

簡易的な環境 DNA 分析方法を用いた絶滅危惧種 イタセンパラの検出

山崎裕治¹・西尾正輝²

¹ 〒 930-8555 富山県富山市五福 3190 富山大学大学院理工学研究部

² 〒 935-0016 富山県氷見市鞍川 1060 氷見市教育委員会

(2019年1月22日受付；2019年4月9日改訂；2019年4月10日受理；2019年7月9日J-STAGE 早期公開)

キーワード：簡易検出, LED 照射装置, 低毒性試薬, 環境教育, 保全

魚類学雑誌
Japanese Journal of
Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2019

Yuji Yamazaki* and Masaki Nishio. 2019. Detection of endangered Itasenpara bitterling using simple environmental DNA analysis. Japan. J. Ichthyol., 66(2): 171-179. DOI: 10.11369/jji.19-005.

Abstract Environmental DNA (eDNA - genetic material released from an organism into the environment, such as water), which has recently gained attention as a new area of study, has applications in confirming the presence and estimating the biomass of target species, especially endangered fishes, as well as aiding an understanding of the general fish fauna. However, eDNA analysis requires expensive equipment and reagents, and is presently subjected to restrictions on widespread use, especially for environmental education and public awareness. For future conservation studies of the endangered Itasenpara bitterling *Acheilognathus longipinnis*, and subsequent application to other species, a species-specific PCR amplification and simple method of eDNA analysis was developed. Species-specific primer pairs based on nucleotide sequences were designed for the Itasenpara bitterling and closely related species. These enabled Itasenpara bitterling-specific amplification in PCR experiments on DNA samples obtained from fin tissues. Subsequently, species-specific amplification of eDNA samples obtained from a watershed containing Itasenpara bitterling habitat was confirmed using a simple PCR-based experimental method, although the amplification ratio varied, probably due to habitat conditions and bitterling growth stage.

*Corresponding author: Graduate School of Science and Engineering for Research, University of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama 930-8555, Japan (e-mail: yatsume@sci.u-toyama.ac.jp)

昨今、自然環境の人為的変化が原因となり、多くの生物種において、その生息範囲や個体数の減少が懸念されている（例えば、Frankham et al., 2002）。そのような希少種の保全のためには、その基礎資料として、生息状況の継続的な把握が必要である（例えば、Nichols and Williams, 2006）。従来、対象生物における生息の有無を確認するためには、対象生物の採集、目視による観察、あるいは糞や足跡などの痕跡調査が行われてきた（例えば、Yamazaki et al., 2006；豊岡ほか, 2017）。しかし、個体数の少ない生物や、逃避や隠遁する能力に長けた生物を発見することは難しい。また、

水中を主な生活の場とする生物においては、上記のような痕跡をとらえることは困難な場合が多い。さらに、このような調査や採集行為が、対象生物や共存生物、あるいはそれらの生息環境に与える影響も考慮する必要がある。

そこで近年では、環境中に存在する DNA（以下、環境 DNA）を対象とした調査方法が注目されている（Rees et al., 2014；高原ほか, 2016；Valentini et al., 2016；山中ほか, 2016）。例えば、水中には、魚類などの水棲生物が排泄した糞や体腔液、あるいは体表から遊離した鱗や粘膜などに由来する DNA が含まれている（Minamoto et al., 2012；Barnes and

Turner, 2016; 高原ほか, 2016). この環境 DNA を調べることで、そこに生息する生物種の把握や生物量の推定を行うことが可能となる (Thomsen and Willerslev, 2015; 高原ほか, 2016; Valentini et al., 2016; 山中ほか, 2016). そのため最近では、魚類を対象とした環境 DNA 分析が多く行われ、希少魚類における生息の有無の確認 (Koizumi et al., 2015; 米田ほか, 2015; 福岡ほか, 2016; Sakata et al., 2017; 丹羽ほか, 2018; Harper et al., 2019) や生物量の推定 (Yamamoto et al., 2016; Doi et al., 2017), さらには魚類相の網羅的な把握 (Miya et al., 2015; Valentini et al., 2016) などにおける有効性が示されている。

