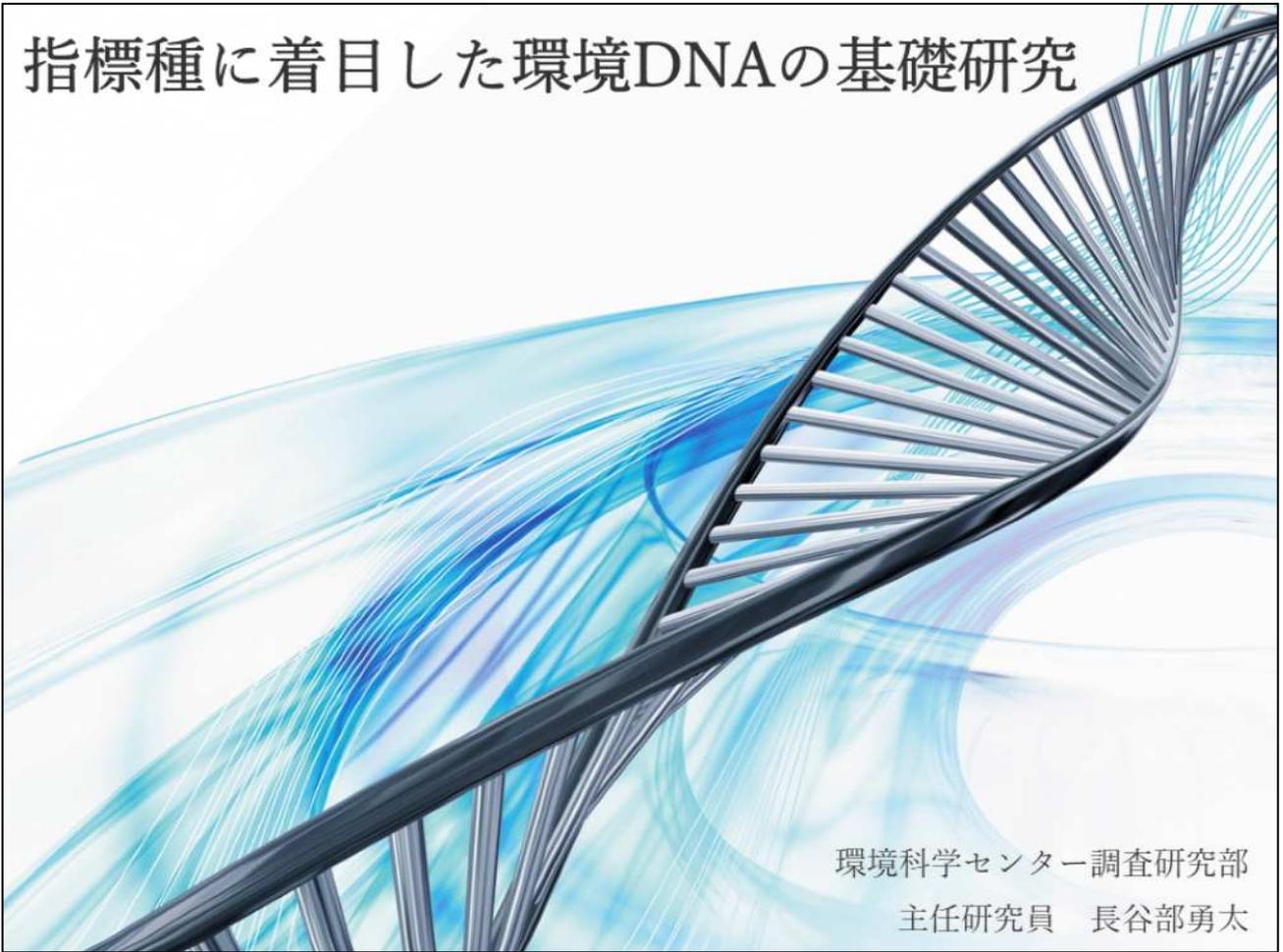


指標種に着目した環境DNAの基礎研究



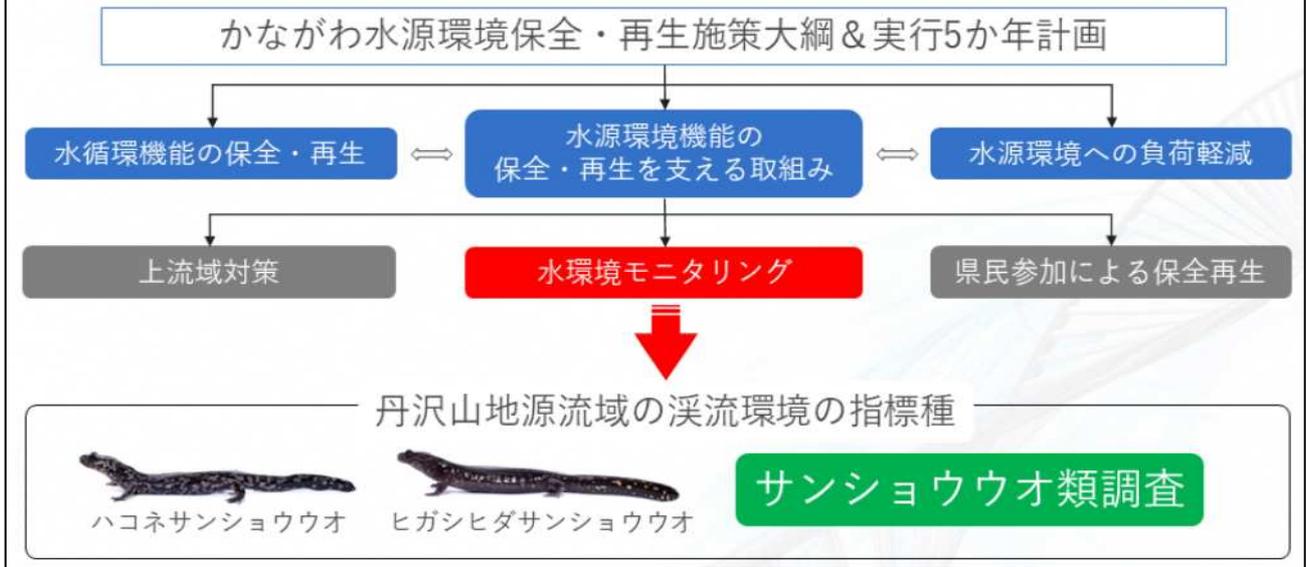
環境科学センター調査研究部

主任研究員 長谷部勇太

その分布状況等の調査をすることによって、地域の環境を類推・評価することができる生物のことを指標種又は指標生物と言います。

本研究では、環境DNAを用いることによって指標種であるサンショウウオ類の生息を把握するための基礎的な調査を実施しましたので、その結果を報告します。

研究背景



まず本研究の背景についてご説明します。

本県では丹沢を中心として良好な水源環境を守るために「かながわ水源環境保全・再生施策大綱」とその具体的な実施内容を定めた「実行5か年計画」を策定し、大きく「水循環機能の保全再生」、「水源環境機能の保全・再生を支える取組」、「水環境への負荷軽減」の三つの対策(森林の保全や水質の改善)を実施しています。

