

The 4th annual meeting of the eDNA Society
環境DNA学会第4回大会

2021
November **20・21** (Sat) (Sun) [JST: UTC+9] **LIVE ONLINE** Hokkaido University
Sapporo Campus

**生物分布、
そしてその先へ**
Species Distributions, and Beyond

要 旨 集
Abstracts



PP001#

両生類を対象とした環境 DNA メタバーコーディング検出系の開発と評価

Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA metabarcoding of Amphibia

* 坂田 雅之、河田 萌音（神戸大・院・発達）、倉林 敦（長浜バイオ大、広島大）、栗田 隆気（千葉中央博）、中村 匡聡、白子 智康（いであ株式会社）、掛橋 竜祐（長浜バイオ大）、西川 完途（京都大・院・地環）、モハマド＝ヤジッド＝ホスマン（サラワク森林局）、西島 太加志、樺元 淳一（農林水産省）、宮 正樹（千葉中央博）、源 利文（神戸大・院・発達）

* Masayuki K. SAKATA, Mone U. KAWATA (Kobe Univ.), Atsushi KURABAYASHI (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Hiroshima Univ.), Takaki KURITA (Natural History Museum and Institute Chiba), Masatoshi NAKAMURA, Tomoyasu SHIRAKO (IDEA Consultants Inc.), Ryosuke KAKEHASHI (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology), Kanto NISHIKAWA (Kyoto Univ.), Mohamad Yazid Hossman (Forest Department Sarawak), Takashi NISHIJIMA, Junichi KABAMOTO (Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries), Masaki MIYA (Natural History Museum and Institute Chiba), Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ.)

本研究では、eDNA メタバーコーディングのための新しい複数の PCR プライマーセットを開発し、その有効性を検討した。まず、現存する両生類 3 目を全て含むように組織から抽出した DNA (3 目 13 科 16 属) を用いて、5 つのプライマーセット候補を用いて PCR 増幅試験を行った。その結果、試験に用いられた全ての組織 DNA が全てのプライマーセット候補によって増幅された。次に、内部増幅領域の各種の配列の非類似度をもとに、各プライマーセットについて種間解像度を比較したところ、Amph16S と名付けられたプライマーセットが最も高い解像度を示した。最後に、日本全国でフィールド調査（10 地域 160 地点）を行い、Amph16S を用いた eDNA メタバーコーディングの検出力を従来の調査（採捕及び目視調査）との検出種の比較により評価した。その結果、Amph16S を用いた eDNA メタバーコーディングでは、従来の調査よりも多くの種が検出され、有効性が示された。

In this study, original PCR primer sets for eDNA metabarcoding were developed and those usability was explored. Firstly, PCR amplification tests of the primer sets were conducted using DNAs extracted from the amphibian. The primer sets successfully amplified all 16 taxa tested consisting of all three living amphibian orders. Next, the taxonomic resolutions were investigated, and the primer set, named Amph16S, had the highest resolution. Finally, the field survey across Japan (160 sites of 10 areas) was conducted and detectability of eDNA metabarcoding with Amph16S was evaluated by comparing the detected species between eDNA metabarcoding and traditional survey. As the result, the eDNA metabarcoding with Amph16S detected more than the traditional surveys, indicating the effectiveness of eDNA metabarcoding with Amph16S.

PP002#

宮崎県延岡市沖合海域における魚類を対象とした海水及び底質の環境 DNA 分析

Fish eDNA analysis of seawater and sediment at offshore Nobeoka City, Miyazaki Prefecture

* 立松 俊和、片山 悦治郎、小濱 智之、真木 伸隆（パシフィックコンサルタンツ株式会社）、神柱 武志、鳥集 一郎（宮崎県）、源 利文（神戸大学）

*Toshikazu TATEMATSU, Etsujiro KATAYAMA, Tomoyuki KOHAMA, Nobutaka MAKI (Pacific Consultants Co.LTD.), Takeshi KANBASHIRA, Ichiro TORIDAMARI (Miyazaki Prefecture), Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ.)

宮崎県延岡市沖合海域において、海産魚の環境 DNA 分析における試料タイプ（海水・底質）の影響を調べた。また、そこから 0.5～1km 離れた地点での ROV による観察結果も参考に比較した。その結果、海水、底質の環境 DNA 調査、ROV 観察で、それぞれ 7、11、14 種の魚類を確認した。確認種は環境 DNA と ROV 調査、及び環境 DNA の異なる試料タイプ間で、それぞれで重複する種が極めて少なかった。これらの結果は、異なる試料タイプの環境 DNA 分析の組合せ、さらには ROV 調査を組み合わせることで、魚類相調査の精度が改善することを示唆する。

We evaluated the effect of sample type (water and sediment) on eDNA metabarcoding of marine fishes at offshore area of Nobeoka city in Miyazaki Prefecture. In addition, we conducted visual survey with ROV at points 0.5-1km away from eDNA sampling sites, and then compared the observation results with eDNA surveys. As a result, 7, 11 and 14 fish species were detected from seawater and sediment eDNA, and ROV observation, respectively. Fish species compositions detected by water eDNA, sediment eDNA, and ROV survey showed little agreement. Our results suggested that combination of eDNA surveys with different sample types, and furthermore ROV surveillance can improve the accuracy of marine fish community assessment.

PP003#

産卵期に特有な環境 DNA 濃度と粒径サイズ分布の時間的变化

Temporal changes in concentration and particle size distribution of eDNA specific to the spawning season

* 芝田 直樹 ((株)環境総合リサーチ)、辻 冴月 (京大院・理)

* Naoki SHIBATA (ER&S.), Satsuki TSUJI (Grad. Sch. Sci. Kyoto Univ.)

近年、繁殖行動によって放出された精子が水中の環境 DNA 濃度を急激に上昇させることが明らかとなった。精子由来の環境 DNA は繁殖期にのみ存在するため、繁殖期と非繁殖期では水中に含まれる環境 DNA の動態や状態が異なると考えられる。繁殖期に特有な環境 DNA の動態や状態の理解は、環境 DNA 分析による繁殖の検知や長期モニタリングにおけるデータの解釈において重要な情報となる。しかし、繁殖期における環境 DNA の基礎的な調査は断片的なものに限られており、知見が少ないのが現状である。そこで本研究では、繁殖期における河川水中の環境 DNA の動態および状態を理解することを目的とし、アユを対象に (1) 繁殖期における環境 DNA 濃度の日周変化、(2) 繁殖行動を行う日没前後の環境 DNA の粒径サイズ分布の違いをそれぞれ調べた。その結果、繁殖行動に起因する特徴的な環境 DNA 濃度の日周変動や粒径サイズ分布の変化が観察された。

In the spawning season of fishes, released sperm rapidly increase the concentration of their eDNA in water. As the sperm-derived DNA is released in water only during the spawning season, the dynamics of eDNA is expected to differ between the spawning and non-spawning seasons. Thus, understanding the state and dynamics of eDNA specific to the spawning season will provide important information for detecting the spawning events and for interpreting results in long-term monitoring. In this study, to understand the dynamics of eDNA in spawning season, we investigated the diurnal changes in eDNA concentration in the spawning season of Ayu and the difference in the particle size distribution of Ayu eDNA before and after their spawning events.

PP004#

アオコの発生した湖における環境 DNA メタバーコーディングの試み

Attempt of fish eDNA metabarcoding in a lake with algal blooms

* 郭 倩倩、坂田 雅之（神戸大・院・発達）、吴 德意（交通大・理工）、山中 裕樹（龍谷大・先端理工）、源 利文（神戸大・院・発達）

* Qianqian WU, Masayuki K. SAKATA (Kobe Univ.), Deyi Wu (Jiao Tong Univ.), Hiroki YAMANAKA (Ryukoku Univ.), Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ.)

アオコの大発生する水域における環境 DNA メタバーコーディングの実用可能性は検討されていない。本研究では、アオコが大量に発生する代表的な湖である中国の太湖において、魚類を対象として本手法の実用性を検討した。2016 年 12 月と 2017 年 8 月にアオコの発生していた地点と発生していなかった地点のそれぞれ 5 地点と 4 地点の合計 9 地点で採水を行い、魚類の環境 DNA メタバーコーディングを行った。その結果、総計 27 種の淡水魚の環境 DNA が検出された。アオコの有る場合、濾過水量はそうでない場合より少なかった。アオコの有無によって、検出種の組成に違いはなかったが、検出種数はアオコの発生していないときの方が多かった。アオコの有無が濾過量を介して間接的に検出種数に影響を与える可能性がある。これらの結果から、アオコ発生下の湖においても本手法は適用可能であるが、より多くの種を検出するためには濾過量を増やす必要がある。

Environmental DNA (eDNA) metabarcoding techniques have been applied to biodiversity investigations in aquatic ecosystems. However, no study has yet tested whether this technique is effective for water bodies with extensive algal blooms. In this study, fish eDNA metabarcoding was conducted in Lake Taihu where frequent and extensive algal blooms occur. Twenty-seven freshwater fish species were detected in total. Under algal blooms, the water volume processed by filtration was reduced that likely caused the reduced number of species detected, while the species compositions were not significantly different between the sites with/without algal blooms. The results suggest that future eDNA metabarcoding studies under similar water environments should increase the amount of filtration to maximize number of species detected.

PP005#

無酸素水中での環境 DNA の分解：亜硫酸ナトリウム添加による実験から

Degradation of environmental DNA in anoxic freshwater

* 齊藤 達也（兵庫県立大院・シミュ）、土居 秀幸（兵庫県立大院・情報科学）

* Tatsuya SAITO (Grad. Sch. Sim Stu. Univ. Hyogo.), Hideyuki DOI (Grad. Sch. Inf Sci. Univ. Hyogo.)

環境中での eDNA の状態や分解などを規定する環境因子は、ほとんど分かっていない。eDNA の分解や環境中での eDNA の状態や挙動を明らかにすることで、eDNA 分析による生物量の定量を行う際に、分解された DNA 量を考慮して評価できる。一方で、堆積物 DNA の研究から、水中の酸素濃度が eDNA 分解に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。そこで本研究では、酸素低下による eDNA 分解の変化について検討する実験を試みた。ため池から採水した環境水に亜硫酸 Na を加え、21 日間静置し、ため池に生息するコイの eDNA 量の変化を調べた。亜硫酸 Na は溶存酸素 (DO) 測定の DO ゼロ液として用いられており、環境水を無酸素状態にするために用いた。その結果、無酸素状態にすることで環境水中の微生物の活性が抑制され、eDNA の分解も抑制されると考えられる。本研究では、無酸素水中での eDNA 分解を観察した結果について議論する。

Environmental DNA (eDNA) degradation is critical phenomenon for eDNA evaluation, but the

dynamics and mechanisms of eDNA degradation are largely unknown. The studies of sedimentary DNA showed that the oxygen concentration in the water affect the eDNA degradation. In this study, we conducted an experiment to test the change in eDNA degradation due to lower oxygen concentration. We added sodium sulfite to the pond water for making it anoxic, and then, after 0-21 days-incubation, quantified the eDNA copies of common carp inhabiting the pond. Anoxic conditions are thought to suppress the activity of microorganisms in the freshwater and consequently suppress the eDNA degradation in the water. With preliminary results, we discuss the eDNA degradation in anoxic freshwater.

PP006#

魚類の環境 RNA による誤検出の極めて少ない河川生態調査の実現

Fish environmental RNA enables precise ecological surveys in rivers with negligible false positives

* 宮田 楓、本田 大士、井上 泰彰、天野 雄斗、西岡 亨、山根 雅之（花王株式会社）、川口 貴光（株式会社 環境指標生物）、森田 修（花王株式会社）

* Kaede MIYATA, Hiroshi HONDA, Yasuaki INOUE, Yuto AMANO, Tohru NISHIOKA, Masayuki YAMANE (Kao Corp.), Takamitsu KAWAGUCHI (Bioindicator Co., Ltd.), Osamu MORITA (Kao Corp.)

生態調査は、生物多様性保全や環境問題解決への方針策定などに重要な役割を担う。環境 DNA は、従来の調査方法の課題を解決する技術として注目されているが、環境中に長期間残存することによって、既にその場に存在しない生物を検出してしまう誤検出が課題である。そのため、DNA よりも分解しやすい RNA の利用が考えられるが、河川において環境 RNA の存在量や生態調査への有用性は不明であった。そこで、那珂川において環境 DNA/RNA メタバーコーディングの比較解析を実施した結果、環境 RNA は環境 DNA と同等以上の感度を示したうえ、顕著に誤検出率が少ないことが見出された。環境 RNA でのみ検出した魚には個体密度の低い生息魚が含まれていたのに対し、環境 DNA でのみ検出された魚の殆どは生息していない海産魚であった。本結果は、環境 RNA は環境 DNA より時空間的解像度の高い精緻な生態調査を実現できる可能性を示唆している。

Ecological surveys play an important role in conserving biodiversity and solving environmental problems. Although environmental DNA (eDNA) has been attracting attention, false detection of organisms that do not already exist in the environment is an issue to be cleared, because eDNA is stable and can persist for a long period. Use of environmental RNA (eRNA), which is easier to degradable, is considered as the solution; however, those amount in rivers and the usefulness for ecological survey has not fully elucidated. The comparative eDNA/eRNA metabarcoding analysis revealed that eRNA enabled precise ecological survey with high sensitivity and extremely low false positive rate compared to eDNA in Naka-river. Therefore, eRNA might provide a more precise ecological survey than eDNA.

PP007#

九州北部豪雨直後の筑後川の魚類相 ～回復過程のモニタリングに向けて～

Fish fauna of the Chikugo River: Clarifying the recovery process of fish communities after heavy rains

赤松 良久、中尾 遼平（山口大学院創成）、横山 良太、太田 宗宏（建設環境研究所）、* 乾 隆帝（福工大社環）

Yoshihisa AKAMATSU, Ryohei NAKAO (Yamaguchi University), Ryota YOKOYAMA, Munehiro

筑後川流域は、平成 29 年 7 月九州北部豪雨により多大な被害を受けた。そこで本研究では、豪雨直後から環境 DNA 分析を用いた魚類相の継続モニタリングをおこない、九州北部豪雨が魚類の生息状況に与えた影響や、その後の回復過程を明らかにすることを試みた。調査は、水系内 54 地点において、2017 年 10 月から 11 月にかけて河川の表層水 1L を採水し、濾過、DNA の抽出後、定量メタバーコーディング法を用いて分析した。分析の結果、52 種類の魚類が検出され、うち 39 種が在来種（13 種が絶滅危惧種、6 種が準絶滅危惧種）、13 種が外来種だった。被災地支川、対照区支川、本川間で在来種と外来種の種数を比較した結果、ともに被災地支川の種数が最も少なかった。在来種は対照区支川が、外来種は本川が最も多かった。これらの結果から、被災地支川では、在来種、外来種ともに豪雨の影響を受けて減少している可能性が示唆された。

The Chikugo River was severely damaged by the torrential rains in northern Kyushu in July 2017. In this study, we attempted to clarify the impact of the floods on the fish fauna and the recovery process of the fish community after the heavy rainfall by conducting annual monitoring using environmental DNA analysis. In this study, 1 L of surface water was collected at 54 sites and analyzed by quantitative metabarcoding. As a result of the analysis, 52 species of fishes were detected, 39 of which were native species and 13 were alien species. In the tributaries affected by heavy rainfall, the number of both native and alien species was low.