環境 DNA 分析は、上記の通り学術的な目的で活用されると同時に、環境教育や市民向けの普及啓発活動における利用も期待されている (Biggs et al., 2015; 高原ほか, 2016). しかし、後者の目的のために行われた活用事例は必ずしも多くはない (米田ほか, 2015; 福岡ほか, 2016; 源ほか, 2016). その原因として考えられることは、従来採用されている環境 DNA 分析方法において、その多くの場合、次世代シーケンサーやリアルタイム PCR 装置およびそれらに用いる試薬類など、高額な機器や試薬類あるいは運用費用が必要となるためである。そして、それら機器等を所有する研究機関は限られており、それら機関と連携した教育・普及啓発活動は、未だ十分には行われていない。また同時に、実験方法によっては、発がん性を有する試薬類や紫外線照射機器などを使用する場合がある。そのため、それらの取り扱いに対する専門的技術や知識、あるいは施設を有しない場合は、環境 DNA 分析の実施に困難が伴う。これらの理由から、簡便、安価、そして安全を担保した簡易的な環境 DNA 分析方法の確立が必要であると考えられ、その活用により、希少種保全を目的とした地域レベルの調査や、環境教育および普及啓発活動の促進が期待される。また、環境 DNA を用いて希少種の生息状況を把握するためには、対象種を特異的に PCR 増幅するプライマーが必要となる。しかし、これまでに魚類で報告されている種特異的プライマーは必ずしも多くはなく (高原ほか, 2016), より多くの希少種について、種特異的なプライマーの開発が必要である。

イタセンパラ *Acheilognathus longipinnis* は、コイ科タナゴ亜科タナゴ属に属する純淡水魚である。本種は、産卵期 (9-11 月) に生きた淡水二枚貝の鰓内に卵を産み込む産卵生態を有する (小川,

2008; 西尾ほか, 2012). 産み込まれた卵は、翌年の春に二枚貝から浮上し、その後成長し、ほとんどの個体が 1 年で性成熟し、産卵後に死亡する (Nishio et al., 2015; 上原, 2016). 本種の生息地は、富山県氷見市の万尾川水系、大阪淀川流域、そして濃尾平野の木曾川流域にのみ限られている。いずれの水域においても、生息地の縮小および個体数の減少が懸念されており、文化庁により国指定天然記念物に指定され、また環境省により国内希少野生動植物種に指定されるとともに、レッドリストにおいて絶滅危惧 IA 類に分類されている (長田, 2001; 小川, 2008; 環境省, 2018).

富山県氷見市の万尾川は、流程約 10 km の小規模河川であり、このうち中流域の約 3 km の範囲でのみイタセンパラの生息が確認されている (氷見市教育委員会, 2008; Nishio et al., 2017). 万尾川におけるイタセンパラの生息状況調査は、管理団体である氷見市により、捕獲や目視観察に基づいて行われてきた (例えば、氷見市教育委員会, 2008). しかし、イタセンパラは国指定天然記念物および国内希少野生動植物種であるため、その捕獲等には制約がある。加えて本種は成長段階に応じて生活場所を変化させ、また灌漑期 (主に 4-6 月) においては万尾川の透明度が低いため、1 年を通じた生息状況の把握には困難が伴う場合が多かった (氷見市教育委員会, 2008; Nishio et al., 2015; 西尾ほか, 2017). そのため、環境 DNA 分析の活用が期待されるが、イタセンパラに特異的なプライマーは報告されていない。また、生息地周辺の教育機関では、イタセンパラを用いた環境教育が行われており (山崎ほか, 2017), その発展や市民を対象とした普及啓発活動のために、簡易的な環境 DNA 分析方法の確立が求められている。

そこで本研究では、富山県氷見市に生息するイタセンパラを保全するために、その基礎資料である本種の生息状況を把握することを目的として、イタセンパラ DNA を特異的に検出する方法の確立を行った。そしてその方法を用いて、PCR および電気泳動による簡易的な環境 DNA 分析方法の開発を目指した。

材料と方法

イタセンパラ DNA の特異的増幅 イタセンパラ DNA を特異的に検出するためのプライマー作成を行った。まず、イタセンパラが属するコイ目魚類

(Cypriniformes)のうち、氷見市の河川に生息が確認されている種(例えば, Yamazaki et al., 2006; 山崎ほか, 2014; Nishio et al., 2015)のミトコンドリア DNA シトクロム *b* 領域の塩基配列情報を, National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した。対象魚種および参照配列として, イタセンパラ(氷見由来 AB458530, 淀川由来 AB366451), ミナミアカヒレタビラ *Acheilognathus tabira jordani* (AB872047), ヤリタナゴ *Tanakia lanceolata* (AB208544), タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* (AB620133), ギンブナ *Carassius auratus langsdorfi* (AB006953), コイ *Cyprinus carpio* (AB158807), タモロコ *Gnathopogon elongatus elongatus* (LC098157), モツゴ *Pseudorasbora parva* (HM117901), オイカワ *Zacco platypus* (AB198972), ウグイ *Tribolodon hakonensis* (AB162647), アブラハヤ *Phoxinus lagowskii steindachneri* (AB162650), タカハヤ *Phoxinus oxycephalus* (LC277227), カマツカ *Pseudogobio esocius* (LC098208), ニゴイ *Hemibarbus barbus* (LC098158), ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (AB899674), そしてニシシマドジョウ *Cobitis biwae* (AP011344) を選択した。イタセンパラおよび近縁種の塩基配列データに基づき, L 鎖側(フォワード側)の 3' 末端側にイタセンパラ DNA に特異的な塩基が多く挿入されるようにプライマーを設計した。その後, NCBI の Primer-BLAST 機能 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて, プライマーの融解温度(T_m 値)が 60°C 前後になる H 鎖側(リバース側)のプライマーおよび増幅される可能性のあるコイ目魚種を, 同機能の初期設定を利用して検索した。さらに, 得られた配列について, NCBI の BLAST 機能 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いた網羅的な検索を行った。

