

河川環境整備の検討における環境DNAの活用事例

いこま あゆむ いのくち けん かがわ やすよし のぞえ けんじ かがわ まき
○生駒 歩¹・井口 謙¹・賀川 泰棋¹・野副 健司¹・賀川 真樹¹

¹いであ(株) 名古屋支店(〒455-0032 愛知県名古屋市港区入船1-7-15)

本業務では、揖斐川と長良川において環境DNAを用いた魚類調査を実施し、その有用性について検討した。揖斐川のワンド群において、環境DNA調査と採捕調査を実施したところ、各ワンドで採捕された魚種の内、平均90%を環境DNAにより検出できた。長良川では、河川整備に伴う重要種イトモロコの移植候補地を検討するため、事前に環境DNA調査を行うことにより、広範囲かつ多様な環境から生息環境を抽出し、採捕調査と合わせて移植後も再生産が可能と考えられる地点を選定した。これらの結果から、ワンド等の緩流域における魚類調査手法として環境DNAは有用であり、採捕調査との組み合わせで効率的に魚類の生息状況を把握できると考えられた。

Key Words : 環境DNA, 魚類調査, 重要種, ワンド, 緩流域, 河川環境整備

1. はじめに

国土交通省木曽川上流河川事務所管内では、水辺の湿地再生や緩流域再生などの河川環境整備事業が多く実施されている。これらの事業効果を把握するためには、整備前後の生物の生息状況を比較する必要があるが、魚類調査をはじめとした各種生物調査が実施されている。

魚類調査において、最も一般的に行われている方法は、漁具を用いて魚類を採捕する手法である(以下、採捕調査とする)。本手法は、実際に現地にて生物を採集することで、確実な魚種の確認を行うことができる一方で、調査には時間と労力を要することから、広範囲において調査を行う場合には、限られた期間やコストの中で生物の生息状況を把握するために、調査地点の抽出や、地点あたりの調査労力を軽減することが課題となっている。

こうした課題を解決する手法の1つとして、環境DNAを用いた調査が挙げられる。本調査法は、近年普及しつつある手法で、環境中に存在する生物の微量なDNA(環境DNA)を検出することで、その環境に生息する生物を推定する技術である。分析には特殊な機器や試薬等が必要となるが、調査地点での作業としては、一定量(1L程度)の水を汲み取ってのみであり、簡便で調査労力の削減につながるため、特に水域の生物調査において幅広く活用され始めている。

一方で、本手法には課題も存在する。分析精度について、偽陽性(本来は生息していないが生息していると評価)や偽陰性(本来は生息しているが生息していないと評価)といった誤った解釈を招く現象が起こりうる。そのため、こうしたエラーを可能な限り排除するためには、従来の採捕

調査と環境DNA調査の結果を十分に比較・検討をする必要があるが、採捕調査と環境DNA調査の結果を比較した事例は少なく、十分に検証がなされているとは言い難いのが現状である^{1)・2)}。

こうした現状を踏まえ、本業務において河川環境整備や保全対策の検討に伴う魚類調査において、従来の採捕調査に環境DNA調査を加えた調査を実施したことから、両手法の結果の比較や河川環境における環境DNA調査の有用性について検討を行った。

2. ワンドにおける魚類採捕調査と環境DNA調査の比較

(1) 調査の背景

揖斐川では、「木曽川上流自然再生計画書」³⁾に基づき、ワンド等湿地環境の再生が検討されている。ワンド周辺の樹林化の進行や、一部ワンドでの底泥の堆積等の課題が確認されたことから、タナゴ類をはじめとする在来魚類や二枚貝の生息・繁殖環境を再生・保全することを目標としている。検討にあたっては、タナゴ類や二枚貝類の過年度の生息状況に基づき、優先的に再生すべき箇所をワンド再生候補エリアとし、エリア周辺のワンドにおいて、対策を検討するための現況把握調査が行われている。また、当該区間では近年、ワンド周辺の広範囲な樹木伐開が行われていることから、それらの効果や影響等も踏まえ、対策が検討されているところである。

