し(写真3)、調査手法の標準化・一般化に向けた課題の整理と検討会の運営を行いました。



写真3 環境DNA試行調査を実施した二次的自然

【業務名】平成30年度国指定浜甲子園鳥獣保護区における保全事業検討調査業務

【発注者】環境省 近畿地方環境事務所

【業務内容】干潟は鳥類の採餌場として重要な環境です。干潟の再生を目指し、貝類や甲殻類、多毛類など餌生物15種の生息状況を把握する手法として環境DNA分析技術がどの程度有効かを調査・検討しました(写真4)。

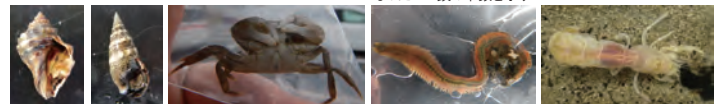
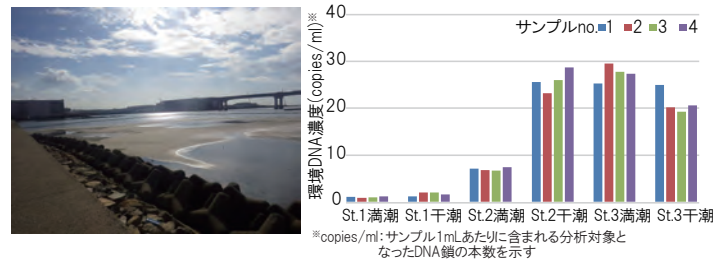


写真4 干潟の底生動物を対象とした環境DNA調査

このほかにも、国土交通省や農林水産省、地方自治体等から環境DNAに関する業務を30件以上受託しています。

### (2)学会発表、共同研究

環境DNA学会の記念すべき第1回大会が2018年9月に東京で開催され、当社もポスター発表を行いました。また、2019年度より農林水産省の戦略的プロジェクト研究推進事業「農業被害をもたらす侵略的外来種の管理技術の開発」に参加し、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構とともに環境DNA分析技術を用いた侵略的外来種のモニタリング手法に関する共同研究を開始しました。このほかにも、大学や行政機関の研究者、NPO等の方々にご協力いただきながら、環境DNAに関するさまざまな共同研究を行っています。

### おわりに

環境DNA分析技術は、従来の捕獲や観察による生物調査がもつ欠点を補うことができる画期的な調査手法です。一方で、間接的に生物の生息を把握する環境DNA調査は、人為排水や流れ等の影響を受けることがあり、調査結果の評価には留意が必要です。この技術が生物調査の標準的な手法として活用されるように、今後も技術的な工夫を重ね、さまざまな技術提案をもって生物多様性の保全に貢献してまいります。

【参考文献】  
源利文(2018)、環境DNAとは何か、海洋と生物, vol.40 no.1, 3-8

Point

相模川水系において、魚類を対象とした環境DNAによる調査を行いました。従来の採捕によるモニタリング調査との結果を比較した結果、環境DNA調査は魚類相の把握において、採捕調査と同程度の精度であることが確認されました。

## 環境DNA調査による魚類相の網羅的把握

国土環境研究所 生態解析部、環境創造研究所 遺伝子解析室

※本調査は、神奈川県環境科学センターの協力により実施しました。

### はじめに

神奈川県では、水源林の涵養機能の低下、ダム湖の富栄養化の進行など水源環境の悪化が懸念されており、「かながわ水源環境保全・再生施策大綱(2005年度)」に基づき、良質な水を安定的に確保するための施策を実施しています。

当社では、神奈川県環境科学センターより委託を受け、相模川水系において動植物の生息状況および水質を定期的にモニタリングしています。魚類を対象とした調査では、数種類の網や専用漁具を組み合わせた採捕が一般的な手法ですが、調査員の技術の差により結果にばらつきが出たり、採捕による確認が難しい魚種がいるなど、いくつかの問題があることも知られています。そこで、一部のモニタリング調査地点において、従来の採捕による調査と同時に、環境DNA調査のための採水を実施し、両者の結果と比較することで、魚類相の把握を目的としたときの環境DNA調査の有効性を検証しました。

### 相模川水系における魚類相調査への適用検証

#### (1) MiFish法による魚類の環境DNA検出

魚類相を調べる環境DNA調査には、千葉県立中央博物館の宮正樹先生のグループが開発したMiFish法<sup>1)</sup>と呼ばれる方法があります。一般的に、河川や湖沼から採水したサンプルには、魚類以外の水中に生息するさまざまな生物由来のDNAが含まれていますが、MiFish法は、サンプル中に含まれる魚類のDNAだけに反応するように工夫された分析手法です。MiFish法は、次世代シーケンサーと呼ばれる最新式のDNA分析機器を用いることで、サンプルに含まれる魚類由来のDNAをすべて読み取り、そのDNAの配列情報をデータベースと照合することでサンプル中に含まれていた魚類の「種」を網羅的に調べることが可能となります。

「水を汲んで調べれば、その水の中に生息する魚の種類が分かる」というこの方法を使えば、現場での作業が採水だけとなり、調査の効率化や省力化が可能となります。また、従来の調査法では採捕することが難しい魚種の生息状況がわかるほか、サンプル採水を時系列的もしくは

空間的に展開することで、従来法よりも低コストで魚類の時系列的・空間的な分布を把握することが可能となるなど、モニタリング調査の革新的進歩に寄与する技術として期待されています。

MiFish法は、現在、環境DNAから魚類相を調べるための世界的な標準法になりつつあります。そのため、相模川水系における環境DNA調査は、このMiFish法により実施しました。

2018年の夏季に、相模川水系の上流域から河口付近までを範囲とした10地点において河川水を1L採水し、MiFish法による環境DNA分析を行いました。その結果、合計で54種の魚類が確認されました(図1)。