それらのうち「水源環境機能の保全・再生を支える取組」の中で、実施した対策の効果を検証することを目的として生物や水質のモニタリングを実施する「水環境モニタリング」があります。

「水環境モニタリング」の中で、丹沢山地源流域の健全な溪流環境の指標種としてサンショウウオ類の調査を実施しています。

今回はこのサンショウウオ類の調査が抱える課題を解決する手法として環境DNAの活用が可能かどうかという点について研究を実施しました。

サンショウウオ類の調査方法

- ✓ 捕獲による調査が基本
- ✓ 礫の下や淵等を手網もしくは手取り
(1地点あたり1人×2時間)



調査風景

● 課題

- ✓ 労働集約的
- ✓ 調査には専門知識が必要

➡ 調査コスト高&調査地点少

- ✓ 現場の状況(増水等)によって結果が変わる可能性

➡ 評価精度の低下

- ✓ 調査により生息域をかく乱(侵襲的)

➡ 希少種の調査として妥当?

まず、現状ではどのような方法でサンショウウオ類の調査を実施しているかご紹介いたします。

調査は捕獲による調査を基本とし、礫の下や淵などに生息するサンショウウオ類を小さな網などを使って捕獲します。

概ね1地点あたり1人×2時間程度の調査努力量とし、調査人員が多い場合はその分調査時間を少なくするなどして、同程度の調査努力量とするようにしています。

この調査方法はサンショウウオ類の調査としては一般的に行われている方法であり、一定の精度は担保されていますが、課題もあります。

まず、第一に現場での調査者の作業量が多く(=労働集約的)、かつ専門的な知識が必要とされる点です。生物を用いた評価の場合、その生物に影響を与える要因は、評価したい要素(今回の場合は森林・溪流環境の健全性になります)以外にも様々に存在しており、データ数を多くすることで評価対象外の要素の影響を排除し、評価精度が向上することが期待できます。しかし現状の調査手法では調査地点を増やすほどに作業量が増加し、本調査のように調査会社に委託する場合には調査コストの増加につながり、調査地点や頻度を増やすことが厳しいのが現状です。

第二に現場が非常に険しい溪流での調査となり、調査日前の天候等によっては通常よりも増水しており、淵等に人が入れず調査ができないといったことも考えられ、評価精度を低下させてしまう恐れがあること。

第三に調査するためにはサンショウウオ類の生息場所である礫をひっくり返したりするなど、ある程度その環境をかく乱せざるを得ない面があります。生息できる環境が限られている希少種の調査としてそういった調査方法が妥当なのかといった点も考えなければいけません。

サンショウウオ類の調査方法

- ✓ 捕獲による調査が基本
- ✓ 礫の下や淵等を手網もしくは手取り
(1地点あたり1人×2時間)



調査風景

● 求められる調査手法

- ✓ 高効率
 - ✓ 低コスト
 - ✓ 高精度
 - ✓ 非侵襲的
- な生物調査手法

「環境DNA」が有望株!!



以上のような課題を抱えているサンショウウオ類調査ですが、ではどのような調査手法が求められているかというと、効率がよく、低コストで、精度よくサンショウウオ類の生息を把握でき、現場の生息環境をかく乱しない(=非侵襲的)な調査といえます。

実際に既にこのような調査が実用化されているのであれば、その調査はおそらく捕獲調査にとって代わっているはずなのですが、まだそのような状況になっていないことからわかるようにこのような夢のような調査方法はまだ実現していません。

ただ、今後の技術の進展や知見の集積により、その調査方法に近くなる可能性が高い有望な調査手法が近年注目を集めています。

それが今回ご紹介する「環境DNA」を用いた生物調査手法です。



環境DNA (eDNA) 動植物の排泄物、組織片などに由来する水中に存在するDNA断片
1リットルの水から、環境DNAを調べることで

環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定

1リットル



各種に特異的なDNA断片が存在

環境省HPより転載

●特徴

- ✓ 現場調査は非常に簡便かつ専門的な知識は不要
- ➡ 作業分担による効率調査が可能(低コスト化も可能?)
- ✓ 現場調査は採水のみのため生息地のかく乱を起こさない
- ➡ かく乱を生じない生物調査が可能

生物調査において環境DNA技術の導入ポテンシャルは高い!!
(一方でまだまだ分かっていないことも多い...)

まず聞きなれない言葉である「環境DNA」についてご説明します。

環境DNAとは、例えば河川であれば、そこに生息する動植物の排泄物や組織片などに由来して水中に存在するDNAの断片のことを言います。

これらを適切な方法で集め、分析することにより間接的にその地点周辺に生息する生物情報を得ようというのが、環境DNAを用いた生物調査です。

現在では様々な研究により、河川だけでなく様々な水域や空気中を浮遊するDNA等も検出できることが明らかとなっており、生物調査において非常に発展性のある技術と目されています。

この調査方法の特徴としては、現場での作業が非常に簡便であり、専門的な知識も必要ないこと、現場作業が採水のみなので生息地のかく乱を起こさないということ等が挙げられます。

現場での作業が簡便であることから、例えば現場作業とそのあとの作業を分担することで効率的な調査が可能となり、場合によっては低コスト化することも可能となるのではないかと考えられます。

この技術が発見されてからまだ日が浅いことから、サンショウウオ類について従来の調査と比較した場合の精度については十分検証が行われているとは言えませんが、他の生物群の結果から判断すると捕獲調査よりも高い精度で調査ができるのではないかと期待できます。



環境DNA (eDNA) 動植物の排泄物、組織片などに由来する水中に存在するDNA断片
1リットルの水から、環境DNAを調べることで

環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定

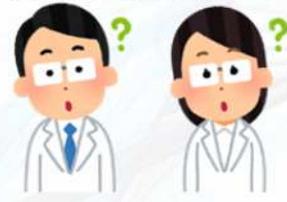
1リットル



各種に特異的なDNA断片が存在
環境省HPより転載

● 分かっていないこと (他にも色々ありますが...)

