

河川における環境DNAの実用化に向けた土木研究所の取組み

村岡敬子・中村圭吾

1. はじめに

水中に浮遊する生物の組織片から生物の遺伝情報をとりだす“環境DNAを使った生物調査”は、生態学や分子系統学といった理学分野において開発・急速に広まっている。生物を直接捕えることなく周辺の生物種や存在量の情報を得る本技術を河川管理の現場に取り入れることにより、調査負担の軽減や高度化を図ることが期待される。既に希少種の調査などでは良好な成果が得られつつある一方で、未解明な部分も多いことから、土木研究所(以下「土研」という)では異分野の専門家たちと連携しながら精査を行っている。本報文では、実務における効果的な活用方法と実用化にあたっての留意点を述べる。

2. 環境DNAの概要

2.1 環境DNAの歴史

土壌や水といった環境試料から取り出したDNA^{注1} = 環境DNA (environmental DNA, eDNA) を使った調査は、1980年代に微生物の分野で始められた²⁾。土壌中の微生物を培養しDNAを得ていた従来の方法に対し、土壌から直接DNAを取り出すことにより得られる微生物の情報量は飛躍的に大きくなり、医薬品の開発などに大きく貢献することとなった。

一方、海や河川、湖沼といった水中の生物を対象とした環境DNAの展開には、これより30年近い年月を必要とした。2008年に環境DNAによって外来種である両生類の侵入状況をとらえる研究が発表されたのち³⁾、対象は魚類、爬虫類、甲殻類と一気に広がった。魚類においては、2015年に、特定領域の配列から魚種を判別するMiFish技術が開発され⁴⁾、“バケツ一杯の水で魚類相がわかる”とのキャッチフレーズで新聞などを賑わした。現在、環境DNA技術は水中の生物を直接とらえることなく生物情報(在不在や存在量、種

構成)を得る方法として、研究分野にとどまらず、河川環境調査の実務においても試験的に導入されつつある。

水域の水棲生物を対象とした環境DNA分析の試料は、生物が呼吸や糞をする際に体外に放出される粘膜、体表面からはがれ落ちるウロコや皮膚片(垢)、産卵行動の際に放出される精子などと推定される。いずれにしても、水中の存在量はそれほど多くない。“微量な試料”の課題を解決したのは、1980年代後半から現在に至るまでに開発された分析技術と、得られた遺伝子配列データを処理する技術である(表-1)。そうして、生物の歴史を遺伝的に紐解こうとする分子生物学者の長年にわたる取組みが、DNAデータベースの情報として蓄積され、個々の種を判別するための基礎情報として活用されている。これらの事項の一つでも欠ければ、水域の環境DNAの現在はなかったであろう。

2.2 環境DNAを使った研究の最前線

国際的な学術誌に掲載された環境DNAを使った発表論文数は、ここ数年間増加の一途をたどっており(図-1)、その研究内容も、基礎的なものから応用的なものまで幅広い。

環境DNAを使ってできることは、あらかじめ選択した種に対して解析を行う“種特異的解析”と、膨大な情報の中から、例えば魚類のみを対象に種判別を行う“網羅的解析(メタバーコーディング)”に分けられる(図-2)。

表-1 水域の環境DNAに関わる開発の歴史

年	出来事		水域の環境DNAとの関連
	項目	内容	
1985	ポリメラーゼ連鎖反応・PCR装置の発表	微量なDNAの特定領域を、数時間で何百万倍に増幅する技術	わずかなDNA試料から、特定領域を分析可能とした
1987	第一世代のシーケンサー	自動的に、遺伝子の配列を読み取る(～1,000塩基)	DNAデータベースの構築
1993	リアルタイムPCR装置	PCR反応から、元サンプルの量を計る	あらかじめ設定した種の量を推定
2005～	次世代シーケンサー	大量の遺伝子配列を読み取る	メタバーコーディング
2015	MiFish	魚類に特異的な領域を発見	魚類の網羅解析が可能となる