設計したプライマーについて, 富山県氷見市に生息するイタセンパラおよびタナゴ類 3 種(ミナミアカヒレタビラ, ヤリタナゴ, タイリクバラタナゴ), さらにイタセンパラと同所的に生息するギンブナを対象として, イタセンパラ DNA に特異的な PCR 増幅を確認した。実験に供したイタセンパラは, 氷見市に造成されたイタセンパラ保護池に導入するために, 2015 年 6 月に万尾川において採集された。採集後, 富山大学理学部・氷見市連携研究室において飼育し, 同年 9 月に標準体長 30 mm 程度に成長した個体について, 尾鰭の一部を切除して 99% エタノールで固定し, DNA 分析に供した。尾鰭の一部を切除された個体は, 活魚状態にてイタセンパラ保護池に導入さ

れた。ミナミアカヒレタビラ, タイリクバラタナゴおよびギンブナは万尾川において, ヤリタナゴは氷見市の上庄川において, それぞれ 2016 年 3 月に採集された個体の鰭の一部を DNA 分析に供した。いずれの個体も, 活魚状態にて採集地に放流した。なお, 一連の作業はイタセンパラの現状変更を伴うため, 「文化財保護法」および「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」の規定に基づき, 文化庁, 環境省および氷見市から許可を得て実施した。また, ミナミアカヒレタビラは, 富山県の指定希少野生動植物であるため, その採集等においては, 富山県から許可を得て実施した。これらを含め, 魚類の扱いにおいては, 日本魚類学会の「研究材料として魚類を使用する際のガイドライン」に基づいて十分な配慮を行った。

鰭試料からの DNA 抽出については, DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて, マニュアルにしたがって行い, 各種の粗全 DNA を得た。抽出産物におけるミトコンドリア DNA の存在を確認するために, Sakai et al. (2009) にしたがって, ミトコンドリア DNA 調節領域を増幅するユニバーサルプライマー (L15923 および H16500; Iguchi et al., 2003) を用いた PCR を行い, 全ての DNA 試料で増幅を確認した。その後, イタセンパラ DNA 特異的プライマーによる増幅を確認する PCR を実施した。その PCR では, PrimeSTAR GXL Polymerase (タカラバイオ) を用い, 溶液の組成は, 0.3 μ L の Polymerase, 3 μ L の 5 \times Buffer, 1.2 μ L の dNTP Mixture, 0.6 μ L の終濃度 0.2 μ M プライマー両側, 8.3 μ L の滅菌水, そして 1 μ L の粗全 DNA であり, 全量を 15 μ L とした。PCR は, PCR Thermal Cycler Dice mini TP100 (タカラバイオ) を用い, 98°C を 10 秒, 60°C を 15 秒, 68°C を 10 秒からなるサイクルを 30 サイクル行った。各種について, 同一条件下で, 10 回の PCR を行った。

PCR による増幅産物の確認のために, 4 μ L の PCR 反応後溶液と 1 μ L の GelGreen (富士フィルム和光純薬) を混合し, TAE 緩衝液中の 2% Agarose Tabrets (BIOLINE) にて, 50V で 1 時間の電気泳動を行った。その後, LED 照射装置ゲルみえーる (富士フィルム和光純薬) を用いて, 増幅産物の有無を確認した。この際, 増幅産物の大まかな増幅サイズを確認するために, 分子量マーカーとして 200bp DNA Ladder (タカラバイオ) を用いた。

環境 DNA 分析 環境 DNA 試料として, イタ

Table 1. Summary of environmental DNA samples and results of amplification using *Itasenpara* bitterling specific primers

No.	Collection site / source	Collection date	<i>Itasenpara</i> bitterling ¹ presence/absence	Filtration method	Amplification ratio ²
Fields					
1	Moo River	4 Jun, 2018	+	Filter paper	1 / 10
2	Moo River	21 Nov, 2018	+	Sterivex	5 / 10
3	Yatabe River	21 Nov, 2018	-	Sterivex	0 / 10
4	Conservation Pond	4 Jun, 2018	+	Filter paper	2 / 10
5	Conservation Pond	21 Nov, 2018	+	Sterivex	5 / 10
Himi corroborative laboratory					
6	Aquarium containing <i>Itasenpara</i> bitterling	21 Nov, 2018	+	Sterivex	10 / 10
7	Aquarium containing species other than <i>Itasenpara</i> bitterling	21 Nov, 2018	-	Sterivex	
8	Reverse-Osmosis water	21 Nov, 2018	-	Sterivex	

