

名古屋市内ため池における環境DNA分析を用いた魚類相調査

岡村祐里子 大畑 史江 福岡 将之 榊原 靖

名古屋市環境科学調査センター 〒457-0841 愛知県名古屋市南区豊田五丁目16-8

Fish fauna survey by environmental DNA analysis on irrigation reservoirs in Nagoya City

Yuriko OKAMURA Fumie OHATA
Masayuki FUKUOKA Yasushi SAKAKIBARA

Nagoya City Institute for Environmental Sciences, 5-16-8 Toyoda, Minami-ku, Nagoya, Aichi 457-0841, Japan

Correspondence:

Yuriko OKAMURA E-mail: okamura@ncies.net

要旨

名古屋市内に位置するため池14か所について、環境DNA分析を用いた魚類相の把握を試みた。MiFish法による網羅的解析の結果、環境DNA分析によつてのべ13分類群が検出された。14地点中11地点においては、環境DNA分析で確認された分類群数が採捕調査で確認された分類群数と同じもしくは上回る結果となつており、名古屋市内のため池においても環境DNA分析による魚類相調査が有用であることが示唆された。また、環境DNA分析によつて、採捕調査では捕獲できなかったトウカイヨシノボリ（名古屋市版レッドリスト2020: 絶滅危惧 I A類）やヌマムツ（名古屋市版レッドリスト2020: 情報不足）といった絶滅危惧種が検出された。

序文

生物多様性の保全はますます重要性を増している。2022年12月に開催された生物多様性条約第15回締約国会議において新たな世界目標である「昆明・モンリオール生物多様性枠組」が採択され、2030年グローバルターゲットのひとつに「2030年までに陸と海のそれぞれ少なくとも30%を保護地域及びOECM（other effective area-based conservation measures：保護地域以外の生物多様性保全に貢献している場所）により保全」する、いわゆる「30 by 30 目標」が盛り込まれた（Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2022）。国内においては目標達成のために特にOECMの認定が重要であるとされている（環境省, 2022a）。里地里山など保護地域に指定されていない身近な生態系における多様性の評価が喫緊の課題であるが、生物多様性を評価するにあ

たっては、言うまでもなく対象区域における生物の生息状況を正確に把握することが必須である。30 by 30目標の達成のためには、限られた時間で、効率よく、多数の地点の調査を行う必要があり、生物調査の需要は高まるばかりである。

著者らはこれまでに、名古屋市内のため池の生物相について継続的に調査を行ってきた（大畑ほか, 2023a）。名古屋市周辺は愛知県内でも知多半島や渥美半島と並ぶため池の密集地帯であり、尾張丘陵の谷を中心として市内にかつては300を超えるため池が、現在でも110のため池が残存している（大畑ほか, 2023b；名古屋市環境科学調査センター, 2023）。高村（2019）が述べているように、ため池は湖沼や河川と比べても単位面積当たりの生物種数が圧倒的に多く、しかも、希少種や絶滅危惧種の重要な生息場所となっている。また、日本型OECM

とも言える「自然共生サイト」の認定基準（環境省，2022b）である「地理的に確定された区域であること」「統治責任者および管理責任者が特定されていること」を満たしている場合が多いと推察され，生物多様性の保全の意味でも，行政的な施策においても，生物相の把握が極めて重要と言える。一方で，池中央部や底質のやわらかい箇所など，構造上安全に採捕調査を行うことが容易でない場合も多く，ため池全体の生物相を正確に把握するのが困難である地点も少なくない。