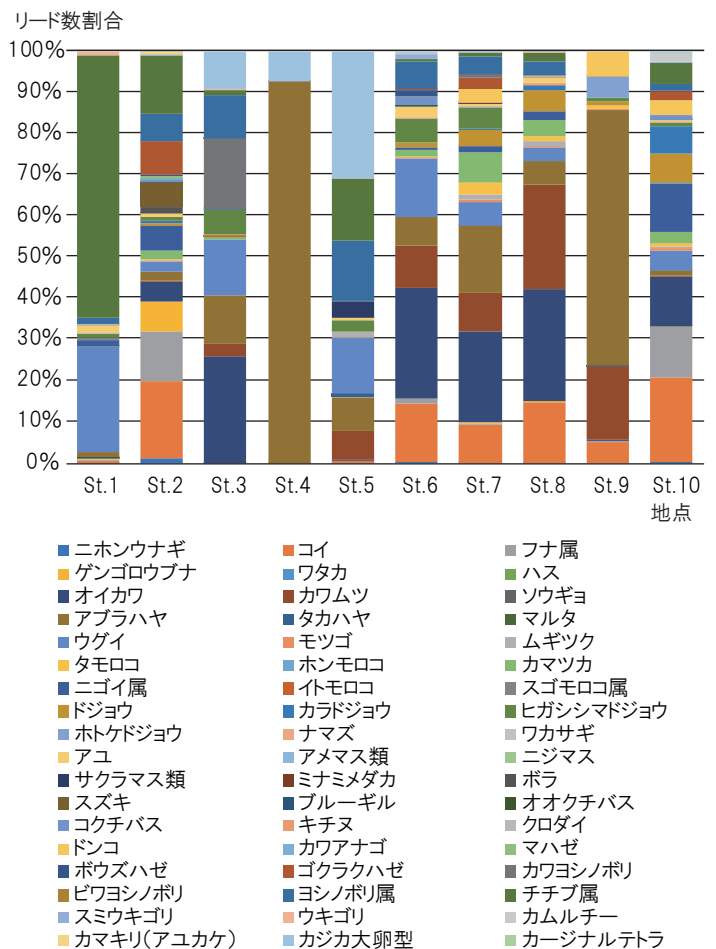


図1 MiFish法による魚種の検出結果

地点別にみると、多様な微環境を含む下流域のSt.2およびSt.7からは、それぞれ41種および39種と多くの魚種が検出されたのに対し、住宅地内を流れる単調な小河川である上流域のSt.4では8種と少なく、調査環境の違いを反映した結果が得られました。

MiFish法の分析結果では、検出された魚種ごとに「リード数」という数値が得られます。リード数は、サンプルから検出されたすべてのDNA配列のうち、その魚種に同定されたDNA配列の本数を示しています。リード数の値は分析上のさまざまなバイアスを含んでいるため、図1のSt.1の結果を例にすると、ウグイとチチブ属ではリード数の割合が2.5倍違いますが、両種の生物量が2.5倍違うという解釈はできません。しかし、仮にリード数が、2つの魚種間で3桁(100倍)や4桁(1,000倍)以上のレベルまで明瞭に異なる場合では、サンプルが採水された地点において、「2つの魚種間の相対的な生物量が多い・少ない」と量的な比較をすることは可能であると解釈されています。すなわち、MiFish法の結果は、基本的には在・不在を示した定性分析として扱うべきものですが、それぞれの魚種のリード数およびその比率は、その差がオーダーレベルで異なる場合は生物量の多寡を反映したものとみなすことができると考えられます。

最近の研究では、得られるリード数に定量性を持たせるための改良法も検討されつつあり、近い将来にはMiFish法によって正確な生物量を把握することが可能になると期待されます。

## (2)環境DNA調査と従来調査との比較

環境DNA調査と同時に実施した採捕調査との結果を比較し、環境DNA調査の有効性を検証しました(図2)。

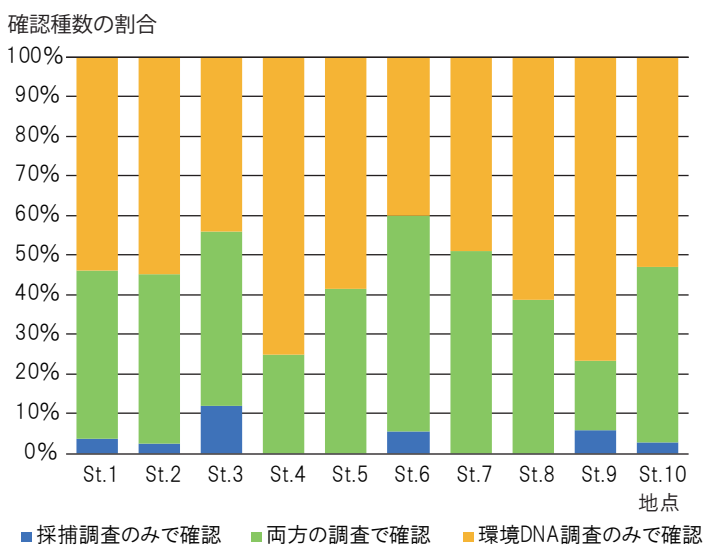


図2 環境DNA調査と採捕調査で確認された種数の割合

いずれの調査地点においても、採捕調査でのみ確認された魚種は0~3種(各地点の確認魚種の0~12.0%)と少なく、採捕調査で確認されたほとんどの魚種が環境DNA調査からも確認されました。環境DNA調査では確認できず採捕調査でのみ確認された魚種は、アユ、ミナミメダカ、アカザ、ウキゴリ、カジカ大卵型などでしたが、いずれも各地点で採捕された個体数が非常に少なかったことから、それぞれの魚種の環境DNA濃度が低いために検出できなかったと考えられます。

一方で、環境DNA調査でのみ確認された魚種は6~23種(各地点の確認魚種の40~76.5%)となりました。これは、採捕調査では設定された50mの範囲のみが調査の対象になっているのに対し、環境DNA調査では採捕が行われた範囲よりもさらに上流側に生息している魚類から放出されたDNAの影響を受けたためと推察されます。環境DNAが検出される範囲は、DNAの分解速度や流速などさまざまな環境要因により変化するため、一般的な値を示すことは困難ですが、実河川におけるアユを使った実験では、DNA放出源からの影響範囲は400~800m程度という結果が報告されています<sup>2)</sup>。このことから、採捕調査では特定の位置における生息情報が得られたのに対し、環境DNA調査では採水地点よりも上流側の“ある程度の範囲内”における生息情報が得られたと考えられます。

