

報告(Note)

指標種に着目した環境 DNA の基礎研究

長谷部 勇太, 白子 智康*

(調査研究部, *いであ株式会社)

The fundamental research on environmental DNA focusing on indicator species

Yuta HASEBE, and Tomoyasu SHIRAKO

(Research Division, *Idea Consultants, Inc.)

キーワード：環境 DNA, 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, 定量 PCR

1 はじめに

神奈川県を流れる相模川と酒匂川の2つの水系は、県内の水道水の約9割を賅っており、県民の重要な水源となっている。しかし、両水系の現状を見ると、ダム湖上流の森林荒廃による水源涵養機能の低下や生活排水対策の遅れによるダム湖（特に相模湖）の水質汚濁、また、中下流においては河川の護岸コンクリート化等が水や土砂の自然な流れを阻害し、自然浄化機能の低下が懸念されている。

このため神奈川県では、水源環境を保全・再生する取組として相模川及び酒匂川の上流域において、水源涵養機能の向上を図るための森林の整備や水質向上のための生活排水対策等の事業を実施している。また、中下流域においては、自然豊かな清流を保全するため、生態系に配慮した水辺環境の整備を行っている。これら水源環境保全事業の効果を把握する目的で、河川に生息する動植物及び水質に関する調査（以下、専門家調査）を、相模川では2008年度から、酒匂川では2009年度からそれぞれ5年間隔で実施している。

また、専門家調査とは別に毎年度県民の方々から調査員を募集し、上記の両河川において生物調査を中心に実施してもらうことにより、水源環境保全事業の普及啓発と上記の専門家調査の補完を行っている（以下、県民調査）。

水源環境保全事業は県民参加を前提とし、事業実施にあたっては計画、実施、評価及び見直しの各段階において、県民意見を反映しながら進める体制となっていることから、県民の方々々が直接事業の評価に貢献できる県民調査は非常に重要な調査であるといえる。

しかしながら課題もあり、調査手法としては捕

獲による生物調査を主体としているため、一定程度の調査精度を確保するにはある程度生物調査に関する経験が必要となる。

現状では毎年度継続的に参加している調査員もいるが、生物調査未経験の新規応募者も多くいるため、そのような調査員でも精度の高い調査が可能手法の開発が求められている。

一方で、水中に生息するマクロ生物（本稿においては、微生物ではなく目に見える大きさの生物を意味する）の調査については、従来から実施されてきた捕獲調査の他に、近年環境中に存在するDNA、いわゆる環境DNAを用いた生物調査手法が注目されている。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の細胞由来の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などの点で多くのメリットがあると報告されている¹⁾。また、従来の捕獲調査と比較した研究においても環境DNA調査が同程度の精度で生物の存在を知ることが可能であるとの報告もある^{2,3)}。

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ウシガエルの研究であり⁴⁾、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）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）(ver. 2.1)が公開された。その後、2020

年4月3日に学会マニュアル (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⁵⁾。

また、環境省においても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、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、環境 DNA 分析技術の標準化（手引きの作成やリファレンスの整備）、一般への普及、あるいはデータの効果的・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」を公表しているところである⁶⁾。

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、捕獲調査と同等の精度の調査結果を得ることが期待され、経験の少ない新規調査員でも精度の高い調査が可能という点から県民調査への導入は非常に有用と考えられる。

しかしながら、導入にあたっては、いくつかの検討すべき事項がある。以下に導入にあたっての検討事項と本研究での対応を示す。

1) 対象種の選定

環境 DNA の分析には大きく網羅解析と種特異解析の二つの方法がある。

網羅解析は、次世代シーケンサーを用いて試料水中の DNA を網羅的に分析することにより、解析対象とする種群に属する様々な種の存在を知ることができる反面、当該種群に共通する DNA 配列を発見し、ユニバーサルプライマーを開発する必要があり、学会マニュアルではユニバーサルプライマーとして MiFish プライマー⁷⁾を用いた魚類の網羅解析手法のみが公開されている⁵⁾。

種特異解析は、主にリアルタイム PCR 等を用いて特定の種の存在を知る手法であり、その種固有のプライマープロブセットを開発する必要がある。一度に数種の分析しかできないが、濃度既知の人工合成 DNA 等を利用することで溶液中の DNA 濃度を定量可能といった点に特徴がある。種特異解析は希少種の新たな生息地の発見⁸⁾ や外来種の侵入の監視⁹⁾ への活用が試みられている。

本研究では、河川環境の変化に比較的鋭敏に反応することが期待される底生動物を解析対象種群とすることとした。底生動物とはカゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目等を中心とした昆虫の幼