PP008#

環境 DNA 定量メタバーコーディングを用いた流域網羅的な魚類多様性評価

Use of quantitative environmental DNA metabarcoding for basin-wide fish diversity evaluation

* 今村 史子(日本工営株式会社)、赤松 良久、宮園 誠二、中尾 遼平(山口大学院創成)、平川 敬也(山口大社会建設工学)、加藤 靖広(日本工営株式会社)

* Fumiko IMAMURA (NIPPON KOEI CO., LTD), Yoshihisa AKAMATSU, Seiji MIYAZONO, Ryohei NAKAO, Takaya HIRAKAWA (Yamaguchi University), Yasuhiro KATO (NIPPON KOEI CO., LTD)

流域網羅的な河川の魚類多様性評価を行うためには多大な時間・労力が必要となるため、効率的な多様性評価手法の開発が求められる。本研究では、中国地方の一級水系を対象とし、環境 DNA 定量メタバーコーディングにより算出した魚類の環境 DNA 濃度を基に、各水系の様々な魚類多様性 (α 、 β 、 γ 多様性) を評価することを目的とした。まず、各調査地点における魚類の α 多様性をシャノンの多様度指数およびシンプソンの多様度指数で定量化した。続いて、各流域の β 多様性を上流から下流の魚類構成の空間的変化を基に算出した。さらに、各水系の γ 多様性を前出の多様度指数を基に算出し、流域全体の魚類多様度を検討した。最後に、本研究の手法で算出した魚類多様度と河川水辺の国勢調査の底生動物データを基に算出した底生動物多様度とを比較することで、環境 DNA 定量メタバーコーディングに基づく魚類多様度の流域環境評価指標としての有用性を検討した。

The efficient basin-wide evaluation method for riverine fish biodiversity is needed because the basin-wide evaluation is usually time consuming and labor intensive. In this study, we evaluated various fish diversity (α , β , and γ diversity) in the river basins of the Chugoku district in Japan using quantitative environmental DNA metabarcoding. We quantified the species diversity of each site for the α diversity, the spatial variation of fish assemblage compositions for the β diversity, and the basin-wide diversity for γ diversity in the study system. In addition, we compared the fish diversity indexes based on eDNA

metabarcoding with the benthic animal diversity indexes based on the captured benthic animal data to evaluate the usefulness of the eDNA-based fish diversity indexes.

PP009#

環境 DNA 濃度で読み解く京都府 由良川のスズキ *Lateolabrax japonicus* の分布と季節回遊
Distribution and seasonal migration of Japanese temperate bass *Lateolabrax japonicus* in Yura River detected by environmental DNA

* 村上 弘章（京大学際融合研）、笹野 祥愛（京大院農）、益田 玲爾（京大フィールド研）、笠井 亮秀（北大院水産）、山下 洋（京大学際融合研）

* Hiroaki MURAKAMI, Sachia SASANO, Reiji MASUDA (Kyoto Univ.), Akihide KASAI (Hokkaido Univ.), Yoh YAMASHITA (Kyoto Univ.)

河川内の多地点における周年の環境 DNA 調査により、スズキ *Lateolabrax japonicus* の分布の季節変化を明らかにした。2020 年 3 月から翌年 3 月までの計 9 回、京都府 由良川の河口付近の沿岸海域から約 62 km 上流までの計 18 地点で水質と環境 DNA の調査を行った。本種の環境 DNA 濃度は、3 月から 9 月にかけて徐々に増加し、より上流で検出されるようになった。河川内の濃度の最大値は 9 月から 10 月にかけて上流側に移行し、11 月以降の濃度の最大値は下流側に移行し、翌年 1 月にかけてその濃度は顕著に減少した。また、環境 DNA 濃度は水温と強い正の相関を示した一方、塩分とは相関しなかった。このように、環境 DNA 濃度の相対的な季節変化は、推定されてきた本種の河川遡上生態、すなわち初夏から晩秋にかけての高水温期に河川を遡上し、冬季の産卵期は海に下るという季節回遊と良く一致した。

We aimed to elucidate the seasonal distribution of Japanese temperate bass *Lateolabrax japonicus* in Yura River, Kyoto, using environmental DNA (eDNA). The survey for eDNA was conducted nine times from March 2020 to March 2021, at 18 points from the coast to ~62 km upstream. eDNA concentration gradually increased from March to September, during which it was detected more in the upstream, then decreased significantly from November to January. This trend may represent the ecology of this species, i.e., ascends a river from summer to autumn and goes down to the sea in the spawning season. eDNA concentration was correlated with temperature. Collectively, eDNA is a useful tool to detect seasonal changes of a target species' distribution in a river.

PP010#

環境 DNA ガラス濾紙サンプルの常温長期保存方法の検討

Investigation of long-term storage method of environmental DNA glass filter samples at low and room temperature

* 橋爪 裕宜（長崎大院・熱帯）、源 利文（神戸大院・人間発達）、大庭 伸也（長崎大・教育）、門司 和彦（長崎大・多文化）、星 友矩（長崎大・熱研）

* Hiroki HASHIZUME (Sch. Trop. Med. Glo. Hea. Nagasaki Univ), Toshifumi MINAMOTO (Sch. Hum. Dev. Env. Kobe Univ), Shin-ya OHBA (Fac. Edu. Nagasaki Univ), Kazuhiko MOJI (Sch. Glo. Hum. Soc. Sci. Nagasaki Univ), Tomonori HOSHI (Inst. Trop. Med. Nagasaki Univ)

環境 DNA 調査では採水・濾過後のサンプルは DNA 分解を防ぐため、すぐに冷凍保存することが推奨される。しかし、例えば海外の調査地で採水したサンプルの場合、濾紙を常に冷凍状態で維持するためのロジスティックを確保するのは容易ではない。そこで、濾紙中の環境 DNA を常温もしくは低温で長期間保存する方法を検討した。本研究では、一般的に用いられるガラス繊維濾紙を用いて、先行研究を参考に 3 種類の保存方法と、35℃・4℃の 2 温度帯で、2 ヶ月間の保存

試験を行った。その結果、DNA 抽出溶液を用いた保存で、両温度ともに 1 ヶ月間は濾紙中の環境 DNA が維持された。本研究は、遠隔地や気温の高い熱帯地帯での準備や作業を簡易化し、環境 DNA 研究を加速させるものになると期待している。

In environmental DNA (eDNA) surveys, it is recommended to immediately freeze the samples after collection and filtration to prevent DNA degradation. However, it is not easy to secure the logistics to keep the filter frozen, for example, at overseas research sites. Therefore, a method to store filters at room or low temperature for a long period was investigated. We used a glass fiber filter and conducted storage tests for two months at temperatures of 35°C and 4°C, with three storage methods. The results showed that the eDNA was maintained for one month at both temperatures with the storage using DNA extraction solution. We expect that this study will accelerate eDNA research by simplifying the preparation in tropical regions.

PP011#

Biodiversity of the surrounding habitats identified by eDNA from the excrement of benthic invertebrates

* Kang-Hui KIM (Department of Integrated Biological Science, Pusan National University), Hyunbin JO (Institute for Environment and Energy, Pusan National University)

Environmental DNA (eDNA) obtained from the excrement of aquatic organisms provides an important information not only in identifying the food source of the species, but also in identifying the biodiversity (α -diversity) of its surrounding habitats. The purpose of this study is to confirm the potential of identifying α -diversity of surrounding habitats through the analysis of excrement of freshwater benthic invertebrates such as *Semisulcospira libertina* and *Radix auricularia coreana*. A field sampling was conducted in Danjangcheon, Miryang, on August 7, 2021. Each sample (*S. libertina*, n=18; *R. auricularia coreana*, n=5; *Corbicula fluminea*, n=1) was put in a tube and the excrement accumulated in it was filtered. Subsequently, extracted gDNA was amplified COI and 18S V9 regions and sequenced by capillary electrophoresis sequencing (CES) and Next Generation Sequencing (NGS). The unique OTUs were identified through BLASTn analysis. As a result, it was confirmed that the excrement of the samples included the nucleotide sequence of various chrysanthemum plants such as *Chrysanthemum boreale*, *Opisthopappus taihangensis*, and *Ajania pacifica*. Our results suggest that the biodiversity of the surrounding habitats can be identified through eDNA analysis that was extracted from the excrement of benthic invertebrates, especially *S. libertina* and *R. auricularia coreana*.

PP012#

既知コピー数 DNA から得た閾値を用いた環境 DNA メタバーコーディング解析の精度向上 Improved accuracy of environmental DNA metabarcoding analysis using thresholds obtained from the defined copy number of DNA

* 大崎 優介、渡邊 和紀、米川 侑希、中澤 聡、海野 洋敬（株式会社リコー）、西山 依里、村上 博昭、松平 崇弘（株式会社ファスマック）、坂田 雅之、源 利文（神戸大学大学院）

* Yusuke OSAKI, Kazuki WATANABE, Yuki YONEKAWA, Satoshi NAKAZAWA, Hiroataka UNNO (RICOH Company Ltd.), Eri NISHIYAMA, Hiroaki MURAKAMI, Takahiro MATSUDAIRA (Fasmac Co. Ltd.), Masayuki K. SAKATA, Toshifumi MINAMOTO (Kobe University)

NGS を用いた環境 DNA 解析において、リード数がどの程度あればその種が環境に存在したと言えるのかは解析上の課題であった。我々はインクジェット技術を用いて、特定の DNA を 1 コ

ピーずつ任意のコピー数だけ反応容器に分注する方法を開発した。本技術に基づいた標準試料を環境 DNA に添加して解析することで特定コピー由来のリード数を閾値として、コンタミネーションを判定できる方法を考案した。MiFish の解析領域に似せた標準配列を設計し、1 コピーずつ PCR チューブに分注した。これを用い、淡水・海水あわせて 9 サンプルを MiFish にて解析を行った。また 1 コピーのリード数近傍の魚種について qPCR で在不在を確認し、本手法が偽陽性を取り除く方法として有用であることを確認した。本手法は、メタバーコーディング解析の課題であるコンタミネーションの判定に貢献し、信頼性の高いデータ解析を行う支援が可能であると考えられる。

In the analysis of environmental DNA (eDNA) using NGS, it has been difficult to determine the optimal read count threshold for indicating the existence of target species. We previously developed a method to accurately control the number of target DNA using inkjet-based bioprinting. Here, we applied this method to prepare for the standard material to set threshold. We designed some standard sequences that resembles the analysis region of MiFish and dispensed one copy of the DNA into each tube. We analyzed nine samples of freshwater and seawater. The presence of fish species above the number of reads from one copy was confirmed by qPCR. Our approach is useful for setting optimal threshold and removing false positives to support data analysis.

PP013#

環境 DNA 技術による鯨類の検出と目視調査による発見情報との予備的な比較

Preliminary comparison between detection of cetaceans by environmental DNA technology and visual cetacean vessel survey

* 勝俣 太貴、後藤 睦夫、松岡 耕二 ((一財) 日本鯨類研究所)

* Taiki KATSUMATA, Mutsuo GOTO, Koji MATSUOKA (Institute of Cetacean Research)

環境 DNA 技術は鯨類に対しても応用が進んでおり、様々な種の検出が報告されているが、鯨類に関しては検出結果が分布や密度を反映しているかを評価した研究は少ない。そこで、本研究では目視調査の際に採水した 84 サンプルを用いて、網羅的検出による鯨類の検出種数と検出位置、及びザトウクジラを対象とした種特異的検出の結果を発見情報と比較することで、環境 DNA 技術が鯨類の分布モニタリングに有効であるかを評価することを目的とした。その結果、イルカ類を中心に 7 種が検出され、うち 4 種は検出位置と発見位置が隣接していた。しかし、大型鯨類は採水箇所付近で発見があったにもかかわらず検出されない種が殆どであった。種特異的検出でも検出位置と発見位置は一致せず、DNA 量も密度依存的な傾向は見られなかった。サンプル中の DNA 量が低量であったことが原因の一つと考えられ、採水の増量や摂餌海域など DNA が多く放出されると予想される海域での検証が必要である。

The purpose of this study was to evaluate whether environmental DNA technology is an effective method for monitoring the distribution of cetaceans. We used 84 water samples collected during the visual survey in offshore sea to compare the number and location of cetaceans, and the results of species-specific detection of humpback whales. As a result, 7 species were detected, mainly dolphins, and 4 of them had the detection position and the sighting position adjacent to each other. Most of the large cetaceans were not detected. Even in the species-specific detection, and the amount of DNA did not tend to be density-dependent. Further surveys are required in areas where a large amount of DNA is expected such as their feeding areas.

PP014#

外洋域における魚類環境 DNA 検出のための最適な採集努力量の推定

Optimization of sampling effort for detecting fish eDNA in the open ocean

* 川上 達也、山崎 彩（北大院・水）、朝見 麻希、後藤 祐子（龍谷大・生物多様性セ）、山中 裕樹（龍谷大・先端理工）、兵藤 晋（東大・大海研）、上野 洋路、笠井 亮秀（北大院・水）

* Tatsuya KAWAKAMI, Aya YAMAZAKI (Fac. Fish. Hokkaido Univ.), Maki ASAMI, Yuko GOTOH (Center Biodiv. Sci. Ryukoku Univ.), Hiroki YAMANAKA (Fac. Sci. Tec. Ryukoku Univ.), Susumu HYODO (Atmos. Ocean Res. Inst. Univ. Tokyo), Hiromichi UENO, Akihide KASAI (Fac. Fish. Hokkaido Univ.)

外洋域において魚類環境 DNA を検出する最適な採集努力量を推定するため、北太平洋の亜熱帯域と亜寒帯域、および北極圏のチャクチ海とカナダ海盆域で、ステリベクス HV（孔径 0.45 μm ）を用いた濾過を 7~8 回繰り返し（計 21~40L）、得られた環境 DNA をメタバーコーディングで解析した。その結果、計 8~37 種の魚類が検出された。これは、Chao2 estimator の 80~92% に相当した。検出種数は繰り返し数に伴い増加し、亜熱帯域、亜寒帯域、チャクチ海では 12~15L で、海盆域では 25L で、80% 以上の種をカバーできた。ステリベクス GV（孔径 0.22 μm ）を使った同様の試験では、より少ない濾過量で HV と同等かそれ以上の種を検出でき、7.5~15L で 80% 以上の種をカバーできた。以上から外洋域では、海域によって異なるが、HV では 20L 前後、GV では 10L 前後が適した濾過量になると推定された。

To estimate the optimal sampling effort for detecting fish eDNA in the open ocean, eDNA samples with seven or eight replicates were collected in various regions using Sterivex HV (0.45 μm pore) and analyzed by metabarcoding. A total of 8–37 species was detected, corresponding to 80–92% of Chao2 estimator. Species accumulation curve indicated that over 80% of species were covered by filtration of 12–15L in the subtropical and frigid zone in the North Pacific and the Chukchi Sea, but it required 25L in the Canada Basin. The same examination conducted using Sterivex GV (0.22 μm pore) demonstrated that the filter with a smaller pore size was more efficient for fish species detection in the open ocean.

PP015#

環境 DNA の簡易な抽出・検出法の提案

Proposal for a simple extraction and detection method for environmental DNA

* 鈴木 良地、河村 邦生、水上 優子（愛知農総試）

* Ryoji SUZUKI, Kunio KAWAMURA, Yuuko MIZUKAMI (Aichi Agric. Res. Cent.)

動力を用いずに、市販の器具だけで環境水をろ過し、簡易キットで環境 DNA を抽出する簡便な方法を提案する。これにより、一連の操作に係るコスト、時間、労力を大幅に低減可能である。Lambda DNA の模擬水による室内試験では、標準的な方法と比べて平均で約 7.8 倍多く DNA を回収できた。また、この簡易法による抽出 DNA は、PCR 法だけでなく、むしろ LAMP 法での分析に適していた。このため、特にオンサイトでの検知に有効と考えられた。

We propose a simple method of filtering environmental water without power using commercially available equipment and extracting eDNA using a simple kit. This will greatly reduce the cost, time, and labor involved in the whole process. In a laboratory test using simulated lambda DNA water, on average approximately 7.8 times more DNA was recovered compared with the standard method. In addition, the DNA extracted using this simple method was suitable for analysis not by the PCR method but rather by the LAMP method. As a result, this method was considered particularly effective for on-site detection.

