

環境DNA分析の野外調査への適用に対する結果と考察



田中 千暉

REPORT

技術本部 河川砂防環境グループ
田中 千暉

概要

環境DNA分析は、水中や大気中に含まれる生物のDNAを採取・分析することで調査対象種の生息の有無や、生息している生き物を網羅的に把握することが可能な技術とされている。本技術を野外調査に適用することが可能となれば、調査に係る労力の軽減や、調査によって生じる生息環境への負荷を低減することが可能となる。

本レポートでは、道北の山地溪流において、ニホンザリガニ(以下、「ザリガニ」として記載)を対象とした環境DNA分析を行い、現時点において野外調査に適用可能かどうか考察を行った。なお、本分析の考察を行うにあたって、従来手法となる採集法による調査も合わせて行った。

キーワード ●環境DNA分析 ●種特異的解析 ●ニホンザリガニ ●網羅的解析 ●PCR解析

1. 環境DNA分析とは

環境DNA分析とは、河川水等を採水・分析することで生き物の種類や生息密度を調査する技術である(図-1参照)。水中に含まれる生物由来のDNAを対象に分析することが多いが、大気中や土中に含まれるDNAを対象とした解析も近年行われている。

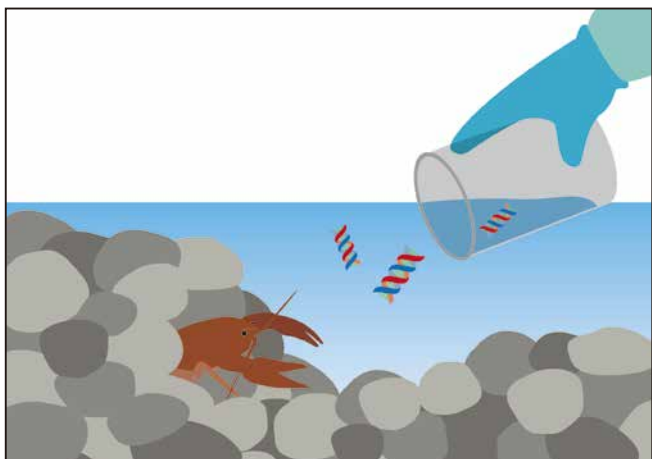


図-1 環境DNA分析のイメージ

分析手法は、『網羅的解析』と『種特異的解析』に大別され、調査目的により、分析手法を使い分ける(表-1参照)。

『網羅的解析』とは、採水地点周辺に生息する生物を網羅的に把握することができる手法である。

『種特異的解析』とは、採水地点の周辺に調査対象種(1種類に限定)がどの程度生息しているのかを把握することができる手法である。

表-1 分析手法の比較

網羅的解析	
目的	・ここに何が生息しているか
利点	・多くの種を対象に分析できる
欠点	・分析の精度が種特異的解析より低い
種特異的解析	
目的	・対象種がそこに生息しているか ・対象種がどれくらい生息しているか
利点	・分析の精度が網羅的解析より高い
欠点	・一種の情報しかわからない

ここでは、環境DNA分析の分析手順について概説する(図-2参照)。環境DNA分析は、採水後にフィルターろ過、DNAの抽出といった作業を経て、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)解析を行う。

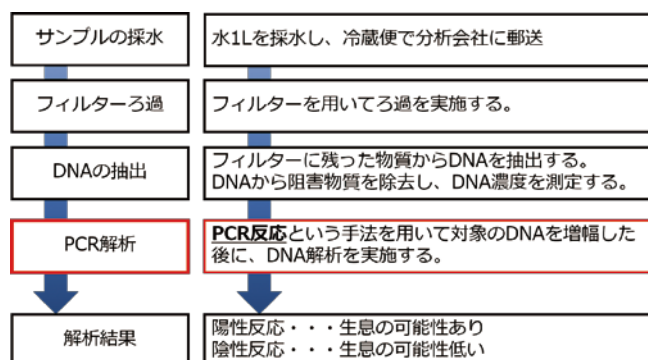


図-2 環境DNA分析の手順

PCR解析とは、2本鎖で構成されているDNAが高温下で1本鎖に分かれることを利用し、別れた鎖をポリメラーゼという酵素で構成された1本鎖と再結合させることで、DNAを増幅させる手法である(図-3参照)。PCR解析を行い、DNAを増幅した後に、DNA解析を行うことで調査対象種が生息しているのかを判断することができる。

