



汽水域の魚類群集把握に向けた 環境DNAの最適な採水手法の検討

○菅野一輝¹・篠原隆佑²・中島颯大³・村岡敬子³・崎谷和貴³

1 (株) 建設環境研究所

※研究当時 (国研) 土木研究所 流域生態チーム

2 (株) ウエスコ

※研究当時 (国研) 土木研究所 流域生態チーム

3 (国研) 土木研究所 流域生態チーム

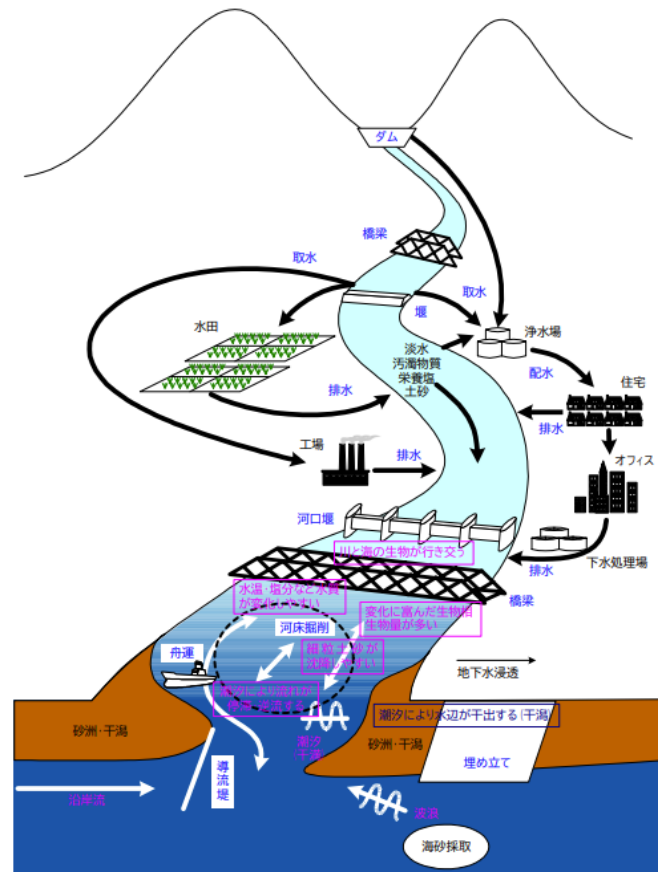
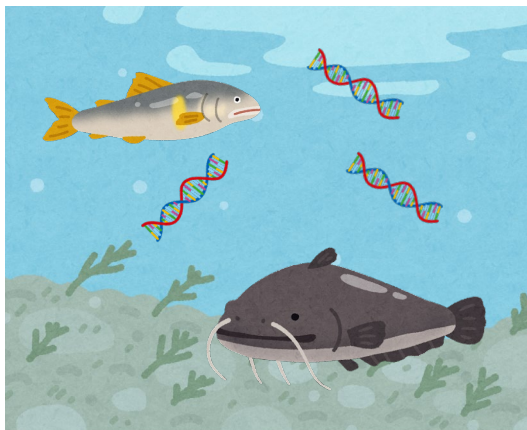
1. 背景

汽水域

- 陸水域と海水域の移行帯で、餌資源の豊富な生産性の高い水域で、塩分耐性のある純淡水魚、河川と海洋を往来する通し回遊魚、干潟等の汽水域特有の環境に依存する汽水魚、遇来的に河川を利用する海水魚等、様々な魚類にとって重要な生息場となる。
- 一方で汽水域は人口が集中しやすく、人為的環境改変の影響が大きい水域であり、自然河岸の護岸等による生息場の機能低下が懸念されている。
- 汽水域の環境保全のためには、環境改変を行う前にどのような生物が生息しているか確認した上で、それらの種に影響を与えない対策を行う必要があり、生物情報を効率的に取得する技術が求められている。

環境DNA

- 水中等の環境に存在する生物由来のDNAから、生息する魚種を推定する技術であり、従来の捕獲調査より現地調査の労力低減が期待されている。



出典：国土交通省（2004）汽水域の河川環境の捉え方に関する検討会：汽水域の河川環境の捉え方に関する手引書

1. 背景

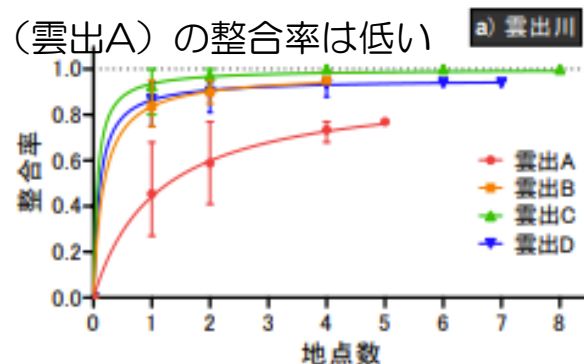
既往知見（環境DNA&汽水域）

- 環境DNAと捕獲調査の**一致率**は、河川淡水域に比べて**汽水域で低い**（篠原ほか、2022）
- 横断的な採水位置は、**流心よりも河岸**の検出数および検出率が高い。鉛直方向では**表層よりも下層**での検出種数が高い（平田ほか、2019）
- アマモの環境DNA量は、**藻場からの距離と流れ**により説明できる（赤塚ほか、2022）
- 河川汽水域において、潮汐に関して環境DNAの採水指針を示した研究は少ない