- ✓ 捕獲調査と比較した場合の検出感度、精度はどの程度か？
- ✓ ある地点で検出されたサンショウウオのDNAはどの程度の範囲の生息状況を反映しているのか？
- ✓ 調査時刻・季節によって検出率・DNA濃度は変わるのか？



環境DNA技術を導入するには上記の点を明らかにする必要あり

今後の調査においては可能であれば環境DNA調査を導入していきたいところですが、導入にあたっては環境DNA調査の限界や特徴を明らかにする必要があります。

そこで本研究では、現状で分かっていない環境DNAの特徴について、実際のフィールド実験により検証することとしました。

まず一つ目は、従来からの捕獲調査と比較して、どの程度の精度、検出感度があるのかについてです。

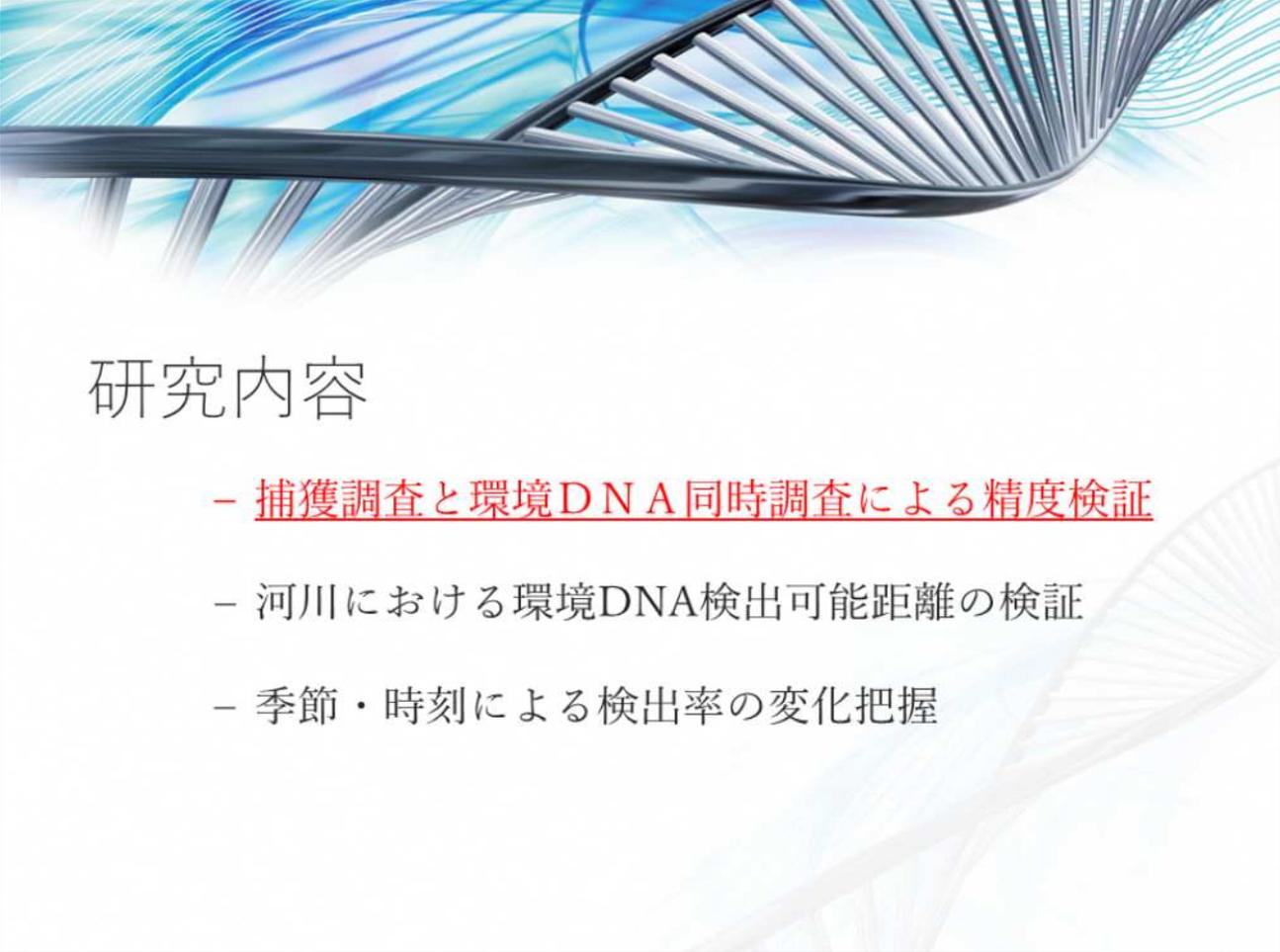
今後環境DNA調査を従来の捕獲調査の代替として利用していくにあたっては、捕獲調査と同程度以上の精度でその生息を判定する必要があります。

二つ目は調査地点において検出されたDNAがどの程度上流の生息状況を反映しているのかについてです。

サンショウウオを当該調査地点周辺の森林環境の指標として扱うのであれば、例えば数キロ上流から流下してきたDNAを検出してしまうようであれば、捕獲調査の結果とは別の評価方法を用いる必要があります。

三つ目は調査時刻や季節によって検出率やDNAの濃度は変わるのかについてです。

最も検出率の高い時刻や季節がわかれば、その時刻・季節に集中的に調査を行うことでより精度の高い調査が可能になると期待できるためです。



研究内容

- 捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証
- 河川における環境DNA検出可能距離の検証
- 季節・時刻による検出率の変化把握

まず一つ目の捕獲調査と環境DNAの同時実施による調査精度の比較について、結果をご説明します。

捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証

調査手法

- ✓ サンショウウオ類の捕獲調査と同時に環境DNA調査を実施
- ✓ 捕獲調査は1人×2時間(あるいは2人×1時間)
- ✓ 環境DNA調査はリアルタイムPCRを用いた種特異的調査を実施



