

湯沢砂防事務所管内における 環境調査の効率化の検討

笛木 久美¹・戸田 満¹

¹湯沢砂防事務所 調査課 (〒949-6102 新潟県南魚沼郡湯沢町大字神立23) .

湯沢砂防事務所では、環境調査の一項目として、以前より管内の河川において魚類調査等を実施している。魚類調査等は広い管内で実施しており、調査箇所が非常に多く、また、急流河川であるため安全面から調査実施に制約を伴う箇所も多い。現在、管内の魚類調査方法は、捕獲による作業を主として行っているが、現地での作業が採水のみである環境DNA分析を行う事により、生息状況の把握が可能となる新技術の研究が進められている。本論文では、砂防事業の対象となる山地河川の魚類調査において環境DNA分析が従来の魚類調査の代替として有効な調査手法になる可能性があるのか、調査精度と経済性の観点で検討した結果を報告する。

キーワード 魚類調査、効率化、経済性、環境DNA分析

1. はじめに

湯沢砂防事務所管内の環境調査のうち、特に魚類調査は、広範囲で実施されるため調査地区数は多く点在しており、急峻地形のため危険箇所も多い。また、作業が規制される自然公園内で実施する頻度も高いため、現場作業が採水のみと簡便な環境DNA分析は、砂防管内の有効な調査手法となる可能性がある。

本検討は、水中の魚類由来の環境DNAを対象に、環境DNA分析を実施し、調査精度と経済性の観点から、現在の魚類調査の代替となる可能性があるのか比較したため、検討結果を報告する。

2. 調査・検討内容

環境DNA分析による砂防管内における環境調査の効率化の検討は、管内の対象溪流において、実際に魚類の環境DNA分析（メタバーコーディング法）を行い、分析による検出結果、労力及び費用について、過年度に管内で実施された魚類調査との比較から、砂防事業の対象となる山地河川の魚類調査において、環境DNA分析が魚類調査の代替となる可能性について検討を行った。

3. 環境DNA分析とは

環境DNAとは、環境中に放出された生物由来のDNA

の総称であり、排泄物や体表からはがれた表皮（粘膜）等に由来するものと考えられている。

上記由来の水の中に浮遊・存在するDNAを分析することで、ある種の生物がいるのかいないのか、どのような種類の生物がいるのかを推定する技術を環境DNA分析という。

4. 環境DNA分析の実施

(1)採水

分析に使用する検体の採水は、湯沢砂防事務所管内において過年度に魚類調査が実施されている50地区から、水系・溪流環境・標高及び確認種数の状況から抽出した15地区（図-2）において実施した。

現地での採水は、令和元年9月2日～4日に実施した（図-1）。各地区内1地点における、河川流心の表層から2L（分析用1L、予備用1L）を採水し、DNA保存液の塩化ベンザルコニウム10w/v%水溶液を0.1%になるように添加し、クーラーボックスと共に遮光・冷蔵状態で実験室に運搬した。