PP016#

魚類繁殖活動による環境 DNA 濃度の時間と距離に伴う変化

Spatio-temporal changes of environmental DNA concentration due to fish spawning activity

* 呉 盧漢 (神戸大・院・発達)、山本 義彦 (神戸大・院・発達; 大阪環農水研・生物多様性センター)、山口 翔吾 (大阪環農水研・生物多様性センター)、源 利文 (神戸大・院・発達)

* Luhan WU (Grad Sc Human Dev Env Kobe U), Yoshihiko YAMAMOTO (Grad Sc Human Dev Env Kobe U; Osaka Biodiv. Res C RIEAFO), Shogo YAMAGUCHI (Osaka Biodiv. Res C RIEAFO), Toshifumi MINAMOTO (Grad Sc Human Dev Env Kobe U)

魚類の繁殖活動は、周囲の環境 DNA 濃度と核 DNA/ ミトコンドリア DNA 比を急増させることが報告されており、この現象を通じて魚類の繁殖活動を推定する研究が行われている。しかし、繁殖活動によって引き起こされる高濃度の環境 DNA が時間と距離に伴ってどのように変化するかはわかっていない。そこで、実験池のコイに人工的に産卵を誘発させ、繁殖活動が行われてから時間的空間的な距離ごとに水サンプルを採取して、核 DNA およびミトコンドリア DNA の濃度を測定した。その結果、環境 DNA 濃度は時間および距離の増加にともなって有意に減少した。環境 DNA 濃度はピークに達してから 24 時間以内に急速に減少し、核 DNA/ ミトコンドリア DNA 比も同様の傾向を示した。

Fish spawning activities cause a sharp increase in the environmental DNA concentration and the nuclear DNA/mitochondrial DNA ratio in the surrounding environment. Previous studies have attempted to use this phenomenon to estimate fish spawning activities. However, the changes of eDNA concentration and the ratio over time and distance caused by spawning activities are still unknown. We induced artificial spawning to the carp in an experimental pool, and collected water samples according to a certain time and distance. The results showed the eDNA concentration decreased significantly with increasing time and distance. When the eDNA concentration reaches the peak, it showed rapid decrease within 24 hours, and the nuclear DNA/mitochondrial DNA ratio also showed the same tendency.

PP017#

環境 DNA を用いた宍道湖・中海の流入河川 8 本における回遊魚 4 種の生息実態の推定

Estimation of habitat use of 4 migratory fish in 8 inflow/outflow rivers around Lakes Shinji and Nakaumi using eDNA analysis

* 山岸 聖 (島根大院・自然科学)、土居 秀幸 (兵庫県立大・情報科学)、高原 輝彦 (島根大・生物資源)

* Satoshi YAMAGISHI (Shimane Univ.), Hideyuki DOI (University of Hyogo), Teruhiko TAKAHARA (Shimane Univ.)

島根県・鳥取県の宍道湖と中海、および、その流入河川は多くの回遊魚が利用しているが、その生息実態はほとんどわかっていない。また、それら河川の水質環境や堰堤のような地形的要因が回遊行動に及ぼしている影響についてもよくわかっていない。本研究では、宍道湖・中海の流入 8 河川において、簡便に広域調査を実施できる環境 DNA 手法を用いて、回遊魚 4 種（アユ、ニホンウナギ、ワカサギ、シラウオ）の利用実態および堰の影響を明らかにすることを試みた。野外調査では、堰を挟むようにして各河川の上流と下流それぞれ 1 か所で毎月 1 回、一年を通じた採水を行い、各魚種の環境 DNA の検出率、および、濃度を調べた。その結果、それら河川ごとに利用する魚種や時期が異なっていることがわかった。また、高い遊泳能力をもつアユやニホンウナギでは堰の上流への移動が可能であり、遊泳能力の低いシラウオやワカサギでは堰による遡上阻害が示唆された。

Many migratory fish can use the Lakes Shinji-Nakaumi and their inflow/outflow rivers, but the

habitats and distribution of their fish species are clarified hardly. Moreover, the effects of water environment and geographical factor such as weir in the rivers are poorly understood. Here, using environmental DNA (eDNA) analysis, we evaluated the distribution of four migratory fish (sweetfish, Japanese eel, pond smelt, and Japanese icefish) and effects of weir in eight inflow/outflow rivers around Lakes Shinji-Nakaumi. We found that each fish could use different rivers depending on their ecological characteristics and life histories. In addition, fish with low swimming ability (i.e., icefish and smelt) were inhibited their migration behavior by the weirs in the rivers.

PP018#

花から送粉者の環境 DNA は検出できるか？

Testing detectability of pollinators' eDNA from flowers

* 池本 美都 (筑波大)、平岩 将良 (農研機構)、中村 祥子、滝 久智 (森林総研)、潮 雅之 (京大)

* Mito IKEMOTO (Univ. of Tsukuba), Masayoshi HIRAIWA (NARO), Shoko NAKAMURA, Hisatomo TAKI (FFPRI), Masayuki USHIO (Kyoto Univ.)

ある植物種での有効な送粉者を解明するには、訪花頻度、送粉効率等様々な指標を調べる必要があり、多大な労力を要する。もし柱頭や葯から訪花者の DNA が回収できれば、解明への第一歩として送粉に寄与する可能性の高い動物を絞ることができる。そこで環境 DNA を用いた送粉者特定手法の開発のため、送粉者が既知の植物種において花の部位ごとに環境 DNA を採取した。つくば市の実験圃場において、ニガウリの雌花と雄花を 6 時から 11 時までビデオ撮影し、それらの花の柱頭、葯、花卉から DNA を抽出し、COI 領域のアンプリコン解析を行った。後生動物では 20 目の DNA が検出され、検出配列数は花卉で平均的に多く、葯では最も少なかった。送粉者とみられる分類群のうち、柱頭と葯からは、コハナバチ科の DNA が検出されたが、ミツバチ科やツチバチ科は検出されなかった。本発表ではビデオ解析と合わせ、DNA の検出率に関わる要因について議論する。

We investigated eDNA from floral organs of *Momordica charantia* of which pollinator species are known, and assessed whether DNA of pollinators is detected from anthers and stigmas. In September 2020, we collected the flowers that were recorded on video, and performed eDNA metabarcoding of each floral organ, using a primer set targeting COI region. Twenty orders of Metazoa were detected, and the number of reads was high in petals, and low in anthers. Among known pollinators of *M. charantia*, Halictidae was the only detected taxon from anthers and stigmas, whereas other pollinators (e.g., Apidae and Scoliididae) were not detected. By compared with the video data, we will discuss which ecological traits of flower visitors influence detectability as eDNA from flowers.

PP019#

環境 DNA 分析による大規模出水前後の河川支流における放流アユの生息密度および生息場利用の把握

Use of eDNA analysis for grasping the abundance and habitat use of hatchery-raised fish in river tributaries before and after a massive flood event

* 宮園 誠二、児玉 貴央、赤松 良久、中尾 遼平、花岡 拓身 (山大院・創成科学)、宮平 秀明 (山大・社会建設)

* Seiji MIYAZONO, Takao KODAMA, Yoshihisa AKAMATSU, Ryohei NAKAO, Takumi HANAOKA (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Hideaki MIYAHIRA (Dept. Civil. Envi. Eng. Fac. Eng. Yamaguchi Univ.)

激甚化する豪雨による河川氾濫の放流魚への影響を予測するためには、大規模出水前後の生息密度や生息場利用の変化を把握することが重要となる。本研究では、環境 DNA 分析を用いて江の川の支流における、2021 年の大規模出水前後の放流アユの生息密度および生息場利用の違いを検討した。その結果、出水後に多くの調査地点において、アユの生息密度が減少した可能性が明らかとなった。また、出水前の 7 月においては、アユの環境 DNA 濃度と護岸率との間に負の相関、流量との間に正の相関がみられ、アユが自然度の高い、相対的に大きな支流を利用している可能性が明らかとなった。出水後の 8 月においては、護岸率のみ環境 DNA 濃度と同様の相関がみられ、流量とは相関がみられなかった。これは、流量が相対的に多い支流の環境 DNA 濃度が顕著に減少したことが一因となっており、出水攪乱のアユへの影響が支流規模によって異なることが示唆された。

We used the environmental DNA (eDNA) analysis to examine differences in the abundance and habitat use of hatchery-raised fish in the river tributaries before and after the massive flood event. Our results indicated that the fish eDNA concentrations were negatively related to the revetment rate and positively related to the discharge in the study sites before the flood event. In contrast, after the flood event, the discharge was not significantly related to the eDNA concentrations. This was largely because the eDNA concentrations in the large tributary sites have significantly decreased due to the flood event. These results suggest that the effects of the flood event on the target fish could vary with the stream size of the study sites.

PP020#

環境 DNA 分析によるホンモロコ地域個体群の遺伝的多様性評価

Evaluation of genetic diversity of an endangered fish *Gnathopogon caeruleus* using environmental DNA

* 脇村 圭、内井 喜美子（大阪大谷大）、亀甲 武志（近畿大）

* Kei WAKIMURA, Kimiko UCHII (Osaka Ohtani Univ.), Takeshi KIKKO (Kindai Univ.)

希少種の保全において、集団の遺伝的多様性を評価することは極めて重要である。近年、環境 DNA 分析は種内変異解析へも応用されつつあるが、遺伝的多様性が極端に低下していることが予想される希少種を対象に網羅解析を行う際には、超並列シーケンスライブラリー調製時やシーケンス解析時に生成されるエラー配列の影響を正確に評価することが肝要となる。本研究では、琵琶湖固有の希少種ホンモロコをモデル生物として、ライブラリー調製条件と網羅解析データのフィルタリング条件を検討した。その後、琵琶湖一円で採集した環境 DNA 試料の分析により、ホンモロコ地域個体群のハプロタイプ出現頻度を求めた。

Environmental DNA (eDNA) metabarcoding has recently been applied in monitoring intra-specific variations. Accurate denoising of erroneous sequences that arise during sequencing library preparation and sequencing run is mandatory for detailed evaluation of genetic diversity of populations. In this study, we focused on an endangered fish species *Gnathopogon caeruleus* and developed a method for estimating the haplotype frequencies in their populations. By analyzing eDNA samples collected around Lake Biwa, the genetic diversity among the local populations of the species was evaluated.

PP021#

環境 DNA を用いた山梨県内の小河川における魚類生物多様性の調査

The investigation of fish fauna in urban and agricultural floodplain streams and channels in Kofu basin

* 小池 一正（YRCE・新事業）、八重樫 咲子、大槻 順朗（山梨大院・総合研究）、外丸 広大（山梨大院・

総合教育)、伊藤 正比呂 (YRCE・新事業)

* Kazumasa KOIKE (YRCE), Sakiko YAEGASHI, Kazuaki OTSUKI, Kouta TOMARU (Univ Yamanashi), Masahiro ITOU (YRCE)

大河川の氾濫原を流れる小河川・用排水路は、都市や農地、工業用地などの様々な周辺環境下を流下する。そのため、大河川と比較して人為的環境影響が大きいことが予想されるが、その魚類相の調査頻度は低い。そこで本研究では甲府盆地の小河川および用排水路を対象に、環境 DNA のメタバーコーディング法による魚類相の調査を行った。2020 年 10 月に対象区域の 8 地点で環境水を採水し、MiFish を用いて網羅的解析を実施した。その結果、国内の氾濫原地帯でよく見られる氾濫原依存種が中央市にかけての下流地域で多く検出された。一方、甲斐市の上流地域は下流地域に加えて、本流でもみられる種が検出された。また、対象区域を囲む河川で確認されている外来種・国内外来種は域内ではほとんど検出されなかった。この小河川の魚類相に至る環境要因は、小河川に流れ込む河川との接続性や人為活動などが影響していることが推定される。

The ecosystem in floodplain rivers and channels flowing urban and agricultural areas is expected to have larger and various anthropogenic impacts. However, their fish fauna is surveyed less frequently. This study investigated the fish fauna of small-scale streams flowing through urban and agricultural areas in the Kofu Basin using the environmental DNA meta-barcoding method. Stream water samples were collected from 8 sites in Kamata River and Kiyokawa River in October 2020. MiFish method was employed for DNA barcoding. As a result, some specialists for floodplain (i.e., carps, loaches) were found in the downstream area. On the other hand, we also found some common species in the mainstream (i.e., Kamanashi River) close to the study area in upstream sites.

PP022#

環境 DNA を用いたアユの産卵行動の検出—核 DNA とミトコンドリア DNA を用いた比較検討—

Identification of Ayu spawning events using environmental DNA-examinations using nuclear and mitochondrial DNA-

* 齋藤 稔 (山口大院・創成)、辻 冴月 (京大院・理)、宮園 誠二、中尾 遼平、児玉 貴央、赤松 良久 (山口大院・創成)

* Minoru SAITO (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Satsuki TSUJI (Grad. Sch. Sci. Kyoto Univ.), Seiji MIYAZONO, Ryohei NAKAO, Takao KODAMA, Yoshihisa AKAMATSU (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.)

近年、産卵時間帯前後における環境 DNA 濃度、あるいは核 DNA とミトコンドリア DNA の比率の変化から、魚類の産卵行動の有無やその活性を評価できる可能性が示されている。本研究では、アユを対象として産卵時間帯である日没の前後で各遺伝子領域 (核 RAG1・ミトコンドリア Cytb) の濃度、およびそれらの比率の変化をそれぞれ観察し、環境 DNA 分析を用いた産卵行動の評価が可能か検討した。調査は、島根県高津川下流の 3 地点にて 2020 年 10 月～12 月に 2 週間おきに実施した。その結果、アユの産卵期である 10 月中旬～11 月中旬の日没後では RAG1・Cytb とともに濃度の上昇がみられ、その傾向は RAG1 でより顕著であった。一方、産卵期の RAG1/Cytb 比については、日没前後で変化が見られない事例も認められた。以上から、環境 DNA に基づくアユの産卵行動の評価には、DNA 濃度の観察がより有効であることが示唆された。

Recent studies showed that fish spawning and its intensity could be evaluated by comparing pre- and post- spawning eDNA concentrations or nuclear to mitochondrial DNA ratio (RAG1/Cyt b ratio). We evaluated whether spawning of the Ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* could be identified using RAG1 in comparison to Cyt b. Surveys were done biweekly at three sites in the lower Takatsu River,

between early October and early December in 2020. During the spawning season, RAG1 and Cyt b concentrations rose after sunset. The trend was more profound for RAG1. In contrast, the RAG1/Cyt b ratio did not increase daytime to nighttime in some of the samples. The results indicated the applicability of both primer regions for identifying spawning of the Ayu.

PP023#

Environmental DNA approach complements citizen science to detect an endangered freshwater stingray species in the wild

* Kean Chong LIM (Institute of Ocean and Earth Studies Universiti Malaya; Institute for Advanced Studies Universiti Malaya), Amy Yee Hui THEN (Institute of Biological Sciences Universiti Malaya; Institute of Ocean and Earth Sciences Universiti Malaya)

We explore the use of a low-cost eDNA barcoding approach for detection of an endangered freshwater stingray species (*Fluvitrygon kittipongi*) in a tropical river system in Peninsular Malaysia. We designed species specific primer for a fragment of *F. kittipongi* cytochrome oxidase subunit I mtDNA (244 bp). The effectiveness of this primer was evaluated using water samples from the Pahang River that had records of *F. kittipongi* based on citizen science reports. Five out of 14 water samples taken along the upper and middle reaches of the Pahang River showed positive amplification. This represents the first successful application of eDNA to detect freshwater stingrays in Malaysia. Using a combination of freshly obtained samples, photographic evidences from citizen scientists and eDNA application, this study provides formal records of *F. kittipongi* in Malaysia, specifically in the three major river systems of Perak River, Pahang River and Kelantan River.

PP024#

空気中の環境 DNA 分析に適したエアーサンプリング法の検討

Study on air sampling method suitable for environmental DNA analysis in the air

* 大中 臨、稲葉 愛美、中尾 遼平、赤松 良久 (山口大院創成科学)

* Nozomu ONAKA, Manami INABA, Ryohei NAKAO, Yoshihisa AKAMATSU (Grad. Sch. Sci. Tech. Inno. Ymaguchi Univ)

環境 DNA 分析はこれまで水中の生物を中心に適用されてきた。しかし、空気中にも鳥類や哺乳類などの微量な DNA が浮遊しており、水中と同様に環境 DNA 分析を活用した広域の生物モニタリングが可能であると考えられる。そこで、本研究では3種のエアーサンプリング方式（液体インピンジャー式、サイクロン式、フィルター式）を用いた室内および野外での実験により、空気中の環境 DNA から鳥類や哺乳類の在・不在を把握する最適なエアーサンプリング法について検討した。

Environmental DNA analysis has been mainly applied to organisms in water. However, there is a high possibility that trace amounts of DNA from birds and mammals are suspended in the air, and there is a potential for monitoring of organisms over a wide area using environmental DNA analysis as well as in water. In this study, we investigated the optimal air sampling method to determine the presence or absence of birds and mammals from environmental DNA in the air by conducting indoor and outdoor experiments using three different air sampling methods.