捕獲調査



環境DNA調査

調査手法としては非常に単純なもので、従来から実施しているサンショウウオ類の捕獲調査時に、同時に環境DNA調査を実施し、その結果を比較するというものです。

調査の流れとしては調査地点に到着後、まず調査開始地点において環境DNAのサンプリング(水1L)を実施し、その後上流に向かって捕獲調査を実施しました。

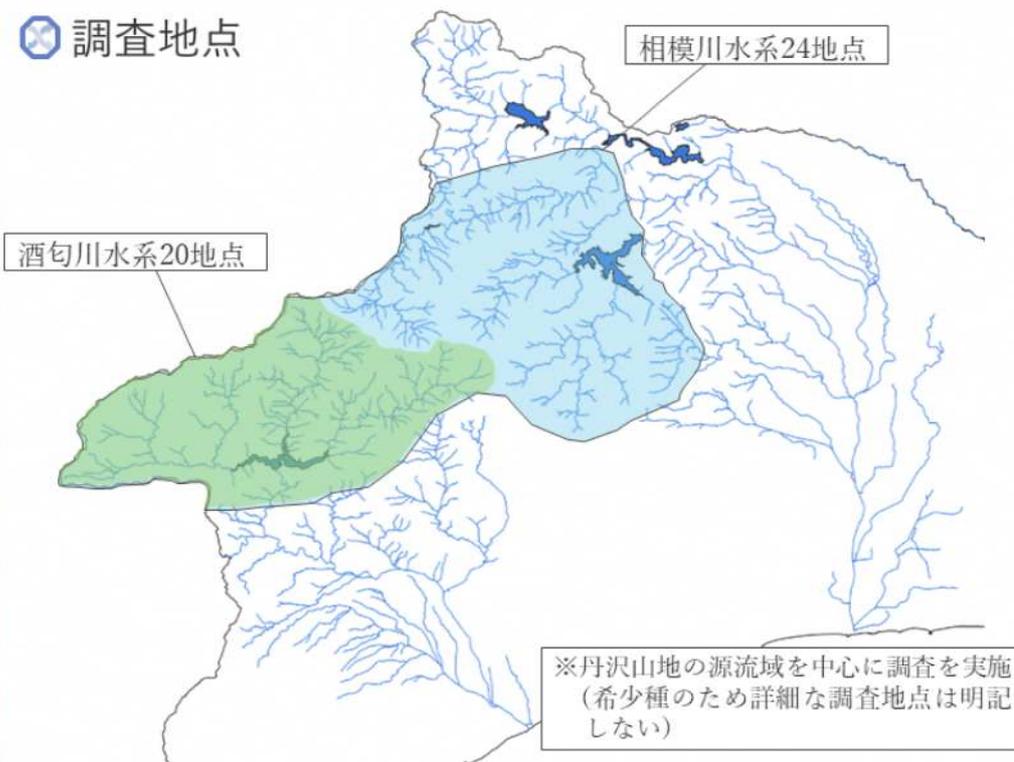
環境DNA調査については、それぞれハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオを特異的に検出可能なプライマープローブセット(※1)を開発し、リアルタイムPCR(※2)を用いて分析を行いました。

※1...プライマープローブセットとは生物固有のDNA配列を増やすことが可能な短い人工のDNA配列のことで、これを用いたPCR反応(DNAを数百万～数億倍に増やせる技術)により対象の生物のDNAを増やすことができます。

※2...リアルタイムPCRはPCR反応で増えていくDNAの量をリアルタイムで測定できる機械のことで、これを用いることで試料中に対象の生物のDNAが存在するかどうか知ることができます。

捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証

調査地点



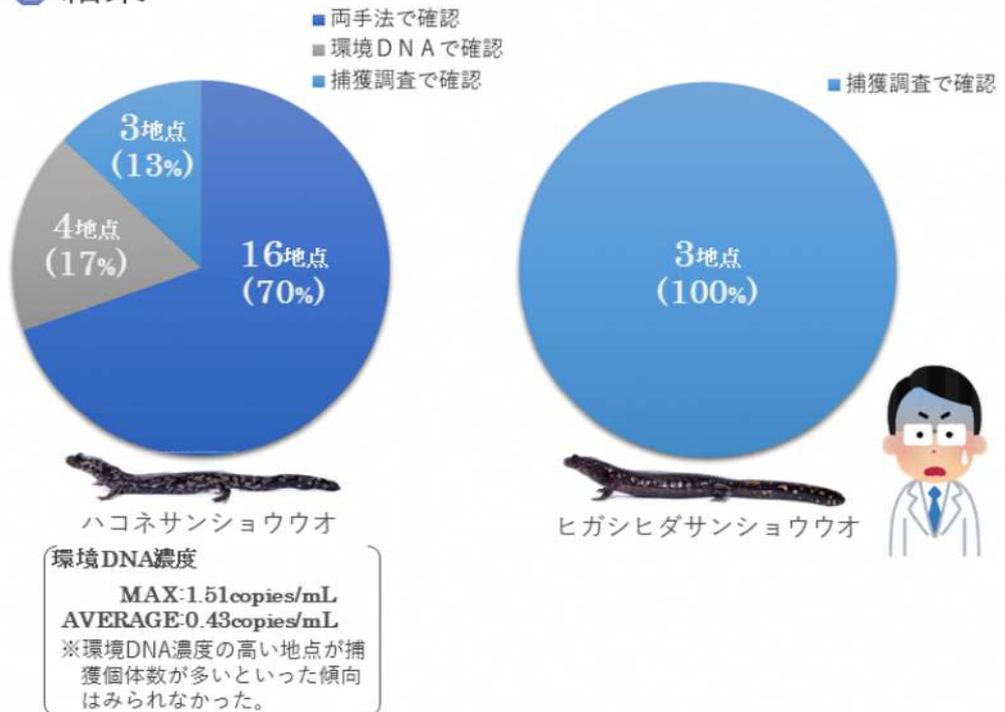
調査地点としては緑と青で着色された丹沢山地を中心に実施しました。

青に着色されたエリアが相模川水系で24地点、緑に着色されたエリアが酒匂川水系で20地点の計44地点で調査を実施しました。

詳細な調査地点については、希少種保護の観点から明記しておりません。

捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証

結果



調査結果を図に示します。

まずハコネサンショウウオについてですが、**16地点**で捕獲と環境DNAの結果が一致する結果となり、一定の精度でその生息状況を把握することが可能であると期待できます。

また、環境DNAのみが検出された地点もあり、過去の調査結果からはその地点においてハコネサンショウウオが生息する可能性が高いという結果となっており、場所によっては捕獲調査を上回る精度でその生息を把握することが可能な場合もあることが示されました。

ただ、環境DNA濃度と捕獲個体数との関係では、最もたくさんのサンショウウオが確認された地点においては環境DNAは検出されたものの定量下限値以下になるなど、一定の傾向はみられませんでした。