採水状況

保存液の添加

図-1 採水状況

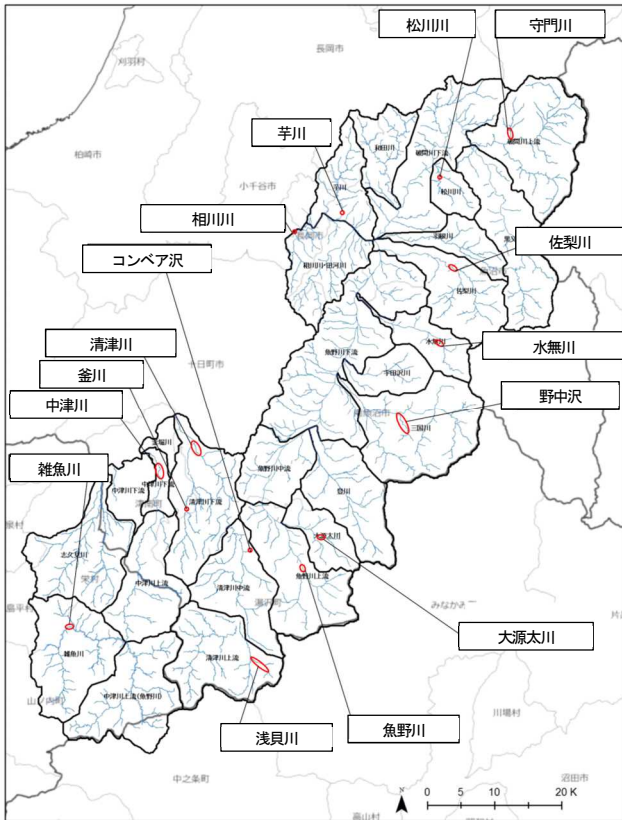


図-2 採水箇所（過去に魚類調査が実施された15地区）

(2)分析

分析は、環境DNA学会の実験マニュアル²⁾を基に作業を実施した。

実験室では、検体を濾過し、濾過に用いたフィルターからDNAを抽出した。抽出したDNAを魚類のユニバーサルプライマー³⁾により増幅し、次世代シーケンサーにより分析した。分析で得られた大量のDNA配列は、解析対象のDNA配列の整形、不良データの除去、魚類のDNAデータベースとの照合による種の確定の各段階が自動化されたMiFishパイプライン⁴⁾より解析した（図-3）。



検体の濾過 分析・データ解析

図-3 室内分析の状況

(3)環境DNA分析の結果

湯沢砂防事務所管内の15地区から採水した検体を分析した結果、環境DNA分析により、5目12科35種の魚類が検出された(表-1)。

検出結果は、アメマス類、カジカ属及びウグイ等、過去の採捕調査において確認された溪流に生息する魚類がほぼ全ての地区で検出された。

また、過去の採捕調査では確認されていない魚類（スナゴカマツカ、キタドジョウ、フクドジョウ属、オヤニラミ、カワヨシノボリ）は、これらの種の分布に関する文献等から、管内における分布が妥当であるのかを確認した上で、分析の結果に含めることとした。

表-1 環境DNA分析の結果

No.	目	科	種	検出箇所数	
1	コイ目	コイ科	コイ(型不明)	8	
2			ゲンゴロウブナ	2	
3			フナ類	5	
4			オイカワ	4	
5			カワムツ	2	
6			アブラハヤ	8	
7			タカハヤ	1	
8			エゾウグイ	6	
9			ウグイ	13	
10			モツゴ	7	
11			シナイモツゴ	1	
12			タモロコ属	3	
13			カマツカ	2	
14			スナゴカマツカ	1	
15			ツチフキ	1	
16			ニゴイ属	1	
17			ドジョウ科	ドジョウ	7
18				キタドジョウ	1
19				シマドジョウ種群	2
20			フクドジョウ科	フクドジョウ属	2
21	ナマズ目	アカザ科	アカザ	2	
22	サケ目	キュウリウオ科	ワカサギ属	2	
23		アユ科	アユ	4	
24		サケ科	アメマス類	14	
25			ニジマス	3	
26			サクラマス類	8	
27		トゲウオ目	トゲウオ科	トミヨ属	4
28	スズキ目	ケツギョ科	オヤニラミ	1	
29		サンフィッシュ科	ブルーギル	2	
30			オオクチバス	2	
31			コクチバス	1	
32		カジカ科	カジカ属	14	
33		ハゼ科	チチブ属	3	
34			カワヨシノボリ	3	
35			ヨシノボリ属	5	
		5目	12科	35種	

5. 環境DNA分析による調査結果と採捕調査による結果の比較

(1)比較に用いた調査結果

環境DNA分析の検出力、精度を検討するために、環境DNA分析に基づいて作成した魚類の確認種の一覧表を、平成21年度から平成29年度に複数回、実施された捕獲による魚類調査（以下、過去の採捕調査とする）の結果と比較した。

(2)調査精度の評価

環境DNA分析を実施した15地区と、そこで実施された過去の採捕調査を合わせると7目15科42種の魚類が確認された。確認種数を比較すると、環境DNA分析が5目12科35種、過去の採捕調査では6目13科27種と環境DNA分析がより多くの種を検出した。

表-2のとおり、環境DNA分析及び過去の採捕調査の両方での確認種は20種、環境DNA分析の確認種は15種、過

去の採捕調査の確認種は7種であった。

また、過去の採捕調査で確認された27種（複数季での調査）のうち、環境DNA分析（1季1回）においても検出された種数は20種（74%）であった。

したがって、1回の環境DNA分析により、過去の採捕調査（魚類の採捕を複数回実施した調査）の7割以上の種を確認出来ると考えられた。本調査結果は、先行研究（約7割の検出）^{5,6}と比較して検出力は遜色ないものであると考えられる(表-2)。