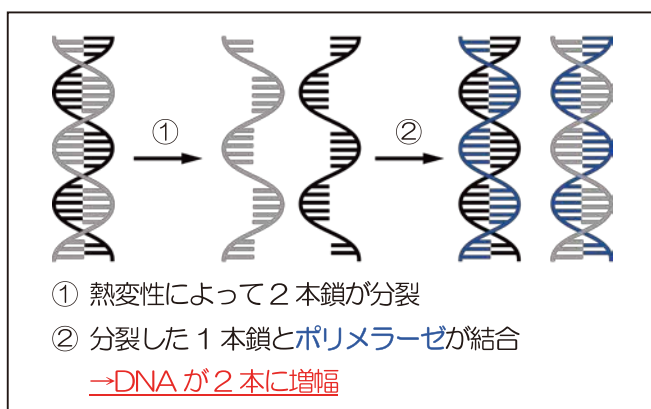


図-3 PCR反応の簡易模式図

環境DNA分析を実用化することによって、以下の効果が期待できる。

① 労力・コストの低減

- ・調査時間の短縮
- ・安全性の向上
- ・低コストでの調査が可能

② 生息環境への負荷低減

- ・踏み荒らしの防止
- ・病原菌等の持ち込み回避

③ 調査結果のバラツキ防止

- ・調査員による調査結果のバラツキを防ぐ

2. 調査対象種の選定について

調査対象種としては、採集法に比べ、環境DNA分析を実施することで上述の効果を大いに期待できるザリガニ(写真-1参照)を選定した。

ザリガニは、かつて北海道・東北北部地方に広く生息していたが、開発行為による水環境の悪化や乱獲等、人為的な要因による個体群の減少が確認されていることから、環境省で絶滅危惧II類に指定されている。

そのため、工事による影響が懸念される場合は、採集法による捕獲調査を行い、影響範囲外への移植を実施することが多い。しかし、ザリガニは細流の河床礫中に生息しているため、調査に労力がかかる。

また、生息環境である河床礫を掘り返してザリガニを採集するため、調査自体が生息環境に与える影響が懸念される。

環境DNA分析をザリガニ調査に適用することが可能となれば、これらの影響を低減することが期待できる。



写真-1 ザリガニ(筆者撮影)

3. 調査目的の設定

環境DNA分析の野外調査への適用は、最近実用化され始めている技術であるが、調査地や調査対象種によっては、環境DNA分析による調査が不向きである事例が報告されている。そこで、本調査においては、現時点の分析技術を用いて「環境DNA分析が野外調査への適用が可能な技術であるかどうか」を明らかにすることを調査目的に設定した。

この目的を検証するにあたって、環境DNA分析と採集法によってザリガニを調査し、分析結果と採集結果が一致するかどうかで適用可能かどうか判断することとした。

分析手法としては、調査対象種がザリガニのみであるため、分析精度の高い『種特異的解析』で実施した。

4. 調査地の概要

調査地は道北の山地溪流N沢川である。道路工事に伴い、N沢川に橋梁が新設される予定になっている。その橋梁工事の際に、ザリガニの生息地が攪乱されるおそれがあるため、移植などの対策が必要な状況になっている。

調査範囲は、本川であるU川との合流点から上流300mの区間である(図-4参照)。この区間全域において、採集法と環境DNA分析による調査を実施した。なお、この区間のうち、橋梁より下流150mの区間において確認された個体については、橋梁より上流側に移植する計画となっていることから、調査を密に行った。

