

環境DNA調査の課題を解決する 新たなサンプリングツールの開発について

いまむら 今村 史子¹・あかまつ 赤松 良久²・なかお 中尾 遼平²・いがらし 五十嵐 美穂³・かとう 加藤 靖広⁴・

¹日本工営株式会社 事業戦略本部（〒102-8539 東京都千代田区麹町5-4）

²山口大学大学院創成科学研究科（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2丁目16-1）

³日本工営株式会社 仙台支店（〒980-0803 仙台市青葉区国分町3-1-11定禅寺通スクエアビル8F）

⁴日本工営株式会社 環境部（〒102-8539 東京都千代田区麹町5-4）

近年、積極的に導入がすすんでいる環境DNA調査だが、標準的な採集方法である環境水の採取では、採水時の瞬間値を捉えるため、夜行性の種や個体数の少ない希少種、特定の環境に依存するような種等のDNAを採水することに課題があった。このような課題への対応策の一つとなるパッシブサンプリングをより効率的に実施し精度や信頼を確保するための手法を開発した。

天然海綿を活用し開発した手法を活用することで、コンタミネーションを軽減しつつ有用な成果が得られることが明らかとなった。

Key Words : 環境DNA, パッシブサンプリング, 水域の生物調査, 下水サーベイランス

1. はじめに

河川や湖沼を対象とした魚類調査では、従来の採捕調査と異なるアプローチとして環境DNA調査が積極的に導入されており、河川管理や河川環境の評価に資する新たな調査方法として注目されている。

一方で、環境DNA調査の標準的な採集方法である河川・湖沼、海域等の水といった環境水の採取では、採水時の瞬間値を捉えるため、夜行性の種や個体数の少ない希少種、特定の環境に依存するような種等のDNAを採水することに課題があった。このような課題への対応策の一つとして、近年、大気中の物質や水環境中の農薬等のモニタリング技術として知られる捕集材を利用した受動的なサンプリング（以下、「パッシブサンプリング」という。）を環境DNAの調査でも試みる事例がみられるようになってきた。

環境DNA調査をより有効にするツールとして、開発した新技術の紹介と、技術開発に繋がった創意工夫について報告する。

2. 水域の生物調査におけるパッシブサンプリング

本来、地域の生物の環境DNAを採取するためには、日に何度も採水が必要になるところである。パッシブサンプリングであれば、捕集材を24時間水中に浸漬しておくだけで、2時間ごとに24時間採水したデータと同程度の種数を検出することができた。

シブサンプリングであれば、捕集材を24時間水中に浸漬しておくだけで、2時間ごとに24時間採水したデータと同程度の種数を検出することができた。



図-1 採水調査とパッシブサンプリング調査のイメージ

調査は、山口県の佐波川水系で、2021年7月30日から31日に実施した(図-2)。パッシブサンプリングは捕集材を用いたサンプリングであるが、本調査では環境DNAを捕集する素材として、市販の天然海綿(朝日商会製)を用いた。天然海綿は調査期間中に河川流水域の中層に設置した(図-3)。

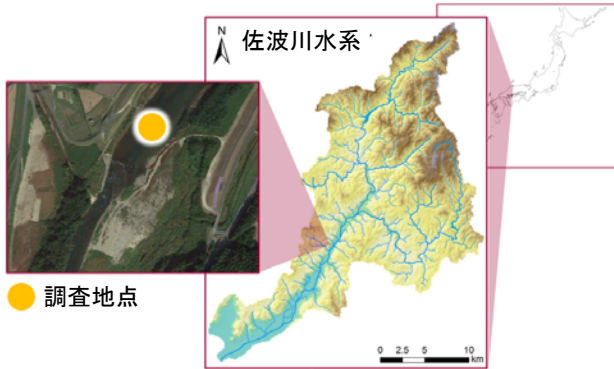


図-2 調査地点



図-3 天然海綿の設置状況

設置期間中、同じ場所で2時間ごとに河川水1リットルを採取した。採取した水は現場でガラス繊維ろ紙を用い濾過した。ろ紙は-16℃で保冷しつつ持ち帰り室内でDNAを抽出、分析に供した。

天然海綿は24時間設置した後、引き揚げ、後述の圧搾機でサンプリング液を約100ml回収し、そのまま保冷して持ち帰った。室内でDNAやRNAを直接捕集できる特殊なフィルターを用い濾過する手法である