a) 環境DNA分析と過去の採捕調査の確認状況

調査手法ごとの検出・確認種数をみると、環境DNA分析及び過去の採捕調査の両手法で確認された種は、0~70%とばらつきが確認された(図-5)。

平成18年度に設定された溪流環境区分で「中流河川域」に分類された地区では、環境DNAによる検出種数、過去の採捕調査による確認種数がともに多い傾向があった。両手法で確認された割合は40~60%と高く(図-5)、さらに、過去の採捕調査で確認された種の63~83%が環境DNA分析で検出されている(図-6)。

b) 地点別の検出・確認種数の比較

図4のとおり、調査箇所15箇所において環境DNA分

表-2 環境DNA分析と魚類調査の種の確認状況

No.	科	種	環境DNA (R1)	魚類調査 (H21-29)	両方調査で確認	環境DNAのみ	魚類調査のみ
1	ヤツメウナギ科	スナヤツメ類	●	●			◎
2	コイ科	コイ(型不明)	●	●	◎		
3		ゲンゴロウブナ	●			◎	
4		フナ類	●	●	◎		
5		ヤリタナゴ	●	●			◎
6		タイリクバラタナゴ	●	●			◎
7		オイカワ	●	●	◎		
8		カワムツ	●	●	◎		
9		アブラハヤ	●	●	◎		
10		タカハヤ	●	●		◎	
11		エソウダイ	●	●		◎	
12		ウグイ	●	●	◎		
13		モツゴ	●	●	◎		
14		シナイモツゴ	●	●		◎	
15		ビワヒガイ	●	●			◎
16		タモロコ属	●	●		◎	
17		カマツカ	●	●	◎		
18		スナゴカマツカ	●	●		◎	
19		ツチフキ	●	●		◎	
20		ニゴイ属	●	●	◎		
21	ドジョウ科	ドジョウ	●	●	◎		
22		キタドジョウ	●	●		◎	
23		シマドジョウ種群	●	●	◎		
24	フクドジョウ科	フクドジョウ属	●	●		◎	
25		ホトケドジョウ	●	●			◎
26	ギギ科	ギギ	●	●			◎
27	アカザ科	アカザ	●	●	◎		
28	キュウリウオ科	ワカサギ属	●	●	◎		
29	アユ科	アユ	●	●	◎		
30	サケ科	アママス類	●	●	◎		
31		ニジマス	●	●	◎		
32		サクラマス類	●	●	◎		
33	トゲウオ科	トミ属	●	●		◎	
34	メダカ科	キタメダカ	●	●			◎
35	ケツギョ科	オヤニラミ	●	●		◎	
36	サンフィッシュ科	ブルーギル	●	●	◎		
37		オオクチバス	●	●		◎	
38		コクチバス	●	●		◎	
39	カジカ科	カジカ属	●	●	◎		
40	ハゼ科	チヂバ属	●	●	◎		
41		カワヨシノボリ	●	●		◎	
42		ヨシノボリ属	●	●	◎		
15科 42種			35種	27種	20種	15種	7種
全確認種数41種に対する割合			85.4%	65.9%	48.8%	36.6%	17.1%