虫及びエビやカニ等の甲殻類、貝類といった川底に生息する生物群の総称である。底生動物の網羅解析手法についての先行研究はあるものの^{10,11)}、現状では DNA データベースの充実等も含めて魚類のように高い精度で調査可能な手法は確立されていない。そのため本研究では、種特異解析を採用することとした。

対象種については、大学教授等の専門家で構成される委員会において、過去の専門家調査結果 (2020年) について得られた意見を参考に、河川環境を指標する種 (以下、指標種) を選定した。本研究では、それらの指標種に対する種特異解析手法の開発を行った。

2) 試料の運搬について

学会マニュアルでは採水した試料は現場でろ過しない場合、塩化ベンザルコニウム (BAC) を終濃度 0.01% となるよう添加した上で、低温で輸送し、48 時間以内でろ過することが推奨されている⁵⁾。

これは BAC と低温による DNA 分解抑制効果を期待した措置^{12,13)} であるが、環境 DNA 調査手法を県民調査に導入した場合、ろ過まで冷蔵すること、あるいは調査日により、48 時間以内でろ過を実施することが困難となることも想定される。

現在のところ、試料の輸送方法としては採水した試料容器をポストに投函し、当センターへ郵送してもらうことを想定しているが、夏場に屋外のポストに投函した場合、高温環境に数時間さらされる可能性がある。また、週末に調査を実施した場合、ろ過までに 48 時間以上経過してしまうことが考えられる。

このため、県民調査に導入した場合に想定される複数の試料輸送パターンについて、学会マニュアル通りにサンプリングした場合と比較して DNA 濃度がどの程度減少するか評価する必要がある。

以上のことから、本研究では、指標種の種特異解析手法を開発し、県民調査において想定している輸送過程における DNA 分解等の影響を把握することにより、環境 DNA 調査手法を県民調査へ導入するための基礎データを得ることを目的とした。

2 方法

2.1 指標種の種特異解析手法の開発

2.1.1 対象種

指標種は県内河川で生息が確認されているウルマーシマトビケラ (*Hydropsyche orientalis*), モクズガニ (*Eriocbie japonicus*) 及びアメリカナミウズムシ (*Girardia tigrina*) とした。

それぞれの生態に関する説明と指標種としての位置づけについては次のとおりである。

ウルマーシマトビケラは最も一般的なシマトビケラ属で、日本の河川では個体数で優先する種になることも多い¹⁴⁾。県内河川においても広く生息が確認されており¹⁵⁾、当該種が確認されない水域においては何らかの河川環境の悪化が生じている可能性が考えられることから指標種として選定した。

モクズガニは北海道、本州、四国、九州、琉球列島及び小笠原諸島にわたる日本全域の河川に広く分布しているイワガニ科のカニであり、成熟したカニは秋に産卵のために川を下り、汽水域・海域で繁殖を行う降河回遊性の生活史を有している¹⁶⁾。その生活史から河川構造物の影響を受けやすく、回遊経路を阻害されると上流域の個体群が衰退するとの報告¹⁷⁾もあることから、河川の連続性の指標種として選定した。

アメリカナミウズムシは、北米原産のプラナリアの仲間であり、第2次世界大戦以降、急速に世界各国の水域に広がった。これは熱帯魚飼育の普及に伴う水草の人為的移動が直接の原因と考えられ、現在では世界的に分布している¹⁸⁾。なお、当センターにおける相模川・酒匂川の調査では、それぞれ直近の調査である2018年と2019年の専門家調査において、初めて生息が確認されており、両水域での分布の拡大が懸念される外来種の代表として指標種に選定した。

2.1.2 プライマープローブセットの設計

種特異解析では、指標種のDNAのみを増幅するような配列を持ったプライマー対(DNA増幅の際の起点となる20塩基対程度のオリゴヌクレオチド)を設計する必要がある。また、より特異性を上げるために必要に応じてプローブと呼ばれる標的配列に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを設計する例もある。

本研究では対象となる試料は河川水等であり、様々な生物由来のDNAが存在することが想定さ

れることから、対象種それぞれについて特異的なプライマーとプローブを設計することとした。またプローブには、より特異性の高い設計が可能となるTaqMan[®]MGBプローブを用いることとした。

プライマープローブセットの設計にあたっては、専用ソフトウェア primer Express を用いて設計した。その際、National Center for Biotechnology Information Databases (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されている近縁種(本調査地域及び環境に生息すると想定される種で、データが存在するものに限る)についてもDNA配列情報を集めたうえで、ソフトウェア MEGA を使用し、指標種と近縁種のDNA配列をデータ上で比較することにより特異性の確認を行った。

2.1.3 生体組織DNAを用いた検証

設計したプライマー及びプローブについて、それぞれ指標種と近縁種の組織から QIAGEN 社製の DNeasy Blood & Tissue Kit で抽出したDNA溶液を用いて、リアルタイムPCRシステム(ThermoFisher社製 QuantStudio3)で分析を行い、種特異的に指標種のDNAのみが増幅することを確認した。