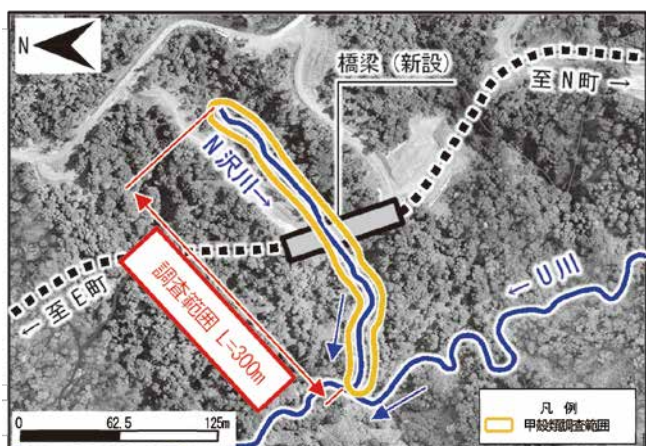


図-4 調査地の概要

5. 調査結果

(1) 採集法の結果

採集法による調査の結果、橋梁より約150m上流の地点において、2箇所で3個体確認した(図-5参照)。確認箇所はいずれも水温が9~12°Cの冷涼で、水の流れがほぼない環境であった(写真-2参照)。なお、橋梁より下流側では個体を確認できなかった。

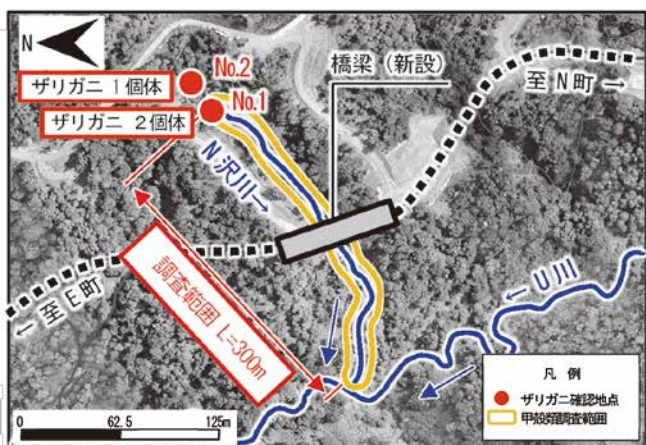


図-5 現地調査結果(採集法)



写真-2 ザリガニ確認箇所No1

(2) 環境DNA分析の結果

環境DNA分析による調査は、橋梁より下流側では、30mピッチで6サンプル、上流側では個体が確認された2箇所で3サンプルの合計9サンプル採水した。分析の結果、採集法でザリガニが確認されなかったNo.1,2,5の地点で陽性反応が検出された。一方、ザリガニが確認された地点では、陽性反応は検出されなかった(図-6参照)。

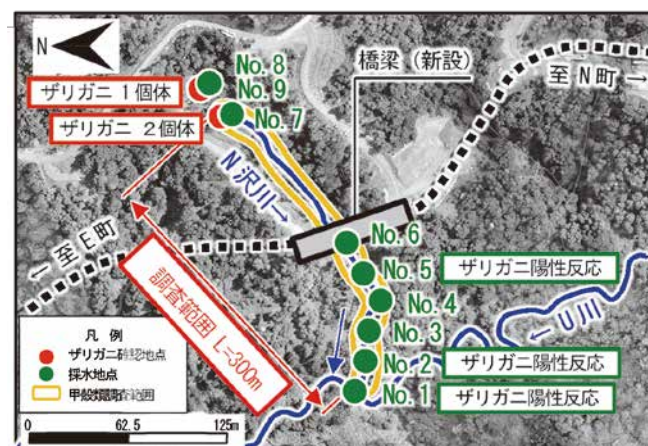


図-6 現地調査結果(環境DNA分析)

6. 考察

(1) 分析結果の考察

採集法と環境DNA分析には、整合性が確認されなかった。整合性がとれなかった理由について考察した。

1) 個体確認地点で陽性反応が検出されなかった要因

一般に、陽性反応が検出されない要因として、『流出』と『阻害』が考えられる。

『流出』とは、流水等によってザリガニのDNAが流出・拡散され、分析に必要なDNAが不十分となることを示す。『阻害』とは、分析の際に何らかの物質が環境DNAの分析工程を阻害し、DNAが検出されないことを示す。