Direct Capture法(プロメガ社)でDNAを回収しMaxwell(プロメガ社)を用いて抽出、分析に供した(以下、「DC法」という。)

抽出したDNAは、MiFishプライマー(Ushio et al., 2018)を用いて増幅し、iSeq(イルミナ社)を用いて分析した。

分析結果は、図-4に示すとおりであった。採水法では時間によるが17~25種、計27種を検出した。パッシブサンプリング法では、試料によるが22~27種、計28種を検出した。検出したほとんどの種が、採水でもパッシブサンプリングでも共通していた(図-5)。天然海綿を用いたパッシブサンプリングは、2時間ごとに採水した結果と同等かそれ以上の種数の検出が可能であることが明らかとなった。

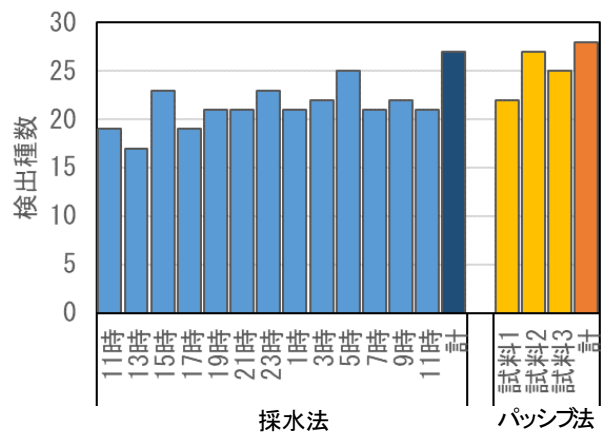


図-4 採水法及びパッシブサンプリング法での検出種数

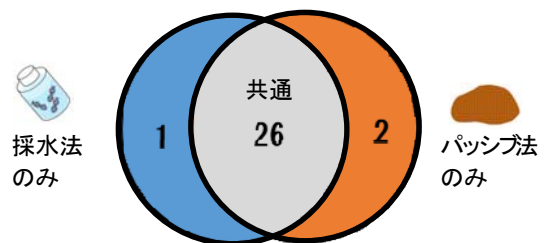


図-5 手法ごとの検出種の比較

(2)天然海綿, DNA捕集材としての性能と課題

天然海綿の使用にあたっては、天然海綿の環境DNAを保持する力の強さが課題にもなることが、室内実験で明らかとなった。

天然海綿の圧搾には、当初は野外でも室内でも圧搾機(シトラスジューサー)を用いていた(図-6)。しかしながら、1回圧搾後の天然海綿に蒸留水を加え再度圧搾しても同程度のDNAが回収されること、さらに同様に10回目の圧搾でも1回目の7~8割のDNAが回収されることが確認された。先の野外調査では、天然海綿でパッシブサンプリングした場合も採水で終日調査した場合と同程度の種数が得られていた。しかしながら、一回の圧搾だけでは取り出せないもっと多くの環境DNAが、天然海綿には捕集されて