なお、複数の個体が用意できたものについては、対象とした領域の種内の変動の有無を確認するため、それぞれ別々にDNAを抽出し、検証を行った。

2.1.4 河川水を用いた検証

1) 調査地点及び調査日

調査地点は2018年の専門家調査(コドラートを用いた定量調査3回及び定性調査)においていずれの種も確認された相模川水系玉川の籠堰橋(35.430000N,139.329400E)とした。調査地点を図1に示す。調査は2020年2月20日に実施した。

2) 採水及びろ過

採水容器は、新品の滅菌済み1L容ポリプロピレン製広口びんを使用した。採水は調査地点において3検体実施した。採水後にDNAの分解を抑制するため、BACを終濃度0.01%となるように添加した。採水後の試料は学会マニュアルに従い、冷蔵したまま分析会社に送り、48時間以内に行過を行った。

ろ過についてはカートリッジ型のステリベクスフィルター(Merck Millipore社製 Sterivex-HV,



図 1 調査地点図

口径 0.45 μ m) を使用した。このとき、ろ過ポンプと廃液タンク等を除き、コンタミネーション防止のため試料に直接接触する部分はすべて使い捨てタイプの器具を使用した。

3) フィルターからの DNA 抽出

ろ過したステリベクスフィルターからの DNA 抽出・精製は学会マニュアルに記載の方法により、実施した。

始めにフィルターに残った水分を遠心分離により除去し、プロテナーゼ K 溶液、リン酸緩衝生理食塩水、Buffer AL (QIAGEN 社製) の混合物を入れ、56°C でロータリーシェーカーを用いて回転した。この工程により DNA を抽出し、遠心分離により DNA 抽出液を回収した。

得られた DNA 抽出液を、QIAGEN 社製の DNeasy Blood & Tissue Kit のプロトコールに従い、エタノール、Buffer AW1、Buffer AW2 及び Buffer AE を添加し、精製を行い、精製した DNA 抽出液 100 μ L を得た。

4) リアルタイム PCR 定量分析

抽出・精製した DNA 溶液を鋳型とし、今回設計した種特異的なプライマー及びプローブを用いて、リアルタイム PCR システム (ThermoFisher 社製 QuantStudio3) による定量 PCR 分析を行った。

PCR 溶液は、それぞれ 900nM のプライマー、250nM の TaqMan MGB プローブ、TaqPath™ qPCR Master Mix (Applied Biosystems 社)、2 μ L の DNA 溶液を加え、合計 10 μ L とした。

PCR の条件は、50°C で 2 分、95°C で 20 秒の後、95°C で 1 秒、60°C で 20 秒のサイクルを 55 サイクル行い、各試料 4 回反復で分析を行った。

また、標準試料として指標種それぞれの塩基配列を人工的に合成した遺伝子を使用し、10000 copies, 1000 copies, 100 copies, 10 copies 及び 1 copy の測定結果から検量線を作成し、試料の DNA 増幅の平均から河川水中のコピー数を算出した。この時、試料中の DNA 濃度が非常に低濃度のため、4 回反復の一部で DNA が増幅しなかったり、阻害物質等の影響により増幅曲線の立ち上がりが遅れたりすることにより、測定結果が標準試料の検量線の範囲外となる可能性がある。

その場合は、コピー数の算出は行わず、「検出」として扱った。

2. 2 輸送方法における DNA 減少量の比較

2. 2. 1 採水及びろ過

2. 1. 4 2) の採水時に同時に 15 検体の採水を実施し、それぞれ 3 検体ずつ県民調査で想定する輸送方法に基づき、試料の保管方法、ろ過までの時間を次の 5 パターンで実施した。

○パターン A

想定輸送方法 : 日曜日又は週前半 (月曜日～水曜日) に調査を実施し、試料はコンビニエンスストア等の空調設備のある場所に設置されたポストに投函

保管方法 : 常温 (概ね 20°C 程度)

ろ過までの時間 : 48 時間以内でろ過

○パターン B

想定輸送方法 : 屋外に設置されたポストに投函 (回収までの時間短)

保管方法 : 45°C で 2 時間保管後、常温

ろ過までの時間 : 48 時間以内でろ過

○パターン C

想定輸送方法 : 屋外に設置されたポストに投函 (回収までの時間長)