## おわりに

今回の環境DNA調査から、従来の採捕調査と同程度の精度で魚類相を把握できることがわかりました。また、相模川水系においては、数m~数10mのような局所的な範囲の魚類相を調べたい場合は採捕調査が、それよりも広い範囲の魚類相を調べたい場合は環境DNA調査が比較的適していると考えられます。したがって、他の河川においても、目的に応じて、2つの調査方法を使い分けたり、もしくは併用することが魚類相の網羅的な把握には有効であると思われます。

今回の調査は魚類が対象でしたが、環境DNA調査では、哺乳類、鳥類、両生類、無脊椎動物(エビ・カニ類、水生昆虫、貝類)、水生植物などを対象に選ぶことも可能であり、将来的にはますます幅広い分野で利用されることが期待されます。

### 〔参考文献〕

- 1) Miya *et al.*(2015), MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2: 150088.
- 2) 赤松良久、乾隆帝、一松晃弘、河野誉仁、土居秀幸(2017)、環境DNAを用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討、土木学会論文集B1(水工学), Vol.73, No.4, 1111-1116.



## Point

環境DNA調査は希少種の調査にも有効です。一般的に、希少種は生息密度が低いため、採捕調査による生息確認が難しいとされています。そこで、3種の希少種を対象にした種特異的な環境DNA検出法を開発し、効率的・高精度に調査する方法を採用した事例をご紹介します。

## 種特異的な環境DNA検出法を用いた希少種の分布調査

国土環境研究所 自然環境保全部、環境創造研究所 遺伝子解析室

※本調査は、神奈川県環境科学センターの委託により実施しました。

### はじめに

4ページに述べた神奈川県環境科学センターからの委託業務では、サンショウウオ類を対象にした採捕調査によるモニタリングも行っています。相模川水系に生息するサンショウウオ類には、ハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオの2種(写真1)が知られています。両種とも、幼生期は河川源流域の石の下などで水中生活を送り、成長して変態した成体は主に水辺近くの陸上で暮らします。また、ハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオは、それぞれ神奈川県において準絶滅危惧と絶滅危惧Ⅱ類にランクされる希少種であり、相模川水系においても生息密度は低いことが予想されました。したがって、サンショウウオ類の採捕調査では、広範囲を対象とした調査になる場合が多く、大きな労力が必要となります。

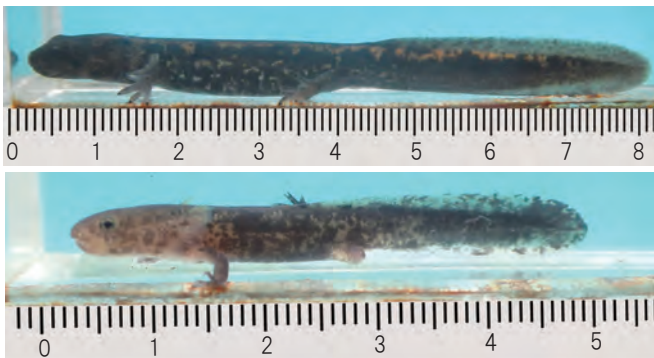


写真1 ハコネサンショウウオ(上)とヒガシヒダサンショウウオ(下)の幼生

また、相模川水系には、半水生の小型哺乳類で、神奈川県において準絶滅危惧にランクされる希少種カワネズミの生息も知られています。カワネズミの調査は、カゴ罠による捕獲やセンサーカメラによる撮影記録などの方法が用いられてきました。これらの調査には、カゴ罠やカメラの設置に関する専門知識が必要であることに加え、罠で捕獲された個体が誤って死傷してしまうこともありました。

これに対し、環境DNA調査は、現地での作業が水を汲むだけでよいという簡便さや、調査対象である希少種を傷つけないという優れた面があります。そこで、ハコネサンショウウオ、ヒガシヒダサンショウウオおよびカワネズミという希少種3種について、環境DNA調査を試験的に実施し、従来の調査方法の代替となりうる可能性があるか検討を行いました。

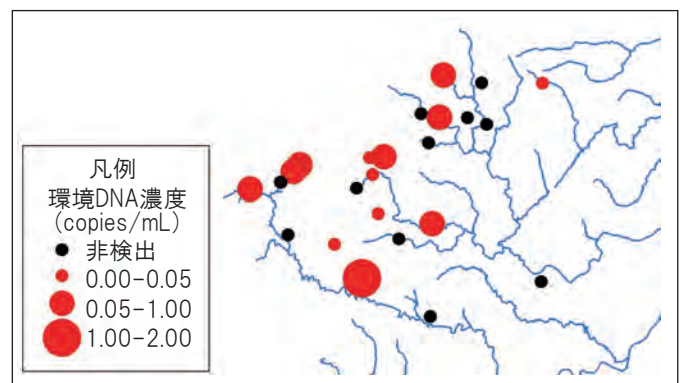
### 調査概要

本調査は、2018年8月に採水し、特定の種の環境DNAだけを特異的に検出する方法で分析を行いました。当社が独自に開発したこの方法では、採水したサンプルの中に含まれている調査対象3種のDNAのみを“種特異的に”検出するような技術的工夫をしており、それぞれの種ごとの環境DNA濃度を選択的に測定することが可能です。測定された環境DNA濃度は、採水地点周辺の生物量と強い正の相関を示すことが知られています<sup>1)</sup>。すなわち、環境DNAの濃度から、地点間の相対的な生物量を比較することができます。なお、生物量という用語にはいくつかの定義がありますが、ここでは調査地点に生息する個体の合計湿重量のようなイメージで示しています。

