

報告(Note)

令和 6 年度市民参加型環境 DNA 調査結果報告

長谷部 勇太

(調査研究部)

Report on the results of the 2024 citizen participatory environmental DNA survey

Yuta HASEBE

(Research Division)

キーワード： 環境 DNA, 脊椎動物, 無脊椎動物, 市民科学, 生物多様性

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懸念されており, 「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された¹⁾。

本県においても, 2024年3月に「かながわ生物多様性計画」を「かながわ生物多様性計画 2024-2030」として改訂し²⁾, 前計画から引き続き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を継続するとともに, 自然共生サイト^{*}といった新たな補完的な仕組みも取り入れながら, 県内の生物多様性保全を推進している。

ただし, 河川等の水圏における生物モニタリングについては, 既報³⁾でも言及したとおり調査の難しさや人手の不足といった様々な制限要因から, 県内の河川での生物相の把握は十分とは言えない状況にある。

このような状況の中, 近年では生物の調査に新たな手法が提案されている。それが環境中を漂う細胞片等に由来するDNA, いわゆる「環境DNA」を用いた生物調査である。河川や湖沼等に生息する生物からは糞や粘液等に由来すると考えられるDNAが環境中に放出されていることが明らかとなっている⁴⁾。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

*: 「民間の取組等によって生物多様性の保全が図られている区域」であって国が認定した区域

存在を把握する手法であり, 特定の生物⁵⁻⁸⁾や魚類を始めとした様々な生物群集⁹⁻¹⁴⁾を調査可能な非常に強力な生物調査ツールとなりつつある。また, 従来の捕獲による調査に比べても, 現場での作業時間やコストの軽減, 生息環境の搅乱の防止, 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¹⁵⁾。

環境DNA調査は上記のメリットにも挙げられている現場調査の簡便さと調査精度の高さから市民参加による調査ツールとしても注目されている¹⁶⁾。

令和5年度の調査ではMifishプライマーを用いた魚類調査を実施したが¹⁷⁾, 調査後のアンケート結果からは参加者は魚類だけでなく, 両生類や水生昆虫類といった様々な生物に対する興味を持っていることが示された。そこで本県では環境DNA調査に関する技術開発を行い, 幅広い生物群を対象にした調査手法を開発し, 令和6年度はその手法を活用して, 脊椎動物及び昆虫類を中心とした無脊椎動物を対象とした県民参加による神奈川県の全県河川の環境DNA調査を実施した。

なお, 本調査は共創の場形成支援プログラム「ネイチャーポジティブ成長社会実現拠点」との共同の取組として実施しており, 当センターも上記プログラムに参画している。

2 方法

2. 1 調査地点と調査時期

調査にあたっては令和5年度の調査¹⁷⁾と同様に県内の高校と水源環境保全事業に基づく河川モニタリング調査¹⁸⁾において県民調査員登録をしている個人及び団体に募集を行い, 調査を実施し

た。調査実施前にはオンラインでの説明会を開催してマニュアルの説明を行った。調査場所については参加者が神奈川県内の全河川の任意の地点を設定することとし、県内 11 河川 51 地点で調査が実施された(図 1, 表 1 のとおり)。調査日は 2024 年 7 月 27 日を基準日としておおむね前後 1 週間以内で大きな降雨などがない時に実施した。

2. 2 採水・ろ過

現地での採水作業とろ過作業については、原則として令和5年度調査¹⁷⁾と同様としたが、ろ過後のステリベクスフィルターにはWu & Minamoto¹⁹⁾に従い、Buffer ATL(QIAGEN Inc.)を1mL充填した。

2. 3 DNA 抽出

DNA の抽出は、Wu & Minamoto¹⁹⁾に準拠し、一部の工程は変更して実施した。

具体的には冷凍していたステリベクスフィルターを解凍し、注入口側から 1 mL の溶解バッファミックス (PBS 495 μ L, Buffer AL 455 μ L, Proteinase K 50 μ L)を注入し、ステリベクスの回転は行わず 56°C 30 分インキュベートした。

インキュベート後、ステリベクスの注入口側を Eppendorf Tubes® 5.0 mL に差し込み、遠心分離機 (KUBOTA Model 4200, ST-2504MS) により 4,300 × g で 1 分間遠心することでチューブに溶解バッフ

アミックスを回収した。

回収した溶解バッファミックスは KingFisher Duo Prime Purification System(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて精製した。具体的には KingFisher Plastics for 24 deep-well を用いて、溶解バッファミックスには MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Binding Beads 200 μ L 及び MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Lysis/Binding Solution 2mL を用い、MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Wash I Solution 5mL 及び 85% に希釀したエタノール(Molecular Biology grade ethanol (99.5%), Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) 5mL で順に洗浄し、MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Elution Solution 300 μ L で溶出し、DNA 抽出液を得た。

また、DNA 抽出時に新品のステリベクスフィルターに Buffer ATL 1mL を注入したものを用意し、上記と同様の DNA 抽出作業を行うことで、この後の分析のネガティブコントロールとした。