¹Based on field survey and visual inspections (see text)

²Number of amplifications / number of experiments

+ present; - absent

センパラの生息が確認されている万尾川、イタセンパラ保護池、富山大学理学部・氷見市連携研究室のイタセンパラ飼育水槽から、それぞれ採水した水試料を用いた (Table 1)。また比較のために、万尾川に隣接する仏生寺川の支流であり、イタセンパラの生息が確認されていない矢田部川から採水した水試料を用いた。同様に、富山大学理学部・氷見市連携研究室において、タイリクバラタナゴ、ギンブナ、タモロコ、モツゴおよびドジョウが混生飼育されている水槽から採水した。さらにネガティブコントロールとして、逆浸透膜処理水を用いた。

各河川および保護池において、プラスチック製ボトルを用いて、1Lの表層水を直接採水した。一部河川においては、橋梁からひも付きバケツを用いて採水し、そこから1Lの水試料を得た。採水した水試料は、冷蔵状態で富山大学理学部・氷見市連携研究室の実験室に持ち帰った。富山大学理学部・氷見市連携研究室の水槽においては、プラスチック製ボトルを用いて、1Lの表層水を直接採水した。

水試料の濾過は2つの方法を用いて、採水した日に行われた。1つ目の方法として、平均孔径0.7 μmのガラス繊維濾紙 (GF/F, GEヘルスケア・ジャパン) を用いて1Lの水試料の濾過を行った。また、1枚の濾紙で濾過が困難な場合は、2枚の濾紙を用いて、それぞれ500 mLずつ濾過した。DNA抽出までの間、濾紙は家庭用冷凍庫にて、-18°C以下で保存した。2つ目の濾過方法として、

平均孔径0.45 μLのステリベクス (Merck) を用いて、採水後に現地にて速やかに、200 mLの水試料の濾過を行った。濾過後ただちに両端をパラフィルムで封じ、冷蔵状態で、上記研究室に持ち帰り、DNA抽出まで-18°C以下で保存した。なお、採水および濾過作業の際には、使い捨て手袋を着用し、器具類は次亜塩素酸ナトリウム処理によりDNAを除去したのち、逆浸透膜処理水を用いて十分にリンスした。

DNA抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kitを用いて、Miya et al. (2015)の方法を一部改変し、実施した。濾紙からのDNA抽出の場合、室温で濾紙を解凍した後、既存のメンブレンを除去したスピнкаラム (EZ-10, Bio Basic) に詰め、4,000 gで2分間遠心分離し、濾紙を脱水した。その濾紙を1.5 mLチューブに移し、400 μLの滅菌水、20 μLのProteinase Kおよび180 μLのBuffer ALを混合した溶解液を加え、56°Cで30分間インキュベートした。その後、コレクションチューブを交換した上記スピнкаラムに移し、4,000 gで2分間遠心分離した。この濾液をDNeasy Mini Spin Columnに移し、4,000 gで2分間遠心分離した。なお、1つの試料につき2枚の濾紙を用いた際には、これ以前の過程を濾紙ごとに行い、この過程を2回行うことで、1つの試料にまとめた。その後、コレクションチューブを交換し、DNeasy Mini Spin Columnに500 μLのBuffer AW2を添加し、12,000 gで4分間遠心分離した。そして、DNeasy Mini Spin Columnを新規の1.5 mLチューブに移し、

100 μ L の Buffer AE を加え、室温で 1 分間静置した後に、4,000 g で 2 分間遠心し、DNA 抽出産物を得た。得られた DNA 抽出産物は、PCR まで、 -18°C 以下で保存した。一方、ステリベクスからの DNA 抽出においては、ステリベクスを解凍後、上記の溶解液をステリベクスに直接注入し、以降は上記と同様に行った。このうち、 56°C で 30 分間インキュベートする間に、複数回の振盪操作を行った。

得られた環境 DNA 試料を鋳型として、上記と同じ条件で、各試料について 10 回の PCR を行った。そして、10 回の PCR のうち、増幅産物の濃さに関わらず、増幅が確認できた回数を記録した。また、増幅産物がイタセンパラの DNA であるか否かを確認するために、FastGeneTM ゲル/PCR 抽出キット（日本ジェネティクス）を用いて、増幅産物のゲルからの切り出しおよび DNA 抽出を行った。この DNA 抽出産物について、Sakai et al. (2009) の方法に従い、上記で設計したプライマーを用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列を NCBI の BLAST 機能を用いて検索した。

結 果

イタセンパラ DNA の特異的増幅 イタセンパラ DNA を特異的に増幅するプライマーとして、L 鎖側 (itasen-cytb-L: CGCAACCATCTTACACCTTTA) および H 鎖側 (itasen-cytb-H: AGTTGGGTGA