目的

汽水域における時空間的な環境DNAの検出特性を把握する

■ 汽水域（雲出A）の整合率は低い



出典：篠原ほか（2022）環境DNA分析の河川の魚類調査への適用に向けた最適な採水地点の検討

■ 流心<河岸

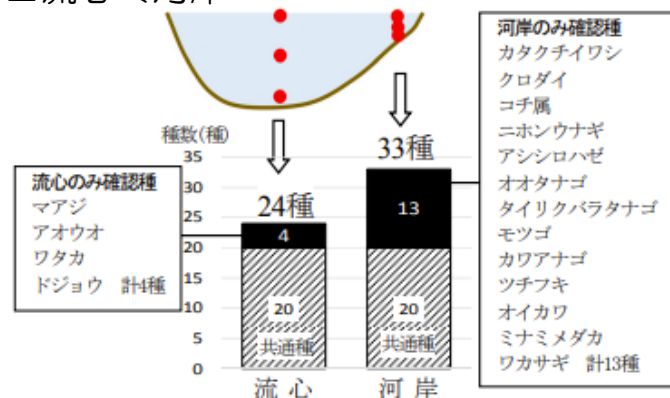


図-6 河岸と流心での確認種の比較

出典：平田ほか（2019）汽水域及び河川下流域における環境DNAの空間分分布把握とサンプリング法の検討

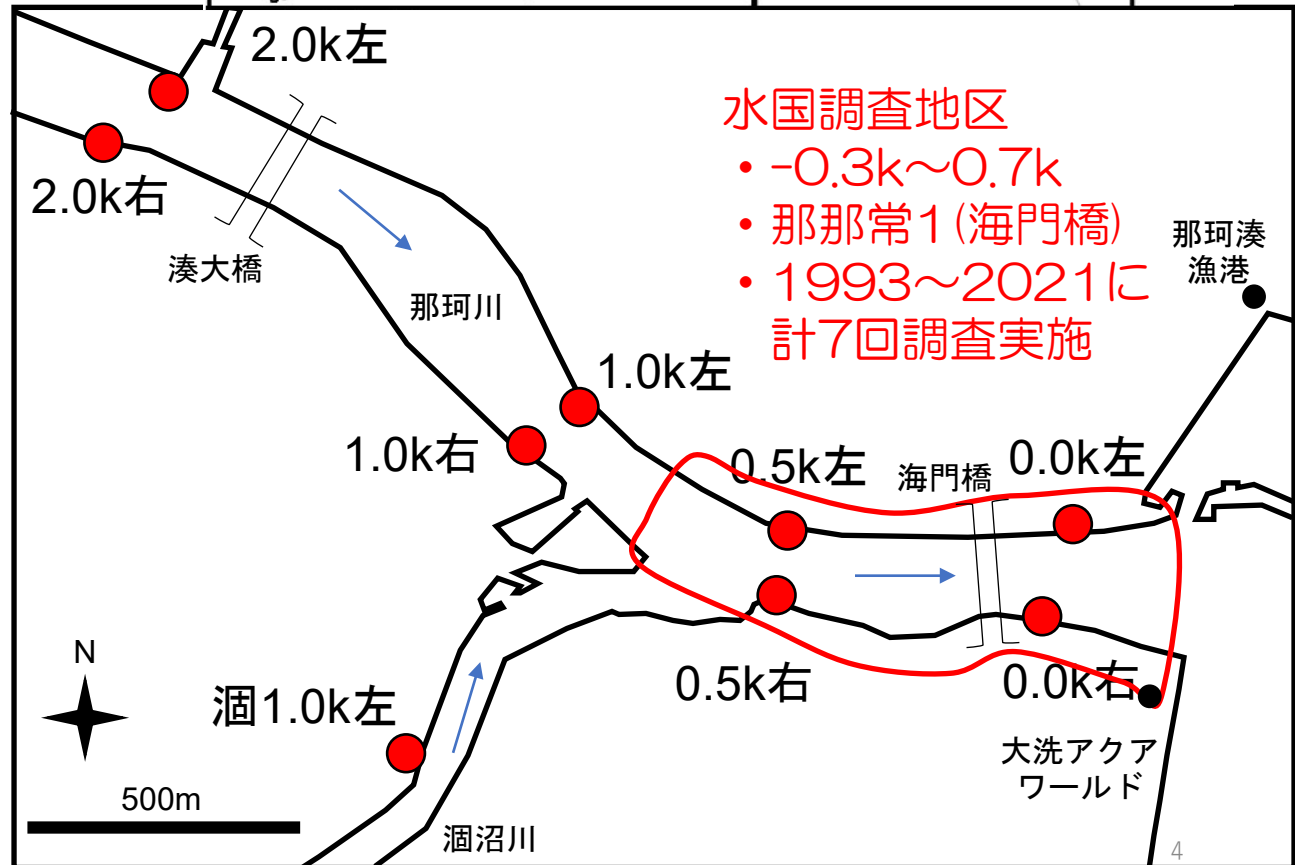
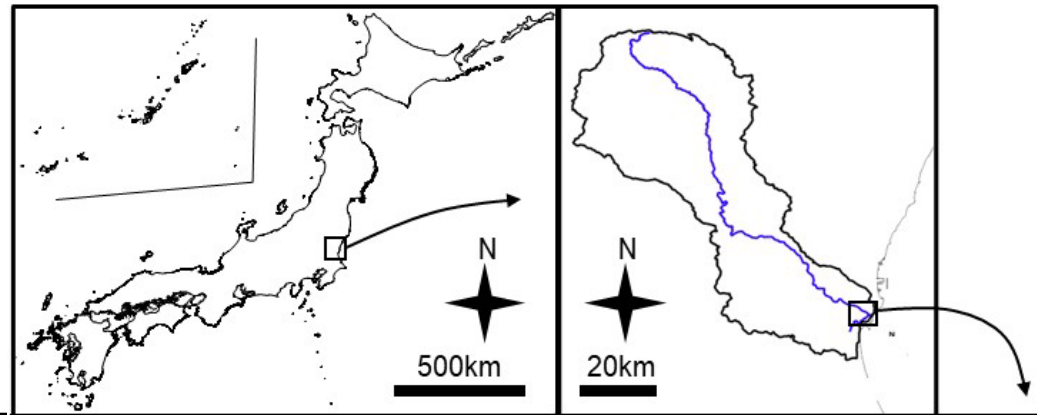
2. 方法