DNA 抽出液は次の工程に使用するまで-20°C以下で保存した。

2. 4 ライブラリー調整

得られた DNA 抽出液に対してミトコンドリア DNA の 16SrRNA 領域を対象にした MtInsects-16S プライマー²⁰⁾及び Amphi16S¹⁴⁾ プライマーを用い

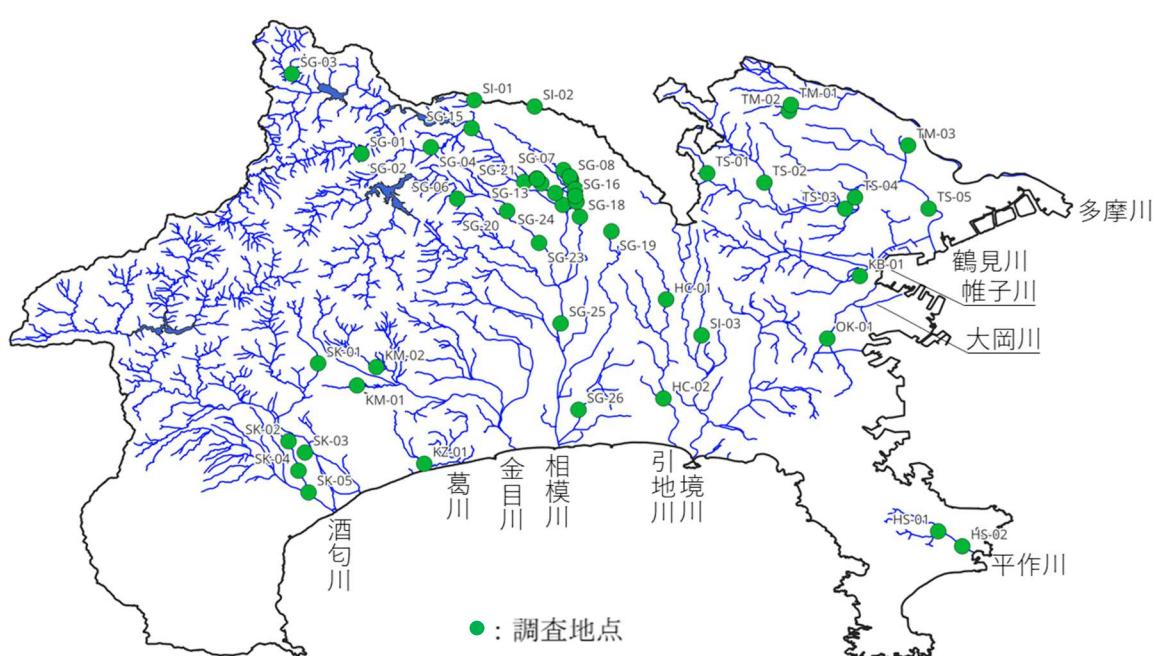


図 1 調査地点一覧

て無脊椎動物及び脊椎動物を対象とした網羅解析用のライプラリー調整を行った。

ライプラリー調整は環境 DNA 学会の分析マニュアルを参考に 2 段階の Tailed PCR で実施した²¹⁾。1stPCR でプライマーによるターゲットアンブリコンの増幅と 2ndPCR 用のアダプター領域の付与を行い、2ndPCR で個別のサンプルを識別するための 8 塩基からなる固有のインデックス配列と次世代シーケンサーのフローセルに結合するための配列の付与を行った。1stPCR に使用した 2 つのプライマーはそれぞれについて、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 0~4 個挿入した 5 種類を用意し、等モル混合したものを用いた。

ライプラリー調整の具体的な手順は以下の通り。1stPCR は、MtInsects-16S プライマー及びAmphi16S プライマーそれぞれについて 10 μ M プライマーミックス 0.45 μ L、DNA 抽出液 2 μ L 及び 7.5 μ L の KOD One PCR Master Mix(TOYOB0, Osaka, Japan)で構成される最終容量 15 μ L で 4 つの複製で実行した。また PCR 工程におけるコンタミの確認のため、DNA テンプレートの代わりに超純水を用いた PCR ブランクを作成し、同様に PCR 増幅を行った。この PCR ブランクについてもネガティブコントロールとして扱った。PCR 増幅は、SimpliAmp サーマルサイクラー(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用して、サンプル間のコンタミネーション防止のため個別に蓋の可能な 8 連チューブを使い、98°C10 秒、55°C5 秒、68°C5 秒の 35 サイクルで実施した。両プライマーで反応させた合計 8 つの複製から等量に分取・混合し、そこから 40 μ L を分取したもの SPRI セレクトにより 0.6 \times -0.8 \times の Right side size selection を行い、精製と非対象の増幅の除去を行った。精製したサンプルは、4150 TapeStation system(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)で対象領域の DNA 濃度を確認し、それぞれ 100 pg/ μ L となるように希釈し、2ndPCR に用いた。ネガティブコントロールについては各サンプルの平均希釈率で希釈を行った。1stPCR を実施した際に対象領域の増幅が確認できないサンプルがあつたため、それらについては PCR 阻害に強いとされる AccuStart II PCR ToughMix (Quantabio, Beverly, MA, USA)を用いて再度 PCR を実施した。反応液