いた可能性がある。天然海綿からの回収方法を工夫することで、現地の生物相をより詳細に反映した結果が得られることを示唆するものである。

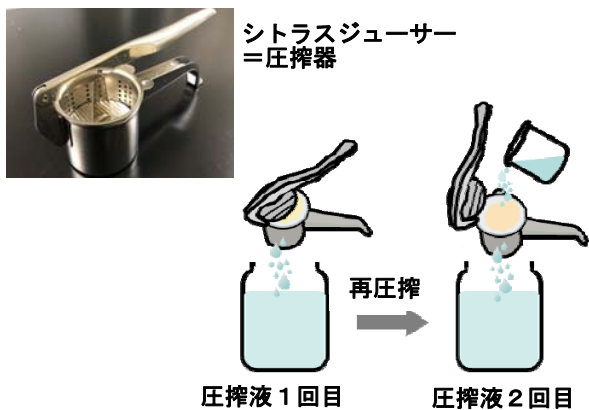


図-6 圧搾に使ったシトラスジューサーと繰り返し圧搾イメージ

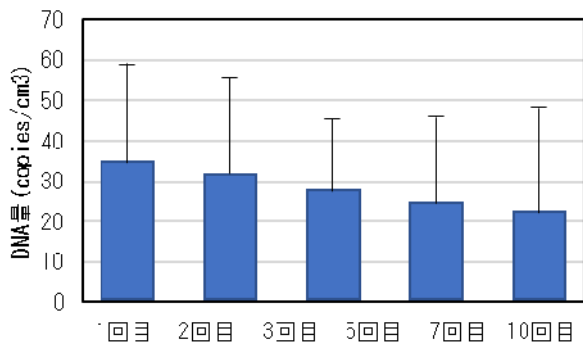


図-7 圧搾回ごとの回収DNA量

天然海綿に捕集されている環境DNAをなるべく多く回収するためには、捕集材の圧搾、洗浄を繰り返す必要があるが、それは処理すべきサンプル量を増やすばかりでなく、処理過程でのコンタミネーションのリスクを高めることにもつながる。コンタミネーションは環境DNA調査において大きな課題である。そこで課題を解決しつつ天然海綿から十分にDNAを回収する手法を開発した。

(3) 環境DNA捕集材からDNAを効率的に回収する方法の開発

今回、開発した環境DNA捕集材からDNAを効率的に回収する方法は、現地で捕集材を引き揚げたらそのままシリンジに入れて脱水、保冷または凍結して持ち帰り、シリンジのままDNAの回収作業を行うことができる方法である（特願2022-162855）。

従来の圧搾による回収方法と比較するため、人工細胞の中にDNAプラスミドを内包したDNAトレーサーを用いて、一定量の環境DNA濃度を暴露できる環境を創出し、環境DNAの回収状況の比較実験を行った。

実験は、山口大学工学部の水路施設で行った。

一定の水量を保った実験水路に天然海綿と脱脂綿を捕集材として設置し、それぞれ一定量のDNAトレーサーを添加した。DNAトレーサー添加後すぐに取り出した捕集材と、DNAトレーサー添加後4時間DNAトレーサーを含まない水を流しつづけた捕集材とで、環境DNAの流失状況、つまり捕集材が環境DNAを長時間保持できる力を比較しつつ、回収できるDNA量も比較した。

それぞれの捕集材から圧搾によりDNAを回収した従来手法の場合と、新しい開発手法でDNAを回収した場合のDNA量を図-8に示す。

天然海綿と脱脂綿を比較すると、DNAトレーサーを添加してすぐに取り出した場合には、脱脂綿も天然海綿と同程度のDNA回収量であった。流水中に4時間放置した後とすぐに取り出した場合と比べると、天然海綿ではDNA回収量が10分の1程度に減少、脱脂綿では100分の1程度に減少と、減少の程度に大きな違いがみられた。

また、従来の圧搾手法と開発手法とでは、いずれも開発手法の方が、DNA回収量が100倍程度となった。

よって、天然海綿は流れてきた環境DNAを長時間保持しておく必要がある水域の生物調査でのパッシブサンプリングに適していること、天然海綿から、コンタミネーション等のリスクをなるべく低くしつつ十分な環境DNAを回収するためには、今回紹介した開発技術が有効であることが示された。

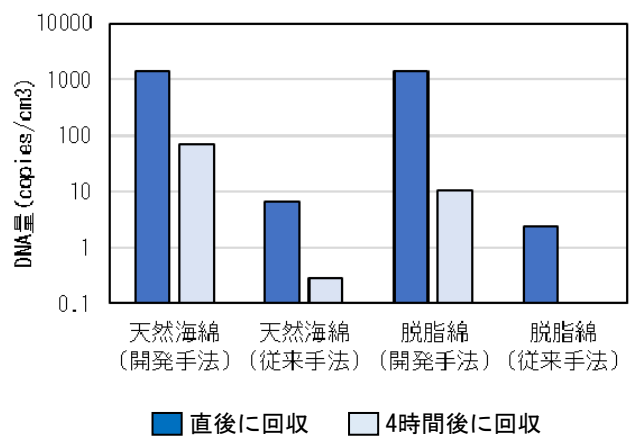


図-8 天然海綿及び脱脂綿を用いた開発手法と従来手法の比較実験結果

(4) 新技術を活用したパッシブサンプリングの試行

天然海綿を用いたパッシブサンプリングと開発技術を活用した水域の生物調査については、公益財団法人リバーフロント研究所とのJVで国立研究開発法人土木研究所との共同研究に参加しており、適用方法を明らかにすることとしている。調査は、富山県の庄川水系で、2022年10月19～21日にかけて行った。