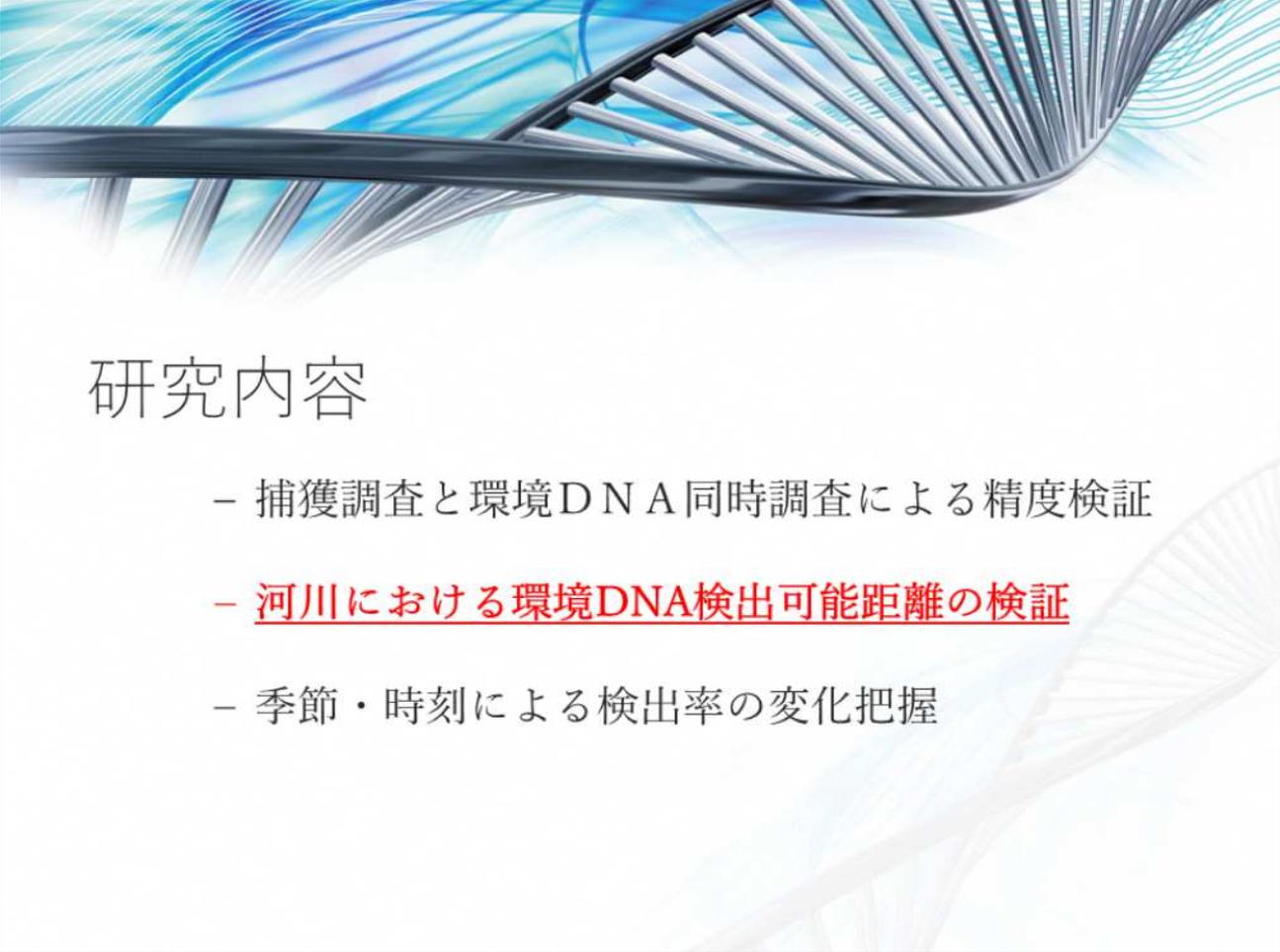
一方ヒガシヒダサンショウウオについては捕獲調査で**3地点**確認され、ハコネサンショウウオに比べて確認地点数は少なくなりました。しかし環境DNAについてはいずれの地点でも検出されず、課題が残る結果となりました。



捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証

⊗ 考察・まとめ

- ✓ ハコネサンショウウオについては捕獲調査との一致率は70%程度となり、環境DNAでも一定の精度でその生息を把握することが可能
- ✓ 更に環境DNAのみ検出された地点もあり、補完的調査としては有用
- ✓ 生物量とDNA濃度の関係については、捕獲されたハコネサンショウウオが多かった地点が環境DNA濃度が高いわけではなく、一定の傾向はみられなかった
- ✓ ヒガシヒダサンショウウオについては、全地点不検出の原因を検証する必要あり



研究内容

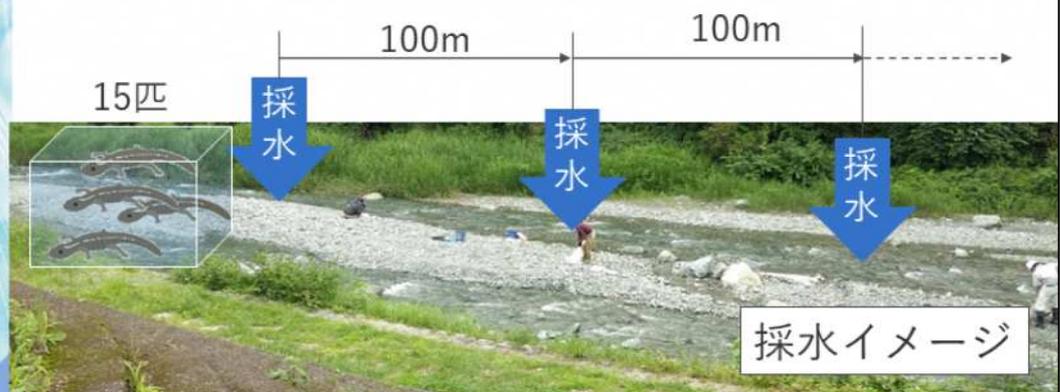
- 捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証
- 河川における環境DNA検出可能距離の検証
- 季節・時刻による検出率の変化把握

それでは次に河川における環境DNA検出可能距離について検証を行った結果についてご説明します。

河川における環境DNA検出可能距離の検証

調査手法

- ✓ サンショウウオが生息していない河川を選定
- ✓ 河川にハコネサンショウウオの幼生15匹を入れたかごを設置
- ✓ 籠直下と100m間隔(400mまで)で2L採水