表 1 調査地点一覧

調査ID	水系	河川・水路名	水系調査地点数
TM-01	多摩川	平瀬川	3
TM-02	多摩川	平瀬川	
TM-03	多摩川	ニヶ領用水	
TS-01	鶴見川	奈良川	5
TS-02	鶴見川	鶴見川	
TS-03	鶴見川	鶴見川	
TS-04	鶴見川	早淵川	
TS-05	鶴見川	鶴見川	
KB-01	帷子川	石崎川	1
OK-01	大岡川	大岡川	1
HS-01	平作川	矢部川	2
HS-02	平作川	平作川	
SI-01	境川	境川	3
SI-02	境川	境川	
SI-03	境川	和泉川	
HC-01	引地川	引地川	2
HC-02	引地川	引地川	
SG-01	相模川	道志川	26
SG-02	相模川	道志川	
SG-03	相模川	沢井川	
SG-04	相模川	串川	
SG-05	相模川	道保川湧水	
SG-06	相模川	中津川	
SG-07	相模川	道保川	
SG-08	相模川	宮川	
SG-09	相模川	道保川	
SG-10	相模川	道保川湧水	
SG-11	相模川	道保川	
SG-12	相模川	八瀬川	
SG-13	相模川	八瀬川	
SG-14	相模川	八瀬川	
SG-15	相模川	串川	
SG-16	相模川	道保川湧水	
SG-17	相模川	道保川湧水	
SG-18	相模川	鳩川湧水	
SG-19	相模川	目久尻川	
SG-20	相模川	中津川	
SG-21	相模川	望地用水	
SG-22	相模川	八瀬川	
SG-23	相模川	中津川	
SG-24	相模川	相模川	
SG-25	相模川	相模川	
SG-26	相模川	小出川	
KM-01	金目川	室川	2
KM-02	金目川	葛葉川	
KZ-01	葛川	葛川	1
SK-01	酒匂川	四十八瀬川	5
SK-02	酒匂川	酒匂川	
SK-03	酒匂川	鬼柳水路	
SK-04	酒匂川	酒匂川	
SK-05	酒匂川	狩川	

組成は KOD One と同様とし, 反応条件は初期変性 94°C3 分の後, 94°C20 秒, 55°C20 秒, 68°C1 分の 35 サイクルとした。

2ndPCR は 5 μ M の 2ndPCR 用プライマー 1.8 μ L, 精製希釀済み 1stPCR 産物 2 μ L 及び 15 μ L の KOD One PCR Master Mix で構成される最終容量 30 μ L で実行した。PCR による増幅はサーマルサイクラーを使用して, サンプル間のコンタミネーション防止のため個別に蓋の可能な 8 連チューブを使い, 98°C10 秒, 60°C5 秒, 68°C5 秒の 10 サイクルで実施した。この際フォワードプライマーとリバースプライマーに使用したインデックス配列についてはインデックスホッピングの影響を除外するため, ユニークデュアルインデックスとした²²⁾。各サンプル 2ndPCR 産物から 10 μ L ずつ等量で分取・混合し, そこから 40 μ L を分取したもの SPRI セレクトにより 0.6 \times -0.8 \times の Right side size selection を行い, 精製と非対象の増幅の除去を行った。

精製したライブラリーの濃度を QubitTM 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で, 塩基長を 4150 TapeStation system で測定し, PhiX Control v3 を 20% 混合し, MiSeq(Illumina, CA, USA) で 250bp のペアエンドシーケンスを行った。

すべての配列データは, 日本 DNA データバンク (DDBJ) の Sequence Read Archive (DRA, アクセッション番号: PRJDB39732) に登録した。

2. 5 データ処理

Miseq から出力された生のシーケンスリードは, bcl2fastq v2.20 (Illumina, CA, USA) を用いて各サンプルに分割された。250bp \times 2 のペアエンドリードは, USEARCH v11.0.667^{23,24)} を用いて結合した。Phred Quality Score が 2 の塩基以降の配列と, アライメント領域にミスマッチが多すぎるペアリード (> 5 bp または同一性 90% 未満) は, デフォルト設定で破棄した。次に, cutPrimers.py v2.0²⁵⁾ を用いてデフォルト設定で両プライマーの配列を除去し, USEARCH の "fastq_filter" コマンドを用いて塩基の長さが 180bp 未満のリードを除去し, 残ったリードについて, 全塩基での予測エラー率 (MAXEE) の合計の閾値を <1.0 として, 各リードの品質フィルタリングを行った。その後, Usearch の "fastx_uniques" コマンドを用いて各固有の塩基配列についてリード数を算出した。その後, Usearch の "unoise3" コマンドを用いて PCR エラーとキメ

ラリードを α 値を 2 のデフォルト設定でチェックし, エラー補正を行った。また, 最小リード数については 3 以下の配列を削除した。その結果, ZOTU (zero-radius operational taxonomic units) と呼ばれる生物学的配列セットが得られた。最後に, USEARCH を使用して, 各サンプルのクオリティフィルターされたリードを, 生成された ZOTUs データセットに 97% 以上の類似度でマッピングし, 保持されるリード数を最大化した。