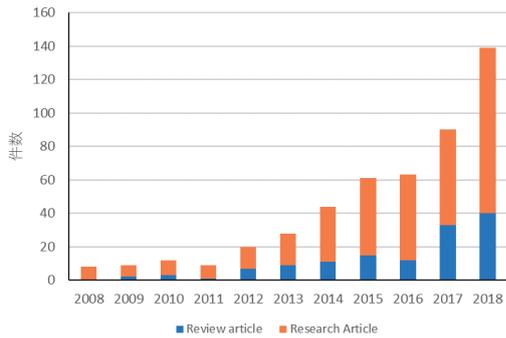


図-1 環境DNAと生物多様性に関する論文数の推移 (Elsevierによるenvironmental DNAの検索結果)

種特異解析の事例をみると、国内においても、例えば以下のように、既存の調査方法では困難であった事象を展開した事例も多くみられる。

- (1) 雄物川におけるゼニタナゴの生息地を推定するために利用。捕獲調査と併用することで、ゼニタナゴの繁殖を効率よく特定 (湯沢河川国道事務所)
- (2) オオサンショウウオの存在および特別天然記念物である在来種か、外来近縁種かについて環境DNAで調査 (神戸大学)⁵⁾
- (3) フクロウが飛び立った後、空気中に浮遊する皮脂を回収し、環境DNAを分析 (掛川西高校自然科学部)⁶⁾

このように、種特異的解析では、対象種を絞り

込み、実験系を組み立てており、その際、他生物の影響などをできるだけ除外できるように、あらゆる予備検討を行っている。サンプリングの段階で大きなミスをしなければ、安定した情報を得ることができる。

種特異解析は、事例をあげた希少魚種の調査のほか、河床に大礫が多く、直接採捕が困難な底生性の魚類の調査、回遊性魚類の遡上範囲の推定などにも期待できる。近年では、現地において採水し、その1時間以内に現地で環境DNAの量を測定する技術も開発され、現地に入る直前に対象種の存在のスクリーニングをする場面などへの展開も視野に入りつつある。さらに、現在、水産分野などでは環境DNAから対象とする種の種内遺伝的多様性を得る研究も進められている。

一方で、河川水辺の国勢調査のように、河川の魚類相を捉えるために、河川湖沼において環境DNAによる網羅的解析を展開するためには、図-3に示すように、いくつかの課題が残されている。これらの課題は、今後の研究によって徐々に解決されるだろうし、現時点においてもワンドや湖沼のような閉鎖的な水域、あるいはこれまで調査の対象としにくかった中小河川や農業水路においては、簡便に種構成を捉えることが可能な効果的な調査手法と考えられる。