### サンショウウオ類2種の調査結果

#### (1)環境DNAの検出結果

分析の結果、採水を実施した全24地点のうち、13地点でハコネサンショウウオの環境DNAが検出されました(図1)。一方、ヒガシヒダサンショウウオでは、全ての地点において環境DNAは検出されませんでした。



※希少種保護の観点から架空の地点情報を掲載しています

図1 ハコネサンショウウオの環境DNA濃度のイメージ図

#### (2)採捕調査との比較

サンショウウオ類2種における採捕調査と環境DNA調査の結果を比較したところ(表1)、ハコネサンショウウオでは、採捕で12地点、環境DNAで13地点で生息が確認されました。地点ごとにみると、捕獲と環境DNAの両方で確認された地点が9地点と最も多く、環境DNA調査のみで

確認された地点が4地点、採捕調査のみで確認された地点が3地点となりました。また、ヒガシヒダサンショウウオでは、採捕で1地点のみ確認されていましたが、環境DNAは検出されませんでした。このことから、どちらか一方の調査方法が優れているというよりも、両方の調査を併用することで、生息密度が低いサンショウウオ類をより確実に確認できると考えられます。

表1 環境DNA調査結果と採捕調査結果の比較

地点名	ハコネサンショウウオ		ヒガシヒダサンショウウオ	
	捕獲個体数	環境DNA	捕獲個体数	環境DNA
St.1	0	×	0	×
St.2	0	×	0	×
St.3	2	検出	2	×
St.4	1	検出	0	×
St.5	0	×	0	×
St.6	0	検出	0	×
St.7	1	×	0	×
St.8	0	検出	0	×
St.9	0	検出	0	×
St.10	5	検出	0	×
St.11	34	検出	0	×
St.12	0	×	0	×
St.13	2	検出	0	×
St.14	1	検出	0	×
St.15	0	検出	0	×
St.16	0	×	0	×
St.17	4	×	0	×
St.18	0	×	0	×
St.19	0	×	0	×
St.20	3	検出	0	×
St.21	5	×	0	×
St.22	1	検出	0	×
St.23	0	×	0	×
St.24	1	検出	0	×
確認地点数	12	13	1	0

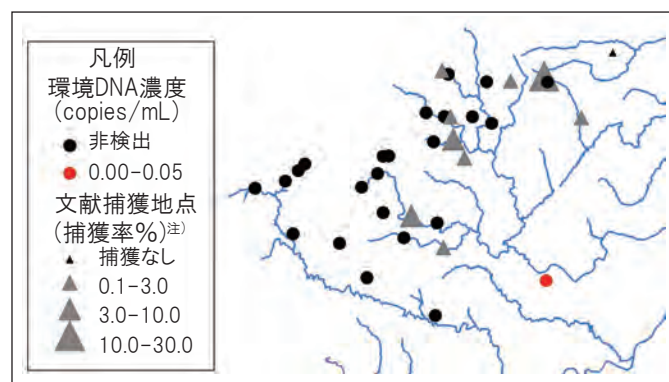
採捕調査のみで確認    両方の調査で確認    環境DNA調査のみで確認

今回の調査では、ヒガシヒダサンショウウオに比べて、ハコネサンショウウオで多数の地点から環境DNAが検出される傾向にありました。これは調査地点における両種の生息密度を反映しているのはもちろんですが、ヒガシヒダサンショウウオが孵化から1年間程度のみの中生活であるのに対し、ハコネサンショウウオは孵化から2~4年間と長期間に渡って水中生活を送ることも関係している可能性があります<sup>2)</sup>。また、両種において、採捕調査で個体が確認されていながら、環境DNA調査では検出されない地点がいくつかありました。その原因としては、分析時にDNA抽出液をピペットで分取する際に、採取した抽出液の中に、DNAが入るか入らないかが確率論的に決まるため、サンプル中に含まれる環境DNA濃度が非常に低いとDNAがピペットで分取されない確率が増え、結果的に検出されない確率も高くなるからと考えられます。一般的な環境DNA分析では、1検体あたり2 $\mu$ L $\times$ 4回繰り返しでサンプルを使用しますが、検出力を向上させるためには、1検体あた

りに使用するDNA量をさらに増やす工夫も必要であると考えられます。

## カワネズミ調査結果

カワネズミ調査では、1地点でのみ環境DNAが検出されました。カワネズミは捕獲調査を実施していないため、既報の調査結果<sup>3)</sup>を参考に確認状況を比較しましたが、過去に分布が確認された地点周辺では環境DNAは検出されませんでした。本種は、移動や捕食の際に水中を利用する性質のため、休息時などは陸上に上がります。また、地域によっては昼間より夜間の方が活動が活発との知見<sup>4)</sup>もあることから、採水した時間や頻度が検出力に影響した可能性があります。今後は、採水頻度を高くしたり、夜間にも採水することで検出力を向上させられるか検討を進める予定です。



注)捕獲率は、罟を1晩設置した際の捕獲確率を示します  
※希少種保護の観点から架空の地点情報を掲載しています

図2 カワネズミの環境DNA濃度と文献捕獲地点のイメージ図

## まとめ

今回の調査結果から、生息密度が低い希少種の調査においては、従来の採捕調査と環境DNA調査を併用することで、生息確認の頻度を向上させられることが明らかとなりました。一方で、分析時や採水時には、対象種の生態的特性に応じて、さらなる技術的な改良が必要であることもわかりました。今後は、そうした課題を解決するための技術開発を進め、環境DNA技術がさまざまな希少種の調査に実用レベルで活用されるよう一層の努力を進めます。

### 【参考文献】

- 1) Doi *et al.* (2017), Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshwater Biology*, 62: 30-39.
- 2) 草野保, 植田健仁, 初芝伸吾 (2001), 東京都におけるヒダサンショウウオとハコネサンショウウオの生息分布, *爬虫両棲類学会報*, 1: 1-7.
- 3) 藤本竜輔, 安藤元一, 小川博 (2011), カワネズミ *Chimarrogale platycephala* における効率的な捕獲調査方法の検討, *東京農大農学集報* 55: 290-296.
- 4) 横畑泰志, 川田伸一郎, 一柳英隆 (2008), *哺乳類科学* 48: 175-176.



