

# 終了課題成果報告書

研究テーマ名	県内河川の魚類生息密度推測法への環境DNA分析の適用の検討						
研究担当者(共同研究者含む)	木持謙、渡邊圭司、田中仁志						
実施期間	平成30年度 ～ 令和元年度 (2か年)						
研究区分	自主研究事業						
研究費(千円)	30年度	元年度	年度	年度	年度	研究費合計	備考
自主研究費	600	600				1,200	
関連外部資金							
環境基本計画上の位置付	(目標) 再生したみどりや川に彩られ、生物の多様性に富んだ自然共生社会づくり (施策) 生物多様性の保全						
背景と目的(目標設定)	<p>従来の BOD 等の水質情報に基づく生息環境評価に対して、これからの水環境施策は、生物多様性の保全・改善も視野に入れた希少種保全策・外来種対策等が重要である。そのためには、対象生物の生息実態の的確な把握が必要となるが、捕獲に基づく従来の生物調査法は、多くの人員と時間を要する、調査者の技術が結果に影響する可能性がある、作業に伴い生息環境を荒らす恐れ(特に希少生物調査の場合)があるといった課題があった。</p> <p>近年、環境 DNA 分析による生物調査手法が着目されており、捕獲調査との併用で、調査の効率化と精度改善が期待される。生物から排泄物や代謝物等を通じて環境中に放出された DNA を環境 DNA とよび、これを分析することで、存在する生物の種類や調査対象生物の在・不在等を調べることができる。</p> <p>本研究では、特定外来生物のククチバス (<i>Micropterus dolomieu</i>) を対象として、環境 DNA 分析を用いて、河川における本種の分布や挙動を把握する手法について検討した。なお、本種は最大約 50cm に成長し、魚類・水生昆虫等を食害する。低水温に強く、流れのある環境にも生息可能なことから、河川の多い本県では急速に分布を拡大しており、特に問題視されている。</p>						
研究内容(緊急性・必要性、新規性・独創性)	<p>ククチバスの駆除対策等を進める上では、効率的な生息実態の把握が必要不可欠である。そこで、定量PCRによる河川水中の本種のDNAの検出・定量方法について検討した。</p> <p>1. ククチバスのDNAの検出・定量法の構築</p> <p>既往研究等も参考に、まず、適切な試料採取～前処理方法(ろ過、DNA抽出等)について検討した。また、本種や近縁種オクチバスの体組織(尾鰭)やこれらの飼育水槽水を用いて、本種のDNAを特異的に増幅・可能なPCRプライマー等を検討した。定量PCRについては、インターカレーター法とプローブ法によるリアルタイムPCRを中心に、DNA増幅・検出の適正条件等を検討した。</p> <p>2. ククチバスからの放出DNAの挙動の検討</p> <p>1. の手法を用いて、水槽実験により、本種から水中へのDNAの放出と、主に生分解に起因するとされるDNA量の減衰の挙動を検討した。水槽に、残留塩素処理をした水道水、少量の淡水魚飼育水(微生物源の目的)、本種1個体(生体)を投入し、一定時間経過後に個体を取り出した。定期的に水槽から水試料を採取し、含有される本種のDNAコピー数を分析した。</p> <p>3. 河川水におけるククチバス放出DNAの検出・定量と生息密度推測法の検討</p> <p>河川水質常時監視地点や、本種の生息確認・駆除対策実績等のある地点から選出した入間川水系の7地点を主な対象として、季節ごとに2年間の調査・試料採取を実施した。また、本種の高密度生息域において、流下方向に調査を行った。</p>						

## 成果の概要(目標達成度)

### 1. コクチバスのDNAの検出・定量法の構築

試料のろ過には、カートリッジ式フィルターが、低汚染リスクで取り扱いが容易と考えられた。しかしながら、懸濁物質量が多い試料では、ガラス繊維フィルター等の使用や、場合によっては2段ろ過(大孔径のガラス繊維フィルター→カートリッジ式フィルター)が有効と考えられた。

定量PCRでは、インターカレーター法・プローブ法ともに本種のDNAを特異的に増幅・検出することができたが、特異的検出性能はプローブ法の方が高いことから、以降の検討はプローブ法で進めることとした。なお、定量下限値は、分析作業過程由来と考えられる試料の汚染にも影響され得ることが、同一試料の繰り返し分析によって確認でき、汚染防止への細心の注意の必要性が示された。

### 2. コクチバスからの放出DNAの挙動の検討

水槽実験の結果、水槽水中の本種の検出DNAコピー数は、本種生体の存在下では時間経過に伴い増大し、生体の取り出し後24時間程度で、取り出し時の約1/10に減少した。このことから、定量PCRにより、生体からのDNA放出～減衰(生分解)の挙動の定量的な追跡を行うことができた。

### 3. 河川水におけるコクチバス放出DNAの検出・定量と生息密度推測法の検討

水槽実験試料に比較して、存在するDNAコピー数が格段に少ない、河川水試料中の本種のDNAを検出・定量することができた。地点ごとの分析結果から、本種の生息数が多い(目視による)地点では検出DNAコピー数が多くなる傾向があった。また、季節的な視点からは、検出DNAコピー数は初夏～夏季が多かった一方で、冬季に少ない(あるいは定量下限値未満)傾向があった。これらは、本種の繁殖形態(初夏が産卵期)や、季節による活性の違い等が反映された結果と考えられる。

以上から、本研究のコクチバスDNAの検出・定量法を用いて、本種の地域的分布、地点ごとの生物量(バイオマス)の大小、河川等における季節的な挙動等のある程度は把握することができた。広範囲・効率的に多くのデータが得られることから、従来法では難しい解析・検討が可能となり、効果的な(駆除)対策等への活用が十分期待できると考えられる。

## 成果の公表(発表・投稿、講演会の開催、報道機関の活用、特許取得等)

現在、学会発表や学術誌投稿等の準備を進めている。

## 成果の発展性(埼玉県(行政・地域)への貢献、技術発展・実用化、課題等)

### 【本県行政や地域への貢献】

#### ・特定外来生物対策の効率・効果的な遂行

県内河川等で本種の生息可能性のある地点のふるい分けに活用できる。加えて、季節における高密度生息地点も抽出することで、対策地点へのマンパワー等のさらなる集中的な投入が可能となる。

#### ・新しい生物調査手法としての県民へのアピール

水質分析による生物調査という新技術として県民にアピールするとともに、河川愛護団体等の現地学習会等で、得られた情報等を活用いただく。

### 【技術発展・実用化可能性】

#### ・稀少生物保護保全策

生息地非破壊的な調査が可能のため、希少水生生物の生息数調査において、実捕獲調査の精度補完で貢献できる。具体的には、季節ごとに年4回の環境DNA調査分析で対象生物の生息密度の傾向を把握するとともに、数年に1回の捕獲調査により生息実数を推計する、といった導入が考えられる。

### 【今後の課題等】

#### ・非年魚(コクチバス含む)の生息密度推測精度の確保

アユ等の寿命が約1年の魚類(年魚)であれば、時季により大きさがある程度そろっているため、検出DNAコピー数と生息密度(匹/単位面積)は比較的相関が高いが、非年魚の場合は、生物量と個体数の関係を見だしにくいいため、さらなる検討が必要である。