■調査地：

- 茨城県、那珂川（1級水系）
- 河口から2.0kmの汽水域
- 500m～1km間隔で、9地点設置

（選定理由）

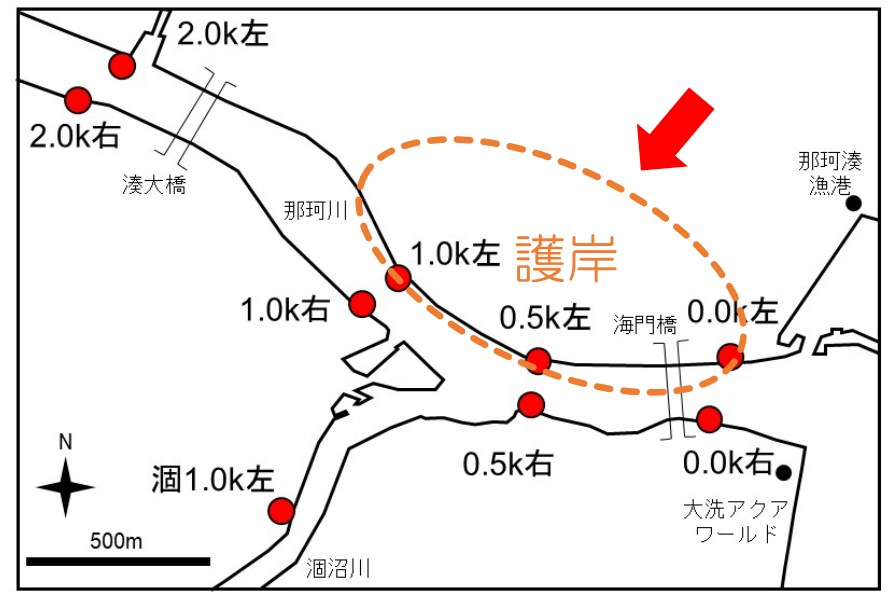
- 河川水辺の国勢調査の調査地区があり、捕獲調査結果が充実している
- 多様な岸際環境を有する



2. 方法

(多様な岸際環境)

矢板 (1.0k左)



消波ブロック (0.5k左)



消波ブロック (0.0k左)



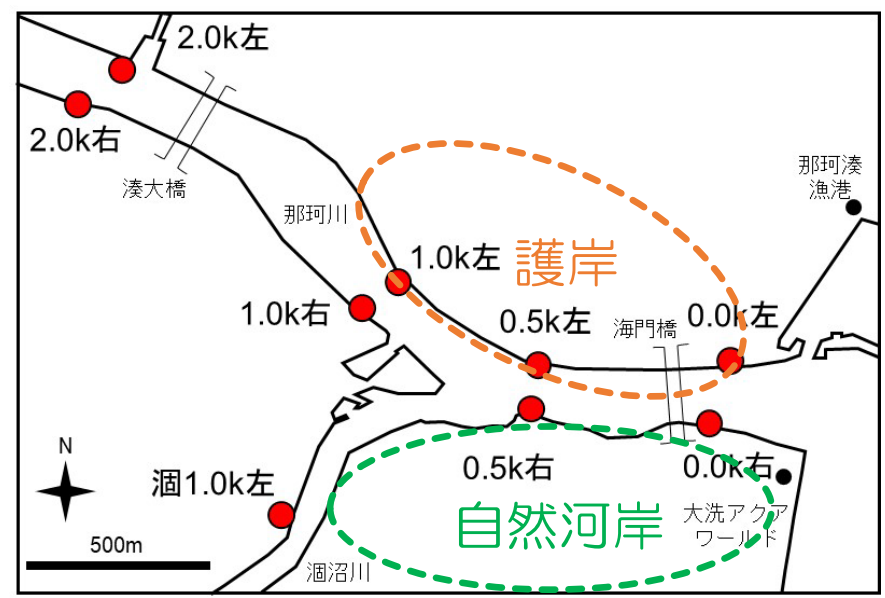
2. 方法

(多様な岸際環境)

岩盤 (0.5k右)



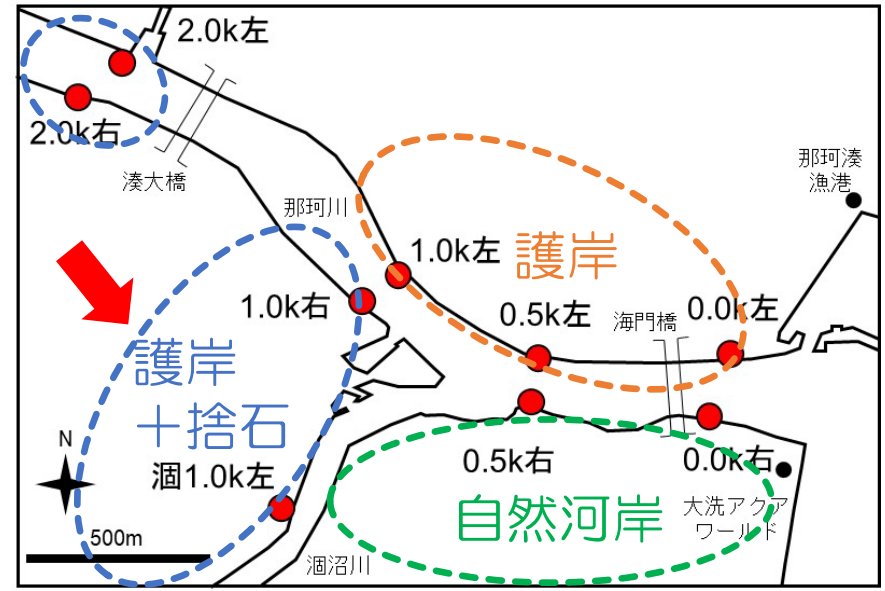
砂浜 (0.0k右)



