

# 環境 DNA メタバーコーディング法の福岡市内河川における 魚類モニタリング調査への有用性

中山恵利・有本圭佑・大平良一

福岡市保健環境研究所環境科学課

## Usefulness of the Environmental DNA metabarcoding method for fish monitoring investigation in Fukuoka city rivers

Eri NAKAYAMA, Keisuke ARIMOTO and Ryoichi OHIRA

Environmental Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

### 要約

令和3年度に福岡市内7河川17地点において行われた捕獲調査による魚類調査と同時に環境DNAメタバーコーディング法を用いた調査（環境DNA調査）を行い、確認・検出された魚種の比較を行った。その結果、7河川中5河川において捕獲調査に比べ環境DNA調査のほうが多くの種数を検出した。同一の河川において捕獲調査では確認されず環境DNA調査のみで検出された種は3~20種（うち希少種と外来種は共に最大4種）であったのに対し、環境DNA調査では検出されず捕獲調査のみで確認された種は1~11種（うち希少種は最大3種、外来種は最大2種）であった。今回の環境DNA調査では、捕獲調査では確認されなかった種を検出することができ、その中には希少種や外来種も含まれていた。一方で捕獲調査のみで確認された種も存在したことから、捕獲調査の結果と環境DNA調査結果を相互に補完することにより、魚類モニタリング精度の向上に有効な手段になると考えられる。

**Key Words:** 環境 DNA environmental DNA, メタバーコーディング法 metabarcoding method, 魚類モニタリング調査 fish monitoring investigation

## 1 はじめに

福岡市では、自然環境の現状を把握するとともに、保全・創造施策の基礎資料等とするため、自然環境調査を実施している。この調査では、市域における水生生物の分布状況及び生息状況等を調査・考察するために河川の水生生物調査を5年毎に実施しており、令和3年度に行われた調査では、市内7河川17地点において、漁具による捕獲と潜水目視観察によって魚類の個体数や生息環境等の調査が行われた（以下、「捕獲調査」とする。）。また、文献調査として、調査対象河川及び周辺水域（博多湾流入河川）における過去の魚類相、底生動物相について記載された文献及び報告書などを収集し、出現種、出現状況等について整理が行われた。

一方で、近年、魚類のモニタリング方法として、生物から排出され、環境中を漂う細胞片等に由来する「環境DNA」を用いた調査手法が注目を集めている<sup>1)</sup>。環境DNAを用いた調査は、捕獲調査に比べて現地での作業が

採水のみと簡便で、多地点や調査が困難な場所での調査を可能とし<sup>2)</sup>、また調査対象となる魚類を捕獲しないため生物や生態系への影響がほとんどないといった特徴がある<sup>3)</sup>。本研究では、環境DNAを用いた調査のうち、特定の分類群のDNAを網羅的に検出するメタバーコーディング法に着目し、捕獲調査と同時に環境DNA調査を行い、両者で確認・検出された魚種の比較することにより、本市の魚類モニタリング調査における環境DNA調査の有用性について検証を行ったので報告する。

## 2 方法

### 2.1 調査地点及び調査日

捕獲調査は令和3年8月24日~27日及び9月8日~9日に、多々良川2地点、御笠川2地点、那珂川2地点、樋井川3地点、金屑川3地点、室見川4地点及び瑞梅寺川1地点の計17地点で調査を行った（表1）。環境DNA

調査の採水は、原則、捕獲調査実施当日に行った。なお、瑞梅寺川の太郎丸新橋は感潮域と淡水域があるが、対象地点の水生生物を網羅的に把握する観点から、両方を対象として調査・採水を行った。

表1 調査地点

河川名	地点数	地点名
多々良川	2	名島橋, 多の津新橋
御笠川	2	比恵大橋, 金隈大橋
那珂川	2	百年橋, 警弥郷橋
樋井川	3	塩屋橋, 前手堰, 羽黒大橋
金屑川	3	潮見橋, 水町橋, 重留橋
室見川	4	福重橋, 河原橋, 丸隈橋, 千石橋
瑞梅寺川	1	太郎丸新橋
計	17	

下線は感潮域を示す

## 2.2 調査方法

### 2.2.1 捕獲調査

調査地点において漁具（タモ網、定置網、投網及びセルびん）による捕獲と潜水目視観察により、魚類の個体数、生息環境等を調査した。実施した漁法・漁具等については、過年度の実施状況、現地踏査の結果を踏まえ設定した。

### 2.2.2 環境 DNA 調査

#### 1) 採水方法

捕獲調査を行った地点の5ヶ所から、河川の表層水及び底層水を1Lずつ採水し混合した。その混合液10Lのうち1Lをろ過に供した。ろ過はSterivex（孔径0.45 μm, Merck）を使用し、ろ過の途中でフィルターが目詰まりした場合はその時点でろ過を終了した。ろ過後はSterivex内の水分を可能な限り除去した後、RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) を約2mL充填し、冷蔵状態で実験室へ持ち帰り、DNA抽出作業を行うまで-20℃以下で保存した。