## Point

環境DNA分析技術は、海域への適用も可能です。採水(採泥)だけで生物の生息状況を把握できる環境DNA調査の利点により、外洋域や深海底など、これまでは調査が困難であった場所においても、効率的かつ効果的な生物調査が行えるようになります。

## 環境DNA調査の海域への展開

環境創造研究所 遺伝子解析室、九州支店 環境調査・化学部

※本調査は、一般社団法人全国水産技術者協会との共同研究として実施しました。

### 海域における学術研究事例

環境DNA調査の研究例や実用事例は、河川や湖沼など淡水域で行われたものが大半でした。世界で最初に環境DNA調査が海域でも適用可能であることを示した研究は、デンマークのThomsen *et al.*(2012)によるものです。彼らは、漁港の内外で1地点あたり海水1.5Lを採水して計15種の魚類を検出することに成功し、環境DNA調査が海域でも行えることを示しました<sup>1)</sup>。

#### (1)海外の事例

海外での事例は、ここ2~3年で特に増加する傾向にあります。グリーンランド沖における中層深海性魚類の水産資源量を調査する手法として、従来のトロール漁法と環境DNA調査法が比較され、従来法で確認された魚種の約93%が環境DNAでも検出されました(図1)。また、両法による調査結果(漁獲重量とDNA配列数)に有意な正の相関が認められ、環境DNA調査が資源量推定法として使える可能性が示唆されました<sup>2)</sup>。

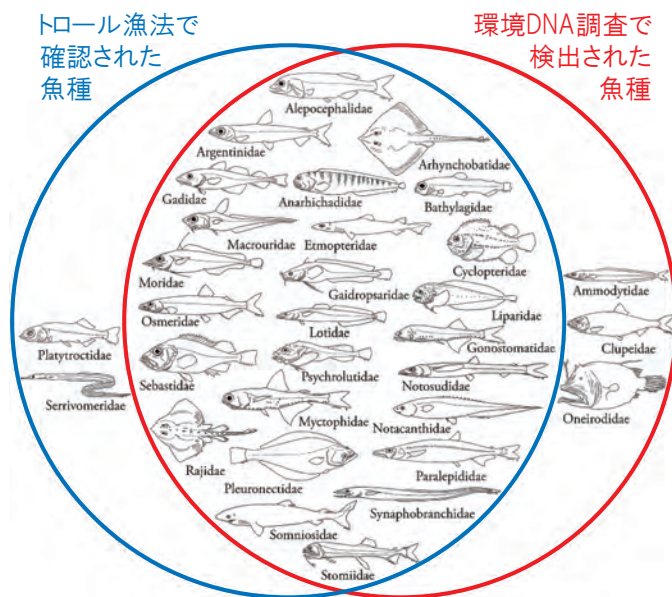


図1 トロール漁法と環境DNA調査で確認された魚種 (Thomsen *et al.*(2016)のFig.2を改変)

オーストラリア西部海域では、継続的な定点モニタリング調査を実施するなかで観測された「夏季の異常な高海水温」が発生した年の前後で、当該海域の生物多様性がどのように変化したのかが明らかにされました<sup>3)</sup>。この研究では、8つの遺伝子領域を対象とした環境DNA分析を組み合わせることにより、刺胞動物、軟体動物、甲殻類、魚類等のほか合計20門245科にわたる非常に広範囲の生物分類群が検出されています。また、同時に測定された化学的水質調査のデータと統合することで、環境DNA調査が急速に変化する気候状況の下で海洋の健康状態を監視するための強力なツールとなりうる可能性が示されました。

#### (2)日本の事例

日本国内では、舞鶴湾を対象海域とした実証的な研究が精力的に行われています。舞鶴湾内の一部に網の目状に47か所の調査地点を設定し、2014年の初夏に湾内の優占種となるマアジを対象とした調査が行われました。この調査では、環境DNA調査と計量魚群探知機を用いた調査を同じ地点で実施し、そこで得られた資源量を比較しました。この結果、環境DNA濃度と魚群サイズには有意な正の相関がみられたことから、環境DNA調査により海域におけるマアジの生物量を把握できることが明らかとなりました<sup>4)</sup>。また、魚類相を網羅的に調べることが可能なMiFish法により前述のサンプルを分析した結果、過去14年間にわたる潜水観察調査で確認されていた魚種の62.5%(40種)が、わずか1日6時間の環境DNA調査により検出されました<sup>5)</sup>。

環境DNA調査は、ニホンウナギの産卵場推定にも利用されています。これまでの研究で産卵場と考えられている西マリアナ海嶺周辺の海域9か所のそれぞれ12層の水深で採水を実施し、合計108検体について環境DNA分析を行ったところ、水深250mおよび400mで採水した3検体からニホンウナギのDNAが検出されました<sup>6)</sup>。

これらの事例のように、広大な海域では捕獲や観察による生物調査は膨大な労力とコストがかかりますが、環境DNA調査を行えば効率的な調査が可能となります。このように環境DNA分析技術を用いた調査手法は、海域調査においても活用効果が高いと考えられます。



## 有明海におけるナルトビエイを対象とした調査

### (1)背景

有明海はアサリやタイラギなど二枚貝類の好漁場として広く知られてきましたが、その漁獲量は、1980年代から急激に減少しています。その原因として、貧酸素水塊や底質の悪化などさまざまな環境要因が挙げられてきましたが、二枚貝類を好んで食べることで知られる魚類「ナルトビエイ」が2000年頃から有明海で増加し始めたこともその一因ではないかと考えられています<sup>7)</sup>(写真1)。



写真1 ナルトビエイ

有明海におけるナルトビエイは、毎年4月頃から個体数が増加し始め、夏季には湾内を回遊しながら摂餌や繁殖活動を行い、海水温が低下する11月以降には湾外へ移動することが知られています<sup>7)</sup>。本種は、水産庁から「漁業有害生物」に指定されており、漁業被害対策として年間数十～数百トン程度が駆除されています。その一方で、環境省版海洋生物レッドリスト(2017)においては、準絶滅危惧にランクされており、その評価については来遊量や行動生態等の生物学的な基本情報をさらに集めたいうえで、慎重に考慮する必要があります。そこで今回は、ナルトビエイの来遊量(生物量)を把握するための調査手法として、環境DNA分析技術が有効かを検討する調査を行いました(写真2)。