河川においてどの程度下流までDNAが検出されるのかについては、既往の研究ではアユを50匹用いた実験が行われており、その結果では1km~2km程度まではDNAが検出可能であり、河川においてはDNAが放出されてから拡散によりDNA濃度が急激に減少することが明らかとなっています。

今回はその結果を参考に、調査で捕獲されたハコネサンショウウオの幼生15匹をかごに入れ、そのかごをサンショウウオが生息していないことを確認した河川に設置し、かご直下と100m間隔(400mまで)で採水を実施し、どの程度下流までDNAが検出されるか調査を実施しました。

河川における環境DNA検出可能距離の検証

調査地点



調査地点としては丹沢湖上流を流れる河内川の地図上の青枠で囲っているところで実施しました。

河川における環境DNA検出可能距離の検証

調査地点



青枠の拡大図はこのような形になっており、河内川本川と東と西からそれぞれ流れ込みがあります。

このうち事前の環境DNA調査や河川の状況を勘案し、西沢を選定し、河内川との合流地点から上流400mのところにハコネサンショウウオ15匹を入れたかごを設置することとしました。

河川における環境DNA検出可能距離の検証

調査地点



かごとかごを設置した場所の状況については写真のとおりになります。

右下の写真のようなハコネサンショウウオの幼生を15匹、右上の写真のかごに入れ、左の写真の場所に設置しました。

河川における環境DNA検出可能距離の検証

❖ 結果

- ✓ かご直下も含め全地点で検出されず...



❖ 考察・まとめ

- ✓ ハコネサンショウウオは個体も小さく、岩の下でじっとしているため、魚類(アユ)等のように常時検出可能な濃度のDNAを放出しているわけではなさそう(フン等の不定期の放出の方が影響が大きいのかも)

遠距離からのDNAの流下の可能性は低く、むしろ検出率を向上させる工夫の方が重要では？

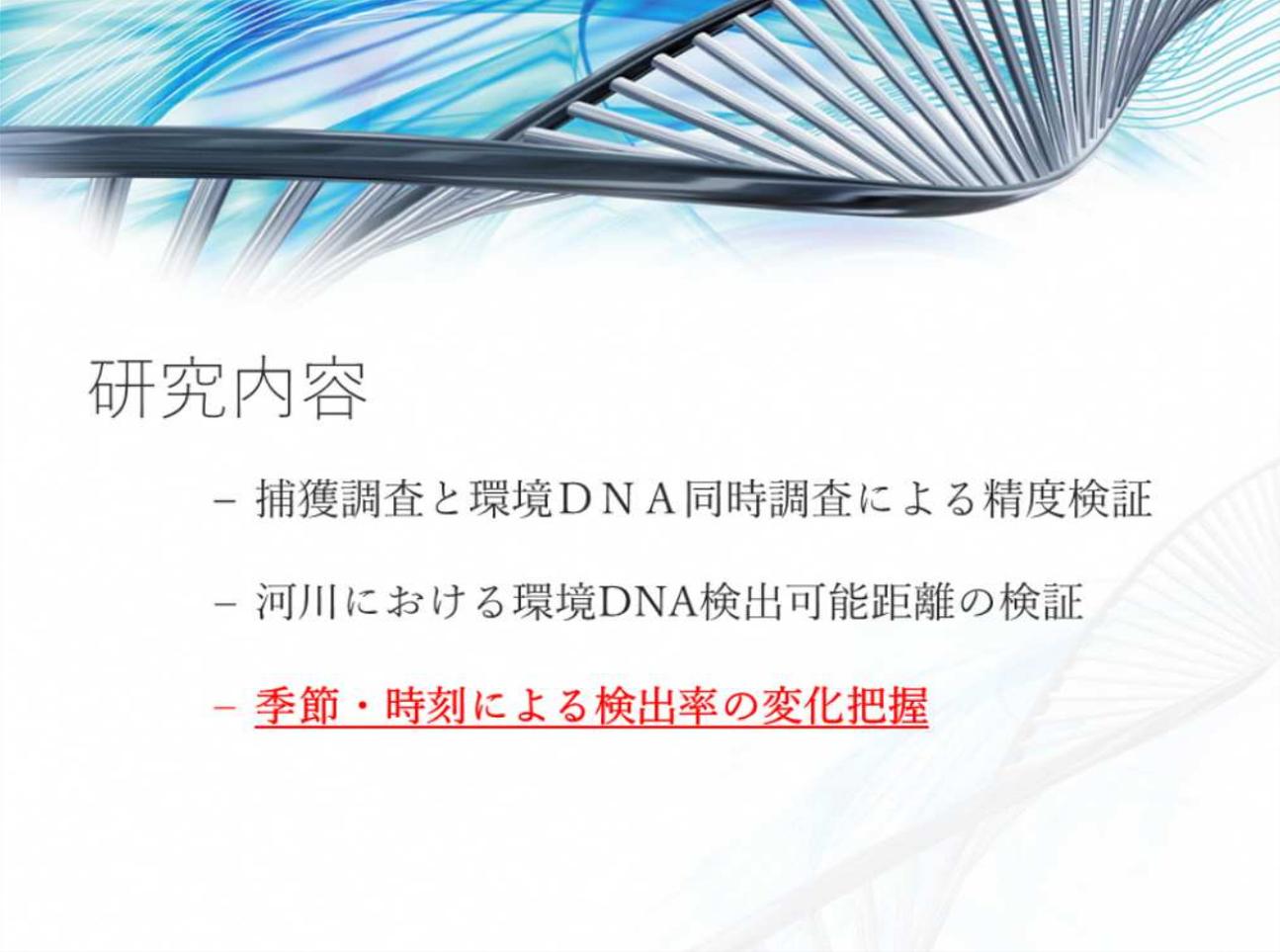
調査結果についてご説明します。

結果としてはかご直下も含めて、全地点で不検出となりました。

一つ目の調査の時もそうでしたが、サンショウウオから放出されるDNAの濃度は非常に低く、調査地点周辺にサンショウウオが生息していてもDNAが検出されない地点も見られました。

このため、今回のような調査方法では検出可能なレベルのDNAを採取できなかったのではないかと考えられました。

今回の結果と既往の研究で河川においては拡散によるDNA濃度の低下も著しいことが示されていることを併せて考えると、より遠くに生息するサンショウウオからのDNAを検出してしまう可能性は低く、むしろ周辺に生息するサンショウウオから放出されたDNAをいかに精度よく検出できるかの方が重要であると考えられました。