近年，従来の捕獲を主体とする調査を補完し得る新たな生物分布の調査手法として環境DNA分析が注目されている（環境省自然環境局生物多様性センター，2022）。水や土壌，空気などの環境中から抽出されるDNAのことを環境DNAと呼び（Taberlet et al., 2012），環境DNA分析は，こうした環境DNAを集めて分析することで，生物の分布や遺伝情報，生理状態などの手がかりを得るための手法である（深谷，2022）。環境DNA分析によって示唆される種の分布や多様性は，一般に，捕獲などの従来手法による調査の結果と大きくは矛盾しないと考えられ，環境DNA分析による種検出の有効性や妥当性は現在では広く受け入れられている（深谷，2022）。従来手法と比較して野外で求められる作業が簡便であり多地点での調査も比較的容易に実施できること，捕獲を伴わないため生物や生態系への影響が少ないこと（環境省自然環境局生物多様性センター，2022），深海のように生息環境へのアクセスが困難な環境の調査にも効果的であること（Fujiwara et al., 2022），といった特徴から，特に淡水魚類については環境省，国土交通省など様々な主体において活用が進められている（平川ほか，2022）。湖沼やため池の調査についても先行研究は多数行われており，ため池における環境DNA分析については農林水産省（2023）がマニュアルを公開しているが，名古屋市内のため池において環境DNA分析を行った報告はまだない。都市部である名古屋市内のため池は全国的に見ると汚濁が進んでいる池が多く，アオコに代表される植物プランクトンの大量発生が確認される事例も少なくない（大畑ほか，2023b）。一般社団法人環境DNA学会（2020）は「赤潮やアオコなどの影響で採水サンプル中に高濃度のPCR阻害物質が混入する可能性がある」としており，名古屋市内のため池は環境DNA分析において注意を要す

る地点であると考えられる。

本研究では，環境DNA分析を利用した魚類調査のうち，主に多種の魚類を網羅的に調べることが可能な網羅的解析法（MiFish法：Miya et al., 2015）を用いて名古屋市内のため池における魚類相の把握を試みるとともに，採捕調査によって確認された種をどの程度検出できるか比較を行った。また，希少種の生息地スクリーニングへの適用可能性についても考察したので報告する。

材料および方法

1) 調査地点および調査時期

調査地点および調査時期を表1に示した。なお，調査地点の詳細については，希少種の生息環境を保護する観点から掲載していない。冬場には環境DNAの検出率が下がること，赤潮やアオコの影響でPCR阻害物質が混入する可能性があることが報告されているため（一般社団法人環境DNA学会，2020），環境DNA試料の採取は双方の影響が比較的少ない秋に実施した。

2) 採捕調査

魚類の採捕は投網（14から16節）およびタモ網（網目2 mm）を用いて実施し，採捕した種および目視で確認した種を記録した。種の同定は中坊（1993），向井（2017）および斎藤・内山（2015）を基本とした。なお，メダカ属 *Oryzias* sp.についてはメダカ属の一種，トウカイヨシノボリ *Rhinogobius telma*を除くヨシノボリ類 *Rhinogobius* spp.についてはヨシノボリ属の一種とした。

3) 環境DNA分析

採水および分析方法は基本的に環境DNA調査・実験マニュアルver2.2（一般社団法人環境DNA学会，2020）に準拠した。各地点とも採捕調査の実施箇所近傍にて水試料1 Lを採取し，DNAの分解を抑制するため10%塩化ベンザルコニウム溶液（富士フィルム和光純薬株式会社，大阪）を1 mL添加したのち冷蔵輸送した。試料はガラス繊維ろ紙（GF/A, Whatman, Maidstone, UK）で予備的にろ過したのち，カートリッジ式フィルター（Sterivex, 孔径 0.22 μm , Merck KGaA, Darmstadt, Germany）に環境DNAが含まれる細胞片等を捕集した。DNA抽出はMiya et al. (2016) を参照し，得られ

たDNAを魚類のユニバーサルプライマーMiFish (Miya et al. 2015) で増幅したのち、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina, San Diego, CA, USA) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列データについて、「MiFish pipeline」(Sato et al. 2018) により魚種の同定を行った。なお、内藤ほか (2020) に従い、100リード以下のデータは、潜在的なコンタミネーション (分析サンプル以外のDNAの混入) や不十分な反応を含むものとして、結果に反映しなかった。さらに、海産魚については、コンタミネーションや生活排水等の人間活動の影響と判断し、結果から除外した。分析結果は「MiFishによる種の識別に注意を要する淡水魚類の判定結果の一覧」(環境省自然環境局生物多様性センター, 2022) に従って精査を行い、種判別が困難な場合は属までの同定とした。