PP025

ANEMONE：日本における環境 DNA 観測ネットワーク

ANEMONE: environmental DNA monitoring network in Japan

近藤 倫生（東北大院・生命）

Michio KONDOH (Grad. Sch. Life Sci. Tohoku Univ.)

環境 DNA は生物多様性観測における非常に有効なツールとして成長し続けている。ANEMONE は我が国における環境 DNA 観測のネットワークであり、2019 年に開始された。水研機構、環境 DNA 学会、JaLTER、JAMBIO 等の様々な機関の協力のもと、日本各地の研究者や行政、市民ボランティアの参加を得て、沿岸や河川・湖沼を対象とした多地点における統一手法での環境 DNA 観測を実施している。2020 年には、45 の沿岸サイトと 23 の河川・湖沼サイト、40 組の市民ボランティアが観測に参加した。ANEMONE はオープンデータサイエンスの精神のもと運営されており、データ獲得より 6 ヶ月の観測サイト優先期間ののち公開されることになっている。これにより生物多様性保全と生態系の持続的利用に貢献することが狙いである。

Environmental DNA is rapidly growing as a powerful tool for biodiversity observation. ANEMONE is an eDNA observation network launched in 2019 in Japan. In cooperation with the Japan Fisheries Research and Education Agency, The eDNA Society, JaLTER, JAMBIO, and other organizations, researchers, government agencies, and citizen volunteers from across Japan are collaborating to conduct multi-site eDNA observations in coastal areas, lakes, and rivers using a unified method. In 2020, 45 coastal sites, 23 river/lake sites, and 40 groups of citizen volunteers participated. ANEMONE is operated in the spirit of open data science and the observation data will be made freely available within six months after observation, which is expected to contribute to biodiversity conservation and sustainable use of ecosystems.

PP026

シアノバクテリアを対象としたメタバーコーディングとリアルタイム PCR

Metabarcoding and real-time PCR for cyanobacteria

* 大井 和之、吉川 さやか（九州環境管理協会）、高橋 威一郎（大分市上下水道局）

* Kazuyuki OOI, Sayaka YOSHIKAWA (Kyushu Env. Eval. Assoc.), Takeichiro TAKAHASHI (Oita City Waterworks and Sewerage Bureau)

止水域ではしばしば植物プランクトンが増殖し、有害な二次代謝産物を産生することがある。異臭の原因となるジオスミンや 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) を産生するシアノバクテリアが水源のダム湖で発生すると上水道の障害の原因となる。ジオスミンは *Dolichospermum* 属、2-MIB は *Psudanabaena* 属のシアノバクテリアが主に産生するが、同属の全ての種（株）が産生するわけではなく、形態観察だけでは有害藻株であるかどうか判定が難しい。有害藻株の発生をモニタリングする手法として、採水濾集したフィルターから抽出した環境 DNA を検体とした 16SrRNA 遺伝子領域のメタバーコーディングと異臭産生関連遺伝子のリアルタイム PCR による検出法を試行し、藻株の識別能力や検出力の観点から有効性を検証した。

Phytoplankton often proliferate in still waters and can produce harmful secondary metabolites. Cyanobacteria that produce geosmin and 2-methylisoborneol (2-MIB), which cause foul odors, can cause water supply failures when they occur in source dam lakes. Although cyanobacteria of the genera *Dolichospermum* and *Psudanabaena* mainly produce geosmin and 2-MIB, not all species (or strains) of the same genus produce them, and it is not possible to determine whether they are harmful algal strains by morphological observation alone. As a method for monitoring the occurrence of harmful algal strains, we tried a detection method using metabarcoding of the 16SrRNA gene region and real-

time PCR of genes related to odor production using environmental DNA extracted from water filters as samples, and verified its effectiveness in terms of the ability to identify and detect algal strains.

PP027

イルミナシーケンサーにおけるインデックスホッピングの検出と除去

Detection and removal of index-hopping in Illumina sequencers

田辺 晶史（東北大）

Akifumi S. TANABE (Tohoku University)

環境 DNA メタバーコーディングでは、由来サンプル識別のためのインデックス配列を付加した上で、イルミナ社の高スループットシーケンサによって塩基配列決定を行うが、この際にインデックス配列部分が入れ替わることで由来サンプルの判定を誤ることがある。これはインデックスホッピングと呼ばれている。この問題に対して、Esling ら (2015) は両端に 2 種類のインデックス配列を付加する（デュアルインデックス）こと、その組み合わせのいくらかを未使用としておくことで、未使用のインデックスの組み合わせで出現した配列、即ちインデックスホッピングにより出現した配列の数の分布を得て、サンプルの配列数が外れ値でないならインデックスホッピング由来と判定する方法を提案した。本講演では、上記手法でインデックスホッピングにより出現した配列数の分布が過大評価されることを示し、その対策を講じた方法を提案する。

In environmental DNA metabarcoding, index sequences are added to identify the origin of the sample, and then sequenced by Illumina's high-throughput sequencer. However, the index sequences are often interchanged and then, the origin of the sample can be incorrectly determined. This is known as index-hopping. For solving this problem, Esling et al. (2015) suggested to use dual-indexing and unused index combinations for estimating distribution of the number of sequences caused by index-hopping. In this poster, I will describe their original implementation overestimate the distribution of the number of sequences caused by index-hopping, and suggest a solution of this problem.

PP028

外来魚検出のための環境 DNA チップの開発とダム湖における野外適用

Development of the environmental DNA chip for the detection of non-native fishes and its application in dam reservoirs

* 中尾 遼平（山口大院・創成）、今村 史子（日本工営（株）中央研究所）、岡村 浩、宮田 亮、村松 万里江、中村 憲章（東洋鋼鈑（株））、赤松 良久（山口大院・創成）

* Ryohei NAKAO (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Fumiko IMAMURA (Res. Dev. Center Nippon Koei Co. Ltd), Hiroshi OKAMURA, Ryo MIYATA, Marie MURAMATSU (Toyo Kohan Co. Ltd.), Yoshihisa AKAMATSU (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.)

オオクチバス等の外来魚は全国の貯水池への侵入・定着が確認されており、ダム湖においてもその駆除および侵入対策は、管理上の重要な課題である。本研究では、外来魚用のより簡易的な環境 DNA 分析手法の開発を目的として、環境 DNA チップの開発を行った。本研究では、外来魚 3 種（オオクチバス・コクチバス・ブルーギル）を対象にした環境 DNA チップを作成し、種特異性の検討を行った。その後、全国 5 ヶ所のダム湖で調査を実施し、環境 DNA チップによる湖水からの外来魚の検出を試みた。その結果、各ダム湖において環境 DNA チップで対象種の DNA 検出できたことから、ダム湖のような野外環境でも適用できることが示された。一方で、リアルタイム定量 PCR と比較すると、環境 DNA チップの検出率は若干低くなっていた。今後、検出種数の増加、検出率の向上、手法の簡略化に取り組んでいくことで、環境 DNA チップの実

用化を目指していく。

In this study, we developed the environmental DNA (eDNA) chip as a simple method for the detection of three non-native fishes (largemouth bass, smallmouth bass, and bluegill sunfish). Developed an eDNA chip accurately detected three non-native fishes from the water samples collected in five dam reservoirs. The results of the eDNA chip well corresponded with those of the real-time quantitative PCR (qPCR). However, the detection rate on the eDNA chip was slightly lower than the qPCR. For the establishment of the eDNA chip as a detection tool of non-native species, further improvement and simplification of the eDNA chip should be needed (e.g., increase of detection rate and target species).

PP029

河川水辺の国勢調査への環境 DNA 導入に向けた取り組み

How introduce environmental DNA into riverside census?

信田 智、大角 一浩、天羽 淳（国土交通省）、中村 圭吾、* 村岡 敬子、篠原 隆佑、菅野 一輝（国研 土木研究所）

Satoshi SHINODA, Kazuhiro OHSUMI, Jun AMOU (Ministry of Land Infrastructure Transport and Tourism), Keigo NAKAMURA, * Keiko MURAOKA, Ryusuke SHINOHARA, Kazuki KANNO (Public Works Research Institute)

河川における生物の生息種や生息位置等の情報は、多自然川づくりを行う際の最も基礎的かつ重要な情報である。国土交通省では、平成2年度より河川水辺の国勢調査により、これらの情報の把握を進めている。近年、環境 DNA 分析技術の進展・普及に伴い、河川や湖沼の水から河川に生息する魚類の情報をより詳細に把握することが可能となっている。令和元年度に、過年度における環境 DNA 実態調査を行った結果、直接採捕と環境 DNA 確認種の間に7割程度の整合結果を得た一方で、採水地点の選定や採水・分析・解析に至る手順が一律ではなく、これが結果のばらつきにも関与していると考えられた。このため、従来の直接採捕による調査に加え、環境 DNA 調査を併用した魚類調査を実施していくための課題を抽出し、その対応策を検討するための広域な調査を実施している。国土交通省における本調査における取り組みと、これまで得られた成果の概要を報告する。

Information on the habitat of creatures in rivers is the most basic and important information for restoring river to ecological vibrancies. Since 1990, the Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism of Japan has been grasping this information through the national census on river environment. In 2019, a national survey was started to incorporate the eDNA for grasping fish information in river. 70% of species of fish was matched between direct sampling and eDNA census result, while selection of water sampling points and water sampling-analysis were varied. eDNA will be introduce into river national census on river environment after optimizing based on eDNA analyzing result on more than 2000 points of river and dams.

PP030

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

Feasibility of environmental DNA analysis in habitat surveys of fish species as indicators of environmental quality standards

* 平川 周作、中島 淳、松木 昌也、古賀 敬興、秦 弘一郎、柏原 学、古閑 豊和、石間 妙子、金子 洋平（福岡県保環研）、宮脇 崇（北九州市立大）、志水 信弘、松本 源生、石橋 融子（福岡県保環研）

* Shusaku HIRAKAWA, Jun NAKAJIMA, Masaya MATSUKI, Takaoki KOGA, Koichiro HATA,

Manabu KASHIWABARA, Toyokazu KOGA, Taeko ISHIMA, Yohei KANEKO (Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences (FIHES)), Takashi MIYAWAKI (The University of Kitakyushu), Nobuhiro SHIMIZU, Gensei MATSUMOTO, Yuko ISHIBASHI (FIHES)

水生生物の保全に係る環境基準は水温を因子とした水生生物の適応性に応じて類型が指定される。本研究では、環境 DNA メタバーコーディングによる魚類相調査において類型指定の評価の指標となる魚種をどの程度把握できるのか調査するため、筑後川水系 7 河川で実施した採捕調査と環境 DNA 分析による検出状況を比較した。その結果、冷水性の指標種であるヤマメ（サクラマス）やカジカ、温水性の指標種であるコイ、オイカワ、ウグイ、ナマズは、採捕調査で確認されたすべての河川において環境 DNA 分析でも検出されており、環境 DNA による検出力の高さが示された。

Environmental quality standards for conservation of aquatic life are classified according to the adaptability of aquatic organisms with water temperature as a factor. In this study, we compared the detection of fish species by eDNA analysis with collection surveys conducted in seven rivers of the Chikugo River system to investigate whether eDNA metabarcoding can identify fish species serving as indicators for typological evaluation. As a result, both cold-water indicator species such as *Oncorhynchus masou masou* and *Cottus pollux*, and warm-water indicator species such as *Cyprinus carpio*, *Zacco platypus*, *Pseudaspius hakonensis*, and *Silurus asotus* were detected by eDNA analysis in all rivers where these species were identified in collection surveys, indicating the high detection power of eDNA.

PP031

MiDeca as an effective tool to study Crustacean diversity in Mangrove Ecosystem

* Tadashi KAJITA, Maria Daniela ARTIGAS RAMIREZ, Shinnosuke KAGIYA (TBRC Univ. Ryukyus), Yukuto SATO (Faculty of Medicine Univ. Ryukyus), Hiroto NAGAI (Faculty of Science Univ. Ryukyus), Ayano MUKAI (Harvard Univ.), Tomoyuki KOMAI (Natural History Museum and Institute Chiba), Hideyuki IMAI (Faculty of Science Univ. Ryukyus)

We explored the potential use of MiDeca DNA metabarcoding as an effective biomonitoring tool for the biological diversity in the mangrove ecosystem. Using the water samples collected from some mangrove rivers on a subtropical island, Iriomote, Japan, we compared the species diversity data detected by MiDeca metabarcoding. The result suggested the influence of tidal time for detection by water sample, which would be associated with species' behavior. Among the 19 families of Decapoda, the top common family was Palaemonidae, Callinassidae, and Upogebiidae; and for 30 genera, the top common genus was *Lepidophthalmus*, *Upogebia*, *Palaemon*, and *Macrobrachium*. Among about 50 Decapoda species, the most common species were *Lepidophthalmus tridentatus*, *Upogebia yokoyai*, *Palaemon debilis*, and *Scylla serrata*.

PP032

環境 DNA 分析を用いた猪苗代湖におけるウチダザリガニの検出

Detection of signal crayfish in Lake Inawashiro by environmental DNA analysis

* 中道 友規、岡村 嵩彦、廣原 嵩也、池上 拓志、林 正敏、西川 崇範、小野 真宏（株式会社 KANSO テクノス）

* Tomoki NAKAMICHI, Takahiko OKAMURA, Takaya HIROHARA, Takuji IKEGAMI, Masatoshi HAYASHI, Takanori NISHIKAWA, Masahiro ONO (KANSO TECHNOS CO. LTD.)

猪苗代湖は、国指定天然記念物のミズスギゴケ群落や白鳥の飛来地として貴重な生態系を保有している。この猪苗代湖の北側に位置し、長瀬川を通じて猪苗代湖へ湖水が流入する秋元湖において、特定外来生物のウチダザリガニが定着しており、流下による猪苗代湖への移入が懸念されている。本研究では、2019年から2020年にかけて猪苗代湖北部の小規模河川と長瀬川においてウチダザリガニを対象とした環境DNAによる広域調査を実施した。その結果、猪苗代湖内からはウチダザリガニの環境DNAは検出されなかったものの、猪苗代湖北部の両河川でウチダザリガニのDNAが検出された。本研究では環境DNA技術により、ウチダザリガニの分布状況を早期に把握できたと考えられる。特定外来生物対策では早期発見と分布状況把握が極めて重要であり、環境DNA技術はこれら課題に対して有用であることが確認された。

Lake Akimoto is on the north side of Lake Inawashiro, and lake water flows into Lake Inawashiro through the Nagase River. The invasive alien species, the signal crayfish, inhabits Lake Akimoto, and there is concern that the flow will invade Lake Inawashiro. In this study, we conducted a survey of signal crayfish in the streams and Nagase rivers in the northern part of Lake Inawashiro by environmental DNA analysis. As a result, although no positives were detected in Lake Inawashiro, positives were detected in both rivers in the northern part of Lake Inawashiro. In other words, it is considered that the distribution of signal crayfish could be grasped at an early stage by environmental DNA technology.