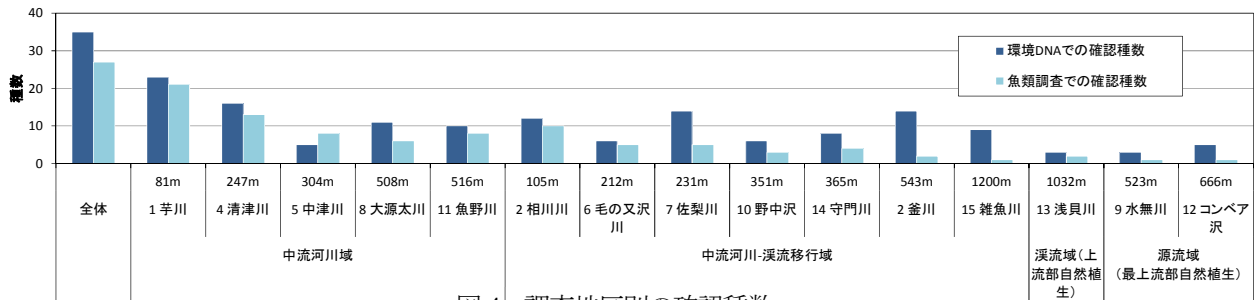


図4 調査地区別の確認種数

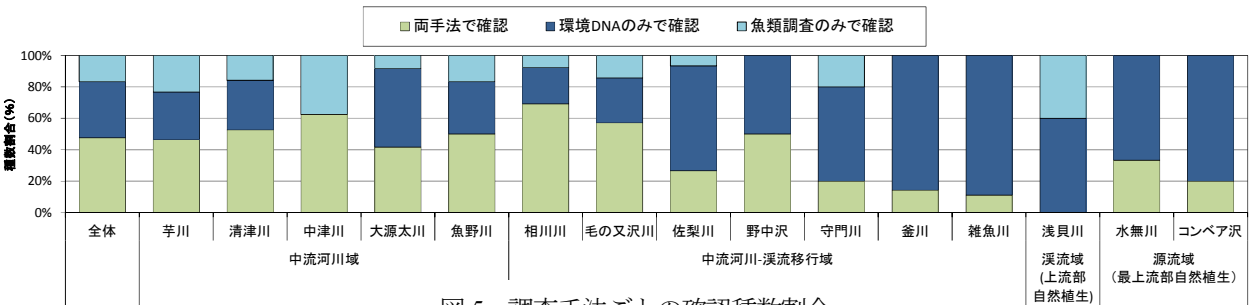


図5 調査手法ごとの確認種数割合

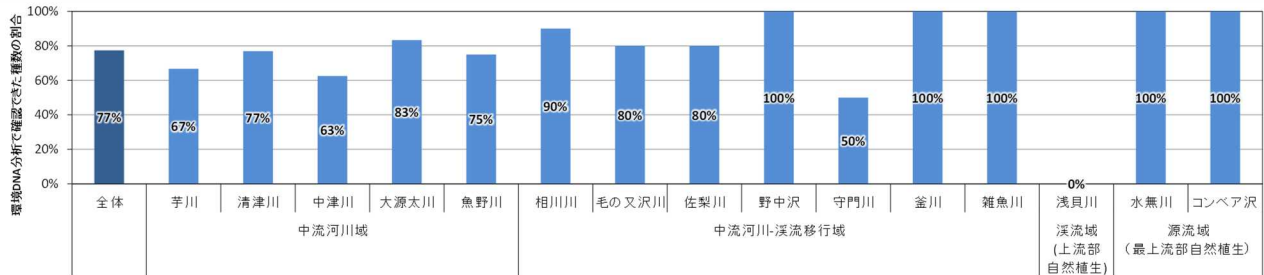


図6 採捕で確認された種が環境DNA分析において検出された割合

析の検出種数は、3種～23種であった。また、過去の採捕調査の確認種数は、1種～21種であり、検出・確認種数を比較すると、15地点中14地点で環境DNA分析による検出種数が多かった。平成18年度に設定された管内の溪流環境区分と調査地区の関係をみると、「中流河川溪流移行帯（中流河川から溪流に移行する地域）」及び「源流域（溪流最上流の源流域）」の調査地区では、環境DNA分析による検出種数が過去の魚類相調査の確認種数を上回っていた。

(3) 有効性の評価

魚類の環境DNA分析を用いた手法は、一定程度検出することが可能である。採捕調査で確認出来なかった魚類の確認もされるなど有効性が確認された（表-3）。

また、「中流河川」よりも魚類種数の少ないと考えられる「源流域」から「中流河川-溪流移行域」の方が確認割合が高いことが確認された。

表-3 有効性の評価

項目	まとめ
検出力	<ul style="list-style-type: none"> 環境 DNA 分析（1季1回）では、過去の採捕調査（複数季）で得られた魚類の7割以上を検出できた。 魚類調査で確認できない種も検出され、その種数も多い。
特徴	<ul style="list-style-type: none"> いくつかの種については、種に分類するのが困難な場合がある点に注意が必要である（アメマス類、ヨシノボリ属等）。 一方で、魚類調査では識別困難な種を識別できる例もみられた（スナゴカマツカ、キタドジョウは形態での識別が困難）。
魚類相の把握	<ul style="list-style-type: none"> 環境 DNA 分析の結果から、採捕・目視調査と同様に、溪流環境の違いによる魚類相の違いを反映した結果が得られた。

6. 環境DNA分析と魚類調査の費用の比較

(1) 調査ごとの工数

環境DNA分析と採捕調査の労力・費用の比較のため、両手法を比較する条件として、表-4のとおり工数を整理した。

(2) 試算の条件

環境DNA分析の採水作業は、1地区あたり1検体、採水は2名で行い、1日に最大4箇所とした。また、分析は、1地区（検体）あたり6人日とした。過去の採捕調査の積算は、河川水辺の国勢調査（魚類）における積算の考え方に基づいて試算を行った。なお、試算における直接人件費は、すべて「技師B」で計算した。