『流出』と『阻害』について、現地状況等を踏まえて考察した結果、『阻害』が大きな要因であると考えられた。

ここで、DNAを増幅するPCR反応を阻害するPCR阻害物質に着目した。

PCR阻害物質とは、有機物が分解される際に発生し、土壌有機物の50%を占める腐植物質もPCR阻害物質の1つである。この腐植物質の生成環境がザリガニの生息環境と類似している。

ザリガニは落ち葉や生物遺骸を主な栄養源としており、堆積した落ち葉の下を生息環境とすることが多い。

つまり、ザリガニの生息環境には腐植物質が豊富に存在していると言える(写真-3参照)。これが、採集法で確認された地点で陽性反応が検出されなかった主な要因であると考えられる。



写真-3 ザリガニと落ち葉(筆者撮影)

2) 個体未確認地点で陽性反応が検出された要因

採集法で確認されなかった地点で、陽性反応が検出された要因を考察した。

No.1,2,5地点においては、図-7に示すV字谷のような河川形態をなしており、河岸部から水の染み出しが確認されている。河床部にはザリガニの生息が確認されなかったため、沢の斜面部に生息しているザリガニ由来のものが検出されたと考えられた。

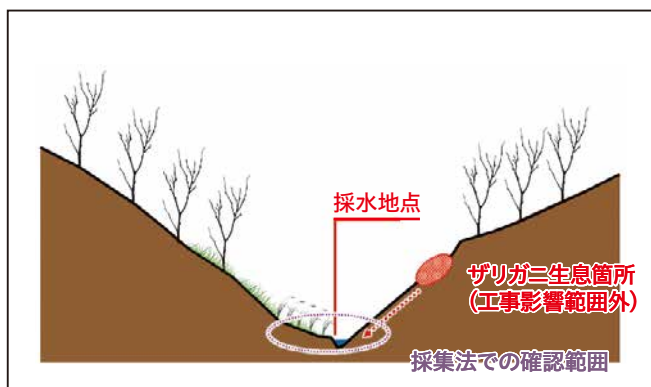


図-7 陽性反応検出箇所の横断イメージ

(2) 野外調査への適用の可能性について

これまでの考察を踏まえて、環境DNA分析がザリガニを対象とした調査で、野外調査に適用可能な技術かどうか考察した。

PCR阻害物質の除去技術は日々進化しているが、完全な除去技術までには至っていない。そのため、現時点では止水域に近い環境に生息しているザリガニのDNAを確実に検出することは困難であると判断した。

しかしながら、流水環境下では採集法と環境DNA分析の整合性が高い研究事例も発表されていることから、野外調査に適用できる可能性が高いと考えられる。

7. まとめ

環境DNA分析は、採集法に比べて低コスト・高パフォーマンスであるが、現時点の技術では調査対象や生息環境によっては、適用が難しい場合もある。

一方で、魚類を対象とした分析では、高い相関性を示す事例が多く報告されている。捕獲調査の前に環境DNA分析を実施することで、採水地点周辺に生息している可能性の高い重要種を事前に把握することができ、より効率的な調査時期・手法を用いて捕獲調査を実施することができる。

今後は、事前に環境DNA分析を行った上で、調査計画を立案し、採集法の調査を行っていくことが望ましいと考えられる。

<参考文献>

- 1) 川井唯史・高島雅一：ザリガニの生物学,2010年
- 2) 川井唯史：ザリガニの博物誌里山入門,2007年
- 3) 一般社団法人環境DNA学会：環境DNA調査・実験マニュアル Ver2.1,2019年
- 4) 池田幸資・田中一典・川井唯史・根岸淳二郎：Using environmental DNA to detect an endangered crayfish, *Cambaroides japonicus* in streams,2016年
- 5) 池田幸資など共著：環境DNAを用いたザリガニ及びウチダザリガニの分布と河川横断工作物の及ぼす影響把握,2018年