写真2 環境DNA分析サンプルの採水作業(有明海)

### (2)調査概要

有明海の干潟では、日最大約6mに及ぶ干満差が見られます。調査の実施にあたっては、この日本一大きな干満差が、環境DNA調査に影響するのではないかと懸念がありました。潮汐の影響の強い海域での調査事例は全く知られていないため、まずは最適な採水タイミングがいつなのかを検討する必要がありました。そこで、湾内の2か所に調査地点を設定し、採水位置を固定したうえで、1時間間隔の採水を12時間連続で実施することで、潮汐等の影響による環境DNAの検出レベルの変化を把握しました。

調査の結果、採水した時間によって検出レベルに大きな違いがあることがわかりました。これにより有明海におけるナルトビエイの環境DNA調査の採水タイミングは、下げ潮時が最適であると推察されます。今回の調査を行った8月は、ナルトビエイの繁殖期であり、日中は干潟等の浅場に集まっていたと考えられます。このことから、採水地点近くの浅場の海水が、潮汐の影響により沖方面に動いていた時間に採水することで、環境DNAを効果的に検出できることがわかりました。

### 今後の展開

近年、洋上風力発電や海底鉱物資源開発など海域での開発事業が注目を集めています。一方で、生物多様性の保全や持続可能な資源利用等の観点から、沖合域における海洋保護区の設定に向けた動きが加速しています。開発と環境保全の両立を目指すためには、海洋生物の生息状況の把握や開発に伴う影響評価調査を行う必要が生じますが、このような調査には簡便で効率的な調査が可能な環境DNA分析技術が有効と考えられます。今後、増加すると考えられる海洋生物のモニタリング調査に向けて、これからも技術開発を進めながら、皆様のニーズに合わせたご提案を行ってまいります。

#### 〔参考文献〕

- 1) Thomsen *et al.*(2012), Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples, PLOS ONE, 7(8): e41732.
- 2) Thomsen *et al.*(2016), Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes, PLOS ONE, 11(11): e0165252.
- 3) Berry *et al.*(2019), Marine environmental DNA biomonitoring reveals seasonal patterns in biodiversity and identifies ecosystem responses to anomalous climatic events, PLOS Genetics, 15(2): e1007943.
- 4) Yamamoto *et al.*(2016), Environmental DNA as a 'Snapshot' of Fish Distribution: A Case Study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan, PLOS ONE, 11(3): e0149786.
- 5) Yamamoto *et al.*(2017), Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea, Sci. Rep., 7: 40368.
- 6) Takeuchi *et al.*(2019), First use of oceanic environmental DNA to study the spawning ecology of the Japanese eel *Anguilla japonica*, Mar. Ecol. Prog. Ser., 609: 187-196.
- 7) 川原逸朗, 伊藤史郎, 山口敦子(2004), 有明海のタイラギ資源に及ぼすナルトビエイの影響, 佐賀県有明水産振興センター研究報告, (22): 29-33.

## Point

環境DNA調査のさらなる普及や新しい分野への応用展開に向けて進めてきた新たな取り組みについてご紹介します。現場における環境DNA分析に必要な、持ち運びが簡便な現場ろ過システムを開発しました。また、漁業対象種における餌資源の由来推定や資源量推定への応用可能性を検討しました。

## 環境DNA調査の普及に向けた新たな取り組み

国土環境研究所 生態解析部、環境創造研究所 遺伝子解析室

### はじめに

環境DNA調査は、現地で採水したサンプルを分析施設まで輸送し、施設内の実験室において採水した翌日もしくは翌々日にはサンプルのろ過を行うことが一般的な流れとなっています。しかし、車でのアクセスが不可能な山間部や離島、外洋(船上)等で行う調査の場合、採水したサンプルの輸送には何日もかかることが想定され、サンプル中の環境DNAが分解してしまう恐れがあります。また、希少種の探索など、環境DNAの検出結果をもとに採捕等の別の調査を進めたい場合には、採水する現場においてろ過や分析までを行う技術が必要となります。そこで、さまざまな状況に対応した環境DNA調査が行えるようにするため、現場へ持ち運びが可能なサンプルろ過システムを開発しました。

また、環境DNA分析技術は、環境調査の一環としての希少種や外来種の分布調査、生物相調査等に用いられることがほとんどでした。一方で、漁業対象種における餌資源の推定や、地域における漁業資源量の推定といった水産分野の調査ニーズも今後は大きく広がる可能性があります。そこで、当社では、水産重要種であるアサリの消化管内容物を分析することで、餌資源の由来推定への応用可能性を検討しました。さらに、近年生息数の減少が指摘されているニホンウナギ(以下、ウナギ)について、河川内の分布状況や資源量を環境DNAから推定するために、水槽実験を行い、必要な基礎データを収集しました。

### 現場ろ過システムの開発

#### (1)システム開発時の留意点

環境DNA分析は、採水時や分析時などすべての段階においてコンタミネーション(試料汚染)対策が非常に重要となります。そのため、現場ろ過システムは、サンプルに接触する部分はすべて滅菌済み、かつ、使い捨て可能な部品で構成しました。また、現場への持ち運びを簡便にするために、車載電源で稼働する機器を使用し、折り畳み可能な骨組みを用いてコンパクトに収納できるよう工夫しました(写真1)。



写真1 現場ろ過システムの積載例

#### (2)システムの特徴

調査用途別に、2つのタイプの現場ろ過システムを開発しました。1号機は、上部に設置した目の粗い紙で懸濁物質を除去した後、下部のカートリッジ式フィルターで環境DNAを捕集する構造となっており、水に強い濁りがあるような池や河川等での調査を対象としています(写真2左)。2号機は、大容量のサンプリング容器を接続できる構造となっており、大量の水をろ過する必要がある海洋での調査を対象としています(写真2右)。いずれのろ過システムも複数サンプルを同時にろ過できるようになっています。