2. 6 リファレンス DNA データベースの作成

種の判断に用いるリファレンス DNA データベースについては汎用性も考慮し, 真核生物全体を対象としたミトコンドリア DNA の 16SrRNA 領域を対象としたものを以下の手順で作成した。

2025 年 4 月 1 日に GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から 「(("Eukaryota"[Organism] AND RNA[All Fields]) OR 16S[All Fields]) NOT "Homo sapiens"[Organism] AND (animals[filter] AND biomol_genomic[PROP] AND mitochondrial[filter]))」 をキーワードにして DNA 配列をダウンロードした。

同様に 2025 年 4 月 1 日に 「("Eukaryota"[Organism] AND 16S[All Fields]) NOT "Homo sapiens"[Organism] AND (animals[filter] AND biomol_genomic[PROP]) AND (ani-mals[filter] AND biomol_genomic[PROP]))」 をキーワードにして DNA 配列をダウンロードした。

最後に機能的なアノテーションのないミトコンドリア全長配列登録が存在することを考慮し, 2025 年 6 月 21 日 「((((("Eukaryota"[Organism] OR eukaryota[All Fields]) AND (animals[filter] AND biomol_genomic[PROP] AND mitochondrial[filter]) AND ("10000"[SLEN] : "20000"[SLEN]))) NOT 16S NOT rRNA) NOT Homo sapi-ence[Organism])」 をキーワードにして DNA 配列をダウンロードした。上記の各配列について重複を削除し, TAXID から系統情報を整理した

ダウンロードした配列の中には使用するプライマーが対象とする領域の塩基配列が含まれていない可能性があることから USEARCH の "search_pcr" コマンドを用いて許容最大ミスマッチを 4 塩基として次のプライマー配列の有無を確認した。昆虫綱については MtInsects-16S プライマー, 脊索動物門については Amphi16S プライマー及び V16S-U プライマー²⁶⁾ のいずれかのプライマ

一配列を有するデータのみ有効とした。

最後に、県で整備した DNA データベース (<https://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/su-igen/edna.html>) の ver1.4.1 から、DDBJ への登録がまだ済んでいない配列を追加し、合計で 522,386 配列の DNA データベース(以下「River16S_v2.1」という。)を作成した。また、解析の中で DNA データベース中に誤同定が疑われる配列が混入していたため、これらは手動で削除した。削除した配列の多くはヒトの DNA であった。

River16S_v2.1 については削除したデータも含めてエクセル形式で整理されており、必要に応じて提供可能である。また、作成手順と共に Github(<https://github.com/Hasebe-KERC/DNADatabase>)からもダウンロード可能である。

2. 7 種及び系統情報の割り当て

得られた DNA 配列の種及び系統情報の割り当てには BLAST ソフトウェア 2.13.0+²⁷⁾ 及び River16S_v2.1 を用いた。

分類学的割り当ての判断基準については以下のとおりとした。

綱の分類は Takenaka et al.¹³⁾ に従い実施し、種の割り当ては昆虫綱のみを対象に各 ZOTU の DNA 配列全体に対して 98.5% 以上で最も高い一致率となった種を有効データとした。この際、DNA データベースの不足により海外に生息すると想定される種が検出された場合や属留めとなった場合についても国内生息種の DNA を検出している可能性が高いと判断し、いずれも有効データとした。

2. 8 レッドリスト掲載種等の確認

割り当てられた種について文化財保護法(昭和 25 年法律第 214 号)により指定された天然記念物、絶滅の恐れのある野生動植物の種の保存に関する法律(平成 4 年法律第 75 号)により指定された国内希少野生動植物種、環境省レッドリスト 2020 掲載種及び神奈川県レッドデータブック 2006Web 版の掲載種に該当するか照合し、これらを総称して「重要種」とした。

2. 9 特定外来生物の確認

割り当てられた種について特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(平成 16 年法律第 78 号)の特定外来生物に該当するか照

合した。

2. 10 調査地点ごとの生物群集解析

得られた調査地点ごとの生物リストを用いて、群集解析を実施した。各地点の生物群集について Jaccard 指数による非類似度を R ソフトウェアの Vegan パッケージ v2.7-1²⁸⁾ により計算し、Cluster パッケージ v 2.1.8.1²⁹⁾ の k-medoid 法により複数のグループにクラスタリングを行った。クラスタリングのグループ数については pam 関数により計算した平均シルエット値が最大となるグループ数を採用した。

次に分類されたグループについて nMDS(非計量多次元尺度法)により可視化し、betadisper によるグループ間の等分散性の確認と permanova による群集間の比較を行った。

その後、それぞれのグループの指標種を特定するため、labdsv パッケージ v2.1-0³⁰⁾ を用いて IndVal 法³¹⁾ による指標種分析を実施した。指標種の判断は IndVal スコア > 0.7 かつ $p < 0.05$ とした。

また、分類されたグループ間で検出された種数に差があるのかについての解析も実施した。対象とした生物群は、河川の主要な生物群である条鰈綱(Actinopterygii、いわゆる魚類)、昆虫綱(Insecta)とし、昆虫綱のうちカゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目(以下「EPT」という。)は水質との関連が深い水生昆虫であることから別途種数の差を解析した。