保管方法 : 45°C で 4 時間保管後、常温

ろ過までの時間 : 48 時間以内でろ過

○パターン D

想定輸送方法 : 週後半 (木曜日～金曜日) の調査で、コンビニエンスストア投函

保管方法 : 常温

ろ過までの時間 : 約 96 時間後にろ過

○パターン E

想定輸送方法 : 週後半 (木曜日～金曜日) の調査で, 屋外に設置されたポストに投函

保管方法 : 45°Cで6時間保管後, 常温
ろ過までの時間: 約96時間後にろ過

ここでは, 屋外に設置されたポストに投函した場合の温度を45°Cと設定した。これは, 2019年8月の快晴時に試料容器を輸送するプレ調査を実施し, 同梱した温度ロガー (Lascar 社製 EL-USB-1-Pro) で試料容器周辺の温度を記録したところ, 回収されるまでの3時間の間に35°Cまで上昇したことから, より厳しい条件として45°Cに設定したものである。

2. 2. 2 DNAの抽出及びPCR定量分析

ろ過後のDNAの抽出及びリアルタイムPCR定量分析についてはそれぞれ「2. 1. 4 3)」及び「2. 1. 4 4)」と同様の手順で実施した。

2. 2. 3 統計解析

今回の調査の目的が, 輸送過程におけるDNA減少量の比較であることから, 河川中のDNA濃度のばらつきの影響を排除するため, 同じ処理を行った3検体について比較を行うこととした。3群での比較のため Tukey-Kramer 検定を実施し, 他の2検体と1%有意水準で有意に異なった検体については, 今回の検討対象から除くこととした。

また, 結果の解析では学会マニュアルに準拠した試料の分析結果を比較対照群として各パターンのDNA濃度の減少を評価するため, 多重比較検定手法のうち Dunnett 検定 (有意水準1%) を行うこととした。

3 結果及び考察

3. 1 特定種の特異的解析手法の開発

3. 1. 1 ウルマーシマトビケラ

1) プライマープローブセットの設計

ウルマーシマトビケラの種特異プライマープローブセットについては, 本種に加え近縁種としては県内に生息が確認されている同属種であるシロズシマトビケラ (*Hydropsyche albicephala*) 及びナカハラシマトビケラ (*Hydropsyche setensis*) の

Primer F	A	A	T	C	G	G	A	G	G	A	T	T	C	G	G	A	A	C	T	
<i>Hydropsyche orientalis</i>
<i>H. albicephala</i>	.	.	.	T	.	G	T	.	.	A	.	.	T	
<i>H. setensis</i>	.	.	.	T	T	.	.	A	.	.	.	

Primer R	G	A	A	G	C	C	G	T	A	G	G	A	A	C	C	A	A	A	A	C
<i>Hydropsyche orientalis</i>	S
<i>H. albicephala</i>	.	.	G	.	G	.	A	.	A	.	.	T	T	
<i>H. setensis</i>	.	.	.	G	A	A	.	T	T	

Probe	C	G	T	T	C	C	C	C	T	A	A	T	A	C	T	G
<i>Hydropsyche orientalis</i>
<i>H. albicephala</i>	A	.	.	.	T	T	T	.	.	.	
<i>H. setensis</i>	A	.	.	.	A	T	T	.	.	.	

注:Primer R の S は, C または G を意味する。

図2 ウルマーシマトビケラのプライマープローブ配列

DNA 配列を収集し, 配列の特異性等を検証した結果, ミトコンドリア DNA の COI 領域において設計を行った。設計した各プライマー及びプローブの配列, 指標種であるウルマーシマトビケラ, 近縁種であるシロズシマトビケラ及びナカハラシマトビケラの当該配列を図2に示す。プライマーについては3'末端側 (図では右側の配列) に種特異的な塩基が多くなるように設計を行った。

また, ウルマーシマトビケラで R 側のプライマー領域で種内多型 (C または G) が認められたが, 近縁種の配列と比較し, より特異的になる塩基を選択した。

2) 生体組織 DNA を用いた検証

生体組織 DNA を用いた検証については, 本種及び近縁種としてナカハラシマトビケラの組織から抽出した DNA 溶液を用いて実施した。

その結果, 図3のとおりウルマーシマトビケラについては良好な増幅がみられた一方で, ナカハラシマトビケラも立ち上がりは遅いものの30サイクル付近から増幅が始まり, Ct 値 (Threshold Cycle の略で, Threshold Line (図の赤線) と増幅曲線が交差する時点のサイクル数のこと) は概ね33~35程度となった。ウルマーシマトビケラの Ct 値は概ね18~20程度であり, Ct 値として13以上