4) 採捕結果と環境DNA分析結果の整合

採捕調査と環境DNA分析では調査手法が異なるため、種・属・系統等の解像度が異なり、結果を単純に比較することができない (長谷部, 2022)。このため、それぞれの調査結果を比較するため、表2のとおり結果の整合処理を行った。

結果および考察

環境DNA分析によって得られた配列リード数を表1

に、採捕調査および環境DNA分析の結果を表3に示した。全14地点の調査によって、採捕調査ではのべ14分類群、環境DNA分析ではのべ13分類群が確認された。14地点中11地点においては、環境DNA分析で確認された分類群数が採捕調査で確認された分類群数と同じもしくは上回る結果となっており、名古屋市内のため池においても環境DNA分析による魚類相調査が有用であることが示唆された。一方で、地点番号 (Sta.) 13を除く13地点においては、採捕調査でのみ確認された分類群、環境DNA分析でのみ確認された分類群、あるいはその両方が認められていることから、この結果は採捕調査の重要性を否定するものではなく、環境DNA分析が採捕調査の補完として効果的であると推察された。

アオコに代表される植物プランクトンの大量発生の影響で環境DNA分析に阻害が生じる可能性を想定していたが、Sta.10は採水時にアオコの発生を目視で確認したにもかかわらず、環境DNA分析で確認された分類群数は採捕調査で確認された分類群数と同じであった。汚濁の進んだ名古屋市内のため池においても環境DNA分析による魚類相調査が問題なく実施でき、有用なデータが得られたと考えている。

一方で、Sta. 1-3では採捕調査で確認された分類群数が環境DNA調査で確認された分類群数を上回っており、採捕調査の重要性が改めて示される結果となった。Sta. 1はシルト質の底泥の影響で季節を問わず水の濁度

表1 調査地点および調査時期

地点番号	所在地	採捕調査日	環境DNA採水日	総リード数	解析に用いたリード数
1	守山区	2021/8/6	2022/11/7	48284	25690
2	守山区	2021/8/6	2020/11/12	51239	29234
3	守山区	2021/8/6	2020/11/12	67461	41802
4	守山区	2021/8/30	2021/11/16	69582	43227
5	千種区	2021/7/19	2021/11/16	68035	42320
6	名東区	2021/7/19	2021/11/16	63043	35563
7	名東区	2021/8/30	2021/11/16	66376	40220
8	天白区	2021/8/16	2021/10/18	49249	30684
9	緑区	2021/7/20	2022/11/7	95578	54237
10	緑区	2021/7/30	2022/11/7	69245	39922
11	緑区	2021/8/16	2021/10/18	66879	41838
12	緑区	2021/7/30	2022/11/7	78162	47741
13	緑区	2021/8/16	2021/10/18	60839	37799
14	緑区	2021/7/20	2021/10/18	66420	41827

が高い地点である。濁度の高い試料では分析に悪影響を及ぼす物質が増加することが報告されており (環境省自然環境局生物多様性センター, 2022), Sta. 1 はリード数が他の地点と比較して低いことから、試料に分析を阻害する物質が含まれていた可能性が考えられる。環境DNA分析の分析精度についてはまだ改善の余地があり、今後の課題としたい。