上記の解析には R ver.4.5.1³²⁾ を使用した。

3 結果

Miseq から出力された生のシーケンスリードはネガティブコントロールを除き 45,452-260,114 リード／サンプルとなった。データ処理を行った結果、得られた ZOTU 数は 76-900 個／サンプルであり、種数とリード数はそれぞれ 28-267 種／サンプル、27,691-226,238 リード／サンプルとなった。全地点合計で 937 種(属あるいは系統含む。以降同じ)の生物の環境 DNA を検出した。各地点の詳細な結果は Supplemental information を参照。

2 つのネガティブコントロールからは全部で 3 つの ZOTUs が検出された。これらはいずれもウシ科の DNA であり、これらは PCR 試薬である KOD One の中に意図せず含まれていたことがメーカーから示されていたため、各サンプルからこ

表2 調査地点のクラスタリング結果

調査ID	水系	河川・水路名	標高	水質 類型	グループ		
					1	2	3
SG-01	相模川	道志川	258.7	A			
SG-02	相模川	道志川	258.7	A			
SG-03	相模川	沢井川	192.6	A			
SK-01	酒匂川	四十八瀬川	176.1	A			
SI-01	境川	境川	161.7	D			
SG-04	相模川	串川	160.2	A			
KM-01	金目川	室川	129.2	A			
SI-02	境川	境川	126	D			
KM-02	金目川	葛葉川	114.7	A			
SG-05	相模川	道保川湧水	94	A			
SG-06	相模川	中津川	86	A			
SG-07	相模川	道保川	83.2	A			
SG-08	相模川	宮川	79.9	A			
SG-09	相模川	道保川	74	A			
SG-10	相模川	道保川湧水	73.8	A			
SG-11	相模川	道保川	73.8	A			
SG-12	相模川	八瀬川	71.3	A			
SG-13	相模川	八瀬川	71.1	A			
SG-14	相模川	八瀬川	70.2	A			
SG-15	相模川	串川	70	A			
SG-16	相模川	道保川湧水	65	A			
SG-17	相模川	道保川湧水	62.7	A			
SG-18	相模川	鳩川湧水	59	A			
SG-19	相模川	目久尻川	57.9	B			
SG-20	相模川	中津川	55	A			
SG-21	相模川	望地用水	48.7	A			
SG-22	相模川	八瀬川	46.3	A			
TM-01	多摩川	平瀬川	41.8	B			
TM-02	多摩川	平瀬川	39	B			
SG-23	相模川	中津川	35.8	A			
SG-24	相模川	相模川	35	A			
HC-01	引地川	引地川	34.6	C			
SK-02	酒匂川	酒匂川	31	A			
SI-03	境川	和泉川	26.9	C			
TS-01	鶴見川	奈良川	26.1	D			
SK-03	酒匂川	鬼柳水路	24.7	-			
SK-04	酒匂川	酒匂川横水路	17.8	-			
KZ-01	葛川	葛川	17	C			
TS-02	鶴見川	鶴見川	15	D			
SK-05	酒匂川	狩川	11	A			
TS-03	鶴見川	鶴見川	10.9	D			
SG-25	相模川	相模川	10	A			
OK-01	大岡川	大岡川	8	B			
HS-01	平作川	矢部川	8	B			
TM-03	多摩川	ニヶ領用水	7.1	B			
HC-02	引地川	引地川	7	C			
TS-04	鶴見川	早瀬川	6	C			
HS-02	平作川	平作川	5	B			
TS-05	鶴見川	鶴見川	4	C			
SG-26	相模川	小出川	4	B			
KB-01	帷子川	石崎川	2.2	B			

指標種

- フタバコカゲロウ
Jコカゲロウ
クシゲマダラカゲロウ
アカマダラカゲロウ
ミドリタニガワカゲロウ
マツムラヒラタカゲロウ
Antocha dilatata
キアシツメトゲブユ
ゴスジシラキブユ
ウグイ

これらの ZOTUs は一律で削除した。

3. 1 重要種の出現状況

本調査では合計で 57 種の重要種が確認された。天然記念物については特別天然記念物であるニホンカモシカ 1 種、環境省レッドリスト掲載種はニホンウナギをはじめとして 10 種、神奈川県レッドデータブック掲載種はホトケドジョウをはじめとして 51 種検出された。国内希少野生動植物種は検出されなかった。

3. 2 特定外来生物の出現状況

本調査ではコクチバスをはじめとして 9 種の特定外来生物(条件付き特定外来生物を含む)の環境 DNA が検出された。また、特定外来生物の疑いがある結果としてチュウゴクモクズガニあるいはモクズガニのいずれかとされる環境 DNA が検出された。

このモクズガニは、2024 年 8 月に登録された沖縄で採取された個体であり、アクセッション No. LC829463 であった。このデータの基となった永井らの報告³³⁾でもチュウゴクモクズガニとモクズガニだけでなく、16SrRNA 領域を対象とした Mideca プライマーではモクズガニ類全体を区別できないことを報告しており、MtInsects-16S プライマーは長さが異なるものの、同様の領域を対象としていることから今回のこのような結果となったと考えられた。