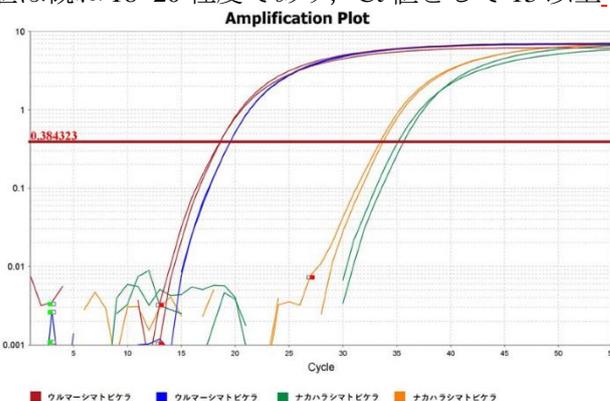


図3 ウルマーシマトビケラの増幅曲線

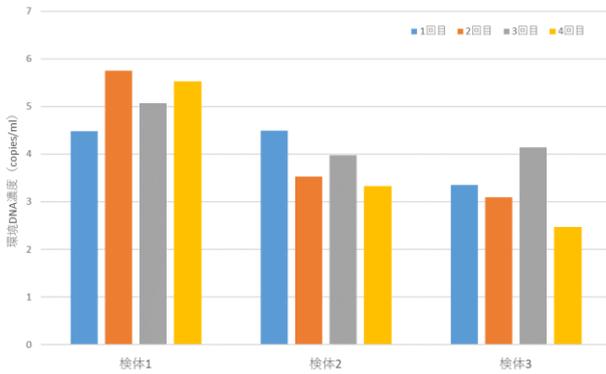


図4 ウルマーシマトビケラの環境 DNA 濃度

の差(増幅効率 100%と仮定した場合, 概ね 10,000 倍程度の濃度差に相当)があった。

生体組織から抽出した DNA 溶液は非常に高濃度なため近縁種の DNA も増幅されたが, 環境水中の DNA は非常に低濃度であることから, ナカハラシマトビケラの DNA が存在した場合であっても, 偽陽性(ウルマーシマトビケラが存在しないのに存在すると判断してしまうこと)を引き起こす可能性は低く, 環境 DNA 調査においては特に問題にならないと考えられた。

3) 河川水を用いた検証

河川水中のウルマーシマトビケラの DNA 濃度を図4に示す。3 検体とも良好な増幅がみられ, 今回設計したプライマープローブセットを用いることにより河川水においてもウルマーシマトビケラの DNA を検出できることが確認された。

ウルマーシマトビケラは相模川において広範囲に生息しており, 過去の調査結果からも近縁種であるナカハラシマトビケラやセリーシマトビケラのみが生息する地点は確認されていないことから, 河川水で近縁種の DNA が増幅されるか検証することはできなかった。

3. 1. 2 モクズガニ

1) プライマープローブセットの設計

モクズガニの種特異プライマープローブセットについては, 本種に加え近縁種としては日本国内においては生息が確認されていないが, 同属種であるチュウゴクモクズガニ (*Eriocheir sinensis*) の DNA 配列を収集し, 配列の特異性等を検証した結果, ミトコンドリア DNA の CO II 領域において設計を行った。

設計した各プライマー及びプローブの配列, 指標種であるモクズガニ, 近縁種であるチュウゴク

Primer F	C	C	A	T	C	C	A	A	T	G	A	G	C	T	G	G	A	A	T	G	
<i>Eriocheir japonica</i>
<i>E. sinensis</i>	T	G	.	A	.

Primer R	T	C	G	G	A	T	T	T	G	A	G	T	A	T	T	T	A	T	T	G	G	A	A	G	A	A	
<i>Eriocheir japonica</i>
<i>E. sinensis</i>

Probe	A	C	T	A	C	T	A	G	A	T	G	T	A	G	A	T	A	A	T	C	G	A	A	C		
<i>Eriocheir japonica</i>
<i>E. sinensis</i>	G	C	C	T	.

図5 モクズガニのプライマープローブ配列

モクズガニの当該配列を図5に示す。

2) 生体組織 DNA を用いた検証

生体組織 DNA を用いた検証については, 本種及び近縁種としてはモクズガニ科の別属の種で海岸域に生息するイソガニ (*Hemigrapsus sanguineus*) 及びケフサイソガニ (*Hemigrapsus penicillatus*) の組織から抽出した DNA 溶液を用いて実施した。その結果, 図6のとおりケフサイソガニも若干の増幅は見られたものの Threshold Line を超えることはなく, モクズガニのみ良好な増幅がみられた。

3) 河川水を用いた検証

河川水中のモクズガニの DNA 濃度を図7に示す。定量下限値(標準試料 1copy が存在した場合の河川水中の DNA 濃度)は, 図7の赤点線で示した 0.05 copies/mL (分析に用いた DNA 溶液 2 μ L 中 1 copy = 抽出した DNA 溶液の総量 100 μ L 中 50 copies となる。これを河川水 1 mL 中の濃度に換算すると 1000 mL に 50 copies = 0.05 copies/mL となる)であり, 検体 2 の 4 回目の分析結果は DNA の増幅は確認されたものの定量下限値未満となったため「検出」とした。