(3) 試算の結果と評価

図-7及び図-8より、環境DNA分析は、対応地区数が1

表-4 各調査の工数

工程	採捕調査		環境DNA分析		
	要否	工数	要否	工数	
計画準備	①計画準備	○	必要	○	必要
	②事前調査	○	必要	○	必要
	③許可申請	○	必要	×	不要
	④関連機関説明	○	必要	×	不要
現地調査	⑤機材準備	○	多	○	少
	⑥現地調査	○	多	○	少
	とりまとめ	○	中	○	多
	⑦データ解析	○	中	○	中
	⑧データ整理	○	中	○	中
	⑨リスト作成	○	中	○	中
	⑩精度管理	○	中	○	中
直接経費	⑪交通費	○	多	○	少
	⑫機材・消耗品	○	多	○	少
分析費	⑬分析費	×	—	○	多

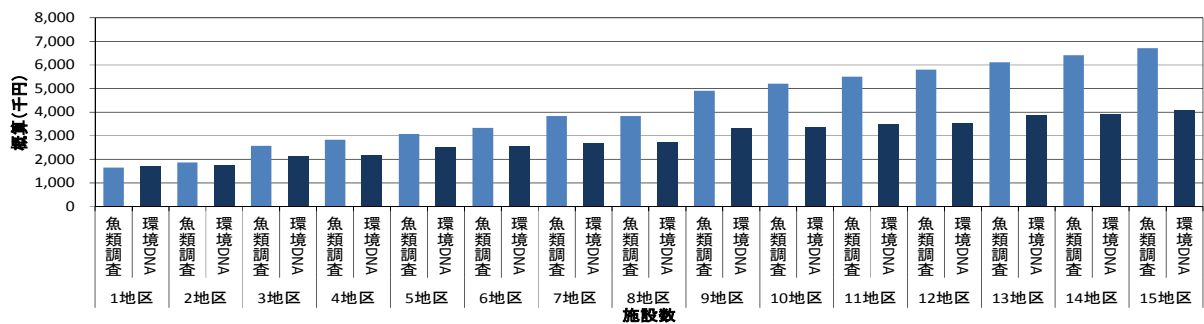


図-7 魚類調査と環境DNA分析の調査地区数ごとの調査額（概算）の試算

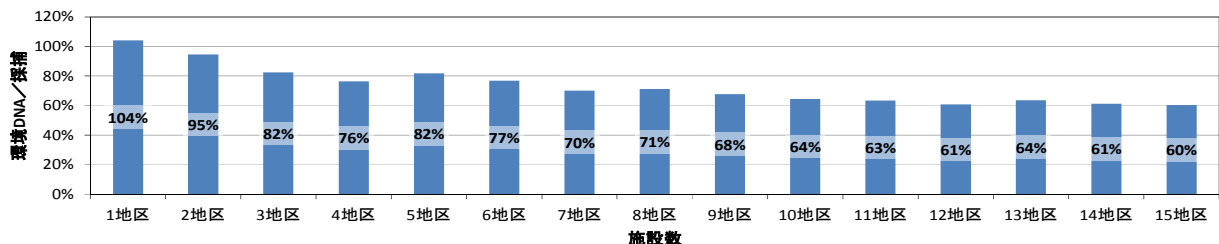


図-8 魚類調査に対する環境DNA分析の概算額の割合

～2地区のときは採捕調査の概算金額に対して104～95%となり効率化はできない状況であったが、3～6地区となった場合は、82～76%となることが示された。

特に、7地区以上となった場合は、採捕調査の概算金額の70%程度となり、10地区以上の場合、64～60%と多数の地区の調査を実施する場合に、環境DNA分析が効率的となる可能性が確認された。

以上より、環境DNA分析による調査手法は、調査地区数が増えるほど1箇所当たりの調査費用が安価になることが確認された。

7. 山地河川における採捕調査の代替の可能性

(1) 検討結果から得られた各調査手法における特徴

これまでの検討を踏まえ、採捕調査と環境DNA分析の特徴を表-5のとおり整理し下記のとおりとりまとめた。

(2) 砂防管内の調査体系を踏まえた活用の検討

環境DNA分析の特徴と、湯沢砂防事務所管内における環境調査の体系を踏まえた活用の可能性を検討した。

a) 個別の事業箇所（事前調査）

個別の事業箇所における魚類調査は、事業箇所と周辺における保全対象種の生息の有無、生息場所の把握が目的である。

環境DNA分析は、生息場所の特定は困難であるため、通常の個別の事業箇所では、調査の代替として効果的な状況は少ない。

許認可等の取得が困難な地区、被災による危険箇所等従来の魚類調査の実施が困難な地区では、作業が採水のみで環境DNA分析は有効であるが、結果を得るまでに時間がかかるため、直ぐに調査結果が必要となる調査には適さない。