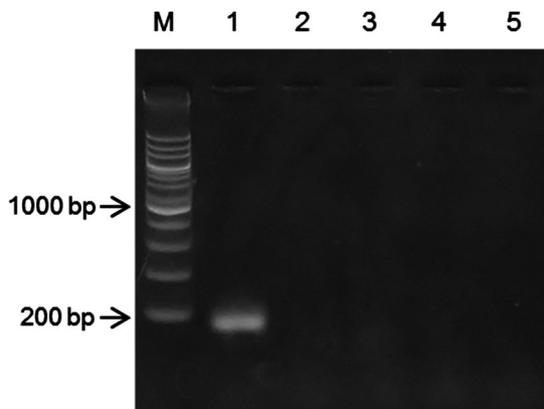


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR amplification using Itasenpara bitterling specific primers (itasen-cytb-L / itasen-cytb-H) in mitochondrial DNA cytb region of *Acheilognathus longipinnis* (1), *A. tabira jordani* (2), *Tanakia lanceolata* (3), *Rhodeus ocellatus* (4), and *Carassius auratus langsdorfi* (5). M, 200 bp DNA ladder size marker.

GAACAATGCT) のプライマーをそれぞれ設計した。予想される増幅産物サイズは、両プライマーを含めて 173 塩基であった。設計したプライマーの特異性を NCBI の Primer-BLAST 機能を用いて確認した結果、L 鎖側・H 鎖側の双方と一致する配列を有する種は、イタセンパラのみであった。また、NCBI の BLAST 機能による検索の結果も同様であった。当該プライマーにおけるイタセンパラ DNA の特異的増幅を確認するために、イタセンパラを含むタナゴ類およびギンブナの鱗に由来する粗全 DNA を鋳型とした PCR を行った結果、イタセンパラの粗全 DNA を鋳型にした PCR において、10 回の PCR のすべてにおいて増幅が確認され、電気泳動像から判断される増幅産物のサイズは、200 塩基より少し小さかった (Fig. 1)。一方、他魚種の粗全 DNA を鋳型にした PCR においては、各種 10 回の PCR のすべてにおいて、増幅は確認されなかった。

水試料からのイタセンパラ DNA の検出 各水試料について、PCR をそれぞれ 10 回行った結果、6 月の万尾川試料においては 1 回、11 月の試料においては 5 回の PCR において増幅が確認された (Table 1)。イタセンパラ保護池試料においては、PCR をそれぞれ 10 回行った結果、2 回あるいは 5 回の PCR において増幅が確認された。一方、矢田部川試料においては、10 回の PCR すべてで増幅が確認されなかった。富山大学理学部・氷見市連携研究室の水槽から得られた環境 DNA については、イタセンパラ飼育水槽試料は 10 回の PCR すべてで増幅が確認された。一方、イタセンパラを飼育していない水槽試料およびネガティブコントロールとして用いた逆浸透膜処理水の試料からは、いずれも 1 回も増幅が確認されなかった。

万尾川試料において確認された増幅産物を切り出し、塩基配列を決定し、BLAST 検索を行った結果、登録されているイタセンパラ (AB458530 など) と同じ配列であることが確認された。

考 察

本研究において設計したイタセンパラ DNA を特異的に PCR 増幅するプライマーを用いて、イタセンパラおよび近縁魚種のタナゴ類 3 種、さらにはギンブナの鱗から抽出した DNA 試料を鋳型とした PCR を行った結果、イタセンパラから得られた DNA 試料においてのみ、増幅が確認された。またその増幅産物の塩基配列から、イタセン

パラ DNA が増幅されていることが確認された。富山県氷見市の河川においては、イタセンパラが属するコイ目魚類は、上記魚種以外にも複数種が生息しているが、本研究においては、そのすべてを対象とした PCR 増幅確認は行っていない。しかし、今回作成したプライマーの塩基配列は、他のコイ目魚類とは明確に異なることから、本プライマーを用いて、イタセンパラ DNA を特異的に PCR 増幅することができると考えられる。また、本プライマーの塩基配列は、氷見市以外の他地域のイタセンパラとも概ね一致したことから、いずれの地域のイタセンパラにおいても種特異的な DNA 増幅に活用されることが期待される。ただし他地域では、氷見には生息しないタナゴ属魚類 (*Acheilognathus*) が共存する。例えば、大阪淀川および濃尾平野の木曽川の双方において、カネヒラ (*Acheilognathus rhombeus*) がイタセンパラと同所的に生息する (池谷ほか, 2012; 内藤ほか, 2012)。NCBI の BLAST 機能を用いて検索した結果においては、本研究において設計したプライマー配列は、カネヒラを始めタナゴ属魚類の登録配列と一致したものはなかったが、上記地域でこれらプライマーを使用する際には、予め当該魚種を対象とした PCR 増幅の確認が必要である。