PP033

高速定量 PCR を用いた水道水源におけるジェオスミン産生ラン藻類の簡易検出手法

A simplified method for the detection of geosmin-producing cyanobacteria in reservoirs using ultrarapid qPCR

* 渡部 健、池田 幸資、真木 伸隆（パシフィックコンサルタンツ株式会社）、大森 淳平（神戸市水道局水質試験所）、戎 紫穂（神戸市建設局下水道部計画課）、清水 武俊、小田 琢也（神戸市水道局水質試験所）、久保 貴大（兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科）、土居 秀幸（兵庫県立大学大学院情報科学研究科）

* Takeshi WATANABE, Kosuke IKEDA, Nobutaka MAKI (Pacific Consultants Co.LTD.), Junpei OMORI (Water Quality Lab. of Kobe Waterworks Bur.), Shiho EBISU (Plan. Div. Sewage Works Dept. Public Construction Projects Bur. City of Kobe), Taketoshi SHIMIZU, Takuya ODA (Water Quality Lab. of Kobe Waterworks Bur.), Takahiro KUBO (Grad. Sch. Simul. Stud. Univ. of Hyogo), Hideyuki DOI (Grad. Sch. Inf. Sci. University of Hyogo)

水道貯水池でカビ臭（ジェオスミン）産生ラン藻類をモニタリングする手法として、カビ臭合成酵素関連遺伝子部位を標的にした定量 PCR 法による簡易検出手法の有効性を検証した。カビ臭産生ラン藻類の細胞数及びカビ臭原因物質の測定と併せて定量 PCR 法による分析を行った結果、試料中の細胞の濃度と標的遺伝子部位の濃度に強い相関がみられ、簡易検出手法によりカビ臭産生ラン藻類の動態を高精度に把握できる可能性が示された。

We validated a simplified qPCR method which target the geosmin synthase gene (geoA) for the detection of geosmin-producing cyanobacteria in reservoirs. We measured cell numbers by microscope, analyzed the copy numbers of geosmin synthesis gene by qPCR, and determined geosmin concentration by PT-GC/MS. We analyze the relationship between three elements of the above, and found good correlation between cell density and gene copy numbers. Results strongly suggest that the qPCR-based method is applicable for accurate detecting and tracking geosmin-producing cyanobacteria in drinking water reservoirs.

PP034

環境水に内標を添加することによる DNA 収量の補正

Compensation of water quality influence to e-DNA analysis

* 白倉 裕美、福澤 隆、大橋 俊則、永田 久雄、西澤 尚文 ((株) ゴーフォトン)

* Hiromi SHIRAKURA, Takashi FUKUZAWA, Toshinori OHASHI, Hisao NAGATA, Naofumi NISHIZAWA (GO!FOTONINC.)

環境 DNA 測定では、濾過できる水量、抽出効率や PCR 効率等が、環境水の水質、例えば、場所・時期等に依存して変化することが予想される。しかしながら、現在の学会マニュアル法では、その影響が考慮されておらず、得られた結果がそのまま用いられている。我々の環境 DNA 調査では、やはり水質などの影響を受け、結果が 10 倍程度変動することがあることが観察されている。昨年、環境水に内標をスパイクすることを提案し、DNA 収量変化を確認できると共に、内標量と対象物の e-DNA 量から水質の影響を補正できる可能性を見出した。今回、多くの場所・時期の異なるサンプルを用いた実験により、内標の有効性を検証したので報告する。またこれらの実験を通して、DNeasy Blood and Tissue kit に同梱されている ATL 試薬の方が学会で使用を推奨している AL 試薬よりも実験結果が安定することが分かったので合わせて報告する

The e-DNA Society has published ‘Environmental DNA Sampling and Experiment Manual’. Although it is widely recognized as giving relatively high yield, we realized the yield sometimes varies more than one order of magnitude depending on water quality and extraction method. This interference makes quantitative discussion of e-DNA complicate. Last year, we proposed to add “Unique DNA” as “Internal Control” into water sample before filtration for direct comparison of experimental results. This year, we made a series of experiments that include the water sample from different locations and the different timings to confirm the effectiveness of “Internal control”. In this experiment, we identified, ATL can be good candidate rather than AL to have stable result.

PP035

環境 DNA メタバーコーディングにおける種検出誤差を考慮した階層モデリングとその実践

Accounting for species detection errors in environmental DNA metabarcoding: hierarchical modeling and its practice

* 深谷 肇一、今藤 夏子、松崎 慎一郎、角谷 拓 (国環研)

* Keiichi FUKAYA, Natsuko KONDO, Shin-ichiro MATSUZAKI, Taku KADOYA (NIES)

環境 DNA メタバーコーディングは非侵襲的かつ費用対効果の高い種検出手法として広く応用されているが、その多段階のワークフローの中では様々な要因で偽陰性が生じ得る。正確な種分布・多様性評価を実現する上で、環境 DNA メタバーコーディングにおける偽陰性への対処は重要な課題である。本発表では、この問題に対するアプローチとして複数種サイト占有モデルを用いた新しい解析の枠組みを紹介する (Fukaya et al. Methods Ecol. Evol. in press)。この手法を用いることでワークフローの異なる段階における種の検出可能性の変動要因を分析でき、また限られた予算の下で種検出の有効性を最適化する調査設計が可能である。また、この枠組みを容易に実践できるフリーソフトウェアとして R パッケージの開発を進めている。このパッケージを用いたデータ解析の流れや実行のイメージを紹介したい。

Although eDNA metabarcoding is a non-invasive and cost-efficient method for species detection, false negatives occur due to various factors in the inherent multistage workflow. Accounting for false negatives is therefore important to achieve reliable ecological monitoring via eDNA metabarcoding. Here, we introduce a novel analytical framework using a multispecies site occupancy model to remedy this problem (Fukaya et al., Methods Ecol. Evol., in press). It allows the analysis of the sources of

variation in the detectability of species throughout the different stages of the workflow and the design of surveys that optimizes the effectiveness of species detection with a limited budget. This framework will be implemented in an R package. We show the flow of data analysis using this package.

PP036

捕獲調査の代替は可能？ - プライマーの選定と DNA データベース整備が大型無脊椎動物の検出に与える影響 -

Is it possible to replace capture surveys? -Impact of primers and DNA databases on macroinvertebrate detection-

* 長谷部 勇太(神奈川県環境科学センター)、源 利文(神戸大)、竹中 將起(筑波大)、半田 佳宏((株) 生物技研)、関 将史 ((株) プラントバイオ)、白子 智康 (いであ(株))

* Yuta HASEBE (Kanagawa Environmental Research Center), Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ), Masaki TAKENAKA (Tsukuba Univ), Yoshihiro HANDA (Bioengineering Lab. Co. Ltd.), Masafumi SEKI (Plant Bio. Co. Ltd.), Tomoyasu SIRAHO (IDEA Consultants Inc.)

次世代シーケンサーを用いて河川に生息する大型無脊椎動物の環境 DNA 網羅解析を実施した結果の紹介。大型無脊椎動物については、対象となる種や分類群が多く、単一のプライマーで全ての種を検出することは難しい。また、プライマーが対象とする領域によっては DNA のデータベースが不十分なことも検出を難しくしている。そのため、本研究では神奈川県内に生息する大型無脊椎動物のうち、カゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目、トンボ目等の水生昆虫を中心にミトコンドリア全長の DNA データベースを整備するとともに、ミトコンドリア領域を対象とした複数のユニバーサルプライマーを使った網羅解析を実施した。結果としては複数のユニバーサルプライマーを併用することで様々な分類群の検出が可能となるが、その前提として DNA データベースの整備が重要となる。

For macroinvertebrates, there are many target species and taxonomic groups, and it is difficult to detect all species with a single primer. It is also difficult to detect all species with a single primer because of the insufficient DNA database in some regions targeted by the primers. In this study, we developed a database of mitochondrial DNA of macroinvertebrates in Kanagawa, focusing on aquatic insects such as Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, and Odonata, and conducted a comprehensive analysis using multiple universal primers targeting the mitochondrial region. In addition, we conducted a comprehensive analysis of the mitochondrial region using multiple universal primers. As a result, it is possible to detect various taxa, but it is important to maintain the DNA database.

PP037

環境 DNA 分析の際のコンタミネーションにおける静電気の影響について

The Effect of Static Electricity on Contamination in Environmental DNA Analysis

* 白子 智康、中村 匡聡 (いであ(株))

* Tomoyasu SHIRAKO, Masatoshi NAKAMURA (IDEA Consultants Inc.)

確度の高い環境 DNA 分析を行う上で最も頭を悩ませるのは、主にラボ内で発生するコンタミネーションである。本学会の調査・実験マニュアルでもその対策方法が示されているが、コンタミネーションを完全に除去することは非常に困難であるだけでなく、ほとんどの場合、コンタミネーションの原因も明らかになっていない。コンタミネーションに対して神経質な半導体工業や医薬・食品工業等の分野では、その主な要因として静電気が挙げられており、様々な対策が実施されている。想定される汚染物質のサイズは異なるものの「微量物質の混入」という点では、環境 DNA

分析におけるコンタミネーションも同様であり、実験機材由来の静電気がその一因となっている可能性が考えられる。そこで、本発表では、環境 DNA 分析の際のコンタミネーションにおける静電気の影響について検証を行った。

One of the most annoying problems in performing highly accurate environmental DNA analysis is contamination. Although countermeasures are described in the survey and experiment manuals of the eDNA society, it is not only very difficult to completely eliminate contamination, but in most cases the cause of contamination is not clear. In the semiconductor and pharmaceutical industries, where contamination is a major concern, static electricity has been cited as a major factor, and various countermeasures have been implemented. Contamination in environmental DNA analysis is similar in terms of "contamination of trace substances", and static electricity from laboratory equipment and supplies is considered to be one of the factors. Therefore, the effect of static electricity on contamination in environmental DNA analysis was examined.

PP038

Environmental DNA Meta-barcoding Analysis by Long Reads using the PacBio Sequel IIe system

* Yoshihiro HANDA, Keiko TSUCHIKANE, Satsuki TSURUTA, Nobuyuki MOROHASHI, Koichiro NAKANO (Bioengineering Lab. Co. Ltd.)

Environmental DNA technology has developed rapidly in biological surveys of water environments and evaluation of biodiversity. Especially, estimation of fish communities using fish universal primer MiFish are widespread worldwide. However, MiFish has problems that cannot be distinguished from species and subspecies in some groups such as carp and gobies. Therefore, we newly designed two types of fish universal primer gFish (amplification length: about 1,100 and 1,700 bp) to increase the resolution. In this study, the amplified libraries using three primers including MiFish were sequenced using the MiSeq and PacBio Sequel IIe (HiFi mode). In this presentation, we would like to discuss the advantages and limitations of decoding long DNA regions.

PP039

水質常時監視における環境 DNA メタバーコーディングによる海域魚類調査

Marine fish survey using environmental DNA metabarcoding during water quality monitoring

横田 雅弘、世良 篤弘、阿部 由克、前田 傑、* 飯塚 徹谷、金谷 智、日野 淳郎、牧野 健一 ((公財) ひょうご環境創造協会)、中村 淑樹、岡田 篤、武田 敦之 (神戸市環境局)

Masahiro YOKOTA, Atsuhiko SERA, Yoshikatsu ABE, Takashi MAEDA, *Tetsuya IIDUKA, Satoshi KANATANI, Atsuro HINO, Kenichi MAKINO (Hyogo Environmental Advancement Association), Toshiki NAKAMURA, Atsushi OKADA, Atsuyuki TAKEDA (Kobe City Environment Bureau)

公共用水域の水質常時監視は、全国の自治体で実施されている施策である。本報告は、神戸市が実施する海域の常時監視と併せて採水した試料を用い、環境 DNA メタバーコーディングにより魚類調査を行った結果である。調査は、令和 2 年度、水質常時監視と同じ 22 地点 (内 13 地点は上・中・下層) で、年間 6 回の採水・分析を行った。調査で検出された魚類は 2 綱 16 目 79 科 167 種であった。また、環境基準水域類型で区分した海域毎に、海域特性に応じた異なる魚類相が、また季節別、水平・鉛直分布別に其々特徴的な魚種が確認された。環境 DNA メタバーコーディングは、魚類相の季節・空間変動を把握し、高効率に生物情報を蓄積する極めて有効な手法である。

水質常時監視と併せて行うことにより、近年、瀬戸法の改正で豊かな海が求められる中、リン、窒素等理化学的指標に、生物学的指標を加えることで、市民にもより分かりやすい評価手法になると期待される。

Monitoring of public waters is an essential program for environmental administration. This report presents the results of a fish survey using eDNA metabarcoding on water samples collected during the monitoring of public waters in Kobe City. Water samples were collected and analyzed six times a year, at 22 sites which are the same as those for the water quality monitoring. The number of fishes detected in the survey was 167 species in 79 families. eDNA metabarcoding is a very effective method to understand seasonal and spatial variations of fish fauna in a highly efficient manner. The addition of biological indicators to chemical indicators, such as phosphorus and nitrogen, is expected to make the evaluation method easier for citizens to understand.

PP040

諫早湾干拓調整池内の水鳥を対象とした水質・底質・ネット濾過物の環境 DNA 分析による出現状況把握

Detection of water birds using environmental DNA of sediment and water and water residue in Isahaya Flood Regulation Pond.

* 小濱 智之、片山 悦治郎、恒岡 徹、松田 賢、溝下 博志、渡部 健（パシフィックコンサルタンツ株式会社）

* Tomoyuki KOHAMA, Etsujiro KATAYAMA, Toru TSUNEOKA, Satoshi MATSUDA, Hiroshi MIZOSHITA, Takeshi WATANABE (Pacific Consultants Co.LTD.)

鳥類の環境 DNA メタバーコーディング分析は野外での実施事例が少ない。そこで、諫早湾干拓調整池において、3つの異なるタイプの環境試料（水質、底泥、ネットを用いた水濾過物）を用いて当該分析手法の有効性を検証する調査を実施した。分析の結果、合計 18 種類の鳥類が検出された。同一地点の水と底泥から検出される種数は（異なる種が含まれるが）同等であった。また、環境 DNA で検出された種は全て、現地の目視調査で確認された。検出された種数は少なかったが、環境 DNA 分析により野外環境条件でも鳥類の検出が可能であることが示された。

Although some reports have demonstrated the potential of the avian eDNA metabarcoding using a universal primer set “MiBird” for assessing bird community, there are few studies conducted in wild environment. In this study, we validated the ability of the DNA metabarcoding analysis to assess bird community at Isahaya Flood Regulation Pond. We collected different type of environmental samples (water and sediment), and also water samples by plankton net. As a result, a total of 18 species of birds were detected. The number of species detected in water and sediment from the same sampling point was almost equal, though including different species. In addition, all the bird species detected by eDNA analysis was confirmed by visual survey. Though the number of species detected from eDNA was small, our results demonstrate that eDNA metabarcoding can detect birds in natural environment.

PP041

山口県周防大島沿岸海域における潮汐条件、採水量、採水水深別の環境 DNA による魚類検出結果比較

Comparison of fish detection results by environmental DNA according to tidal conditions, water sampling volume, and water sampling depth in the coastal waters of Suooshima, Yamaguchi Prefecture

* 片山 悦治郎、小濱 智之、立松 俊和、渡部 健、糸井 孝一、金子 幸司（パシフィックコンサル

タニツ株式会社)、源 利文 (神戸大学)

* Etsujiro KATAYAMA, Tomoyuki KOHAMA, Toshikazu TATEMATSU, Takeshi WATANABE, Koichi KUMEI, Koji KANEKO (Pacific Consultants Co.,LTD.), Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ.)

山口県周防大島沿岸海域において、魚類を対象に環境 DNA 分析を実施した。調査は、潮汐条件(上げ潮、満潮)、採水量 (5L、10L)、採水水深 (0.5m、底上 1m) の 3 条件別に魚類検出結果を比較した。その結果、10L の試料からは 5L の試料に比べてより多くの種数が検出されたが、潮汐条件や採水水深による確認種数への明瞭な影響は見られなかった。これらの結果から、淡水域では標準の採水試料が 1L とされているが、海域では採水量をより多くすることで、環境 DNA による検出効率を向上させられることが示唆された。

We analyzed water sample using eDNA metabarcoding with MiFish primer to survey fish community in coastal habitats of Suo-Oshima Island. In this survey, we compared the results of eDNA analysis according to three sampling conditions: tidal conditions (rising tide and high tide), the volume of sample water (5L and 10L), and the depth of water samples (surface [0.5m] and 1m above the sea bottom). As a result, more fish species were detected from 10L water sample than 5L, whereas tidal conditions and the depth of water samples did not affect the number of detected fish species. Our results suggested that the detection efficiency by eDNA can be improved by increasing the volume of sampling water in sea area, although standard of required sample water volume is 1L in freshwater.