#### 2) 分析

DNA分析は環境DNA調査・実験マニュアル<sup>4)</sup>（以下、「マニュアル」とする。）に基づき環境DNAメタバーコーディング法により行った。

SterivexからのDNA抽出・精製はマニュアルに従い行った。抽出・精製した環境DNA溶液を用いて1st PCRを行った。プライマーはマニュアルに記載のユニバサルプライマー-MiFish-E, MiFish-U, MiFish-U2の3種を1:2:1の比率で混合したものを使用した。1サンプルあたり8連のPCRを実施し、その8連のアンプリコンを混合したものを2nd PCRに用いた。作成したライブラリーはiSeq™100システム（Illumina）を用いて、シーケンシ

ング解析を行った。

次に、取得したDNAリード配列について、解析ソフトPMiFish pipeline v2.4.1を用いて魚種の同定を行った。得られた種名のうち検出配列のリード数が3以下のものは除外し、一致率が98.5%以上の種名について環境省生物多様性センター作成の「MiFish法に係る誤同定チェックシート」（[https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish\\_checksheets\\_ver1\\_0.xlsx](https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_checksheets_ver1_0.xlsx)）を用いて精査を行った。さらに過去の捕獲調査や文献調査の結果を参考に種名を整理した。なお、本研究で使用した12S rRNA領域では種の識別が困難であった分類群（フナ属、ヨシノボリ属及びビチブ属）は属名の識別までを行った。また、「環境省レッドリスト2020」<sup>5)</sup>、「福岡県の希少野生生物 福岡県レッドデータブック2014」<sup>6)</sup>、「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」及び「福岡県希少野生動植物の保護に関する条例」のいずれかに記載の種については希少種として分類し、「外来生物法」、「我が国の生態系等に被害を及ぼすおそれのある外来種リスト」<sup>7)</sup>及び「福岡県侵略的外来種リスト2018」<sup>8)</sup>のいずれかに記載の種については外来種として分類した。

## 3 結果

各河川において捕獲調査及び環境DNA調査で確認・検出された割合と種数を図1及び表2に示す。なお、本調査では調査した17地点ごとに種名又は属名まで識別しているが、その中には希少種が含まれており、本市では希少種の確認地について非公表としているため、本報告では河川名と種数の報告に留める。また、下流域において環境DNA調査によりスケトウダラとイトヨリダイを検出した河川があったが、これらの種は生息域が異なることと、これまでの捕獲調査や文献調査で確認された実績がないことから、生活排水由来と考えられたため、種数の計上から除外した。

7河川中5河川で環境DNA調査により検出された種数が捕獲調査により確認された種数より多く、1河川で同数、1河川で少ない結果であった。捕獲調査と環境DNA調査で確認・検出した合計種数のうち、両調査で共に確認・検出された種数の割合は、最も高い室見川で76%、最も低い多々良川で35%であった。一方で、多々良川では環境DNA調査のみで検出された種が42%（20種）と7河川中で最も高かった。これは捕獲調査で確認できなかった種を環境DNA調査で多く検出した結果であると考えられる。さらに、環境DNA調査でのみ検出された希少種及び外来種は7河川中どちらも最大4種であり、捕獲調査のみで確認された希少種は3種、外来種は2種