2. 方法

(多様な岸際環境)

捨石工 (2.0k右)



袋詰め玉石工 (1.0k右)



捨石工 (洶1.0k左)



2. 方法

(解析のフロー)

環境DNA採水



メタバーコーディング解析



魚種リストの精査



環境DNA魚種リスト



解析

①捕獲と環境DNAの比較

+捕獲調査結果を合わせて

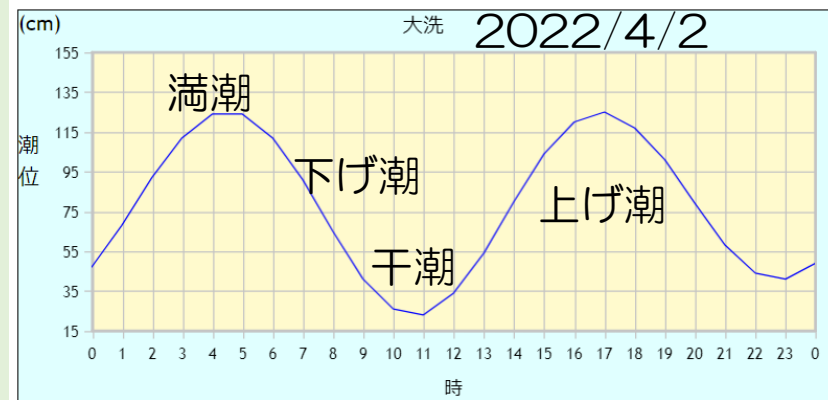
②群集構造の解析 (NMDS)

+物理環境を合わせて

③潮汐間の環境DNA比較

■環境DNA採水

- 2022年4月2日 (大潮)
- 9地点 (0.0k、0.5k、1.0k、2.0kの左右岸、涸沼川1.0k左岸)
- 潮汐の異なる4タイミングで1L採水
下げ潮、干潮、上げ潮、満潮
※2.0k左右岸は、下げ潮、上げ潮のみ



注意

- グラフの縦軸は潮位、横軸は時刻を示しています。
- 潮位は潮位表基準面上の値 (単位: センチ) で表示しています。

- 10℃以下になるよう氷冷し、環境DNAの分解を抑制
※塩化ベンザルコニウム等は仕様せず
- 物理環境を計測、記録
(塩分、流向、流速、岸際環境) 。

2. 方法

(解析のフロー)

環境DNA採水



メタバーコーディング解析



魚種リストの精査



環境DNA魚種リスト



解析

①捕獲と環境DNAの比較

+捕獲調査結果を合わせて

②群集構造の解析 (NMDS)

+物理環境を合わせて

③潮汐間の環境DNA比較

■メタバーコーディング解析

- MiFish系プライマーによる1stPCR
MiFish-U-F/R (魚類全般)、
MiFish-U2-F/R (アナハゼ類)、
MiFish-E-F/R-v2 (軟骨魚類)、
MiFish-L-F/R (ヤツメウナギ類) を4:2:2:1で混合
- クラスタリングを行い代表配列を取得
DADA2によるデノイジング
リード数4以上の代表配列を使用
- 代表配列の相同性検索 (BLAST) を
行い、一致率が一番高い種を特定
一致率98.5%以上を使用
二次的自然環境に生息する淡水魚リスト (環境省、
2019)、誤同定チェックシート (環境省、2022)
を参考に種名を決定

(解析不調) 4検体 (0.0k左の上げ潮、1.0k
右の干潮時、涸1.0kの干潮時と上げ潮時) は、
解析不調で十分なリード数が得られなかった。
特に、上げ潮時の検体の解析不調は、海藻に
由来するアルギン酸等の多糖類によるPCR阻
害が一因と推察された

2. 方法

(解析のフロー)

環境DNA採水



メタバーコーディング解析



魚種リストの精査



環境DNA魚種リスト



解析

①捕獲と環境DNAの比較

+捕獲調査結果を合わせて

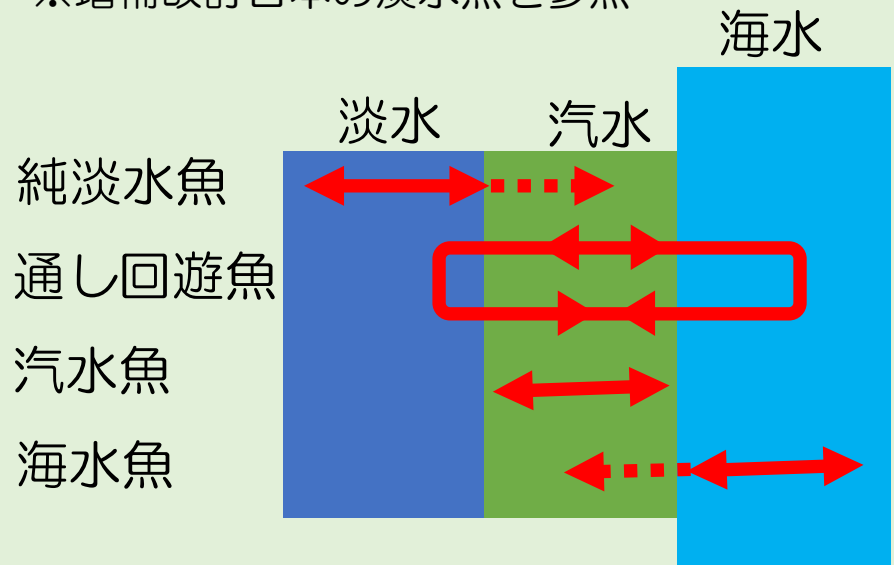
②群集構造の解析 (NMDS)