PP042

環境 DNA 調査のためのパッシブサンプリング法に関する基礎的検討

Fundamental study for the development of a passive sampling method on the environmental DNA surveys

* 赤松 良久、中尾 遼平、稲葉 愛美 (山口大院創成)、今村 史子 (日本工営株式会社中央研究所)

* Yoshihisa AKAMATSU, Ryohei NAKAO, Manami INABA (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Fumiko IMAMURA (Research and Development Center Nippon Koei Co. Ltd.)

環境 DNA 調査において、調査地における環境サンプルの採集時間や採水場所の選定は、サンプリングによる種のばらつきや取りこぼしの可能性を抑制するうえで重要な課題となる。しかし、最適なサンプリング場所や時間帯は、対象とする調査地や環境条件によって大きく異なることから、それらを標準化することは非常に難しい。近年、河川調査において、水中に活性炭を長時間浸漬して河川の上流側から流れる環境 DNA を吸着することで、調査地の生物情報をより効率的に収集できる可能性が示されている。そこで本研究では、環境 DNA 調査におけるより簡便かつ効率的なサンプリング手法の開発を目的として、天然海綿由来のスポンジを水中に長時間浸漬するパッシブサンプルと環境水サンプルを比較することで、魚類環境 DNA メタバーコーディングにおける種の検出率の違いについて評価した。

In the environmental DNA (eDNA) surveys, a sampling location and time are important issue to reduce the lack of species diversity and abundance. However, the standardization of sampling methods is very difficult due to the differences in the best sampling timing and location at each survey site. In this study, to develop an effective sampling method for eDNA surveys, we evaluated the species detection capability of natural sponges as a passive eDNA sampling tool using fish eDNA metabarcoding. We compared the difference in species detection capability of fish eDNA between water samples collected from submerged sponges with 24 hours and water samples collected at each time point.

PP043#

Development of eDNA detection system for evaluating abundance and reproduction of freshwater mussels in the Ishikari River Floodplain

* Junyi WU (Graduate School of Env.Science Hokkaido Univ.), Takashi KANBE (Research Faculty of Agriculture Hokkaido Univ.), Hiroki MIZUMOTO (Japan Fisheries Research and Education Agency), Hokuto IZUMI (Graduate School of Env.Science Hokkaido Univ.), Itsuro KOIZUMI (Faculty of Env. Earth Science Hokkaido Univ.), Hitoshi ARAKI (Research Faculty of Agriculture Hokkaido Univ.), Junjiro NEGISHI (Faculty of Env.Earth Science Hokkaido Univ.)

Unionoida provides important ecological functions in freshwater ecosystems but is recognized as one of the most imperiled groups worldwide. *Buldowskia iwakawai*, which breeds in winter when lakes are frozen, suffers from population decline in Ishikari oxbow lakes. We aimed to develop an eDNA method to monitor *B. iwakawai* more efficiently throughout the year. We designed a species-specific primer set based on COI gene combined with optimal qPCR protocol to identify *B. iwakawai* by differentiating the target species from five coexisting closely-related species. This primer set will be applied to environmental water as well as water in the experimental tanks. The forthcoming results include the relationships between eDNA copy number and hand-collection CPUE, and between eDNA copy number and gravidity levels.

PP044#

環境 DNA 分析を用いた土師ダム下流区間の支流におけるオオカナダモ繁茂状況の検討 Examination of the *Egeria densa* abundances in the tributaries in the downstream segment of the Haji Dam using environmental DNA analysis

* 児玉 貴央、宮園 誠二、赤松 良久（山大院・創成科学）

* Takao KODAMA, Seiji MIYAZONO, Yoshihisa AKAMATSU (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.)

江の川土師ダム下流では、オオカナダモの異常繁茂が問題となっている。本研究では、土師ダム下流の本流および支流を対象とし、環境 DNA 分析を用いてオオカナダモの分布密度が本流に匹敵する支流を特定することや支流のオオカナダモの季節変化（3 月から 7 月）が河川環境によって変化するかどうかを検討することを目的とした。解析の結果、3 月では 4/16 地点、7 月では 2/16 地点において支流の環境 DNA 濃度が本流よりも高い値を示した。また、支流調査地点を自然河川と用水路に分類し、環境 DNA 濃度の季節変化を比較したところ、用水路では自然河川よりも環境 DNA 濃度の季節変動が低く、3 月・7 月共に環境 DNA 濃度が高いことが明らかとなった。これらの結果から、用水路型の支流が季節を通して切れ藻の供給源になっている可能性が示唆された。The overgrowth of *Egeria densa* in the downstream segment of the Haji Dam is one of concerns in the Gonokawa River. We estimated the abundances of *E. densa* in the mainstem and tributaries in the downstream segment of the Haji Dam and examined the environmental conditions that could be related to the abundance. Our results indicated that the *E. densa* abundances of some tributary sites could be higher than those of mainstem sites. In addition, the seasonal changes of the *E. densa* abundances in the artificial tributaries could be lower than those of the natural tributaries. These results suggest that the artificial tributaries could be the constant sources of *E. densa* to the mainstem in the study system.

PP045#

魚類の核環境 DNA メタバーコーディング手法の開発

Development of eDNA metabarcoding assay targeting nuclear DNA as a marker for fish

* 佐々木 大介（神戸大院・発達）、山中 裕樹（龍谷大・先端理工）、坂田 雅之、源 利文（神戸大院・発達）

* Daisuke SASAKI (Kobe Univ.), Hiroki YAMANAKA (Ryukoku Univ.), Masayuki K. SAKATA, Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ.)

魚類モニタリングツールとして、eDNA メタバーコーディング手法が注目されている。現在使われる多くの手法ではミトコンドリアの 12S rRNA 領域をマーカーとしているが、この領域では判別できない近縁種が存在する。対して、核 DNA のリボソーム RNA 遺伝子領域内には ITS 領域と呼ばれる可変領域があり、この領域をマーカーとすることで、これまで以上の解像度が得られる可能性がある。本研究では、核 DNA のリボソーム RNA 遺伝子 ITS2 領域をマーカーとする新たな eDNA メタバーコーディング手法の開発を試みた。まず、データベースから得たシーケンスを元にユニバーサルプライマーを設計した。設計したプライマーが魚類の組織から抽出した DNA を増幅することを確認した後、琵琶湖、およびその内湖で採取した水サンプルに適用して魚類の DNA の検出に成功した。またその結果から、適切な PCR 酵素と温度条件の検討を行った。Recently, the use of eDNA metabarcoding methods has been developed as a monitoring tool for fishes. The most common universal primers use the mitochondrial 12S rRNA region as a marker, but there are some closely related species that cannot be distinguished by this region. On the other hand, the nuclear rRNA gene has more variable regions, referred as ITS regions, and the use of ITS region as a marker may provide better taxonomic resolution. In this study, we designed a new eDNA metabarcoding assay using the nuclear ITS2 region as a marker and tested its applicability.

PP046#

環境 DNA 分析による北海道における国内外来種ヌマエビの分布に関する研究

eDNA survey on distribution of domestic alien freshwater shrimp, *Paratya compressa*, in Hokkaido

* 加藤 優樹、神戸 崇、荒木 仁志（北海道大学）

* Yuki KATO, Takashi KANBE, Hitoshi ARAKI (Hokkaido Univ.)

本研究では両側回遊性の生活史をもつ国内外来種、ヌマエビの北海道における分布様式を明らかにするために、本種を対象とした種特異的環境 DNA 分析手法を確立し、道内 45 河川で採取した環境サンプルを用いた解析を実施した。その結果、合計 14 河川からヌマエビの環境 DNA が検出され、本種が道内の日本海に面する河川に広く分布していることが明らかとなった。また、GIS を用いた解析から、本種の分布が河川勾配などの環境要因と関連している可能性が示唆された。

In this study, we aimed to clarify distribution of *Paratya compressa* which is a domestic alien freshwater shrimp in Hokkaido. We developed *P. compressa* specific eDNA detection system, and applied it to water samples collected from 45 rivers in Hokkaido. As a result, we found *P. compressa* eDNA in 14 rivers that are widely distributed along the Sea of Japan. In addition, the results of statistical analysis using geographic information suggested that distribution of the species is related to a few environmental factors including stream gradient.

PP047#

シロヒレタビラ特異的環境 DNA 検出系の構築と琵琶湖における分布調査

Establishment of *Acheilognathus tabira tabira* specific environmental DNA detection system, and habitat survey in Lake Biwa

安井 憲臣（長浜バイオ大院・バイオサイエンス研究科）

Kenshin YASUI (Grad. Sch. Biosci. Nagahama Institute of Bio-Science and Technology.)

シロヒレタビラ (*Acheilognathus tabira tabira*) は、日本固有のタナゴの 1 種で、東海、近畿地方に自然分布している。本種は個体数の減少が著しく、環境省レッドリストで絶滅危惧 I B 類に指定されている。かつて、シロヒレタビラは琵琶湖のほぼ全域に広く生息していたとされるが、2010 年以降本種の明確な報告はなく、現在の琵琶湖における本種の生息域は不明瞭である。また、本種を特異的に検出する環境 DNA 解析用のプライマーとプローブは開発されていない。そこで本研究では、シロヒレタビラ種特異的な検出が行える環境 DNA 実験系を開発し、琵琶湖におけるシロヒレタビラの生息地を調査することを目的とした。種特異的プライマーとプローブのセットの作成を行い、他種のタナゴの DNA を鋳型とした解析から、作成したプライマーとプローブが、琵琶湖水系については本種特異的な増幅が可能であることを確かめた。

Acheilognathus tabira tabira is one of the bitterling species endemic to Japan and distributed in Tokai and Kinki regions. The *A. tabira tabira* population has been declined rapidly, and this species is designated as an endangered species (IB) in the Red List of the Ministry of the Environment. In this study, to survey the habitat of *A. tabira tabira* in Lake Biwa using eDNA procedure, we attempted to construct a quantitative PCR system. As the result, using a set of species-specific amplification primers and detection probe newly designed here, we succeeded in establishing a high sensitive qPCR system that can detect as few as five copies of the target DNA.

PP048#

へビからのウイルス由来核酸の抽出とメタゲノム解析

Establishment of extraction method of virus nucleotides from snakes and metagenomic analysis of snake viruses

吉積 宙（長浜バイオ大学大学院・バイオサイエンス）

Sora YOSHIDUMI (bioscience. nagahamabio inst.)

本研究室では、へビ由来の長鎖散在反復配列の一種 (BovB) が、カエルのゲノムに水平伝播していることを発見した。本水平伝播を仲介したウイルスを探索することを最終的な目的とし、本研究では、これまでに実施例がない、へビからのウイルス由来核酸精製を行った。これまでに、コウモリからウイルス精製を行なった Baker et al. (2013) の方法をベースに、へビ（アカマタ）の消化管内容物からウイルス画分を得、そこから核酸を抽出した。抽出核酸をランダム増幅した後、DNBSEQ を用いた NGS 解析を行った。ここで得られたリード（約 500 万リード）を KRAKEN2 によって解析した結果、ウイルスに相当する配列は、全リードのわずか 0.03% であった。現在は、野鳥からウイルス精製を行なった Jessy et al. (2018) を参考に、ウイルス粒子の画分法と核酸増幅法を変更し、プロトコルの再構築を行なっている。

We have discovered a horizontal transfer phenomenon of BovB LINE having a unique transfer direction from snakes to frogs. With a final goal of investigation if the virus that mediated this horizontal transmission, in this study, we involved the purification of virus-derived nucleic acids from snakes, which has not been reported so far. We obtained viral fractions from the intestinal contents of *Dinodon semicarinatum* and extracted the nucleic acids, based on the method of Baker et al. (2013). After random amplification the nucleic acids from the viral fractions were sequenced using DNBSEQ. The resultant NGS reads (Approximately 5 million reads) were analyzed by KRAKEN2 software and only 0.03% reads corresponded to the virus sequence. We are reconstructing the virus fractionation procedure.

PP049#

環境 DNA 分析を用いた複数水系のオオカナダモ繁茂状況の把握

Use of environmental DNA analysis for grasping the abundance patterns of *Egeria densa* in multiple river basins

* 宮平 秀明 (山大・社会建設)、宮園 誠二、児玉 貴央、赤松 良久、中尾 遼平 (山大院・創成科学)

* Hideaki MIYAHIRA (Dept. Civil. Envi. Eng. Fac. Eng. Yamaguchi Univ.), Seiji MIYAZONO, Takao KODAMA, Yoshihisa AKAMATSU, Ryohei NAKAO (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.)

近年、外来沈水植物のオオカナダモが国内の水系において分布を拡大し、様々な問題を引き起こしていることが指摘されている。本研究では環境 DNA 分析を用い、オオカナダモの複数水系における分布特性を検討した。2021 年 4～6 月に中国地方の 5 つの一級水系（佐波川、江の川、高津川、太田川、高梁川）を対象として、環境 DNA 分析のための河川水の採水（合計 141 地点）を行い、定量 PCR 法により各採水地点のオオカナダモの環境 DNA 濃度を算出した。オオカナダモの環境 DNA 濃度の空間分布から、江の川、佐波川、高津川においてオオカナダモの繁茂が相対的に高いことが明らかとなった。また、複数水系におけるオオカナダモ繁茂に影響し得る環境要因の解明を目的として、オオカナダモの環境 DNA 濃度と環境要因（河床勾配、河川水温など）との関係について検討した。

It was reported that the distribution of an invasive aquatic plant *Egeria densa* had been spreading in aquatic systems in Japan, causing various issues. In this study, we examined the spatial distribution patterns of *E. densa* in the five first-class rivers (Saba, Gonokawa, Takatsu, Takahashi, and Ota rivers) using the environmental DNA (eDNA) method. Our results indicated that the eDNA concentrations of *E. densa* of the three rivers (Saba, Gonokawa, and Takatsu rivers) were higher than those of other rivers. We also examined the relationships between the eDNA concentrations of *E. densa* and environmental factors (e.g., riverbed slope, water temperature, etc.) in the study sites to elucidate the factors that could cause the overgrowth in multiple rivers.

PP050#

ダム湖の魚類調査における環境 DNA メタバーコーディング分析の実装に向けて

Towards the implementation of environmental DNA metabarcoding for fish surveys in dam reservoirs.

* 松本 岳大 (神戸大・院・発達)、深谷 肇一 (国立環境研究所)、坂田 雅之 (神戸大・院・発達)、沖津 二郎、稲川 崇史、平岡 康介 (応用地質 (株))、一柳 英隆 (水源地環境センター)、源 利文 (神戸大・院・発達)

* Takehiro MATSUMOTO (Grad Sc Human Dev Env Kobe U), Keiichi FUKAYA (NIES), Masayuki K. SAKATA (Grad Sc Human Dev Env Kobe U), Jiro OKITSU, Takashi INAGAWA, Kosuke HIRAOKA (OYO Corporation), Hidetaka ICHIYANAGI (WEC), Toshifumi MINAMOTO (Grad Sc Human Dev Env Kobe U)

魚類の環境 DNA メタバーコーディング分析をダム湖の調査に実装するための調査デザインを検討した。国内の 6 ダム湖において、春と秋に各 30 本の水サンプルを採取し、MiFish プライマーを用いた環境 DNA メタバーコーディングによる魚種検出を行った。本研究では、多種サイト占有モデルを用いることによる偽陰性を考慮した最適調査デザインについて検討する。具体的には、ある一定の予算下において期待される検出種数が最大となるような調査デザイン（調査時期、採水本数、シーケンスデプスなど）の検討を行う。また、ダム湖により適した調査デザインは異なると考えられるため、それがダム湖の有するどのような特徴に依存しそうかについても報告する。A cost-effective survey strategy for the implementation of fish eDNA metabarcoding in dam reservoirs

was investigated. Thirty water samples were collected in each of six domestic dam reservoirs in spring and autumn for fish species detection by eDNA metabarcoding using MiFish primers. In this study, we will investigate the optimal survey strategy considering false negatives by using multispecies site occupancy model. Specifically, the survey design (sampling season, number of samples and sequence depth, etc.) will be examined to maximize the expected number of detected species under a budget limitation. The appropriate survey design may differ for each dam reservoirs. Therefore, we will also report on what characteristics of the dam reservoirs might depend on.