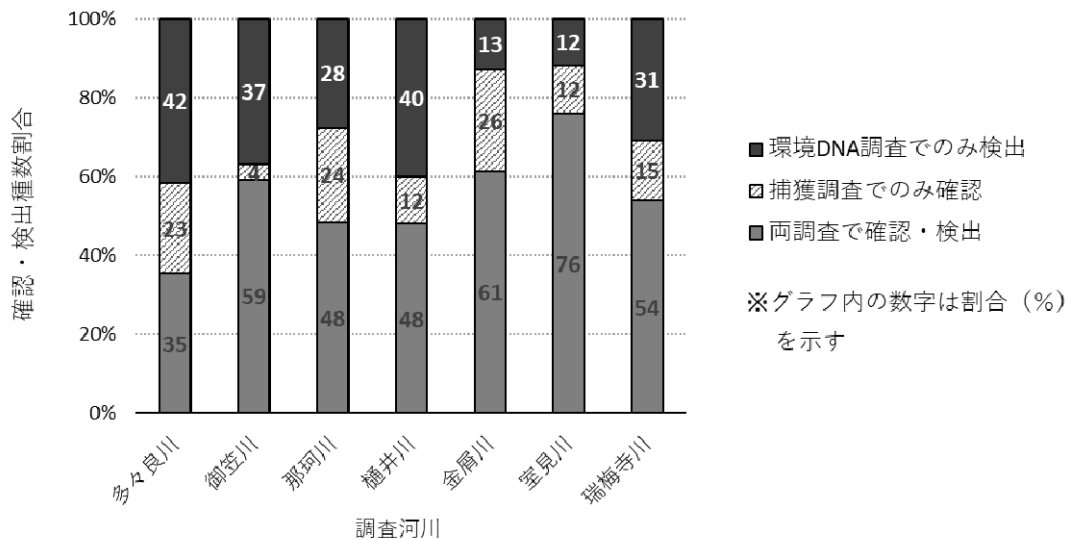


図1 捕獲調査及び環境DNA調査で確認・検出された割合

表2 捕獲調査及び環境DNA調査で確認・検出された種数

	多々良川	御笠川	那珂川	樋井川	金屑川	室見川	瑞梅寺川
両調査で確認・検出した種数	17	16	14	12	19	19	14
(希少種)	(1)	(1)	(3)	(0)	(2)	(7)	(3)
(外来種)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)
捕獲調査のみで確認した種数	11	1	7	3	8	3	4
(希少種)	(3)	(0)	(2)	(0)	(1)	(1)	(1)
(外来種)	(0)	(0)	(1)	(2)	(1)	(0)	(0)
環境DNA調査のみで検出した種数	20	10	8	10	4	3	8
(希少種)	(4)	(2)	(2)	(4)	(2)	(0)	(1)
(外来種)	(4)	(2)	(2)	(1)	(2)	(3)	(1)
合計種数	48	27	29	25	31	25	26
(希少種)	(8)	(3)	(7)	(4)	(5)	(8)	(5)
(外来種)	(6)	(2)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)

( ) は内数

であった。

また、環境DNA調査では上流域に比べ下流域ほど検出種数が多い傾向が見られた。(データ詳細未掲載)これは下流域に生息する魚類の種数が多いことに加え、下流の河川水ほど、そこに至るまでに排出された様々な環境DNAを含有・検出していることによると考えられる。その中には、実際の採水地点には存在しなかった種のDNAが含まれている可能性があるが、今回の精査では明らかに生活排水由来と考えられる種以外の判別は困難であった。

#### 4 まとめ

市内7河川計17地点において捕獲調査と環境DNA調

査を同時に行い、確認・検出された魚種の比較を河川ごとに行った。その結果、捕獲調査と環境DNA調査で一致して確認・検出した種数の割合は35~76%であった。7河川中5河川で環境DNA調査により検出された種数が捕獲調査により確認された種数より多かった。環境DNA調査のみで検出された種は最大20種であり、その中には希少種と外来種が最大各4種含まれていた。環境DNA調査は、プライマーの特性により種の識別が困難である分類群が存在し、また、その場に生息していない生活排水由来等の魚類も検出するためデータの精査が必要ではあるが、捕獲調査では確認できなかった種や個体数が少ない種を検出できるメリットがあると考えられる。さらに、この特徴を活かし、環境DNA調査による非捕獲での希少種及び外来種の探索やモニタリングに利用可能であると考えられる。一方で、捕獲調査のみで確認された

種も最大 11 種存在したことから、捕獲調査と環境 DNA 調査の結果を相互に補完することにより、魚類モニタリング精度の向上に有効な手段になると考えられる。

### 文献

- 1) 宮正樹：環境 DNA メタバーコーディングー魚類群集研究の革新的手法バケツ一杯の水で棲んでいる魚がわかる技術，化学と生物，Vol.57, No.4, 242～250, 2019
- 2) 今藤夏子，他：霞ヶ浦における定置網と環境 DNA を用いた魚類調査と種多様性の比較，水環境学会誌，Vol.41 (A) ， 137～139, 2018
- 3) 環境省自然環境局生物多様性センター：環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 改訂第 2 版，1～5，2022 年 6 月
- 4) 一般社団法人環境 DNA 学会：環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver.2.2, 34～76, 2020 年 4 月 3 日発行
- 5) 環境省：環境省レッドリスト 2020<<https://www.env.go.jp/content/900515981.pdf>> (令和 5 年 4 月 7 日閲覧)
- 6) 福岡県環境部自然環境課：福岡県の希少野生生物 福岡県レッドデータブック 2014<<http://www.fihes.pref.fukuoka.jp/~kankyouseibutsu/rdb/rdb2014/all.pdf>> (令和 5 年 4 月 7 日閲覧)
- 7) 環境省・農林水産省：我が国の生態系等に被害を及ぼすおそれのある外来種リスト (生態系被害防止外来種リスト) <<https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/iaslist.html>> (令和 5 年 4 月 7 日閲覧)
- 8) 福岡県環境部自然環境課：福岡県侵略的外来種リスト 2018<<https://www.pref.fukuoka.lg.jp/contents/sinryakugairai.html>> (令和 5 年 4 月 7 日閲覧)