結果、過去の採捕調査の結果と比較して遜色ない結果が得られ、特に河口域においては採水による環境DNA調査と比較し2倍以上の種数を検出した（図-9）。干満があることから、瞬間的な採水とパッシブ

ブサンプリングの違いがより顕著に表れたと考える。引き続き現地での検証を重ね、パッシブサンプリングの適用範囲の拡大やより良い調査方法について明らかにしていく予定である。

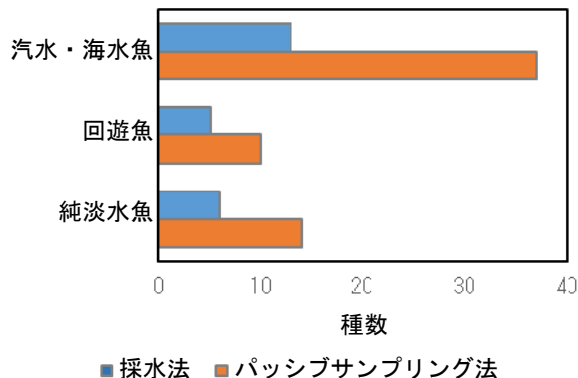


図-9 河口域における生活型別の検出種数

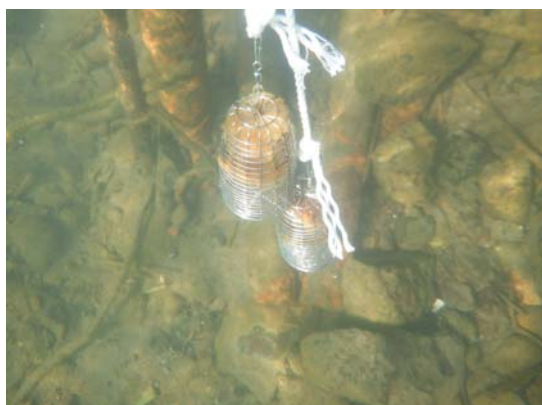


図-10 サンプラーの設置状況

3. パッシブサンプリングの活用場面

パッシブサンプリングの活用場面として、①水域

の生物調査、②下水疫学調査、③DNAトレーサー等が考えられる。①では、特に環境DNAが薄い希少種調査や海域の調査で効果を発揮すると考える。現在、この技術の普及のため国立研究開発法人土木研究所との共同研究に参加している。②は、令和4年度に内閣府の下水サーベイランスの実証事業としてモデル都市等で取り組みが行われたものである。感染者数とウイルス量の関係は定量的とされているものの、感染者数が少ない場合には定量困難であった。5類引き下げ後も新型コロナも感染の波は収まっておらず、感染初期の動向把握にはパッシブサンプリングが役立つと考える。③は、DNAをマーカーとして河川水や地下水等の環境水中や管路内をどのように流下してくるかを確認することで、流達時間や流路等を推定する技術である。しかし、いつ流れてくるかわからないDNAトレーサーをどのように捉えるかが課題であった。パッシブサンプリングにより、流下してきたDNAトレーサーを効率的に捕捉することができると、実用化に役立つと考える。

以上より、環境DNAをさらに有効な調査手法とするパッシブサンプリング法は、様々な場面での活用が期待され、今後の発展が期待できる新技術といえる。

4. 今後について

いずれも山口大学との共同研究として講座を設けて取り組んできた。本年度からは、山口大学において新たな技術として試験的な受託分析サービス提供が開始される。その後は希望者への技術指導により同手法のライセンス供与を行っていく予定である。

適用範囲の拡大やより良い調査方法を目指し、従来の環境DNA調査の課題を解決する手法として広く普及することが期待される。

参考文献：

- 1) Masaki Miya, Ryo O. Gotoh, Tetsuya Sado : MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples, *Fisheries Science* 86(6), pp.939-970, 2020.
- 2) Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M. : Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*. 2018.2.6, pp.1-15, 2018.
- 3) S. Tsuji, N. Shibata : Identifying spawning events in fish by observing a spike in environmental DNA concentration after spawning. *Environmental DNA* (Special Issue), 3(1), pp.190-199. doi: 10.1002/edn3.153., 2021.