研究内容

- 捕獲調査と環境DNA同時調査による精度検証
- 河川における環境DNA検出可能距離の検証
- 季節・時刻による検出率の変化把握

それでは次に最後の調査である季節・時刻による検出率の変化把握についてご説明します。

これまでの調査からサンショウウオについては、非常にDNAの放出量が少なく、捕獲調査でその存在が確認された場所においてもDNAが検出されなかった地点も存在しました。

この問題を解決する方法としては、例えば採水量を多くするといったことも考えられますが、これは同時に分析を阻害する物質も試料中に多く入ってきてしまうため、慎重な検討が必要となります。

一方で、サンショウウオは夜行性かつ成育ステージにより成体が水の中にいたりいなかったりすることもあるため、例えば夕方から夜にかけて採水を行うとDNAの濃度が上昇したり、成体が繁殖のために水の中に入ってきたりするときの方がDNA濃度が高かったりするようなことが考えられます。

この調査ではそのあたりを明らかにし、高い精度での環境DNA調査を実現することを目的として実施しました。

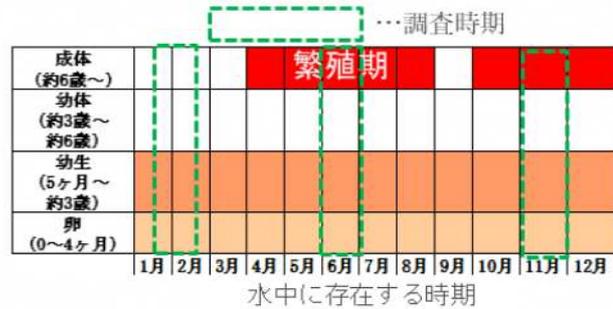
季節・時刻による検出率の変化把握

調査手法

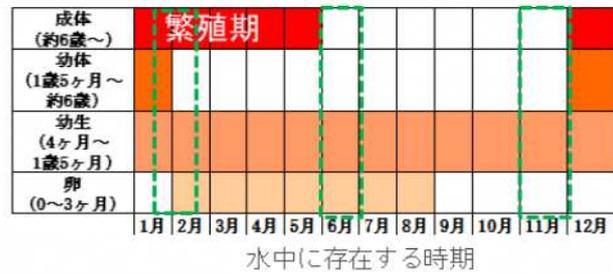
- ✓ サンショウウオ類の成育ステージを考慮した調査日を設定



ハコネサンショウウオ



ヒガシヒダサンショウウオ



調査手法についてご説明します。

サンショウウオ類の成体が水中にいる時期や繁殖期などを考慮して、概ね6月、11月、1月～2月ごろに調査を実施する計画としました。

季節・時刻による検出率の変化把握

調査手法

- ✓ 3時間ごとに2Lサンプリングを計8回(24時間)行い、環境DNA濃度の変化を調査



※台風の影響により秋は調査地点の変更、冬は調査を中止

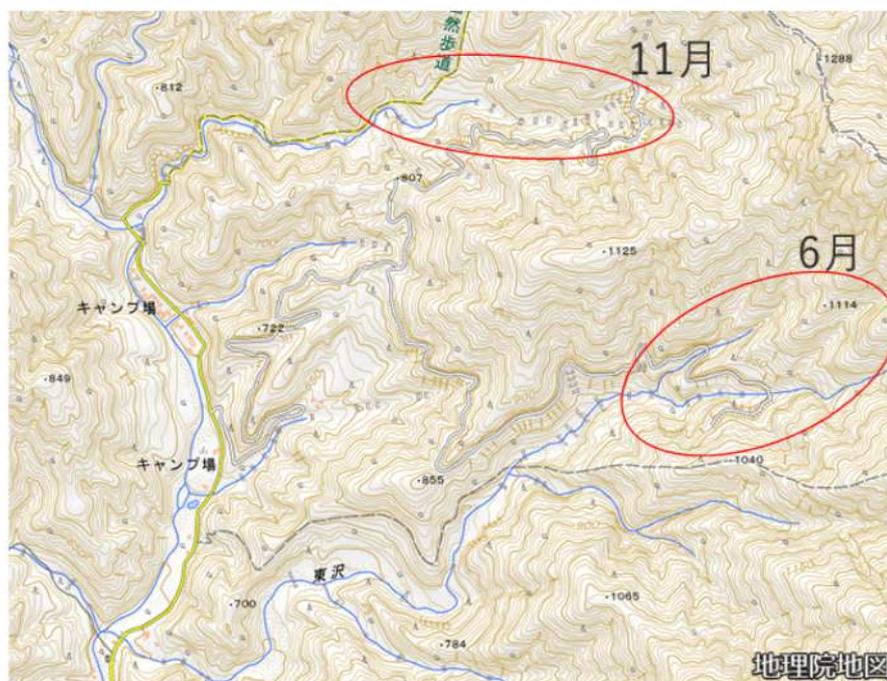
時刻による検出率の違いについては、調査日に3時間ごとの2L採水を8回実施し、1日における環境DNA濃度の変動を確認しました。

調査日については春の調査は6月20日から21日にかけて実施し、秋については台風の影響により林道が崩落してしまった関係で地点を変更して11月5日から6日にかけて実施しました。

冬の調査についてはヒガシヒダサンショウウオの繁殖期の調査を目的としていましたが、林道崩落の影響により生息する地点にアクセスすることが困難となってしまったことから調査を断念しました。