本調査では、ワンドに生息するタナゴ類を中心とした魚類の生息状況を把握するため、環境DNA調査と採捕調査を実施することとした。

(2) 調査地点

揖斐川のワンド再生候補エリアを中心に、ワンドの面積や本川との接続状況、樹林化の程度、現地踏査の結果に基づき、左右岸10地点を選定して実施した（表-1）。

(3) 調査手法

a) 環境DNA調査

環境DNA分析用サンプルとして、令和4年6月29日に調査地点ごとに河川水を1,000mL採水し、MiFishプライマーを用いたメタバーコーディング解析を行った。

採水及び分析の手順については、環境DNA学会から公開されている「環境DNA調査・実験マニュアル ver. 2.2⁴⁾」および先行研究⁵⁾に準拠し実施した。なお、マグロ類やアジ類といった淡水域には生息していない種が検出された場合は、リストから除外した。

b) 採捕調査

採捕調査は令和4年6月28日から7月1日にかけて実施し、投網、タモ網、サデ網、定置網（定置網は設置するのではなく魚類追い込みに使用）、セルビンによる採捕を行った。採捕した魚類は種の同定、計数、標準体長の計測（最大、最小個体）を行った。

(4) 調査結果の比較

環境DNAの検出結果を表-1に、採捕調査と環境DNA調査の比較結果を図-1に示す。

採捕調査で確認された、各地点7～18種の魚類のうち、73～100%の魚種を環境DNA調査で検出することができた。環境DNAの検出率が低かったワンドについて、ワンドの形状（開放・閉鎖、面積等）との関連性は見出すことができなかったが、採捕調査で確認された魚種について、概ね環境DNAでも確認できることが分かった。特にSt.Cにおいて採捕調査で1個体のみ捕獲されたカワバタモロコ（環境省レッドリスト2020：絶滅危惧IB類）が環境DNAでも検出された。採捕調査の結果や周辺での本種の生息情報から、St.Cに生息する本種の個体数は非常に少ないと想定されるが、採捕のみならず環境DNAでも検出できたことから、魚種によっては本手法の精度は高いことが分かった。

環境DNAは検出されず、採捕調査のみで確認された種（偽陰性）は各地点で0～20%あり（表-2）、地点によって魚種は異なっていたが、ヌマムツとコクチバスは採捕された全地点で偽陰性であった。ヌマムツは止水域を好む魚種であるが、揖斐川中流部のような平野部を流れる大規模な河川ではなく、山地から平野に移行するあたりの泥っぽい小河川が主な生息地であるとされている⁶⁾。コクチバスは比較的流水環境に適応した魚種であり⁶⁾、ワンドは主な生息環境ではないと考えられる。その他の偽陰性についても、遊泳性の魚種が多いことから、避難場や休息場として一時的

にワンドを利用していた個体が偶発的に採捕されたと考えられ、ワンドを主な生息場としている魚種と比較して、排出されたDNA量が相対的に少なく、環境DNAが検出されなかった可能性が考えられる。

一方、環境DNAのみで検出した種（偽陽性の可能性がある種）は、各地点で25～50%あった。これらには、コイ科やドジョウ科、ナマズ科等のワンド環境を主な生息場や繁殖場としている種が多く含まれているが、採捕調査では確認されなかったことから、ワンド内における生息数が少ないために採捕調査では確認されなかった可能性が考えられるが、詳細な原因については不明であり、今後の課題である。

本調査の結果、採捕された魚種の内、平均90%の魚種を環境DNAにおいて検出できたことから、ワンド等の緩流域においては、環境DNA調査が非常に有用なツールであることを示していると考えられる。