3. 3 調査地点ごとの生物群集解析

pam 関数により計算した結果は 3 つのグループで最も高いシルエット値を示した。そのためグループ数 3 でクラスタリングを実施し、nMDS を実施した。nMDS の結果は k-medoid 法により分けられたグループにより色分けを行い、図 2 の通りであった。betadisper の結果から等分散性が確認されたため permanova を実施したところ、3 つのグループ間では有意な群集の違いが確認された。

各調査地点のグループ分けと各グループの指標種分析の結果及び標高、一般項目 (pH, BOD, SS, DO, 大腸菌数) に係る水域類型を表 2 のとおりまとめた。ここではすべての調査地点を標高順に並べている。なお、グループ 1 については有効な指標種は選定されなかった。

グループ間の種数の違いについてはグループ数が 3 つであったことから Kruskal-Wallis 検定を

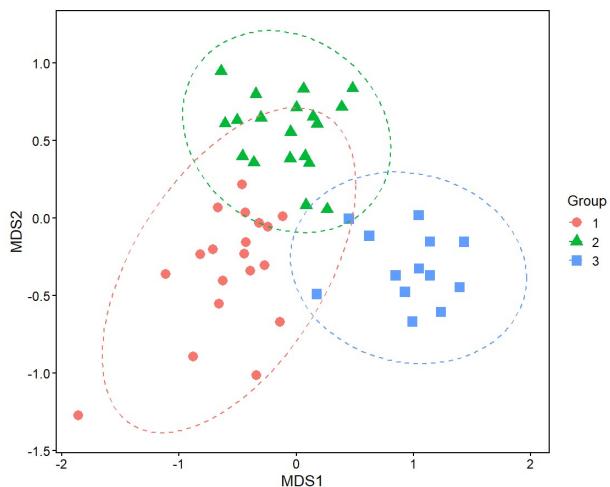


図 2 グループ別 nMDS 結果

実施したのち、各グループ間の違いについては Dunn 検定(Benjamini-Hochberg 補正)を実施した(図 3)。その結果、条鰓綱種数についてはグループ 3 のみが有意に低く、昆虫綱種数と EPT 種数はいずれもグループ 2 のみが有意に高かった。

4 考察

令和 5 年度の調査時は、対象生物群が魚類であったが、今年度は大きく対象分類群を拡大したことにより、検出される種は格段に多くなり、各調査地点の生物群集に関する解像度を大きく上昇させることに成功した。重要種に関しても全部で 57 種検出しており、これらは河川の生態系保全にとって重要な情報となるため、関係する市町村と共有するなどの活用を行う予定としている。

特定外来生物については特定外来生物と特定された 9 種についてはいきものログ (<https://ikilog.biodic.go.jp/>) でも神奈川県内に記録がある。今回結果の評価が困難なものとしては沖縄に生息するモクズガニあるいはチュウゴクモクズガニとされる環境 DNA が検出された点である。なお、当センターでは神奈川県内で採取したモクズガニについて 16SrRNA 領域の DNA 配列の登録を実施しており、そのアクセッション No. LC801969 である。今回得られた配列は登録された神奈川県で採取されたモクズガニの配列とは異なるものであったことは確認している。現状ではどちらの種か判断できないものの特定外来生物の可能性も排除せず、今後の対応を検討する必要がある。具体的には、リアルタイム PCR などを用いた種特異的な分析手法や現地での捕獲調査