+物理環境を合わせて

③潮汐間の環境DNA比較

■魚種リストの精査

- ノイズとしてリストから除外した種
※捕獲調査で未確認の種かつ、令和2年度主要魚種別海面漁業産出額に記載がある分類群（主要な食用魚）、魚類検索第三版から概ね5m以深に生息する種（マイナーな食用魚）、日本産魚類全種目録に未掲載の種
- 生態によって4つに区分
※増補改訂日本の淡水魚を参照



2. 方法

(解析のフロー)

環境DNA採水



メタバーコーディング解析



魚種リストの精査



環境DNA魚種リスト



解析

①捕獲と環境DNAの比較

+捕獲調査結果を合わせて

②群集構造の解析 (NMDS)

+物理環境を合わせて

③潮汐間の環境DNA比較

■解析

①捕獲と環境DNAの比較

- 一致率を生態区分別に比較

②群集構造の解析 (NMDS)

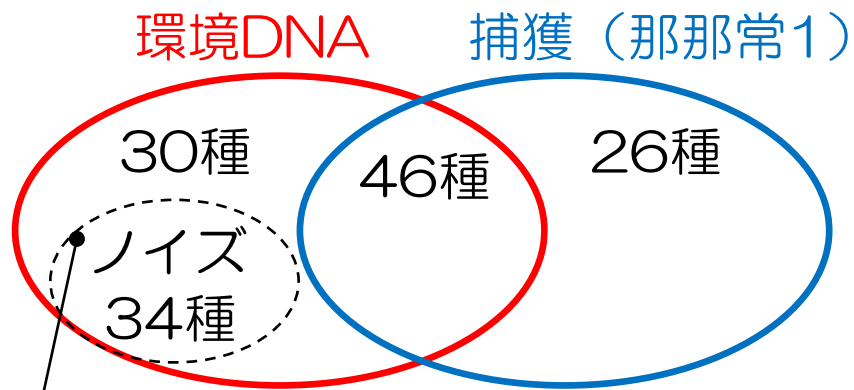
- 環境DNAで検出された魚類の在・不在データを用いて、NMDSを実施 (類似度はJaccard計数を使用)
- 環境要因 (塩分、河口からの距離 (KP)、自然河岸の有無、捨石の有無) の関係を解析 (envfit関数)

③潮汐間の環境DNA比較

- 種数の比較 (Kruskal-Wallisの多重比較検定)
- 種組成の比較
解析不調なく、4タイミング共通して得られた4地点 (0.0k右、0.5k左、0.5k右、1.0k左) を合算した魚類相からベン図作成

3. 結果

①捕獲と環境DNAの比較



■ノイズ (34種)

ニシン, サッパ属の複数種 (国外), ギンザケ, タイセイヨウサケ (国外), サンマ, ユメカサゴ / オキカサゴ, ホウボウ, ブリ, カンパチ, ニシマアジ (国外), マダイ, チダイ, シログチ, メダイ, イボダイ, マサバ, サワラ, カツオ, タイセイヨウサバ (国外), マグロ属の複数種, キタノホッケ, ホッケ, アオメエソ / マルアオメエソ, キアンコウ, コブシカジカ / ヤマトコブシカジカ, カサゴ亜目の複数属 (遠洋性・深海性), ウマガレイ / ソウハチ / コガネガレイ, ババガレイ, カラフトシシャモ, キンメダイ, ヒメスミクイウオ, スケトウダラ / マダラ / タイセイヨウダラ, ツマリニギス, メバル属の複数種 (国外)

第1位、第2位

生態区分	種数 (区分内での割合)			
	eDNAのみ	一致	捕獲のみ	計
純淡水	12 (50%)	8 (33%)	4 (17%)	24
通し回遊	4 (22%)	13 (72%)	1 (6%)	18
汽水魚	2 (8%)	14 (58%)	8 (33%)	24
海水魚	12 (33%)	11 (31%)	13 (36%)	36

- 環境DNAで109種が検出、うち34種がノイズと考えられた
- 捕獲の72種に対して、63.9%にあたる46種が環境DNAで検出
- 一致率の傾向は、生態区分で異なり、通し回遊魚、汽水魚は、一致率が高く、環境DNAでの調査により適していると考えられた
- 純淡水魚は、環境DNAのみの種が多くみられた