本研究では、環境DNA分析によって、名古屋市版レッドリスト2020 (名古屋市, 2020) において絶滅危惧種に指定されている魚類を複数種検出することができた。トウカイヨシノボリは名古屋市版レッドリストでは絶滅危惧 I A 類 (CR), 環境省レッドリスト2020 (環境省, 2020) でも準絶滅危惧 (NT) に指定されている。止水性生活史をもつため、生息地の消失や外来魚による捕食といったリスクにさらされている (Suzuki et al. 2019; 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 2015)。MiFish法では、トウカイヨシノボリを他のヨシノボリ類と判別することが可能であり、本研究ではSta.12とSta.14において環境DNA分析でトウカイヨシノボリが検

出されている。Sta.14は採捕調査でもトウカイヨシノボリを確認しているが、Sta.12では採捕調査では確認されておらず、詳細な追加調査が望まれる。

同様に、Sta. 9では環境DNA分析でヌマムツ *Candidia sieboldii*が検出された。ヌマムツは名古屋市版レッドリスト2020 (名古屋市, 2020) では情報不足 (DD) とされており、レッドデータブックなごや2015 (名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 2015) では市内の分布は庄内川支流および香流川と書かれている。著者らは過去に実施した調査でSta. 9において採捕調査でヌマムツを確認している (大畑ほか, 2023a)。本研究の採捕調査では捕獲に成功していないが、環境DNA分析でヌマムツが検出されたことから、採水当時はヌマムツが生存していた可能性がある。Sta. 9についても詳細な追加調査が望まれる。

環境DNA分析は種を高い感度で検出できることから、特に個体密度の低い種の調査において有効であるといわれている (深谷, 2022)。本研究の結果は希少種の生息状況の把握、特に初期の生息地スクリーニングに有用で

表2 採捕調査結果と環境DNA分析結果の整合

標記	採捕調査結果	環境DNA分析結果
コイ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ (飼育型) <i>Cyprinus carpio</i>
フナ属 <i>Carassius</i> sp.	フナ属の一種 <i>Carassius</i> sp.	ギンブナ <i>Carassius</i> sp. / キンブナ <i>Carassius buergeri</i> subsp. 2 / オオキンブナ <i>Carassius buergeri buergeri</i> / ニゴロブナ <i>Carassius buergeri grandoculis</i> / キンギョ <i>Carassius auratus</i> / フナ属の一種 (琉球列島) <i>Carassius</i> sp.
モツゴ <i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ <i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ <i>Pseudorasbora parva</i> / モツゴ属の一種 <i>Pseudorasbora interrupta</i> [海外]
タモロコ属 <i>Gnathopogon</i> sp.	タモロコ <i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	ホンモロコ <i>Gnathopogon caeruleus</i> / タモロコ <i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>
ニゴイ <i>Hemibarbus barbuis</i>	ニゴイ <i>Hemibarbus barbuis</i>	ニゴイ <i>Hemibarbus barbuis</i> / コウライニゴイ <i>Hemibarbus labeo</i>
スゴモロコ属 <i>Squalidus</i> sp.	スゴモロコ属の一種 <i>Squalidus</i> sp.	スゴモロコ <i>Squalidus chankaensis biwae</i> / デメモロコ <i>Squalidus japonicus japonicus</i> / コウライモロコ <i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>
メダカ属 <i>Oryzias</i> sp.	メダカ属の一種 <i>Oryzias</i> sp.	ミナミメダカ (ヒメダカを含む) <i>Oryzias latipes</i>
ヨシノボリ属 <i>Rhinogobius</i> sp.	ヨシノボリ属の一種 <i>Rhinogobius</i> spp.	トウヨシノボリ <i>Rhinogobius</i> sp. / クロヨシノボリ <i>Rhinogobius brunneus</i> / オオヨシノボリ <i>Rhinogobius fluvialis</i> / カズサヨシノボリ <i>Rhinogobius</i> sp. KZ / オウミヨシノボリ <i>Rhinogobius</i> sp. OM / シマヒレヨシノボリ <i>Rhinogobius tyoni</i> / ルリヨシノボリ <i>Rhinogobius mizunoi</i> / クロダハゼ <i>Rhinogobius kurodai</i>
チチブ属 <i>Tridentiger</i> sp.	ヌマチチブ <i>Tridentiger brevispinis</i>	チチブ <i>Tridentiger obscurus</i> / ヌマチチブ <i>Tridentiger brevispinis</i> / ナガノゴリ <i>Tridentiger kuroiwa</i>