氷見市の河川および富山大学理学部・氷見市連携研究室の水槽から得た水試料を鋳型とした PCR を行った結果、これまでイタセンパラの生息が確認されていない矢田部川 (山崎ほか, 2014) やイタセンパラを飼育していない水槽、さらにネガティブコントロールとして扱った逆浸透膜処理水から得られた試料においては、イタセンパラ DNA の増幅は確認されなかった。これに対して、イタセンパラの生息が確認されている地点から得られた水試料において、イタセンパラ DNA の増幅が確認された。このうち、富山大学理学部・氷見市連携研究室のイタセンパラ飼育水槽から得られた水試料については、すべての PCR において増幅が確認された。この飼育水槽は、濾材を用いた飼育水の物理的濾過で維持された閉鎖的水槽であるため、飼育水の中にイタセンパラから放出された DNA が多く存在し、PCR においてこれを検出したものと考えられる。この結果は、人為的管理下に置かれたイタセンパラから水中に放出された DNA を、本研究における環境 DNA 分析方法を用いて検出することが可能であることを示している。

一方、イタセンパラ生息河川およびイタセンパラ保護池の水試料においては、異なる季節に採水

した試料のそれぞれにおいて、イタセンパラ DNA の増幅確認に成功している。しかし、その増幅成功率は、必ずしも一定ではなかった。特に、2018 年 6 月に万尾川とイタセンパラ保護池から得られた水試料については、10 回の PCR のうち、1 回もしくは 2 回しか増幅が確認されなかった。これに対して、それぞれ同一地点から、同年 11 月に得られた試料については、概ね半分の実験で増幅が確認された。このように、調査を行う時期によって異なる結果が得られた原因としては、環境 DNA の動態やその検出感度に対して、対象生物の状態や生息地の様々な環境要因、あるいは偶然性が影響していることが考えられる (Barnes and Turner, 2016; 高原ほか, 2016; 山中ほか, 2016)。例えば、万尾川および保護池において、イタセンパラ稚魚が群泳する 6 月は、個体の体サイズが小さいことから (Nishio et al., 2015)、環境中に放出された DNA が少なかった可能性が考えられる。一方、産卵後の成魚が周辺水域に滞在している 11 月においては (Nishio et al., 2015)、それら個体が比較的多い量の DNA を放出していることが推察される。この他にも、6 月と 11 月における濾過方法の違いや、それぞれ 1 回の採水であるため、その操作上の偶然性が調査時期における結果の違いに影響した可能性も考えられる。そのため、PCR 増幅成功率に与える影響や、それらを考慮した最適な分析方法に関しては、今後さらに詳細な調査が必要である。

昨今、環境 DNA 分析を用いた研究は数多く報告されており、特定種の存否確認を目的とした研究や調査の事例については枚挙に暇がない (Koizumi et al., 2015; 米田ほか, 2015; 福岡ほか, 2016; 高原ほか, 2016; Sakata et al., 2017; 丹羽ほか, 2018; Harper et al., 2019)。それら研究の多くにおいては、リアルタイム PCR を用いて行われており、検出感度および精度の高さが指摘されている (高原ほか, 2016; 山中ほか, 2016)。その一方で、その分析においては高額な機器や試薬類を必要とするため、その実施は一部の研究機関に限られており、広範囲に普及し、活用された方法とは、必ずしも言えなかった。これに対して、本研究において採用した PCR と電気泳動を組み合わせた環境 DNA 分析方法は、比較的安価で汎用的な分析機器や試薬類を用いて行うことができるため、研究機関による分析だけではなく (Jerde et al., 2011; 高原ほか, 2016)、高等学校の活動においても利用されてきた (米田ほか, 2015)。これ

に加えて本研究では、PCR および電気泳動により増幅した DNA の確認において、低毒性の試薬類を用いるとともに、従来使われることが多かった紫外線照射装置に代わって LED 照射装置を用いるなど、実験の安全性のさらなる向上が実現できた。また、水試料を濾過した後の濾紙やステリベクス、そして DNA 抽出産物の保存は、通常は -30°C 以下の研究用冷凍庫を用いて行われるが、本研究では -18°C 程度の家庭用冷凍庫を用いても、少なくとも数か月程度は保存できることが示唆された。さらに一般の DNA 抽出方法と比べて、弱い遠心力による遠心分離を用いた DNA 抽出にも成功している。以上のように、従来の方法と比べて、簡便、安価、そして安全、すなわち簡易的な環境 DNA 分析方法を確立することができたと考えられる。