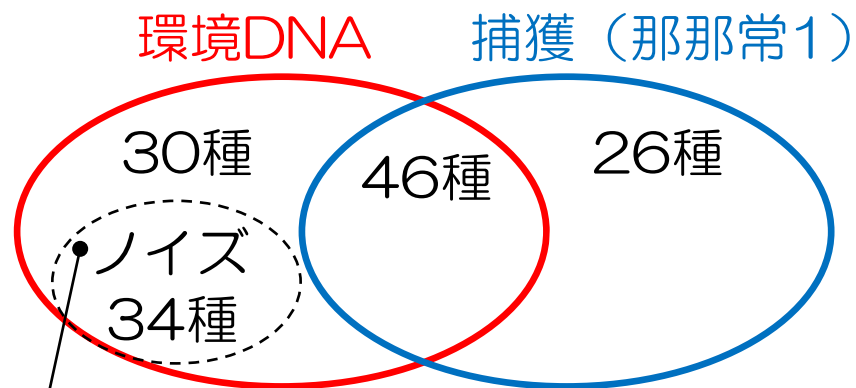
→より上流の調査地区で捕獲され、同一水系で確認された魚種が多い

- 海水魚は、捕獲のみ、環境DNAのみともに多くみられた

→片方の手法のみで把握することは困難で、併用が望ましい

3. 結果

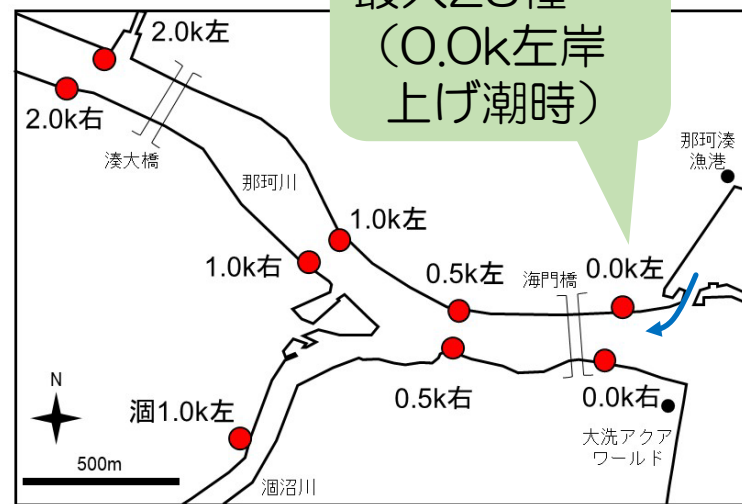
①捕獲と環境DNAの比較



■ノイズ (34種)

ニシン, サッパ属の複数種 (国外), ギンザケ, タイセイヨウサケ (国外), サンマ, ユメカサゴ / オキカサゴ, ホウボウ, プリ, カンパチ, ニシマアジ (国外), マダイ, チダイ, シログチ, メダイ, イボダイ, マサバ, サワラ, カツオ, タイセイヨウサバ (国外), マグロ属の複数種, キタノホッケ, ホッケ, **アオメエソ / マルアオメエソ**, キアンコウ, コブシカジカ / ヤマトコブシカジカ, カサゴ亜目の複数属 (遠洋性・深海性), ウマガレイ / ソウハチ / コガネガレイ, ババガレイ, カラフトシシャモ, キンメダイ, ヒメスミクイウオ, スケトウダラ / マダラ / タイセイヨウダラ, ツマリニギス, メバル属の複数種 (国外)

ノイズ：
平均7.9種
最大23種
(0.0k左岸
上げ潮時)



3. 結果

②群集構造の解析 (NMDS)

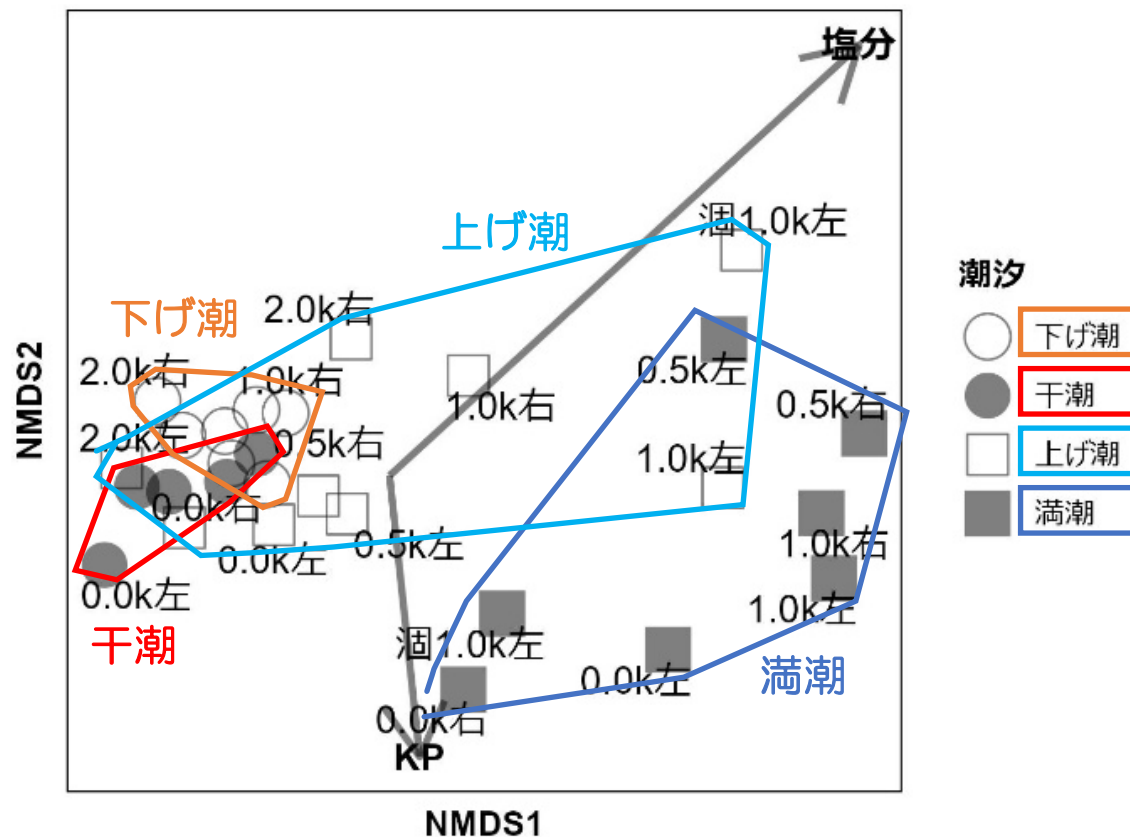


図 魚類相の類似度を用いたNMDSによる28検体から検出された魚類相の可視化。地点名を文字で示し、プロットの形状で潮汐回を示す（○下げ潮，△干潮，●上げ潮，▲干潮）。ばらつきを有意に説明する環境要因（ $P < 0.05$ ）を矢印で示した。

- 上げ潮時・満潮時に比べて、下げ潮時・干潮時の検体がまとまって配置され、魚類相のばらつきは塩分、KP、種数によって有意に説明された

→那珂川汽水域の2 km区間において、地区内の採水箇所空間的な違いより、どの潮汐タイミングで採水するか時間的な違いが大きかった

- 河岸の状況（自然河岸、捨石工法）と魚類相の間には有意な関係はみられなかった

→環境DNAの流下量は、概ね2 km以内（Jo et al., 2022）とされ、解像度が不足している可能性が高い

3. 結果

③潮汐間の環境DNA比較

(種数の比較)