PP051#

花虫綱を対象とした環境 DNA メタバーコーディング系の開発

Development of eDNA metabarcoding assays for Anthozoa

* 西澤 峻平、鰐 倩倩（神戸大・院・人間発達）、中野 智之（京大・フィールド研）、駒井 智幸（千葉中央博）、源 利文（神戸大・院・人間発達）

* Ryohei NISHIZAWA, Qianqian WU (Kobe Univ.), Tomoyuki NAKANO (Kyoto Univ.), Tomoyuki KOMAI (Natural History Museum and Institute Chiba), Toshifumi MINAMOTO (Kobe Univ.)

人間活動による海水温の上昇や海洋酸性化に伴い、花虫綱（サンゴやイソギンチャクなど）の分布域は変化しつつある。また造礁サンゴからソフトコーラルへ群集シフトが起こる例など生物相の変化も多く報告されている。しかしソフトコーラルなどについての研究は造礁サンゴに比べると少なく、分布の変化に関する調査は不十分である。生態系の構造と機能の変化を捉えるため、より広い分類群のモニタリングが必要であり、環境 DNA メタバーコーディング手法に着目した。本研究では花虫綱を対象に環境 DNA メタバーコーディング系の開発を試みた。データベースから対象分類群の塩基配列をダウンロードし、ミトコンドリア 16SrRNA 領域上に、それぞれ対象の異なる 4 組のプライマーセットを設計した。プライマーを用いて対象生物の組織 DNA 抽出液を鋳型に PCR を行い、条件の検討を行った。また系の有効性を確認するため、飼育水槽水を用いた実験を行った。

Sea temperatures rise and ocean acidification due to human activities cause change of the distribution areas of Anthozoa. In addition, there have been many reports of changes in the biota, such as a community shift from hard corals to soft corals. However, studies on soft corals and other cnidarians are scarce compared to hard corals, and research on biota change is insufficient. To monitor changes in ecosystem structure and function, monitoring a wide range of taxa is necessary, and we focused on the environmental DNA (eDNA) metabarcoding. In this study, we developed eDNA metabarcoding assays for Anthozoa with four sets of primers, all on the mitochondrial 16SrRNA gene. Using these primers, PCR was performed with tissue DNA extracts of the target organisms. To confirm the effectiveness of the assays, experiments were conducted using aquarium water.

PP052#

堆積物 DNA により復元された動物プランクトンの過去 100 年にわたる産卵量の変動

Reconstruction of 100-year dynamics in zooplankton spawning activity revealed by sedimentary DNA

* 中根 快（愛媛大・沿岸環境）、土居 秀幸（兵庫県立大・情報）、越智 梨月、加 三千宣（愛媛大・沿岸環境）、槻木 玲美（松山大・法）

* Kai NAKANE (CMES. Ehime Univ.), Hideyuki DOI (Grad. Sch. Info. Sci. Univ. Hyogo), Natsuki OCHI, Michinobu KUWAE (CMES. Ehime Univ.), Narumi TSUGEKI (Fac. Law. Matsuyama Univ.)

近年目覚ましい発展を遂げている環境 DNA の分析手法であるが、その供給源についてはまだ十分に解明されていない。一方、海底や湖底の堆積物には様々な生物の環境 DNA が残っており、堆積試料の環境 DNA から過去数百年の長期にわたる生物相復元も報告されている。本研究は、環境 DNA の由来を明らかにするため琵琶湖のミジンコ 2 種を対象に過去 100 年に相当する堆積試料のミジンコ由来の環境 DNA をリアルタイム法で解析し、その結果をミジンコの個体数・休眠卵量を反映する遺骸・休眠卵数の変動と比較することで環境 DNA の供給源を検証した。分析の結果、環境 DNA 濃度は個体数変動とは一致せず、休眠卵量の変動とよく一致していることが判明した。この結果は、ミジンコの環境 DNA は産卵時に放出される基質が主要な供給源であることや、堆積試料の環境 DNA を用いれば過去 100 年にわたる産卵量の変動を再現できる可能性を示唆している。

Environmental DNA continues to develop as a powerful tool for assessing species dynamics, but its sources remain under debate. This study applied a quantitative PCR analysis of Daphnia environmental DNA in sediment core (sedimentary DNA) collected from Lake Biwa, Japan. Their sedimentary DNA and the remains and ephippia, reflecting their abundance and resting egg production, respectively, were analyzed and compared. The sedimentary DNA concentrations for 100 years were inconsistent with their population abundance; however, they provided a good representation of the resting egg production. Our results provide evidence that substrates released during spawning activities are significant sources of sedimentary DNA, which provides critical insights for using sedimentary DNA as a monitoring tool for egg production dating back 100 years.

PP053#

環境 DNA から河川の魚類分布を推定する：DNA の流下と減衰を考慮したモデリング

Estimating fish distributions in rivers using eDNA: a hierarchical Bayesian modeling approach that takes the eDNA dynamics into account

* 伊藤 青葉（東北大学）、香川 裕之、成田 勝（東北緑化環境 保全株式会社）、長田 穰（水産機構・水資研）、近藤 倫生（東北大学）

* Aoba ITO (Tohoku Univ.), Hiroyuki KAGAWA, Masaru NARITA (Tohoku Ryokka Kankyohozen Co. Ltd.), Yutaka OSADA (FRA), Michio KONDOH (Tohoku Univ.)

河川環境において環境 DNA を利用した生物分布推定を精度良く実施するには、DNA の放出、流下や減衰といった「環境 DNA 動態」を考慮することが不可欠である。しかし、環境 DNA 動態にかかわる変数を実験等によって別途評価するには無視できない労力が求められ、そのことが環境 DNA を利用した河川での広域生物調査実現の制限要因となる可能性がある。そこで我々は環境 DNA 動態を明示的に考慮した階層ベイズモデルを構築し、これを利用することで多地点観測データと河川の基礎的な物理データから生物分布と減衰速度を同時に推定するアプローチを提案する。開発したモデルを 3 水系の多地点で実施された魚類を対象とする環境 DNA メタバーコーディング調査のデータに対して適用し、魚類分布と DNA 減衰速度を推定した結果を報告するとともに、環境 DNA を利用した河川生態系調査における今後の課題について考察する。

Environmental DNA is an effective tool to estimate the distribution of organisms. For its application to a river environment, it is essential to consider the eDNA dynamics (release, flow and decay of eDNA). However, evaluation of those parameters is effort-demanding and can be a limiting factor for the realization of wide-area surveys using eDNA. Here, we present a hierarchical Bayesian model that considers the release, flow and decay of eDNA, which enables simultaneously estimating the organism's distribution and eDNA decay rate from multipoint eDNA data and physical environmental data. The model is applied to the multi-site eDNA metabarcoding data in three water systems to estimate fish distribution and DNA decay rate in those systems. Some future issues will be discussed.

PP054#

北海道におけるワカサギ 2 種の季節性異所的分布

Seasonally differentiated distributions of the two smelt species in Hokkaido

* 池田 崇人、神戸 崇、荒木 仁志 (北大)

*Takahito IKEDA, Takashi KANBE, Hitoshi ARAKI (Hokkaido Univ.)

北海道にはワカサギ (*Hypomesus nipponensis*) と、イシカリワカサギ (*H. olidus*) の 2 種が存在している。本 2 種は、同所的に存在しつつも遺伝的に大きく分化していることが分かっている。一方 2 種の生殖隔離の要因や具体的な分布については分かっていない。そこで本研究では北海道・石狩川河口近傍に位置する茨戸川において、2 種の生殖隔離メカニズムを解明することを目的とし、環境 DNA 技術を用いて春の繁殖時期と秋の遡上時期に焦点を当てて検証を行った。その結果、春にはワカサギは海に近い地点、イシカリワカサギは海から遠い地点に多く分布していることが示唆された。また秋には、ワカサギは海での分布が確認された一方、イシカリワカサギは降海していないことが示唆された。これらの結果から繁殖時期の生息地の違いや降海遡上などの行動様式の差異、といった複数の要因が絡まり 2 種の生殖隔離が生じたと考えられる。

In Hokkaido, there are two species of smelt called Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*) and the Pond smelt (*H. olidus*). These two species are known to be often sympatric but genetically differentiated. However, factors that cause reproductive isolation between the two species are unknown. In this study, we tried to evaluate a potential barrier of the reproductive isolation between the two species using environmental DNA. We found that in both breeding season and up-migrating season, their distributions in Barato river, near to the mouth of Ishikari river system in Hokkaido, are different. These results suggest reproductive isolation between the two species is presumably caused by differences in seasonal habitat use and reproductive migratory behaviors.

PP055

環境 DNA 分析×系統地理学：水を汲んで複数種の系統地理情報を同時に得る

eDNA x Phylogeography: Revealing phylogeographic information of multiple species from water samples

* 辻 冴月 (京大院・理)、芝田 直樹 ((株)環境総合リサーチ)、中尾 遼平 (山口大院・創成)、乾 隆帝 (福工大・社環)、赤松 良久 (山口大院・創成)、渡辺 勝敏 (京大院・理)

* Satsuki TSUJI (Grad. Sch. Sci. Kyoto Univ.), Naoki SHIBATA (Env. Res. Sol. CO. LTD.), Ryohei NAKAO (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Ryutei INUI (Fac. Socio-Env. Studies. FIT), Yoshihisa AKAMATSU (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Katsutoshi WATANABE (Grad. Sch. Sci. Kyoto Univ.)

近年の環境 DNA 分析技術の発展により、水中の環境 DNA を収集して配列決定すれば個体を捕獲・観察することなしに、種多様性はもちろんのこと、遺伝的多様性を評価することも可能になってきた。さらに、以前は困難であった遺伝的多様性の量的な評価（つまり、リード数ではなく各ハプロタイプの DNA コピー数を推定する）が可能となったことで、環境 DNA 分析の適用可能性はますます拡大している。そこで、本研究では環境 DNA 分析の次の展開として、系統地理学への適用に取り組んだ。また、環境 DNA 試料には複数種の DNA が含まれているという特徴を生かし、単一の環境 DNA 試料に対して 2 つの検出系を用い、計 5 種の検出の系統地理を同時に明らかにすることを試みた。

The recent development of eDNA analysis technology allows us to evaluate not only species diversity but also genetic diversity without capturing individuals by simply collecting and sequencing eDNA in water. Furthermore, the applicability of environmental DNA analysis continues to expand by the development of techniques for the quantitative evaluation of genetic diversity (i.e., estimating the

number of DNA copies of each haplotype rather than the number of reads), which previously been considered difficult. In this study, as the next step of eDNA analysis, we challenged phylogeography based on eDNA analysis. In addition, as the samples contained DNA of multiple species, we tried to evaluate phylogeographic information of multiple species (five fishes) simultaneously by using two primer sets.

PP056

環境 DNA を用いたヤマトシジミ資源量推定の試み

An attempt to estimate the biomass of the brackish-water clam using environmental DNA

* 楠田 聡、山崎 哲也、安藤 大成（道さけます内水試）、真野 修一（道網走水試）、神戸 崇、荒木 仁志（北大農）、高原 輝彦（島根大・生物資源）

* Satoshi KUSUDA, Tetsuya YAMAZAKI, Daisei ANDO (HRO Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute), Shuichi MANO (HRO Abashiri Fisheries Research Institute), Takashi KANBE, Hitoshi ARAKI (Hokkaido Univ), Teruhiko TAKAHARA (Shimane Univ)

網走湖のヤマトシジミの生息密度（個/m²）と生物量（g/m²）は、ほぼ毎年6月に噴流式ジョレン（採集面積1.8m²）を使用した資源量調査と、採泥器（同0.05m²）を使用した分布調査を実施することで把握している。本研究では、シジミ資源量推定に環境DNA分析手法が利用可能かを検討するため、6月に岸から沖に向かう6ラインに各々設定した水深別5地点の環境DNA濃度と、各調査で得られた生息密度と生物量との相関を調べた。資源量調査では生息密度、生物量ともに水深1.5mと3mでDNAと強い正の相関（ $P<0.01$ ）を示したが、4m以深では無相関であり、シジミと鉛直距離が近いほど相関係数が大きくなった。一方、分布調査では、シジミに近いほどDNA濃度が高くなる傾向は確認できなかった。以上のことから環境DNAは水深3m以浅における1.8m²あたりのシジミの生息密度と生物量を推定できる可能性がある。

The density (clam m⁻²) and biomass (g m⁻²) of the brackish-water clam *Corbicula japonica* have estimated using commercial fishing implements called Jollen (sampling area 1.8 m²) or a Smith-McIntyre grab (0.05 m²) during June in Lake Abashiri. In this study, we investigated a correlation with the eDNA concentration and density/biomass to consider whether the clam biomass could estimate using an eDNA method. We found that the eDNA concentration was significantly correlated with density/biomass ($P<0.01$) at 1.5-3 m depth, but there was no correlation at 4 m depth or more using Jollen and at 5 m depth or less using the grab. These results suggest that eDNA concentrations could estimate density/biomass of clam at 3 m depth or less using Jollen.

PP057

福島県太田川におけるDNAメタバーコーディングによるヤマメ食性解析

Diet analysis of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) using DNA metabarcoding at the Ota River, Fukushima

* 石井 弓美子、趙 在翼、斎藤 梨絵、今藤 夏子、玉置 雅紀、中嶋 信美（国立環境研究所）、金指 努、和田 敏裕、難波 謙二（福島大学）、舟木 優斗、寺本 航（福島県内水面水産試験場）、小荒井 一真（日本原子力研究開発機構）、林 誠二（国立環境研究所）

* Yumiko ISHII, Jaeick JO, Rie SAITO, Natsuko KONDO, Masanori TAMAOKI, Nobuyoshi NAKAJIMA (National Institute for Environmental Studies), Tsutomu KANASASHI, Toshihiro WADA, Kenji NANBA (Fukushima University), Yuto FUNAKI, Wataru TERAMOTO (Fukushima Prefectural Inland Water Fisheries Experimental Station), Kazuma KOARAI (Japan Atomic Energy

福島原発事故後、福島県の一部地域ではヤマメの出荷制限が続いている。ヤマメは餌となる陸生昆虫と水生昆虫から放射性セシウムを取り込むため、魚の個体ごとの餌生物の組成の違いと放射性 Cs 濃度の関係を調べることで、放射性 Cs の取り込みに重要な餌資源を明らかにすることができる。本研究では、DNA メタバーコーディングによるヤマメの食性解析を行った。魚の食性解析は消化管内容物の直接的な観察によって行われてきたが、DNA を用いた解析では、断片化した餌などより詳細な食性を明らかにすることができると考えられる。ヤマメ消化管内容物は顕微鏡観察を行った後、DNA を抽出し、COI 領域をターゲットとした複数のプライマーを用いて PCR を行い次世代シーケンサーにより配列を決定した。その結果、DNA による食性解析では、顕微鏡観察では観察されなかった分類群の餌生物が多く検出された。季節による食性解析結果の違いについても検討を行う。

After the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident, masu salmon continues to be contaminated because they take up radiocesium from their diet, terrestrial and aquatic insects. Investigating the relationship between the composition of prey and the activity concentration of radiocesium in each individual fish possibly identify the important prey resources for radiocesium uptake. In this study, we analyzed the diet of masu salmon by DNA metabarcoding. After microscopic observation of the contents of the digestive tract, they were subjected to DNA-based diet analysis. As a result, many prey items that were not identified by microscopic observation were detected in the DNA-based diet analysis. Differences in the results of the diet analysis depending on the season will also be discussed.

PP058

サンショウウオ類の生息地年間調査における環境 DNA 検出傾向について

Environmental DNA detection trends in annual surveys of salamander habitats

* 赤塚 真依子、高山 百合子、内池 智広、松宮 綾香（大成建設（株））

* Maiko AKATSUKA, Yuriko TAKAYAMA, Tomohiro UCHIIKE, Ayaka MATSUMIYA (Taisei Co. LTD.)