b) その他（個別の課題）

広範囲における生物相の把握（水と緑の溪流づくり調査）など地区数が多い場合や、長期間継続してモニタリングを実施する際には、経費・労力の観点から環境DNA分析は有効であると考えられる。

広範囲で数多くの地区のデータを短時間で入手でき、15地区あれば、試算した採捕調査の6割程度の経費・労力で実施が可能となる可能性があり、また、採捕調査で確認される種の7割程度を確認できることが期待できるため、広範囲のモニタリング調査として活用できる。

環境DNA分析が有効に活用できる広範囲のモニタリングとしては、集中して事業を開始する場合、災害後等に管内で広域のモニタリングを行う場合などが想定される。また、気候変動や災害激甚化等、管内環境の長期的変化に対する生物の生息状況を定期的・長期的モニタリングでの適用が想定される。

表-5 採捕調査と環境DNA分析の特徴

調査手法	調査精度	経費・労力	その他留意事項
採捕調査	・捕獲により、 確実な情報が得られる。	・調査対象施設数に応じて増加する。	・調査結果は調査後すぐに得られる。
環境DNA分析	・地区ごとにみると、採捕調査で確認された種の約7割の確認が可能。	・1～2地区では採捕調査の方が経費・労力が低い。 ・3～15地区では採捕調査の6～8割程度の経費・労力で実施が可能な可能性がある。	・検体の分析とデータの精査が必要であり、結果を得るために4週間程度要する。 ・緊急性の高い調査では用途が限られる。

8. まとめ

以上の検討から、管内で実施する環境調査（魚類調査）における、環境DNA分析の有効性及び効率化に関して、表-6のとおり整理した。

環境DNA分析を用いる事で、広範囲の多数の地区のデータを入手する事ができ、15地区以上であれば、試算した採捕調査の6割程度の経費・労力で実施が可能となる事が期待できるため、広範囲のモニタリング調査として活用可能であると考えられる。

本検討では、各地区1地点での採水で採捕調査結果との比較を行ったが、今後、採水箇所数を増やすことによる調査成果の変化等について引き続き調査を行い、砂防事業の対象となる山地河川における環境DNA分析による魚類調査手法についてとりまとめを行う予定である。

表-6 管内の魚類調査における環境DNA分析の有効性

項目	内容
精度	○環境DNA分析は1回の調査で、過去の採捕調査（複数回実施）で確認された種の約7割を確認。
効率化	○多数の調査地区（施設）での生物相調査に適する。 ・7地区以上を対象にすると、採捕調査の約7割のコスト。 ・10地区以上を対象にすると、採捕調査の約6割のコストで対応できる可能性がある。
その他の特徴	○許認可等の取得が困難な施設、危険箇所等で採捕調査が困難な施設での調査に適する。 ○多数の地区での調査、長期間継続の調査に適する。
適用時の注意点	○結果を得るまでに時間を要する（通常4週間程度）ため、緊急性の高い調査には適さない。

参考文献

- 1) 高原, 山中, 源, 土居, 内井 (2016) 環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. 日本生態学会誌, 66:583-599.
- 2) 環境DNA学会 (2019) 環境DNA調査・実験マニュアルver2.1 http://ednasociety.org/eDNA_manual_ver2_1_3.pdf
- 3) Miya, Sato, Sado, Poulsen, Minamoto, Yamamoto, Yamanaka, Araki, Kondoh, Iwasaki (2015) 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.
- 4) Yukuto Sato, Masaki Miya, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, and Wataru Iwasaki, 2018. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1553-1555. (2018)
- 5) 赤松, 都築, 横山, 舟橋, 太田, 畔上, 内藤, 乾 (2018) 河川水辺の国勢調査による魚類相調査と環境DNA メタバーコーディング解析の比較検討. 土木学会論文集B1(水工学) Vol.74 : I_415-I_420.
- 6) Fujii K, Doi H, Matsuoka S, Nagano M, Sato H, Yamanaka H, 2019 Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. *PLoS ONE* 14(1): e0210357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210357>.