本研究において確立されたイタセンパラを対象とした簡易的な環境 DNA 分析方法を用いることで、採集行為に伴うイタセンパラや共存生物、さらには生息環境への影響を軽減した上で、イタセンパラの存否を確認することが可能となった。また、稚魚期におけるイタセンパラ検出の可能性も示された。これらの成果は、成長段階に応じて利用場所を変化させるイタセンパラの生息場所（西尾ほか、2017）を把握する際の方法として有効であると考えられる。特に、個体の確認が比較的難しい幼魚期における微生物場利用の検証における活用も期待される。ただし、二枚貝の中に産み込まれたイタセンパラ卵・仔魚の検出における本方法の有効性については、今後の検討が必要である。さらに本方法は、近年イタセンパラの生息が確認されていない氷見市内の水域において利用が始まっていることから（山崎、未発表）、地元の高등학교の部活動や課題研究活動、さらには企業におけるイタセンパラ保全活動などにおける活用が期待される。同時にこのような活動において、国指定天然記念物および国内希少野生動植物種に指定されている本種の取り扱いに関する許可申請手続きの簡素化も本方法の利点である。そして、本研究において主な実験を行った富山大学理学部・氷見市連携研究室は、研究、教育そして普及啓発を目的とした施設であり、これまでに高校生等を対象とした環境 DNA 分析も行っている（山崎ほか、2017）。今後、このような施設を活用することにより、イタセンパラのみならず、それぞれの地域における生物多様性評価やその保全活動の推進が期待される。また昨今では、野外におけ

る DNA 分析の実施が期待されているが（Guevara et al., 2018）、この際にも本研究で確立した簡易的な環境 DNA 分析方法は有効であると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、公益信託エスベック地球環境研究・技術基金（エスベック環境研究奨励賞）の助成を受けて行われた。本研究の遂行にあたっては、NPO 法人 Bio クラブの川上僚介氏および富山大学理学部・氷見市連携研究室メンバーに協力をいただいた、ここに記して厚くお礼申しあげる。

引用文献

- Barnes, M. A. and C. R. Turner. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for consecration genetics. *Conserv. Genet.*, 17: 1–17.
- Biggs, J., N. Ewald, A. Valentini, C. Gaboriaud, T. Dejean, R. A. Griffiths, J. Foster, J. W. Wilkinson, A. Arnell, P. Brotherton, P. Williams and F. Dunn. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biol. Conserv.*, 183: 19–28.
- Doi, H., R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara and T. Minamoto. 2017. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biol.*, 62: 30–39.
- Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 617 pp.
- 福岡有紗・高原輝彦・松本宗弘・兵庫県立農業高校生物部・丑丸敦史・源 利文. 2016. 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立. *日本生態学会誌*, 66: 613–620.
- Guevara E. E., D. C. Frankel, J. Ranaivonasy, A. F. Richard, J. Ratsirarson, R. R. Lawler and B. J. Bradley. 2018. A simple, economical protocol for DNA extraction and amplification where there is no lab. *Conserv. Genet. Resour.*, 10: 119–125.
- Harper L. R., N. P. Griffiths, L. L. Handley, C. D. Sayer, D. S. Read, K. J. Harper, R. C. Blackman, J. Li and B. Hänfling. 2019. Development an application of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*). *Freshwater Biol.*, 64: 93–107.
- 氷見市教育委員会. 2008. イタセンパラ天然記念物. 再生事業報告書Ⅲ. 氷見市教育委員会, 富山. 26 pp.
- Iguchi, K., G. Yamamoto, N. Matsubara and M. Nishida. 2003. Morphological and genetic analysis of fish of a *Carassius* complex (Cyprinidae) in Lake Kasumigaura