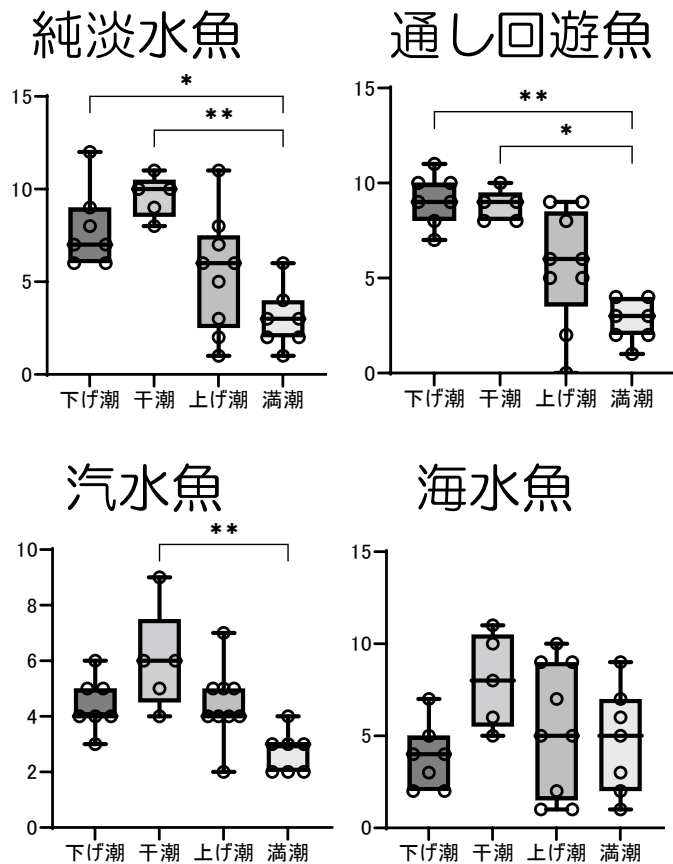
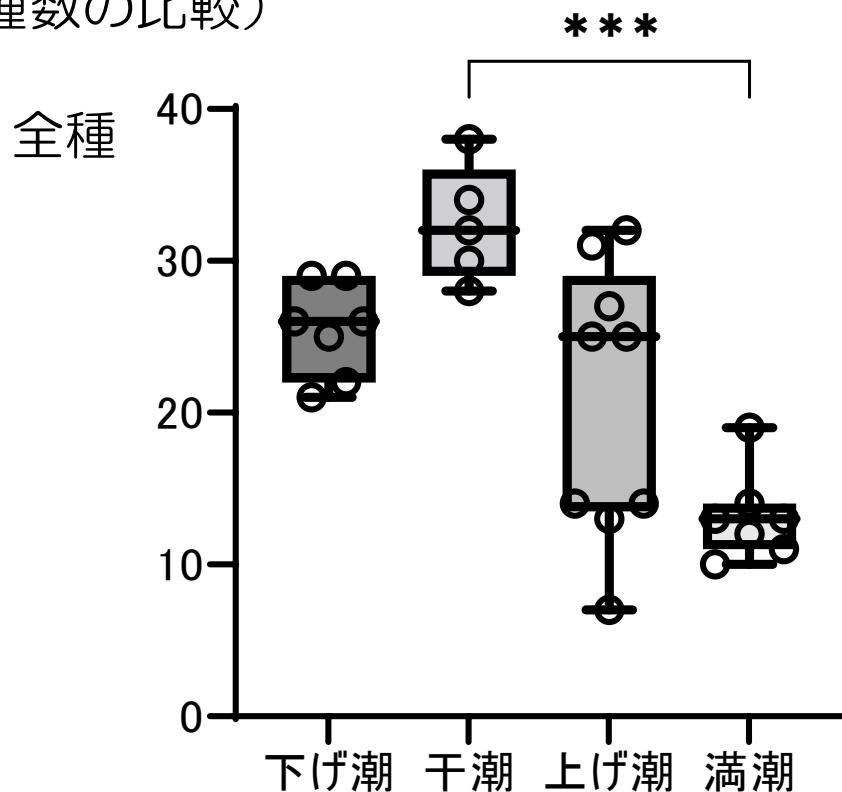


図 潮汐タイミングによる検出種数の違い (Kruskal-Wallisの多重比較検定
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

- 満潮時は、干潮時に比べて有意に種数が少なく、純淡水魚、通し回遊魚、汽水魚でも同様の傾向がみられたが、海水魚の種数に有意な違いはなかった
- 下げ潮、干潮、上げ潮の検体間の種数は、生態区分別でも有意な違いはみられなかった