ウルマーシマトビケラに比べて DNA 濃度は低濃度であり, 検体 3 では 4 回とも不検出であった。

この要因としては, 捕獲調査の際定性調査で 1 個体確認されたのみで, 生息密度が低かったこと

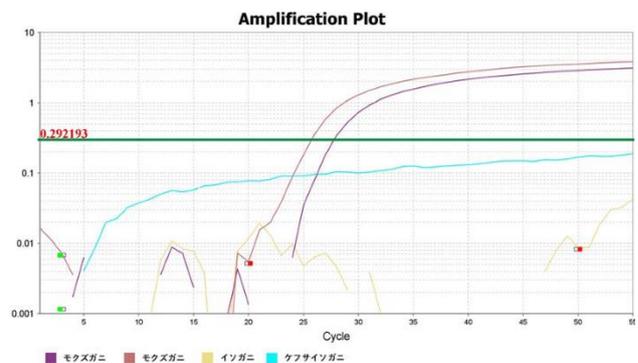


図6 モクズガニの増幅曲線

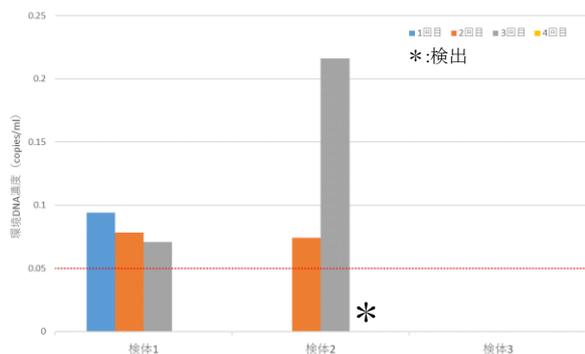


図7 モクズガニの環境 DNA 濃度

が考えられた。今回のように生息密度が低い場合、環境 DNA が検出されないことがあることは他の事例でも報告されており¹⁹⁾、環境 DNA 調査の結果を評価する際には留意する必要があると考えられた。

3. 1. 3 アメリカナミウズムシ

1) プライマープローブセットの設計

アメリカナミウズムシの種特異プライマープローブセットについては、本種に加え近縁種としては相模川・酒匂川の両河川において広く分布している外来種であるアメリカツノウズムシ (*Girardia dorocephala*) の DNA 配列を収集し、配列の特異性等を検証した結果、ミトコンドリア DNA の CO I 領域において設計を行った。

設計した各プライマー及びプローブの配列、指標種であるアメリカナミウズムシ、近縁種であるアメリカツノウズムシの当該配列を図8に示す。

2) 生体組織 DNA を用いた検証

生体組織 DNA を用いた検証については、本種及び近縁種として同属のアメリカナミウズムシ及び同科の在来種であるナミウズムシの組織から抽出した DNA 溶液を用いて実施した。

その結果、図9のとおりアメリカツノウズムシについても若干の増幅がみられたものの、ケフサイソガニの場合と同様に Threshold Line を超える

Primer	F	G	A	C	G	A	T	G	A	T	T	A	T	T	G	G	A	G	T	G	C	C	T	A	C	T	
<i>Girardia tigrina</i>
<i>G. dorocephala</i>	.	.	.	A	.	.	R	?	A	

Primer	R	T	A	A	A	C	C	C	C	A	A	A	G	C	T	C	A	C	A	A	T	A	C	A	G
<i>Girardia tigrina</i>
<i>G. dorocephala</i>	C	C	A	.	C	.	欠	失	

Probe	T	T	T	A	G	G	T	G	A	T	T	G	G	C	T	A	C	T	T	T
<i>Girardia tigrina</i>
<i>G. dorocephala</i>	G	A	.	.	.	

図8 アメリカナミウズムシのプライマープローブ配列

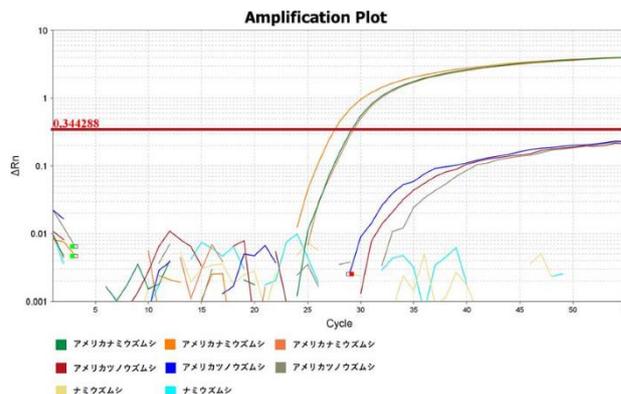


図9 アメリカナミウズムシの増幅曲線

ことはなく、アメリカナミウズムシのみ良好な増幅がみられた。

3) 河川水を用いた検証

河川水を分析した結果、アメリカナミウズムシの DNA はいずれの検体からも検出されなかった。

この要因として、捕獲調査においては定量調査で1個体確認されたのみで、モクズガニと同様に生息密度が低かったことが考えられた。

さらにアメリカナミウズムシは個体重量もモクズガニに比べて小さく、河川水中で検出できるだけの DNA が存在しなかったと考えられた。今後生息範囲を広げ、生息密度が高くなれば DNA が検出されることが想定されるため、今後も捕獲調査を含め継続的に監視をしていくことが必要と考えられた。