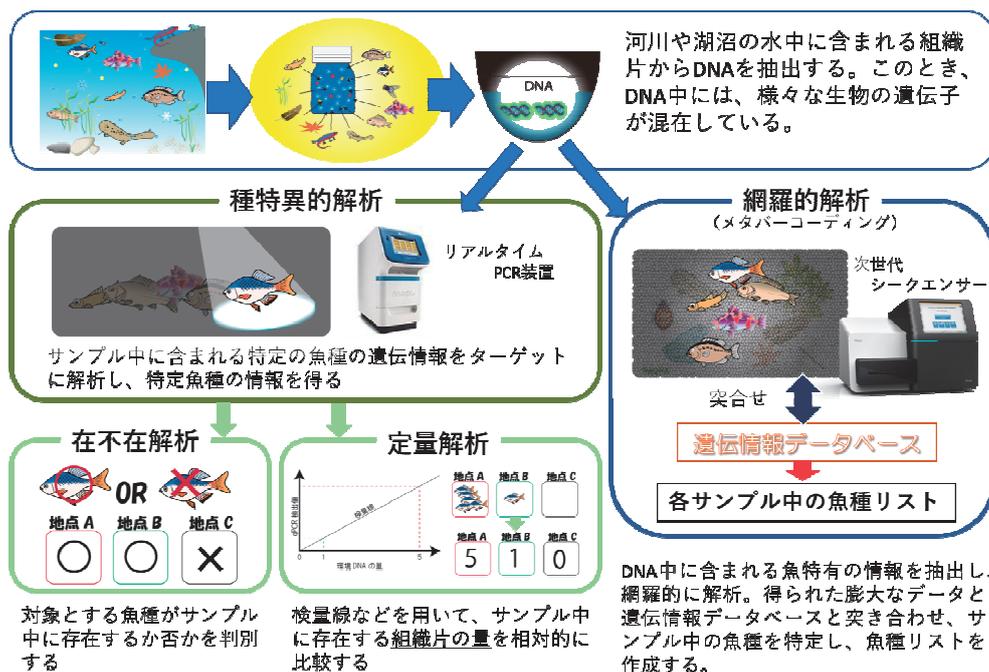


図-2 環境DNAを使ってできること (魚類を例に)



図-3 環境DNAの網羅解析の結果に影響する諸元の例

3. 河川環境調査実務への展開

3.1 実装に向けた課題と土木研究所の取組み

環境DNAが水域における生物調査への応用研究の段階に入った今、河道における環境DNAの挙動の把握や信頼性の確保が極めて重要となる。

組織片の挙動：対象フィールドを河川として例に考えると、環境DNAの組織片は、水と共に流下してくる。組織片の偏在を解消するためには、河川の流れを踏まえた採水計画を立てる必要がある。その組織片も、瀬と淵を流れ下る間に礫間での吸着や沈降が起こるであろう。周辺からの流入物によっては、分解が加速されることもある。支川の合流や湧水の流入で希釈もおこるし、降雨でそのバランスは変化する。水質との関係も無視できない。正確なデータを得るためには、河川における水理学的知見が極めて重要となるのである。

発生源や発生量：河道内における組織片の挙動が一定の条件であっても、サンプル中に含まれる環境DNAの量は常に変動している。魚を例に挙げれば、魚は生活史の中のイベントによって必要とする空間が異なるため、同じ場所にとどまるとは限らない。一日の中でも採餌などのために移動する種も少なくない。餌を求めて活発に移動すれば、呼吸や体表面からの組織が水中に放出され、糞をすれば糞由来の組織が水中に放出される。夜行性、昼行性など、対象とする生物の行動パターンも、結果に影響を与えることがある。

分析結果の信頼性：データ解析の際、種特異解析で対象としている遺伝子の長さは150塩基程度、種網羅解析の対象は、MiFishの場合170塩基程度である。この長さ中で、他の生物とは異なる領域を探し出し、実験系を組み立てているのだが、そ

こにも落とし穴がある。例えば、淡水魚は、地史的な長い歴史の中では別の水系へと移動しているものの、数百年単位で考えれば、水系ごとに隔離されている状況である。そのため、同一種でも、地域によって遺伝子の配列に違いがみられ、分析結果が異なる場合もある。あるいは、別種であっても遺伝子の配列がもともと似通っているため、分析対象の領域では、種判別や在不在の判定ができないものもある。地域によって遺伝子の配列にバリエーションが生じ得るのは、あらゆる生物に起こり得る現象である。種特異的解析の場合には、対象としている生物だけを定量しているのか、検証が必須である。

サンプリング：極めて少ない組織片を分析とする環境DNAであるがゆえに、サンプルの汚染防止には最大限の配慮が必要である。例えばサンプリング時に着用していた長靴への付着物、昼食に食べたウナギの微量な肉片などの混入が不正確な分析結果の原因となり得る。同様に、観賞魚店の排水や動物の糞などによるコンタミネーションもあり得るのである。

このように、環境DNAを河川環境調査の実務に展開していくためには、配慮すべき事項が多く残されている。土研では、これらの影響を最小限に抑え、実河川における環境DNAを利用した生物分布域調査法を提案するため、重点研究課題「河道内における環境DNAの動態解明と河川事業への適用技術の開発（平成29～32年度）」に取り組んでいる。

3.2 共同研究の概要

分析・解析技術における課題は、今後の基礎研究の積み重ねにより徐々に解消されていくことが期待される。一方で、河川管理の現場で活用し、信頼性のある成果を得るためには、調査目的や現地状況に応じた様々な配慮が必要である。