あることを支持するものであり、加えて、名古屋市内のため池においても適用可能であることを示している。環境DNA分析の結果をもとに、人的資源に制限される採

捕調査をより重要性の高い地点で行うことが可能となり、生物多様性保全や生態系管理の取り組みを効率化できると期待される。

表3 採捕調査と環境DNA分析で検出された魚種一覧

和名 学名	地点番号													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
コイ <i>Cyprinus carpio</i>			○	●	●	●	●	○●	△●	○●	○●	●	△●	●
ゲンゴロウブナ <i>Carassius cuvieri</i>		●	●		●			●	●	●	●	●		
フナ属 <i>Carassius</i> sp.	○●	○●	○●	○●	●	○●	●	○●	●	○●	○●	○●	○●	○●
ヌマムツ <i>Nipponocypris sieboldii</i>									●					
モツゴ <i>Pseudorasbora parva</i>	○						○●	○●	○●	○●	○●	●	○●	●
タモロコ属 <i>Gnathopogon</i> sp.							●			○				
カマツカ <i>Pseudogobio esocinus</i>			○											
ニゴイ <i>Hemibarbus barbus</i>					△									
スゴモロコ属 <i>Squalidus</i> sp.	○	○	○											
カダヤシ <i>Gambusia affinis affinis</i>						○			●	○	○	○●	○●	
メダカ属 <i>Oryzias</i> sp.							○							●
ブルーギル <i>Lepomis macrochirus macrochirus</i>	○	○	○	○●	●	○●	○●	○●		○●	○●	○●		
オオクチバス <i>Micropterus salmoides</i>	○	○	○●	●	○●		○●							
トウカイヨシノボリ <i>Rhinogobius telma</i>												●		○●
ヨシノボリ属 <i>Rhinogobius</i> sp.	○	○	○	○	○●		○		○	○●	●	○●		
チチブ属 <i>Tridentiger</i> sp.	○													
カムルチー <i>Channa argus</i>					●				●	●				●
確認分類群数*	1/7	2/5	3/7	4/3	7/3	3/3	6/5	5/4	7/3	7/7	6/5	8/4	4/4	6/2

採捕調査 (○：採捕確認、△：目視確認)

環境DNA分析 (●：検出)

*環境DNA分析で検出された分類群数 / 採捕調査で確認された分類群数

都市部である名古屋市にとって、ため池は地域の生物多様性保全において極めて重要な環境である。環境DNA分析の長所を生かし、採捕調査の補完として活用していくことで、希少種をはじめとする生物たちの貴重な生息環境が迅速かつ適切に保全されることが望まれる。