3. 2 輸送方法における DNA 減少量の比較

輸送方法における DNA 減少量の比較には、3. 1の結果から、河川水において他の指標種に比べ高濃度で DNA が検出されたウルマーシマトビケラを対象に実施した。

同一の処理を行った検体間での Tukey-Kramer 検定 (有意水準 1%) の結果、パターン B の 1 検体とパターン D の 1 検体を検討対象から除外した。

各パターンの分析結果を図10に示す。学会マニュアルに準拠した結果を比較対照群として各パターンの濃度について Dunnett 検定 (有意水準 1%) を実施した結果、パターン D 及び E において DNA 濃度の減少が確認された。

既往の研究では BAC を終濃度 0.01% で添加することにより、淡水環境で採取した魚種の DNA 濃度が 10 日間有意な低下が認められなかったと

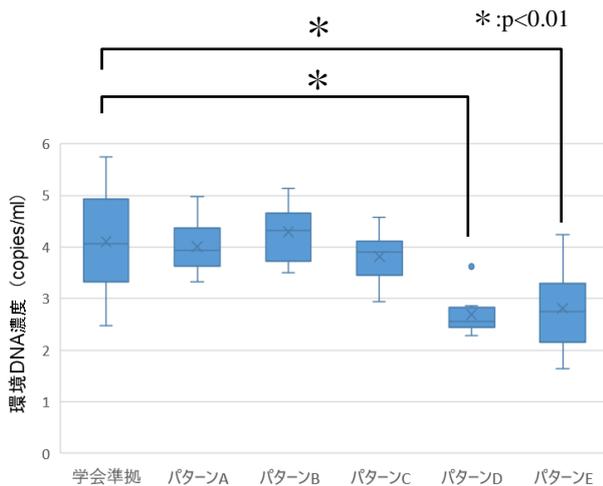


図 10 各パターンにおけるウルマーシマトビケラの DNA 濃度

いった報告¹²⁾や、BACによるDNAの分解抑制効果は貝類や海域に生息する種でも淡水の魚種と同様の効果が確認されるなど種間の違いが見られなかったという報告²⁰⁾があり、水生昆虫であるウルマーシマトビケラの場合でも2日間の保管までは同様の結果が得られた。一方で4日経過するとDNA濃度の減少がみられたことは既往の研究とは異なる結果となり、BACによるDNAの分解抑制効果については今後さらなる検討が必要であると考えられた。

今回の検証では、ろ過まで常温で保管したパターンAに比べ、それぞれ45°Cで2時間、4時間放置した屋外ポスト投函を想定したパターンB、CでDNA濃度に大きな減少は見られず、同じくろ過まで常温で保管したパターンDに比べ、45°Cで6時間、その後常温で保管したパターンEでも、DNA濃度に大きな差は見られなかった。これについても既往の研究でBACを投入した場合、ろ過までの保管温度(25°C, 4°C, -30°C)はDNAの濃度に影響を与えないことが報告されており、45°Cという比較的高温での保管も同様の結果となることが明らかとなった。

このことから、試料中のDNA濃度はろ過までの保管温度より保管時間が影響していることが明らかとなり、DNA濃度の低下の影響を避けるには可能な限り48時間以内でのろ過が推奨され、県民調査への導入にあたっては48時間以内のろ過が実現できるような体制づくりが必要と考えられた。

4 まとめ

本研究では県内に生息する底生動物であるウルマーシマトビケラ、モクズガニ及びアメリカナミウズムシの種特異解析手法の開発として種特異プライマープローブセットの設計、生体組織から抽出したDNA溶液を用いた検証及び河川水を用いた検証を実施した。

その結果、河川水においては、生物の個体数が少ないことなどからDNAが検出できなかった種も確認されたものの、組織DNAを用いた検証では、いずれの指標種のDNAも良好な増幅が確認された。

ウルマーシマトビケラの組織DNAを用いた検証では、近縁種のDNA配列と比較し、十分に特異性を有するよう設計したにもかかわらず、増幅効率は非常に低いものの近縁種であるナカハラシマトビケラのDNAの増幅が確認されたが、環境DNA調査で想定されるDNA濃度であれば、近縁種のDNAによる偽陽性の可能性は低く、特に問題ないと考えられた。