3. 結果

③潮汐間の環境DNA比較

(種組成の比較) 第1位、第2位、第3位

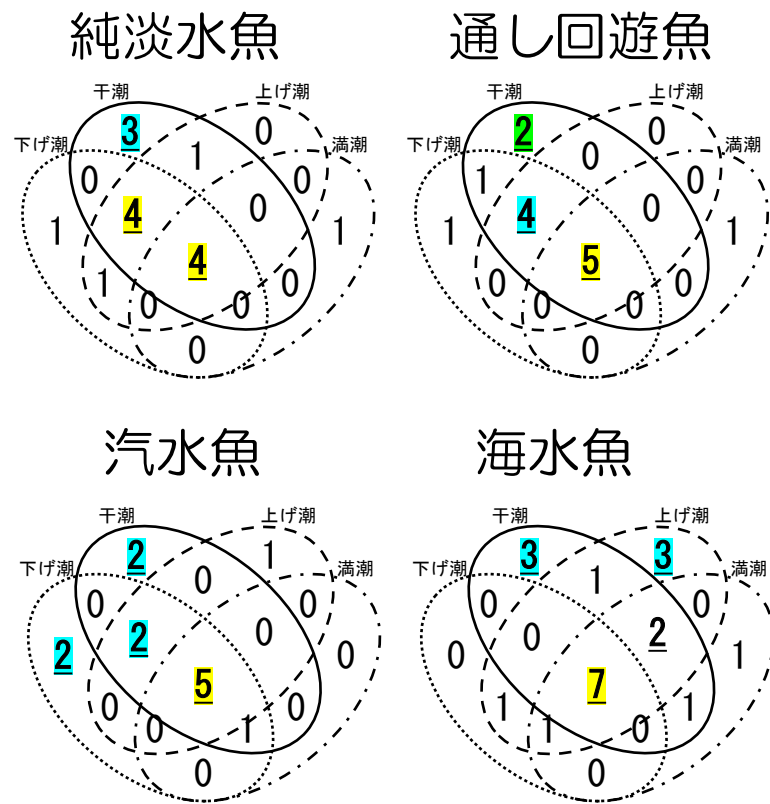
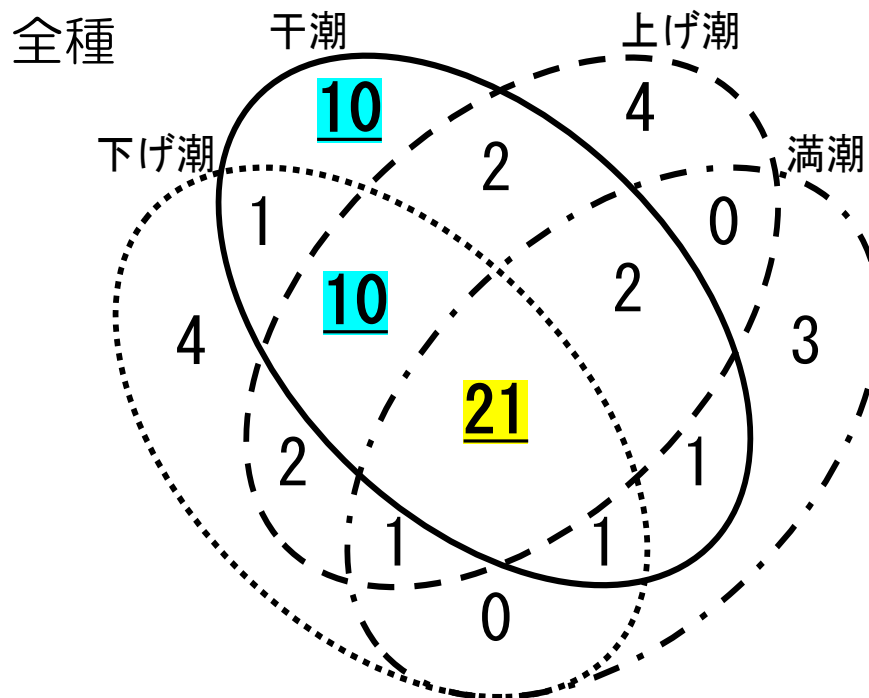


図 潮汐タイミングによる4地区における検出種の重複状況

- 4地区 (0.0k右、0.5k左、0.5k右、1.0k左) の合計種62種のうち干潮で48種、上げ潮で42種、下げ潮で40種、満潮で29種が検出され、干潮で最も多かった
- 干潮固有の10種に生態的な偏りは見られないが、下げ潮固有の4種に海水魚はみられず、上げ潮固有の4種に純淡水魚、通し回遊魚はみられなかった

4. 考察

■最適な採水タイミング

- NMDSの結果からは、那珂川汽水域の2 km区間において、地区内の採水箇所の空間的な違いより、時間的な違いが大きいことが分かった。魚類相の把握には、採水タイミングが重要

種数に有意差なし

干潮

干潮に固有の種が最も多い

下げ潮

固有の種は淡水魚がやや多い

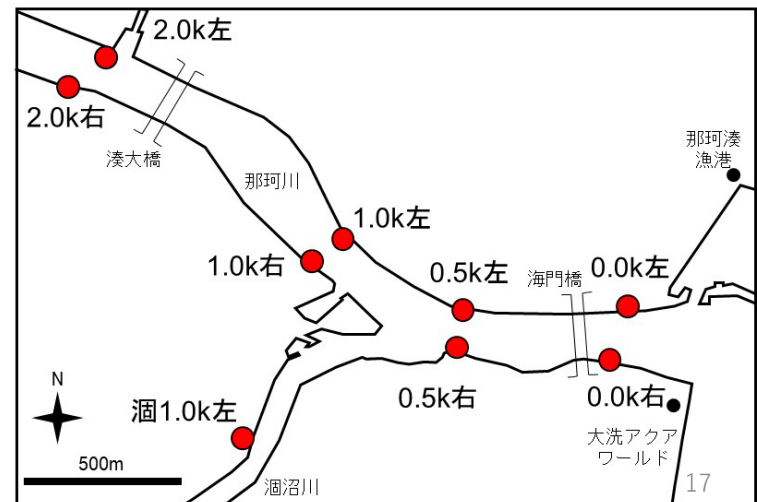
上げ潮

固有の種は海水魚がやや多い

他より種数が少なく避けるべき

満潮

- 汽水域で採水を行う際には、干潮時の採水を基本とし、上げ潮時か下げ潮時の採水を追加すると良いと考えられた。その際、確認したい魚種、漁港等ノイズとなるDNA放出が想定される施設との位置関係に注意する必要がある



5. まとめ

目的

汽水域における時空間的な環境DNAの 検出特性を把握する

- 那珂川河口部の2 km区間での環境DNAの魚類相は、空間的な差異より潮汐による時間的な違いで変化した
- 岸際環境と魚類相の間に有意な関係は見られなかった
- 汽水域で採水を行う際には、干潮時の採水を基本とし、上げ潮時か下げ潮時の採水を追加すると良いと考えられた