季節・時刻による検出率の変化把握

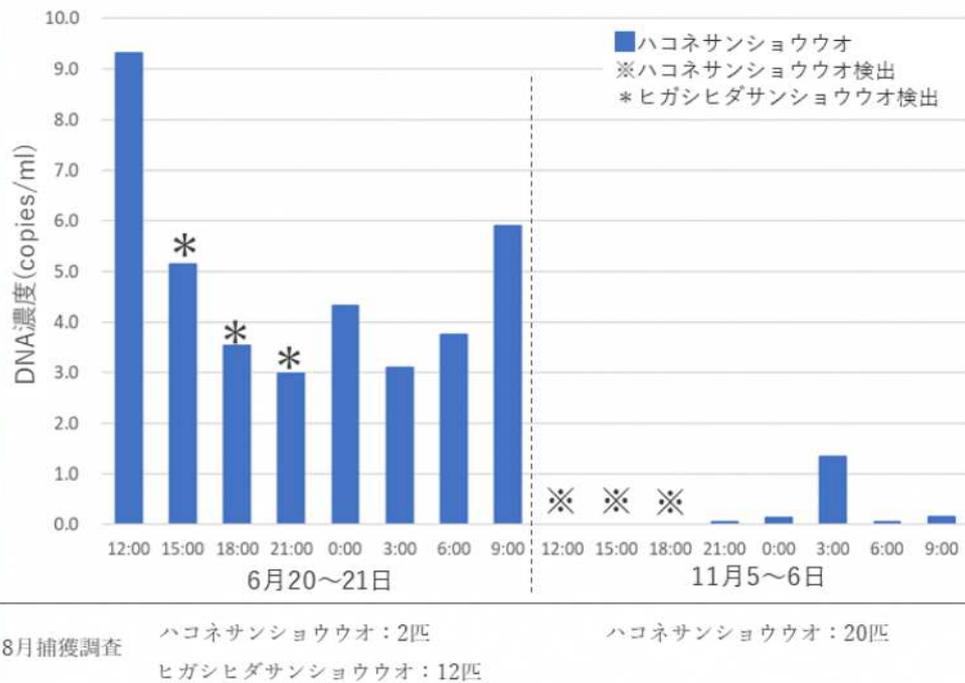
⊗ 調査地点



春の調査(6月)と秋の調査地点(11月)は地図の赤丸で囲った地点で実施しました。なお、過去の捕獲調査では春の調査地点ではハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオが確認されており、秋の調査は春と同様の地点で調査を予定していたものの、先ほど説明した林道崩落により調査地点を変更しました。この調査地点では過去の調査ではヒガシヒダサンショウウオは確認されておらず、ハコネサンショウウオのみが確認されています。

季節・時刻による検出率の変化把握

結果



調査結果を図に示します。

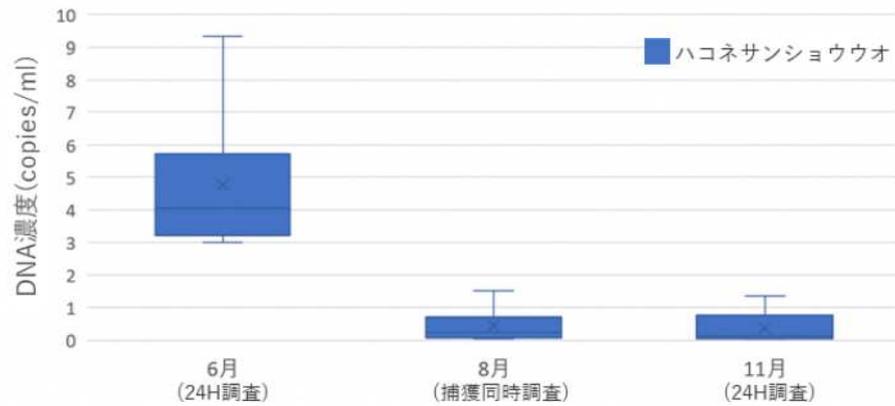
まずヒガシヒダサンショウウオについては、6月調査においてごく微量のDNAが検出されたのみであり、検出率が非常に低いことが依然として課題になっています。

一方、ハコネサンショウウオについては、6月の調査時に11月に比べ高濃度のDNAが検出されてきました。一方で採水時刻による変化を見てみると、夜行性だからといって必ずしも夜間にDNA濃度が高くなる傾向等は見られませんでした。このことから、採水時刻の変動よりも季節的な変動の方が環境中のDNA濃度に与える影響が大きいことが明らかとなりました。

また、同年の8月に実施した捕獲調査結果を見てみるとハコネサンショウウオの方が捕獲されている数は少ないのに、DNA濃度は非常に高く、個体数だけではないDNA放出要因の存在が疑われます。

季節・時刻による検出率の変化把握

結果



ハコネサンショウウオ



水中に存在する時期

上の図はハコネサンショウウオのDNAについて春と秋の調査に加えて、8月に実施した捕獲調査との同時調査の結果も含めたグラフを示しています。

同一地点での調査と複数地点での調査であるため、単純な比較はできないものの明らかに6月は非常に高濃度のDNAが検出されており、何らかの要因でハコネサンショウウオのDNAが比較的高濃度に放出されていたことが考えられます。

その要因の一つとして、6月はハコネサンショウウオの繁殖期にあたる季節であり、繁殖行動に由来したDNA(精子等)が大量に放出されていたことが考えられます。



季節・時刻による検出率の変化把握

⊗ 考察・まとめ

- ✓ 採水時刻による環境中のDNA濃度については一定の傾向は確認されず、夜行性にもかかわらず日中でも環境中にはDNAが存在することが判明
- ✓ 繁殖期には環境DNAの濃度が上昇(精子由来等?)し、調査精度の向上が期待できる可能性あり
- ✓ ヒガシヒダサンショウウオについては6月の24時間調査において初めてDNAが検出されたが、非常に微量であり、繁殖期等の採水を実施するなど検出率の向上が課題



🌀 今後の取組

- ✓ ヒガシヒダサンショウウオについては、検出率の向上が課題であり、次の取組を実施予定
 - 今回調査できなかった繁殖期での環境DNA調査
 - プライマープロブセットの増幅率等の検証
- ✓ ハコネサンショウウオについては、繁殖期における高頻度の調査を行い、DNA濃度の変動を詳細に把握するとともに、丹沢山地における詳細な生息状況把握を実施予定





ご清聴ありがとうございました

本発表の詳細については以下の報告書をご覧ください。

- 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 44巻2号29-35頁 2019年)

- ✓ 相模川流域における捕獲調査結果との比較



- サンショウウオ類分布調査における環境DNA活用のための基礎的検討
(全国環境研会誌 45巻1号38-44頁 2020年)

- ✓ 酒匂川流域における捕獲調査結果との比較や季節変動について調査



その他当センターの環境DNAに関する報告

- 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)

- ✓ 底生動物の指標種のプライマー開発と保管温度・時間によるDNA分解に関する調査



以上、ご覧いただきありがとうございました。

詳細な実験条件等については、ここに記載の全国環境研会誌に報告した資料をご覧ください。

また、当センターの環境DNAの取組として、底生動物に関するプライマー開発や試料の保管温度やろ過までの時間によるDNAの分解に関する調査結果について報告しているのでご興味があればこちらもご覧ください。