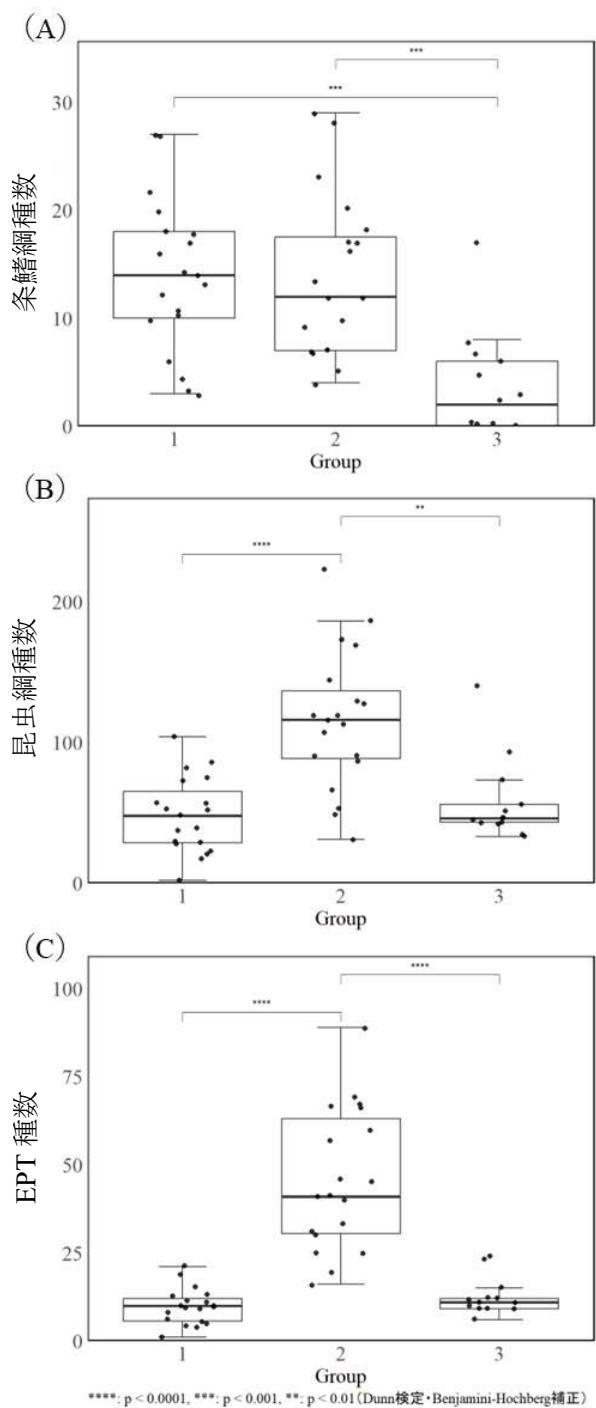


図3 各分類群の種数比較

等を併用することを検討中である。

生物群集解析については調査地点が3グループに分けられたが、この結果については、指標種や標高等の特徴からそれぞれ次のような特徴を持ったグループであることが考えられた。

グループ1は標高が低い地点が多く、条鰐綱種数はグループ2と変わらないものの、昆虫綱種数やEPT種数がグループ2より少ないという特徴がある。これらの特徴は単に河川下流域であると

いうだけでなく、水質類型でもA類型に該当する河川がないことからも水質などがグループ2に比べて汚れていることを示している可能性が示唆された。

グループ2は標高の高い地点が含まれているものの下流域まで幅広い地点が属している。条鰐綱種数はグループ3よりも多く、昆虫綱種数やEPT種数はグループ1, 3よりも多い点から全体的に種の多様度が高い傾向がみられるグループであるといえる。グループ1と比べても条鰐綱種数に違いがみられないことから、少なくとも堰などの遡上阻害の影響は小さいと考えられた。本グループに属するのは水質類型ではA類型に属するものがほとんどであり、D類型に属する境川についても調査地点は上流域であり、周囲が森に囲まれていることから人為的な汚染源が少ないことがうかがえた。指標種についてもカゲロウの仲間が幅広く選定され、清流を好むブユの仲間についても選定されている点からも水質の良い河川であることが示されている。これらのことからグループ2については堰などの影響も少なく、水質が良い地点が多いグループであるといえる。

グループ3は湧水での調査地点が多く、条鰐綱種数が少ない点からも湧水あるいは湧水から近い小規模な河川・水路環境であることが想定される。指標種となっているヤマトフタツメカワゲラについても「日本産水生昆虫 第二版: 科・属・種への検索」によると緩流部に生息するとされており今回の結果から想定される河川環境とも矛盾しない結果となっている。

今回の調査では大規模な河川の下流から上流の湧水環境まで幅広く調査が実施されたため、群集のクラスタリングにおいても、それらの環境を反映した結果が得られた。また、nMDSの結果からも3つのグループの群集が明確に分かれていることが確認された。今後は3つのグループを別々に解析することで、グループ内の河川・水路の特徴を明らかにできるのではないかと期待される。

また、今回の調査ではRNALATERを用いず、保存液としてBuffer ATLを用いたDNA抽出方法を採用したが、令和5年度に比べてPCRの阻害が発生するサンプルが多い傾向が確認された。定量的なデータはないものの、RNALATERの封入と除去の工程には一定程度フィルターに付着したPCR阻害物質の除去効果があるのではないかと

考えられた。ただし、同時にフィルターに付着したDNAも一定程度除去されることも考えられるので、感度と阻害のバランスを考慮しつつ、最適な手法を選択する必要がある。

5 おわりに

生物群集の変化は長期的な継続調査によって観測されることも多く、モニタリングサイト1000(<https://www.biodic.go.jp/moni1000/>)などは、そのような考えに基づいて継続的な生物データの取得を実施している。環境DNA調査も同様に長期的な継続調査を実施することで生態系の変化を把握することは重要と考えられる。

さらに生物多様性は地域性が高い問題であり、地域住民やその地域に関係のある人たちと共に考えていくことが望ましい。その際、生物相を簡単に調査することが可能な技術である環境DNA調査を活用し、誰でも参加可能な生物調査を継続することは非常に重要な取り組みであり、今後も継続するべきと考えられる。