謝辞

トウカイヨシノボリの同定にあたってはなごや生物多様性センターの宇地原永吉氏にご助言を頂いた。ここに感謝を申し上げる。

引用文献

- 深谷肇一. 2022. マクロ生物調査のための環境DNA分析 – 種の検出と定量およびその他の応用における可能性と課題 –. 全国環境研会誌, 47: 159-165.
- Fujiwara, Y., S. Tsuchida, M. Kawato, K. Masuda, S. O. Sakaguchi, T. Sado, M. Miya and T. Yoshida. 2022. Detection of the largest deep-sea-endemic teleost fish at depths of over 2,000 m through a combination of eDNA metabarcoding and baited camera observations. *Frontiers in Marine Science*, 9: 945758.
- 長谷部勇太・濱邊一弥・武田麻由子・中山駿一・菊池宏海・勝呂尚之. 2022. 環境DNA を用いた県内生物多様性調査手法の確立. 神奈川県環境科学センター研究報告, 45: 1-10.
- 平川周作ほか. 2022. 水生生物の保全に係る水質環境基準の指標となる魚種の生息状況調査における環境DNA分析の可能性. 全国環境研会誌, 47: 19-24.
- 一般社団法人環境DNA学会. 2020. 環境DNA調査・実験マニュアルVer. 2.2. https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA_manual_ver2_2.pdf. 2023年8月31日確認
- 環境省. 2020. 環境省レッドリスト2020. <https://www.env.go.jp/content/900515981.pdf>. 2023年8月31日確認
- 環境省. 2022a. 30by30ロードマップ. <https://www.env.go.jp/content/900518835.pdf>. 2023年8月31日確認
- 環境省. 2022b. 認定基準. <https://policies.env.go.jp/nature/biodiversity/30by30alliance/documents/30by30site-Identification-criteria.pdf>. 2023年8月31日確認
- 環境省自然環境局生物多様性センター. 2022. 環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き. 改訂第2版. 環境省自然環境局生物多様性センター, 富士吉田. 97pp.
- Miya, M. et al. 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(7): 150088.
- Miya, M., T. Minamoto, H. Yamanaka, S. Oka, K. Sato, S. Yamamoto, T. Sado and H. Doi. 2016. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *J Vis Exp*. 117: 54741.
- 向井貴彦 (編). 2017. 岐阜県の魚類. 岐阜新聞社, 岐阜. 214pp.
- 名古屋市. 2020. 名古屋市版レッドリスト2020. <https://www.city.nagoya.jp/kankyo/cmsfiles/contents/0000125/125632/redlist2020.pdf>. 2023年8月31日確認
- 名古屋市環境科学調査センター. 2023. 環境科学調査センターだより vol.44. <https://www.city.nagoya.jp/kankyo/cmsfiles/contents/0000068/68418/dayori44.pdf>. 2023年8月31日確認
- 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課. 2015. 名古屋市の絶滅のおそれのある野生生物 レッドデータブックなごや 2015 – 動物編 –. 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 名古屋. 504pp.
- 内藤太輔・都築隆禎・蔭山一人・宮本健也・赤松良久・乾隆帝. 2020. 環境 DNA による魚類の網羅的解析の河川水辺の国勢調査への導入に関する検討. リバーフロント研究所報告, 31: 9-16.
- 中坊徹次 (編). 1993. 日本産魚類検索全種の同定. 東海大学出版会, 東京. 1474pp.
- 農林水産省農村振興局. 2023. 防災重点農業用ため池の廃止工事における生態系配慮について. https://www.maff.go.jp/j/nousin/kankyo/kankyo_hozen/attach/pdf/tameike-9.pdf. 2023年8月31日確認.
- 大畑史江・岡村祐里子・福岡将之・榊原 靖. 2023a. 市内ため池における2017年度および2021年度の生物調査結果概要 (底生動物, 魚類, 両生類). 名古屋市環境科学調査センター年報, 11: 48-53.

- 大畑史江・岡村祐里子・福岡将之・榎原 靖. 2023b. 市内ため池における内部生産の現況. 名古屋市環境科学調査センター年報, 11: 38-47.
- 斉藤憲治・内山りゅう. 2015. くらべてわかる淡水魚. 山と溪谷社, 東京. 127pp.
- Sato, Y., M. Miya, T. Fukunaga, T. Sado and W. 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.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2022. <https://www.cbd.int/doc/decisions/cop-15/cop-15-dec-04-en.pdf>. 2023年8月31日確認
- Suzuki, T., S. Kimura and K. Shibukawa. 2019. Two new lentic, dwarf species of *Rhinogobius* Gill, 1859 (Gobiidae) from Japan. *Bulletin of The Kanagawa Prefectural Museum Natural Science*, 48: 21-36.
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei and L. H. Rieseber. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 1789-1793.
- 高村典子. 2019. ため池の生物多様性損失の評価と保全－兵庫県南部の調査研究から－. *農村計画学会誌*, 38: 332-335.