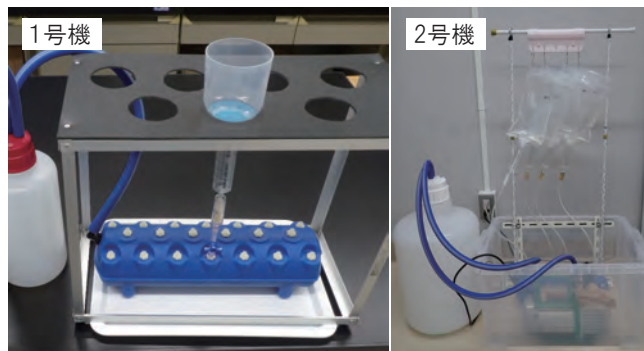


写真2 現場ろ過システム

開発した現場ろ過システムを使用して、山奥の小さな沢に生息する希少魚類トウカイナガレホトケドジョウの生息調査を実施し、第1回環境DNA学会において発表を行いました<sup>1)</sup>。

### 応用可能性の検討

#### (1)餌資源の由来推定\*

アサリは、海底の砂に潜り、直上の海水をろ過して懸濁物を餌料とする懸濁物食者です。そのため、アサリが生息するうえで、餌料となる生物が付着する底泥や砂礫、海藻等の存在は、重要な要因であると考えられます。しかし、アサリの生息にとって、いずれの環境が重要であるかはわかっていません。そこで、アサリの消化管に含まれる餌となった生物相と周辺環境(直上水および底質)の生物相を環境DNA分析により調査し、比較することで、アサリの採餌に重要な環境を検討しました。

分析の結果、アサリ消化管から検出された生物は、直上水よりも底質の生物組成に比較的近く(図1)、底質由来の



ものを餌として多く取り込んでいると考えられるため、アサリの生息にとって底質の環境が重要であることが明らかとなりました。このことから、次世代シーケンサーを用いた食性解析法と環境DNA分析技術を組み合わせることで、餌資源だけでなく、餌資源の供給源まで明らかにできる可能性があります。

※本件は中部大学との共同研究として実施しました。

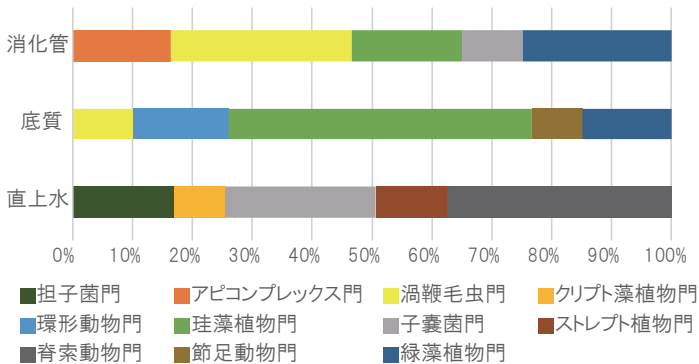


図1 アサリ消化管および周辺環境の生物相

## (2) 漁業対象種の資源量推定

採集した天然ウナギを実験水槽に投入し(表1、写真3)、1時間、1、2、3、7、10、14日後に1Lずつ採水し、フィルターでろ過して、次世代シーケンサー(Mi-seq)を用いてサンプル中のDNA濃度を定量的に分析しました。そして、そのDNA濃度(copies/L)と供試個体の体重(g)から、DNA放出の速度・量と、分解速度を推定しました。

表1 実験条件

項目	実験条件
水温設定	10℃、24℃
水槽容量	100L
水槽数	2セット
供試個体	3~4個体/水槽(全長27~56cm)
試験日数	放出試験、分解試験 各14日



写真3 実験水槽(左)と実験に用いたウナギ(右)

10℃(冬季条件)と24℃(夏季条件)を比べると、夏季の方がDNA放出速度、放出量ともに多いことがわかりました。

DNAの分解は指数関数的に進み、夏季では3日程度でほとんど分解されてしまうことがわかりました(図2)。また、DNAの放出実験では、ウナギを水槽に投入後、馴致するまでの2日程度はDNAが多く放出されましたが、7日程度経

過すると水槽内のDNA濃度が安定しました(図3)。この期間の放出量と分解量から、ウナギ1個体あたり、1時間あたりの放出量を算定できました。

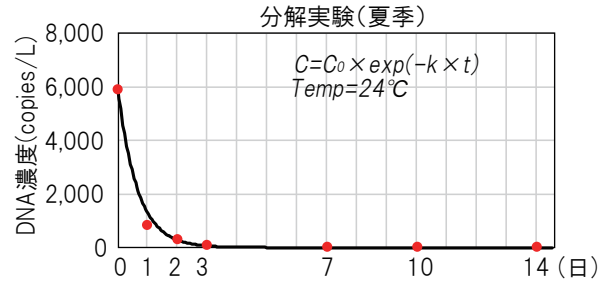


図2 ウナギから放出された環境DNA分解実験結果

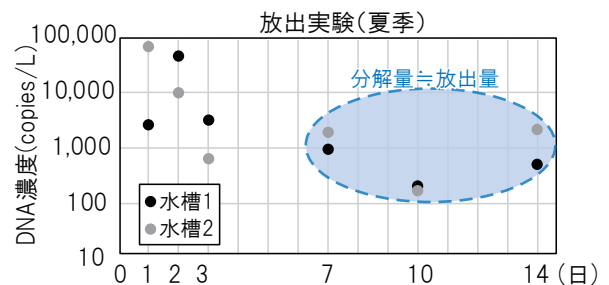


図3 ウナギから放出された環境DNA量

今回の実験では水槽ごとのばらつきも大きいため、追加実験を行うとともに、自然生息地と比較・検証を行い、資源量推定のモデルを構築することを目指します。

## おわりに

現場ろ過システムの開発により、サンプルの輸送に時間がかかることが問題となっていた山間部や離島、外洋といった場所の調査でも、環境DNA分析のためのサンプル処理が可能となりました。さらに、現場での処理が可能な簡易型DNA抽出キットと車載可能な分析機器とを組み合わせることで、調査現場において、環境DNA調査のすべての工程が行えるようになりました。