また、ウルマーシマトビケラを対象とした輸送方法におけるDNA減少量の比較調査では、学会マニュアルで定められた方法と比較した結果、48時間以内でろ過が可能であれば、常温での保存や夏場のポスト投函等による数時間の周囲温度の上昇は結果に大きな影響は与えないことが明らかとなった。

一方、ろ過までの時間が96時間経過すると、DNA濃度は有意に減少することが明らかとなった。

これらの結果から、今後は県民調査への導入に向けて、ポストへ投函可能な調査キットの開発とろ過までの時間を48時間以内となるような調査マニュアルの作成を実施する予定としている。

参考文献

- 1) Darling, J.A., Mahon, A.R.: From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111, 978-988 (2011)
- 2) Shaw, J.L., Clarke, L.J., Wedderburn, S.D., Barnes, T.C., Weyrich, L.S., & Cooper, A.: Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation*, 197, 131-138 (2016)

- 3) Sard,N.M., Herbst,S.J., Nathan,L., Uhrig,G., Kanefsky,J., Robinson,J.D., Scribner,K.T.: Comparison of fish detections, community diversity, and relative abundance using environmental DNA metabarcoding and traditional gears, *Environmental DNA* 1,4,368–384 (2019)
- 4) Ficetola,G.F., Miaud,C., Pompanon,F., Taberlet,P.: Species detection using environmental DNA from water samples, *Biology Letters*,4,423-425 (2008)
- 5) 一般社団法人環境 DNA 学会：環境 DNA 調査・実験マニュアル,
<https://ednasociety.org/manual> (参照 ; 2020.8)
- 6) 環境省：環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き第 1 版,
http://www.biodic.go.jp/edna/reports/fwfish_tebiki1.pdf (参照 ; 2020.8)
- 7) Miya,M., Sato,Y., Fukunaga,T., Sado,T., Poulsen, J.Y., 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, *Royal Society Open Science*, 2:150088 (2015)
- 8) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文: 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立, *日本生態学会誌*, 66, 613-620 (2018)
- 9) Furlan,E.M., Gleeson,D., Wisniewski,C., Yick,J., Duncan,R.P.: eDNA surveys to detect species at very low densities: A case study of European carp eradication in Tasmania, Australia, *Journal of Applied Ecology*, 56,11, 2505-2517 (2019)
- 10) Fernández,S., Rodríguez-Martínez,S., Martínez, J.L., Garcia-Vazquez,E., Ardura,A.:How can eDNA contribute in riverine macroinvertebrate assessment? A metabarcoding approach in the Nalón River (Asturias, Northern Spain) *Environmental DNA*, 1 (4) ,385–401 (2019)
- 11) 八重樫咲子, 細川大樹, 渡辺幸三:河川水中の環境 DNA の次世代シーケンス解析を利用した水生昆虫の群集構造および生息個体数推定の可能性：従来型定量評価手法と比較して, *土木学会論文集 G (環境)* ,73 卷 7 号 III_139-III_147 (2017)
- 12) Yamanaka,H., Minamoto,T., Matsuura,J., Sakurai,S., Tsui,S., Motozawa,H., Hongo,M., Sogo,Y., Kakimi,N., Teramura,I., Sugita,M., Baba,M., Kondo,A.:A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant, *Limnology*,17 (2) , 233-241 (2017)
- 13) Eichmiller,J., Best,S.E., Sorensen,P.W.:Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water,*Envir Sci Tech* 50,1859–1867 (2016)
- 14) 川合禎次, 谷田一三: 日本産水生昆虫 科・属・種への検索[第二版],572,東海大学出版部 (2018)
- 15) 神奈川県環境科学センター: 神奈川県内河川の底生動物ー II,12 (2014)
- 16) 小林哲: 通し回遊性甲殻類モクズガニ *Eriocheir japonica* (DE HAAN) の生態 回遊過程と河川環境,*生物化学*, 51 (2) ,93-104 (1999)
- 17) 浜野 竜夫: 河川横断工作物がエビ カニ類に及ぼす影響とその個体群の復元について, *河川技術に関する論文集*, 4,183-188 (1998)
- 18) 川勝正治, 西野麻知子, 大高明史: プラナリア類の外来種,*陸水学雑誌*, 68,461-469 (2007)
- 19) Tréguier,A., Paillisson,J.M., Dejean,T., Valentini, A., Schlaepfer,M.A.& Roussel,J.M.:Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds, *Journal of Applied Ecology*, 51, 871–879 (2014)
- 20) Teruhiko Takahara, Junya Taguchi, Satoshi Yamagishi, Hideyuki Doi, Shigeki Ogata, Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto : Suppression of environmental DNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride, *Limnology and Oceanography*, 18(8) 437 – 445(2020)