- with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs. *Biol. J. Linn. Soc.*, 79: 351–357.
- 池谷幸樹・佐川志朗・大原健一. 2012. イタセンパラの野生復帰を見据えた生息域外保全への取り組み. *野生復帰*, 2: 121–128.
- Jerde, C. L., A. R. Mahon, W. L. Chadderton and D. M. Lodge. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Letters*, 4: 150–157.
- 環境省. 2018. 環境省レッドリスト 2018 の公表について. <https://www.env.go.jp/press/105504.html>. (参照 2019-1-22).
- Koizumi, N., T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi, A. Mori, K. Watabe and T. Takemura. 2015. Preliminary experiment for detection method of fish inhabiting agricultural drainage canals using environmental DNA. *IDRE Journal*, 297: IV_7–IV_8.
- 源 利文・伊藤真之・蛭名邦禎. 2016. 環境 DNA 分析手法による高校生研究活動への支援. *日本科学教育学会研究会研究報告*, 30: 21–24.
- Minamoto, T., H. Yamanaka, T. Takahara, M. N. Honjo and Z. Kawabata. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13: 193–197.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki. 2015. 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.
- 長田芳和. 2001. イタセンパラ. 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海 (編), p. 370. 山溪カラー名鑑 日本の淡水魚 3 版. 山と溪谷社, 東京.
- 内藤 馨・上原一彦・辻野耕實. 2012. 淀川ワンドにおける外来魚および外来植物の駆除. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 78: 769–772.
- Nichols, J. D. and B. K. Williams. 2006. Monitoring for conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 21: 668–673.
- Nishio, M., K. Edo and Y. Yamazaki. 2017. Paddy management for potential conservation of endangered Itasenpara bitterling via zooplankton abundance. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 247: 166–171.
- 西尾正輝・タハソリマン・山崎裕治. 2012. 富山県氷見市万尾川におけるイタセンパラの出現と産卵場所. *魚類学雑誌*, 59: 147–153.
- Nishio, M., T. Kawamoto, R. Kawakami, K. Edo and Y. Yamazaki. 2015. Life history and reproductive ecology of the endangered Itasenpara bitterling *Acheilognathus longipinnis* (Cyprinidae) in the Himi region, central Japan. *J. Fish Biol.*, 87: 616–633.
- 西尾正輝・川本朋慶・川上僚介・秦 康之・江戸謙顕・山崎裕治. 2017. 富山県氷見市万尾川に生息する絶滅危惧種イタセンパラ *Acheilognathus longipinnis* の繁殖期における微生物場利用. *魚類学雑誌*, 64: 25–30.
- 丹羽英之・坂田雅之・源 利文・清野未恵子. 2018. 河川における流程 500m 間隔での環境 DNA 分析と現地採集調査による魚類検出結果の比較. *保全生態学研究*, 23: 257–264.
- 小川力也. 2008. イタセンパラ: 河川氾濫原の水理環境の保全と再生に向けて. *魚類学雑誌*, 55: 144–148.
- Rees, H. C., B. C. Maddison, D. J. Middleditch, J. R. M. Patmore and K. C. Gough. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *J. Appl. Ecol.*, 51: 1450–1459.
- Sakai, H., K. Iguchi, Y. Yamazaki, V. G. Sideleva and A. Goto. 2009. Morphological and mtDNA sequence studies on three crucian carps (*Carassius*: Cyprinidae) including a new stock from the Ob River system, Kazakhstan. *J. Fish Biol.*, 74: 1756–1773.
- Sakata, M. K., N. Maki, H. Sugiyama and T. Minamoto. 2017. Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *Sci. Nat.*, 104: 100.
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土井秀幸・内井喜美子. 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～. *日本生態学会誌*, 66: 583–599.
- Thomsen, P. F. and E. Willerslev. 2015. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, 183: 4–18.
- 豊岡由希子・松田 勉・山崎裕治. 2017. 立山のライチョウにおける糞を用いた遺伝的多様性の評価. *保全生態学研究*, 22: 219–228.
- 上原一彦. 2016. イタセンパラ: 生息地再生と野生復帰プロジェクト. 渡辺勝敏・森 誠一 (編). pp. 67–85. 淡水魚保全の挑戦 – 水辺のにぎわいを取り戻す理念と実践 –. 東海大学出版会, 東京.
- Valentini, A., P. Taberlet, C. Miaud, R. Civade, J. Herder, P. F. Thomsen, E. Bellemain, A. Besnard, E. Coissac, F. Boyer, C. Gaboriaud, P. Jean, N. Poulet, N. Roset, G. H. Copp, P. Geniez, D. Pont, C. Argillier, J. M. Baudoin, T. Peroux, A. J. Crivelli, A. Olivier, M. Acqueberge, M. L. Brum, P. Møller, E. Willerslev and T. Dejean. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.*, 25: 929–942.
- Yamamoto, S., K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K. W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh. 2016. Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru bay, Sea of Japan. *PLoS ONE*, 11: e0149786.
- 山中裕樹・源 利文・高原輝彦・内井喜美子・土

- 居秀幸. 2016. 環境 DNA 分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, 66: 601-611.
- Yamazaki, Y., S. Haramoto and T. Fukasawa. 2006. Habitat uses of freshwater fishes on the scale of reach system provided in small streams. *Environ. Biol. Fish.*, 75: 335-342.
- 山崎裕治・川上僚介・西尾正輝. 2017. ひみラボ(富山大学理学部・氷見市連携研究室). 魚類学雑誌, 64: 87-92.
- 山崎裕治・高木竜太郎・馬場幸大・西尾正輝. 2014. 富山県氷見市を流れる小規模河川における淡水魚類の生息場所決定要因. 日本生物地理学会会報, 69: 1-10.
- 米田創樹・木澤祥士・松本 涼・久次米 響・生月秀幸・本城将真・岸田周士・喜多山友輔・柳瀬 太・松本宗弘・森垣 岳. 2015. 環境 DNA 手法を用いた希少種調査方法の確立. 共生のひろば, 10: 18-21.