表-1 調査ワンドの特性と環境DNAの検出結果

調査地点	ワンドの形状	面積 (㎡)	水深 (cm)	水温 (℃)	環境DNA検出率 ^{注)}	備考
右岸	A 閉鎖	693	16	36.3	90.9	
	B 開放	1,446	34	34.2	83.3	
	C 閉鎖	699	20	28.1	92.9	
	D 閉鎖	1,273	42	25.7	85.7	樹木繁茂
左岸	E 閉鎖	874	11	37.7	100.0	
	F 閉鎖	1,092	16	38.1	73.3	
	G 閉鎖	4,488	24	35.7	80.0	
	H 開放	4,461	23	36.1	100.0	
	I 閉鎖	927	25	34.3	100.0	
	J 閉鎖	409	48	27.6	77.8	湧水有

注) 環境DNA検出率：採捕調査で確認された魚種の内、環境DNAで確認された魚種の割合

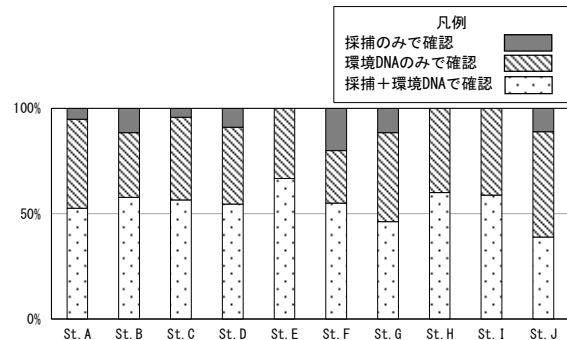


図-1 採捕調査と環境DNA調査の種数比較

表-2 採捕調査のみで確認された種（偽陰性）

No.	目名	科名	和名/地点名
1	コイ目	コイ科	ヌマムツ
2			カマツカ
3			ニゴイ / コウライニゴイ
4	ボラ目	ボラ科	ボラ
5	カダヤシ目	カダヤシ科	カダヤシ
6	ダツ目	メダカ科	ミナミメダカ (ヒメメダカを含む)
7	スズキ目	サンフィッシュ科	オオクチバス
8		ハゼ科	コクチバス
9			マハゼ
10			ウキゴリ
11			ゴクラクハゼ
12			ヨシノボリ類 ^{注2)}

注1) 1地点以上で偽陰性であった種を示す。

注2) ヨシノボリ類には、複数種が含まれる可能性がある。

3. 環境DNAを活用した移植候補地の検討

(1) 検討の背景と方針

長良川中流域では遊水地整備が計画されているが、本流域においては、重要種のイトモロコ（岐阜県レッドデータブック2010：準絶滅危惧）が確認されている^{6), 7)}（表-3）。

表-3 イトモロコの生態情報

イトモロコ <i>Squalidus gracilis gracilis</i>	
	・河川の中下流域や、用水路の流れの緩やかな砂底、砂礫底に生息する。
	・主として底層を遊泳する。
	・砂または砂泥底で産卵する。

整備内容を検討するにあたり、本種への影響が懸念されたことから、整備区域内における本種の生息状況の把握、整備区域外における移植候補地の検討が喫緊の課題となり、魚類調査を実施することとなった。しかしながら、検討にあたっては、広範囲な流域から短期間で候補地を抽出する必要があり、効率の良い調査が求められた。このため、採捕調査の事前に環境DNA調査を実施し、イトモロコの生息可能性が高いと判断された地点で採捕調査を実施する方針とした（図-2）。

調査地点の抽出にあたっては、航空写真を用いて対象範囲約20kmからイトモロコの生息に適したワンド、副流路等の緩流域を抽出し、現地踏査によって環境DNA調査を行う10地点を選定した。