土研では、このような課題を解決し、環境DNA技術の汎用化を計るため、共同研究「河道内における環境DNAの動態解明と河川事業への適用技術の開発(平成30～33年度)」を実施している。本共同研究では、公募により選ばれたコンサルタント会社4社が参加し、各々の者が得意とする領域において、課題を設定するとともに、互いに情報を共有しながら検討を進めているところである(図-4)。

さらに、水質調査と併行したサンプリングの可能性について、関東地方整備局関東技術事務所と連携し、サンプリング方法について検討している。この中では環境DNAを取り扱った経験のない調査者に、どのように配慮事項を伝えていくか、あるいは人為的エラーを減らすために、どのようなサンプリング方法がよいのか、などを検討している。

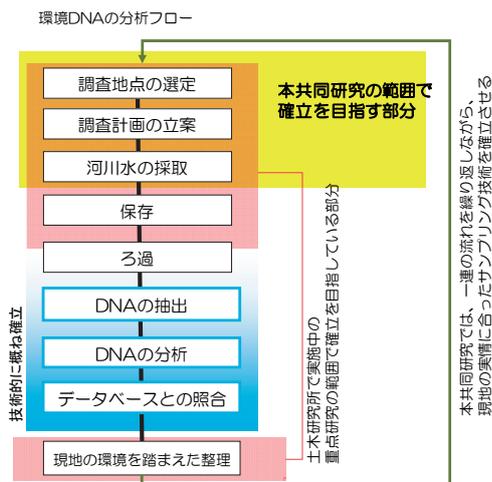


図-4 土木研究所の取り組みと共同研究

4. 生物・空間ビッグデータによる河川管理

河川の空間情報については測量分野に代表されるように、ドローンやグリーンレーザ（ALB）といった新しい技術によって、3次元のビッグデータを活用できる時代に入ってきた（九頭竜川11kmのグリーンレーザでは3,000万点の測量データ）。一方、生物データについては、直轄河川の水辺の国勢調査であっても河川当たり数点～10点程度とその差は開く一方であった。環境DNAの導入により、これまでよりも低コストで生物データを取得できる可能性が出てきた。網羅的解析で現在1検体数万円程度であるが、この価格は今後劇的に低下すると考えられ、これまで調査できなかったような中小河川でもデータ取得も可能になると考えられる。

これらの言わば生物・空間ビッグデータを活用することにより、これまでよりもはるかに高度な河川環境管理が可能となり、河川環境の保全再生

技術が進化すると考えられる。

5. まとめ

環境DNAについては2018年に“環境DNA学会”が設立され、調査マニュアルに向けた動きが始まっており、環境省や水産庁の関係機関においても、環境DNAを利用した研究や具体的な調査が進められている。土研においてもこれらの機関と連携しつつ、新しい河川管理の時代に向けて、大きく貢献したいと考えている。

参考文献

- 1) 高原輝彦、山中裕樹、源利文、土井秀幸、内井喜美子：環境DNA分析の手法開発の現状～湛水域の研究事例を中心にして～日本生態学会誌、66: 583-599、2016
- 2) 星野裕子、長谷部亮：土壌からのDNA抽出法、Journal of Environmental Biotechnology、Vol.5、No.1、pp.43～53、2005
- 3) Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet P.: Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters, 4:423-425, 2008
- 4) Miya, M., Sato, Y., Sado, T. et al.: 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
- 5) Fukumoto, S., Ushimaru, A., Minamoto, T.: A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. Journal of Applied Ecology, 52:358-365, 2015
- 6) “空中からフクロウDNA採取、掛川西高自然科学部”、静岡新聞 SBS、2018.8.31
- 7) Watanabe, T., Hayashi, M., Kadowaki, Y., et.al.: Rapid Detection of Environmental DNA (eDNA) through the Development of Real-time Mobile PCR Device, International Symposium of Ecohydraulics 2018, 2018

村岡敬子



土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム主任研究員
Keiko MURAOKA

中村圭吾



土木研究所水環境研究グループ河川生態チーム上席研究員、博士(工学)
Dr. Keigo NAKAMURA