謝辞

本報告の基となった令和6年度河川環境DNA調査プロジェクトの調査にご参加いただきました皆様にこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- 1) IPBES (2019): 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. Diaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1148 pages
- 2) 神奈川県:「かながわ生物多様性計画2024-2030」のページ
<https://www.pref.kanagawa.jp/docs/t4i/cnt/f12655/p1042709.html> (2025.9参照)
- 3) 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:環境DNAを用いた県内生物多様性調査手法の確立, 神奈川県環境科学センター研究報告, 第45号, 1-10 (2022)
- 4) Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P.:Species detection using environmental DNA from water samples, Biol. Lett. 4, 423–425 (2008)
- 5) 長谷部 勇太, 白子 智康:指標種に着目した環境DNAの基礎研究, 神奈川県環境科学センター研究報告, 第43号, 28-36 (2020)
- 6) 長谷部 勇太, 白子 智康:サンショウウオ類の分布調査における捕獲調査と環境DNA調査の比較, 全国環境研会誌, Vol.44, No.2, 29-35 (2019)
- 7) Fukumoto, S., Ushimaru, A. and Minamoto, T.:A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan, J Appl Ecol, 52, 358-365 (2015)
- 8) Katano I., Harada K., Doi H., Souma R., Minamoto T.:Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods, PLoS ONE 12(5), e0176541(2017)
- 9) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. and 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, 2150088 (2015)
- 10) Komai T., Gotoh RO., Sado T., Miya M.:Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans, Metabarcoding and Metagenomics, 3: e33835 (2019)
- 11) Ushio M., Fukuda H., Inoue T., et al. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. Mol Ecol Resour., 17, e63–e75(2017)
- 12) Ushio, M., Murata, K., Sado, T. et al. :Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. Sci Rep 8, 4493 (2018).
- 13) Takenaka, M., Hasebe, Y., Yano, K., Okamoto, S., Tojo, K., Seki, M., Sekiguchi, S., Jitsumasa, T., Morohashi, N., Handa, Y., & Sakaba, T.: Environmental DNA metabarcoding on aquatic insects: Comparing the primer sets of MtInsects-16S based on the mtDNA 16S and general marker based on the mtDNA COI region, Environmental DNA, 6, e588 (2024)
- 14) Sakata MK., Kawata MU., Kurabayashi A., Kurita T., Nakamura M., Shirako T., Kakehashi R., Nishikawa K., Hossman MY., Nishijima T., Kabamoto J.,

- Miya M., Minamoto T.:Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. *Metabarcoding and Metagenomics*, 6: e76534(2022)
- 15) 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)
- 16) 清野聰子：環境 DNA の市民科学で見直す地域の自然-技術的課題と解決の可能性, *水環境学会誌*, 46(A), 331-335 (2023)
- 17) 長谷部 勇太：市民参加型環境 DNA 調査の成果と課題, そして今後の展望, 神奈川県環境科学センター研究報告, 第 47 号, 1-13 (2024)
- 18) 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> (2025.9 参照)
- 19) Wu, Q., Minamoto T.:Improvement of recovery yield of macro-organismal environmental DNA from seawater samples, *ANAL. SCI.*, 39, 713–720(2023)
- 20) Takenaka,M.Yano,K.,Suzuki,T.et al.:Development of novel PCR primersets for DNAbarcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species, *Limnology*, 24, 121–136(2023)
- 21) Minamoto T., Miya M., Sado T., Seino S., Doi H., Kondoh M., Nakamura K., Takahara T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Iwasaki W., Kasai A., Masuda R., Uchii K. :An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols, *Environmental DNA*, 3: 8-13(2021)
- 22) Martin Kircher, Susanna Sawyer, Matthias Meyer: Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform, *Nucleic Acids Research*, Volume 40, Issue 1, 1 January, Page e3 (2012)
- 23) Edgar RC.:Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, Oct 1;26(19):2460-1(2010)
- 24) Edgar, R. C.:UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *Preprint at bioRxiv*(2016)
- 25) Kechin A., Boyarskikh U., Kel A., Filipenko M.: cutPrimers: A New Tool for Accurate Cutting of Primers from Reads of Targeted Next Generation Sequencing, *J Comput Biol.* Nov;24(11):1138-1143(2017)
- 26) Wang Z., Liu X., Liang D., Wang Q., Zhang L. and Zhang P.: VertU: universal multilocus primer sets for eDNA metabarcoding of vertebrate diversity, evaluated by both artificial and natural cases. *Front. Ecol. Evol.*, 11:1164206(2023)
- 27) Altschul, Stephen F., et al.: "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410(1990)
- 28) Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoechs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Weedon, J.: *vegan: Community ecology package*. R Package Version 2.6.4. (2022)
<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- 29) Maechler M., Rousseeuw P., Struyf A., Hubert M., Hornik K.:*cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 2.1.6 — For new features, see the 'NEWS' and the 'Changelog' file in the package source) (2023)
<https://CRAN.R-project.org/package=cluster>.
- 30) Roberts, D.W. ,Labdsv: *Ordination and Multivariate Analysis for Ecology*. R Package Version 2.1-0(2019)
<https://CRAN.R-project.org/package=labdsv>
- 31) Dufrêne, M. and Legendre, P.:*SPECIES ASSEMBLAGES AND INDICATOR SPECIES:THE NEED FOR A FLEXIBLE ASYMMETRICAL APPROACH*. *Ecological Monographs*, 67: 345-366(1997)
- 32) R Core Team.:*R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2024) <<https://www.R-project.org/>>.
- 33) 永井 大翔, 佐藤 行人, 今井 秀行, 梶田 忠 : 環境 DNA 分析による宜野湾市大山のタイモ水田用水路の魚類および十脚甲殻類相調査, *水生動物*, vol. 2024-20 (2024)