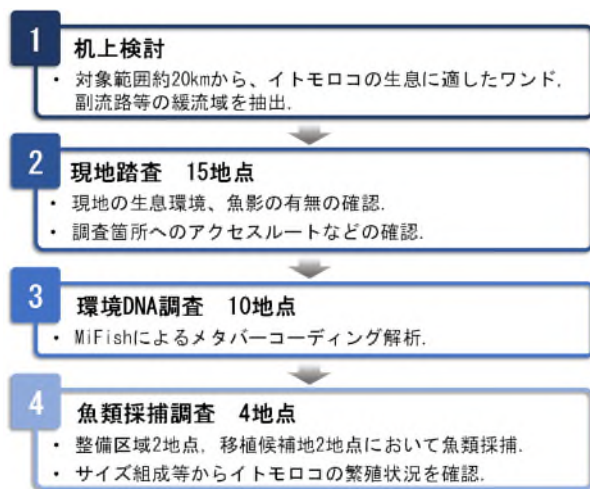


図-2 調査依頼から候補地の提案までのフロー

(2) 環境DNA調査による採捕調査地点の抽出

環境DNA調査は、令和4年7月5日に移植候補地7地点と整備区間3地点の計10地点で行った。なお、環境DNAの採水及び解析手法については、「2. 緩流域における魚類採捕調査と環境DNAの比較」と同様とした。

解析の結果、イトモロコのDNAは移植候補地の3地点と、整備区間の3地点で検出された（表-4）。

移植候補地のうち1地点（St.1）は、流速が速く本種の移植候補地として適していないと考えられたため、採捕調査地点からは除外した。整備区間については3地点（St.5～7）全てで環境DNAが検出されたことから、整備区間の副流路全域に本種が生息していると考え、本区間における生息状況を把握するため、整備予定地にSt.11、St.12を新たに設置し、計4地点で採捕調査を実施することとした。

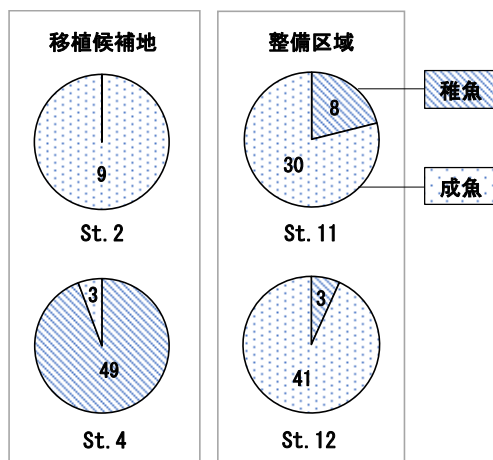
表-4 各地点におけるイトモロコの環境DNAの検出状況

地点	地点区分	地点の概要	環境DNA
St.1	本川	調査対象範囲の最上流部	○
St.2	副流路A	礫河床で水際の一部分に植生・緩流域あり	○
St.3	副流路B	排水樋管から続く副流路、砂泥底で水際に植生が多い	-
St.4			○
St.5	副流路C	既往調査でイトモロコの生息確認	○
St.6			○
St.7			○
St.8	支川	整備区間近傍の支川	-
St.9		整備区間下流の支川 合流部がワンド形状	-
St.10		調査対象範囲の最下流に合流する支川 既往調査でイトモロコの生息確認	-

注) 環境DNA:「○」は調査地点においてイトモロコが検出されたことを、「-」は検出されなかったことを示す。

(3) 採捕調査による移植候補地の選定

採捕調査は令和4年8月8日から9日にかけて実施し、その結果を図-3に示す。地点によって採捕された個体のサイズや個体数は異なっていたものの、DNAが検出された全地点において、イトモロコが確認された。また、St.2、11、12については流水環境であるにもかかわらず、環境DNA調査・採捕調査の両方においてイトモロコを検出・確認されたことから、環境DNA調査は流水環境でも有用な手法である可能性が示された。



注) グラフ中の数字は採捕された個体数を示す。

図-3 イトモロコの成長段階ごとの個体数

地点ごとの成長段階をみると、移植候補地の St. 2 では、成魚のみしか確認されなかったが、St. 4 と整備区域である St. 11, 12 では、稚魚も複数個体確認された。