また、食性解析と環境DNA分析を組み合わせることで、餌資源の供給源が推定できる可能性が示唆されました。この技術は、希少種や水産有用種の保護増殖事業にも活用できると考えています。

ウナギの水槽実験からは、1個体が一定時間に放出するDNA量およびDNAの分解速度が把握できましたので、今後実験を重ねて精度を上げることで、河川水中の環境DNA濃度からその河川内に生息するウナギの資源量の推定も可能になると考えられます。この技術は、減少しているウナギの資源管理や河川内の重要な生息場の保全につながる河川管理に活用することが期待されます。

〔注〕

1) 白子智康, 中村匡聡, 相馬理央(2018), 環境DNA分析を用いた静岡県内におけるウカイナガレホトゲドジョウの生息調査, 第1回環境DNA学会東京大会



## CORPORATE DATA

### 社会基盤の形成と環境保全の総合コンサルタント

商号	いであ株式会社
創立	昭和28年5月
本社所在地	東京都世田谷区駒沢3-15-1
資本金	31億7,323万円
役員	代表取締役会長 田畑 日出男 代表取締役社長 田畑 彰久
従業員数	954名(2019年4月1日現在、嘱託・顧問を含む)

#### 事業内容

- 社会基盤整備に係る企画、調査、計画、設計、管理、評価
- 社会基盤整備に係る環境アセスメント(調査計画立案、現地調査、予測評価、対策検討、事後調査)、環境計画
- 環境リスクの評価・管理
- 食品衛生・生命科学関連検査
- 自然環境の調査・解析、生物生息環境の保全・再生・創造
- 情報システムの構築、情報発信
- 災害危機管理、災害復旧計画
- 海外事業

## 「お部屋の健康診断」 してみませんか?

ホコリや汚れの中に存在するダニ・花粉などのDNA量を測定して、お部屋の衛生状態を評価します。

お客様の状況に合わせた診断プランを用意しております。詳しくは下記のウェブサイトをご覧ください。

### お申し込みは、Webショップから

<https://lifecare.ideacon.co.jp/>



## 「お部屋の健康診断」 という 新習慣。



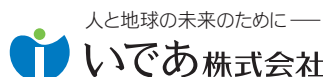
DNA測定による室内リスク評価

本 土 環 境 環 境 創 造 研 究 所	社 研 究 所	〒154-8585	東京都世田谷区駒沢 3-15-1	電話:03-4544-7600
環 境 創 造 研 究 所	社 研 究 所	〒224-0025	神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-2	電話:045-593-7600
食 品 ・ 生 命 科 学 研 究 所	社 研 究 所	〒421-0212	静岡県焼津市利右衛門 1334-5	電話:054-622-9551
亜 熱 帯 環 境 研 究 所	社 研 究 所	〒559-8519	大阪府大阪市住之江区南港北 1-24-22	電話:06-7659-2803
大 阪 支 社	支 社	〒905-1631	沖縄県名護市宇屋我 252	電話:0980-52-8588
沖 縄 支 社	支 社	〒559-8519	大阪府大阪市住之江区南港北 1-24-22	電話:06-4703-2800
札 幌 支 店	支 店	〒900-0003	沖縄県那覇市安謝 2-6-19	電話:098-868-8884
東 北 支 店	支 店	〒060-0062	北海道札幌市中央区南二条西 9-1-2	電話:011-272-2882
福 島 支 店	支 店	〒980-0012	宮城県仙台市青葉区錦町 1-1-11	電話:022-263-6744
北 名 支 店	支 店	〒960-8011	福島県福島市宮下町 17-18	電話:024-531-2911
古 屋 支 店	支 店	〒950-0087	新潟県新潟市中央区東大通 2-5-1	電話:025-241-0283
中 国 支 店	支 店	〒455-0032	愛知県名古屋市中区入船 1-7-15	電話:052-654-2551
四 国 支 店	支 店	〒730-0841	広島県広島市中区舟入町 6-5	電話:082-207-0141
九 州 支 店	支 店	〒780-0053	高知県高知市駅前町 2-16	電話:088-820-7701
シ ス テ ム 開 発 セ ン タ ー	支 店	〒812-0055	福岡県福岡市東区東浜 1-5-12	電話:092-641-7878
I D E A R & D C e n t e r	支 店	〒370-0841	群馬県高崎市栄町 16-11	電話:027-327-5431
富 士 研 修 所	支 店	Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand	山梨県南都留郡山中湖村山中茶屋の段 248-1 山中湖畔西区 3-1	
海 外 事 務 所	支 店	〒401-0501	山陰 青森、盛岡、秋田、山形、いわき、茨城、群馬、北関東、千葉、神奈川、相模原、富山、金沢、福井、山梨、伊那、長野、岐阜、恵那、磐江、静岡、伊豆、 菊川、豊川、三重、名張、滋賀、神戸、奈良、和歌山、鳥取、岡山、下関、山口、徳島、高松、高知、北九州、佐賀、長崎、熊本、宮崎、鹿児島、沖縄北部	
連 結 子 会 社	支 店		ポゴール(インドネシア)、マニラ(フィリピン)、ロンドン(英国) 新日本環境調査株式会社、沖縄環境調査株式会社、東と環境科学株式会社、以天安(北京)科技有限公司	



SEPTEMBER 2019 Vol.53 (2019年9月発行)

編集・発行: いであ株式会社 経営企画本部企画部  
〒154-8585 東京都世田谷区駒沢3-15-1  
TEL. 03-4544-7603, FAX. 03-4544-7711  
ホームページ: <https://ideacon.jp/>



お問い合わせ先  
E-mail: [idea-quay@ideacon.jp](mailto:idea-quay@ideacon.jp)



古紙配合率100%再生紙を使用しています