イトモロコは流れの緩やかな砂泥底で産卵することが知られている⁷⁾。稚魚が確認された3地点では、流れの緩やかな砂礫や砂泥環境が地点内に存在しており、繁殖に適した環境であると考えられる。特に、移植候補地の一つである St. 4 は、地点全域が流れの緩やかな砂泥底であることに加え、岸際は稚魚の隠れ場所となる植生が豊富で、本川からも隔離された環境であることから、本川から稚魚が流下してきた可能性は低く、本地点内で繁殖していると考えられた。このことから、St. 4 は移植に適した地点であると評価した（表-5）。

一方、St. 2 は、流れの緩やかな砂泥環境が地点内に点在するものの、St. 4 と比較してその面積は小さく、稚魚も確認されていないことから、本地点は繁殖場としては機能しておらず、一時的な生息場である可能性が高いと考えられた。但し、移植後のリスク分散という観点から、生息地を複数箇所に設けることは重要であり、成魚の生息地として機能している St. 2 も、移植候補地の候補に含めて問題無いと評価した。

表-5 移植候補地点の適性評価

	St. 2	St. 4
繁殖状況	稚魚未確認	稚魚を多数確認
緩流域の有無	地点の一部が緩流域	地点全域が緩流域
避難場の有無	水際植生が少ない	水際植生が多い
総合判定	△ 生息地としては適しているが、繁殖地としては不適	○ 生息地としても、繁殖地としても適している

4. まとめ・今後の展望

本調査では、環境DNA調査と採捕調査の結果を比較することで、環境DNA調査の有用性について検討した。

揖斐川の事例においては、環境DNA調査でワンドに生息する魚種の平均90%を確認できたことに加え、生息個体数が少ない重要種も検出できた。今後の河川環境整備において、広範囲の流域や多数の調査地点で魚類の生息状況を把握する際の調査手法の一つとして、環境DNA調査の活用が期待される。

長良川の事例においては、広範囲の流域から短期間で重要種の生息状況を把握するため、採捕調査の事前に環境DNA調査を行い、調査地点を抽出することによって効率的に移植候補地を選定することができた。イトモロコの環境DNAが検出された全ての地点で本種が採捕されたことから、環境DNA調査の精度の高さが示された。また、本調

査では緩流域だけでなく、流水域でも環境DNA調査を実施したが、どちらの環境でも環境DNAにより対象種を検出できる可能性が示され、汎用性の高さが示唆された。これらのことから、ワンド等の止水域、緩流域のみならず、河川等の流水域における環境整備においても、保全対象種の生息状況の把握等に、応用できるものであると考えられる。

一方で、採捕調査では確認されたものの、環境DNAでは検出されない偽陰性や、環境DNAのみが検出される偽陽性の可能性も示唆された。また、流水域においては、上流側の本川等から流下してきた環境DNAを検出している可能性も考えられるため、流水域における対象種と環境DNAで確認するための採水方法については、今後の課題である。これらのことから、魚類の生息状況の把握には、従来の採捕調査と組み合わせた形で環境DNA調査を利用することが望ましく、目的や状況に応じた柔軟な利用を実施していくことが重要であると考えられる。

謝辞：本業務の実施にあたり、国土交通省木曽川上流河川事務所の関係者の皆様にはご指導、ご協力を頂きました。感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 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, pp. 613-620, 2016.
- 2) 丹羽英之, 坂田雅之, 源利文, 清野未恵子：河川における流れ500m間隔での環境DNA分析と現地採集調査による魚類検出結果の比較, 保全生態学研究, 23, pp. 257-264, 2018.
- 3) 国土交通省 中部地方整備局 木曽川上流河川事務所: 木曽川上流自然再生計画書, 2011.
- 4) 環境DNA学会編：最新版マニュアル 環境DNA調査・実験マニュアル (ver. 2.2), 2020.
- 5) M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki: 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.*, 2: 150088, 2015.
- 6) 岐阜県編：岐阜県の絶滅のおそれのある野生生物（動物編）改訂版-岐阜県レッドデータブック（動物編）改訂版- 5. 魚類 イトモロコ, 2010.
- 7) 向井貴彦：岐阜県の魚類, 2017, p. 58, p. 86, p. 156.