建設工事では、小型で活動範囲が限られるサンショウウオ類が保全対象になることが多い。サンショウウオ類の生息調査は、産卵期における目視での卵塊分布調査に留まることが多く、水中・陸上を移動する幼体、成体の調査は困難である。そこで環境 DNA によるサンショウウオ類の調査を実施し、産卵期以降の幼生（水中）期・成体（陸上）期を通じた生息調査への環境 DNA の活用を検討した。本発表では、サンショウウオの卵塊を移設した湿地において、18 か月間、11 回のサンショウウオ類の環境 DNA を調査した結果を報告する。産卵期と幼生（水中）期に DNA の増幅を確認でき、成体（陸上）期に DNA が非検出になる傾向が得られた。環境 DNA 検出傾向と水陸利用期に関連が得られ、環境 DNA によるサンショウウオ類の調査では産卵期以降、水中で活動する幼生期において生息を追跡できる可能性が得られた。

General habitat surveys of salamanders are often limited to visual surveys of egg distribution during the spawning season, as it is difficult to survey adults moving on land. Therefore, we considered using environmental DNA for habitat surveys of larva (underwater) and adults (terrestrial) after spawning. This poster reports the results of a one-year eDNA survey of salamanders up to the spawning season, a year following the migration of salamander egg masses. eDNA amplification during the spawning and larva stage was confirmed, confirming low possibility of eDNA amplification during the terrestrial period after summer. This result suggests that it is possible to investigate the habitat of salamanders using eDNA during the period from the spawning season to the larval stage.

PP059

微細流路を使用した簡易濾過・抽出原理の開発

Proposal of simple filtration and extraction method with Micro Channel Technology for e-DNA analysis

* 福澤 隆（ゴーフォトン、ビリュー企画）、西澤 尚文、永田 久雄、白倉 弘美（ゴーフォトン）、土居 秀幸（兵庫県立大学）

* Takashi FUKUZAWA (GoFoton & Biryu Planning), Naofumi NISHIZAWA, Hisao NAGATA, Hiromi SHIRAKURA (GoFoton), Hideki DOI (University of Hyogo)

環境 DNA 測定に於いて学会マニュアルに規定されている前処理（濾過・抽出）方法は手順や必要な機器が多い。そのため検出に時間やコストが掛かるだけでなく、作業者のスキルによる測定値のバラツキが発生する。更に作業中に試料が何度も外部に晒されるためコンタミリスクが高い。それ故環境 DNA 測定を社会実装するにあたって大きなハードルとなる可能性がある。そこで我々はこの問題を解決するにあたり、微細流路を使用した前処理の原理を考案し、試作品（微細流路チップ）を作り実証を試みた。その結果数工程でろ過から抽出まで 3 分程度で完了でき、性能はマニュアル法の 1/20 ~ 1/40 の濾過量でマニュアル法とほぼ同等の PCR 結果が得られた。またろ過から抽出まではすべてチップの閉空間で処理するためコンタミリスクも低いものと考えられる。必要機器も少ないことからアタッシュケースサイズのモバイル測定キットも製作し動画でも紹介する。

The e-DNA Society has published ‘Environmental DNA Sampling and Experiment Manual’ (e-DNA Manual). Although it is widely recognized, the processes were designed to use it in the laboratory and requires many steps and equipment, and it takes long time as a result. Because many steps are required, contamination risk is getting higher. Also, the processes require “skilled operator” to have accurate and uniform results. When we consider the usage of e-DNA widely, these processes maybe negative factor. We propose a novel method of filtration and extraction with ‘Micro Channel’ technology. We got almost the same qPCR results compared with ‘e-DNA Manual’ within 3 minutes.

PP060

Multiplex PCR 法による沖縄県内離島における在来フナと移植フナの分布評価

Evaluation of indigenous and introduced *Carassius auratus* populations in two isolated islands in the Ryukyu Archipelago by Multiplex PCR methods

* 伊勢 孝太郎、吉本 昌弘（株式会社沖縄環境保全研究所）

* Kotaro ISE, Masahiro YOSHIMOTO (Okinawa Kankyo Hozen Kenkyusho Co. Ltd.)

琉球列島には 20-100 万年前に分岐したと推定される固有のフナ個体群の存在が確認されている。一方で、近年は日本主列島などから人為的に移植された個体群の分布が広がっていることにより、特に島嶼地域において在来個体群の急速な減少、絶滅が危惧されている。本研究の目的は、過去に在来個体群のみが確認されている沖縄県内の離島において、改めて個体群分布調査を行うことにより、今後の在来個体群の保全計画策定のための基礎データの取得を行うこととする。調査方法として、これらフナの在来個体群と移植個体群は形態的に見分けることは困難であることから、河川や池、水路で捕獲したフナの鰭の一部および環境水から抽出した DNA に対して Multiplex PCR による在来、移植フナの判定を行い、分布評価を行うこととした。

Unique domestic *Carassius auratus* populations are confirmed in the Ryukyu Archipelago. However, recently, habitat of artificially introduced *C. auratus* populations has been rapidly spreading and invading to habitat of the indigenous species. Therefore, decreasing and extinction of the domestic species are concerned in the Ryukyu Archipelago, especially in small island areas. The objective of this study is to confirm existence of domestic populations in two isolated islands in the Ryukyu Archipelago, since there

were confirmed only the domestic *C. auratus* populations by previous studies in both islands. Because difficulties of distinguishing the populations in morphological methods, we conducted multiplex PCR methods. Technically, we extracted DNA from the collected fins of fishes from the rivers, ponds and waterways, and conducted PCR to detect specific sequences.

PP061

環境 DNA を利用したダム上下流の水生昆虫群集多様性調査

Investigation of aquatic insect community using eDNA meta-barcoding based on three DNA regions

* 八重樫 咲子、有賀 廣弥、金子 栄廣（山梨大学）

* Sakiko YAEHASHI, Hiroya ARUGA, Hidehiro KANEKO (University of Yamanashi)

水生昆虫を中心とする底生動物群集は種数・個体数が多く、採集も容易であることから河川環境の指標生物として用いられている。しかし、その分類手法の難解さや分類に対する労力が調査時の問題となる。そこで本研究では塩川ダムの上下流と釜無川の上下流の水生昆虫群集を対象として、複数領域を利用した環境 DNA バーコーディングにより水生昆虫群集解析を行った。解析領域は 16S、Histon 3、COI 領域を用いた。カゲロウ目はどの領域でも検出されやすい傾向にあったが、トビケラ目はどの領域でも検出されにくかった。カゲロウ目は Histon 3 領域でよく検出された。どの領域でも実際のサンプリングで得られた科数より環境 DNA で得られた科数が少なかった。これらは DNA データベースの偏在と PCR バイアスが関わっていると考えられる。

We investigated the aquatic insect community using eDNA meta-barcoding. Water samples were collected in Shiokawa River and Kamanashi River in 2018 November. DNA meta-barcodings were conducted by three regions (i.e., 16S RNA, Histon 3, Cytochrome Oxidase I (COI)). Ephemeroptera tended to be easily detected in all regions, while the order Trichoptera families were difficult to be detected in any region. Plecoptera families were well detected in the Histon 3 region. In all regions, the number of families obtained from environmental DNA was lower than the number obtained from field sampling. It may be due to the uneven distribution of the DNA database and PCR bias.

PP062

環境 DNA 重力濾過システムの開発：動力不要の簡易ろ過法

Gravity filtration for eDNA: A simple and fast filtration system without electric power

* 岡 慎一郎（美ら島財団）、宮 正樹（千葉県博）

* Shin-ichiro OKA (Okinawa Churashima Res Cent.), Masaki MIYA (Nat. Hist. Mus. Inst. Chiba)

希薄な環境 DNA を分析可能な量まで収集するには、フィルターを用いたろ過（濃縮）が必須となる。これまでは、シリンジによる現場ろ過や、実験室や滞在先におけるアスピレーターでの吸引ろ過が主流であった。ただし、前者は現場でろ過作業を繰り返すために時間と体力が必要で、後者では電力が必要なおよび機材も大きく機動性に乏しい。本研究では、1 リットルのサンプルバッグにアタッチメントを介してステリベクスフィルターの入水孔を接続し、出水孔にさまざまな長さのビニルホースを接続することで重力を利用した簡易ろ過システムを考案し比較検討した。この簡易ろ過システムのろ過速度を測定したところ、ビニルホースが長いほど（吊り下げ高が高いほど）速く、2m のホースでは澄んだ海水で 10 分、濁った汽水域の水でも 17 分程度でろ過でき、実用性の高いろ過システムであることがわかった。

Filtration represents an essential step to concentrate environmental DNA. The mainstream methods have been on-site filtration using a combination of filter cartridge and syringe or suction filtration in the

lab using aspirator. The former requires time and workforce, while the latter requires a larger system with electric power. We developed a simple gravity filtration system only hanging, connecting the filter cartridge to 1-L sample bag via an attachment and connecting silicon hoses to the outlet. When the filtration speed of the system was measured, longer outlet hose (the higher the suspension height) was faster. This filtration system is practical and cost-effective; with a 2 m hose, filtration took 10 minutes for clear seawater and 17 minutes for turbid brackish water.

PP063

Fish Diversity of Mangrove Rivers in Iriomote Island, Japan.

* Maria Daniela ARTIGAS RAMIREZ (TBRC Ryukyu Univ.), Yukuto SATO (Ryukyu Univ.), Shinnosuke KAGIYA (TBRC Ryukyu Univ.), Ayano MUKAI (Harvard Univ.), Hiroto NAGAI, Hideyuki IMAI (Ryukyu Univ.), Tadashi KAJITA (TBRC Ryukyu Univ.)

The degradation of the mangrove ecosystem, including the loss of biological diversity, is a global issue. We used MiFish DNA metabarcoding for the water samples collected in mangrove rivers in Iriomote Island to fill the knowledge gaps on fish diversity in the mangrove ecosystem. We studied rivers of different sizes and collected samples in several tidal times from a river. The metabarcoding data suggested more fish species diversity in mangrove areas in larger rivers. Some sampling sites suggested patterns of fish species diversity associated with tidal times. In total, 39 families, 63 genera, about 80 species were found in the mangrove area of the Urauchi River bridge. The top representatives genera were *Planiliza*, *Gerres* and *Favonigobius*.

PP064

環境 DNA によるフィリマングースの検出系の検討

Development of environmental DNA-based method for detecting small Indian mongoose *Urva auropunctata*

* 入口 友香、荒谷 友美（自然研）、中尾 遼平（山口大院・創成）、佐藤 拓真、城ヶ原 貴通（沖縄大）、諸澤 崇裕、川本 朋慶、橋本 琢磨（自然研）

* Yuka IGUCHI, Tomomi ARATANI (JWRC), Ryohei NAKAO (Yamaguchi Univ.), Takuma SATO, Takamichi JOGAHARA (Okinawa Univ.), Takahiro MOROSAWA, Tomonori KAWAMOTO, Takuma HASHIMOTO (JWRC)

奄美大島の特定外来生物フィリマングース（以下マングース）は、環境省を中心として実施されてきた防除事業により 2018 年度以降生息が確認されておらず、根絶に極めて近い状況となっている。一方で、マングースは奄美大島と物流が盛んな沖縄島や鹿児島県本土部にも生息しており、今後、奄美大島に再侵入する可能性は否定できない。本研究では、奄美大島へのマングースの再侵入に対するバイオセキュリティ体制の一つとして、本種の環境 DNA による検出系の確立を試みた。マングースに特異的なプライマーとプローブを設計し、本種と奄美大島に生息する哺乳類の DNA サンプルを分析したところ、本種の DNA のみが増幅された。また、奄美大島と沖縄島にあるマングースの飼育小屋の飲み水に由来する環境 DNA サンプルから本種の DNA の増幅が確認されたことから、検出系の有効性が確認された。

Small Indian mongoose *Urva auropunctata*, an invasive alien species in Amami-Oshima Island, is mostly eradicated by control programs of the Ministry of the Environment. In the present study, we established an environmental DNA (eDNA)-based method for detecting *U. auropunctata* as a component of the biosecurity system to address its re-invasion into Amami-Oshima Island. We developed a primer/probe set which is specific to *U. auropunctata* by comparing with mitochondrial

DNA sequences of terrestrial mammals inhabiting Amami-Oshima Island. With this set, we detected eDNA of *U. auropunctata* from their drinking water pots in captive facilities in Amami-Oshima Island and Okinawa Island. It suggests that our eDNA-based method in the biosecurity system would be effective to detect *U. auropunctata*.

PP065

小型 PCR 装置の環境 DNA 分析への応用

Application of compact PCR system to environmental DNA analysis

* 井戸 基博 (龍谷院理工)、北川 正成 (タカラバイオ)、山中 裕樹 (龍谷理工)

* Motohiro IDO (Grad. Ryukoku Univ.), Masanari KITAGAWA (Takara Bio Co. Ltd.), Hiroki YAMANAKA (Ryukoku Univ.)

本研究ではベンチトップ PCR 装置 (StepOne Plus) と小型 PCR 装置 (CronoSTAR) の検出限界及び定量精度を比較し、後者の環境 DNA 分析における利用可能性を検討した。段階希釈したアユとコクチバスの人工合成遺伝子試料と両種が生息する野洲川で採取した野外試料に対し、ベンチトップ PCR 装置が備えているスタンダードモード (2 時間) と Fast モード (40 分) の PCR 条件で分析を行った。人工合成遺伝子ではすべての項目で有意な差はなかった。野外試料でアユを定量した場合には、Fast モードで機種間比較すると小型 PCR 装置でコピー数が少なく、PCR 条件間で比較すると、小型 PCR 装置では Fast モードでコピー数が少なかった。小型 PCR 装置における Fast モードでの定量は PCR 条件のさらなる検討が必要であるが、多くの分析条件下では既存のベンチトップ PCR と同様の測定結果が得られた。

In this study, we compared the detection limit and quantification accuracy of a benchtop PCR system (StepOne Plus) and a small PCR system (CronoSTAR), and examined the availability of the latter to eDNA analysis. Dilution series of artificially synthesized DNA samples of *Plecoglossus altivelis* and *Micropterus dolomieu*, and a field sample collected in the Yasu River where both species inhabit, were analyzed under the PCR conditions of standard mode (2 hours) and fast mode (40 minutes) preset for the benchtop PCR system. Although further investigation of the PCR conditions is necessary for quantification in the Fast mode on the compact PCR system, the measurement results were comparable to those of the existing benchtop PCR system under many analytical conditions.

PP066

宮中取水ダム魚道でのモニタリングにおける環境 DNA の活用に向けた検討について

Examination for utilization of eDNA in monitoring at Miyanaka Intake Dam fishway

* 枡本 拓、奥富 誠、木伏 宏俊 (JR 東日本)、川崎 誠 ((株) 建設技術研究所)、加藤 秀男 ((株) CTI リード)

* Taku MASUMOTO, Makoto OKUTOMI, Hiroto KIBUSHI (JR EAST), Makoto KAWASAKI (CTI Engineering Co. Ltd.), Hideo KATO (CTIreed Co. Ltd.)

JR 東日本が所有する宮中取水ダムには、1939 年の完成当初から魚道が設置されている。2012 年には、底生魚用のせせらぎ魚道を含めた 3 つの魚道に改築され、現在も毎年 6 月に 1 か月間、採捕調査によるモニタリングを継続している。今回、採捕調査に伴う採捕魚類への負荷と多大な努力量を軽減する代替手法として環境 DNA の活用を検討した。2017 年から 2020 年にかけて、採捕調査と環境 DNA 分析 MiFish 法を並行して実施し、調査地点・回数などを段階的に検討することにより、魚道内における基本的な調査手法を確立した。また、アユの定量 PCR 分析により遡上量推定の方方向性を整理した。2021 年には、定量 MiSeq 法も活用してさらに検討した。その

結果、魚道における魚類相とその主要魚種の魚道選好状況が検出でき、魚類相の変化を確認するうえで、環境 DNA の活用は魚道の採捕調査の代替手法として有効であることが分かった。

The three fishways at the Miyanaka Intake Dam were renovated in 2012 and are being monitored. In order to reduce the load on the caught fish and the survey effort, we examined the use of environmental DNA (eDNA). By using the catch survey and the MiFish method in combination, a step-by-step study was conducted from 2017 to 2020, and a basic survey method in the fishway was established. In 2021, the MiSeq method was also utilized for further study. As a result, it was possible to detect the fauna of fish and the preference status of major fish species in the fishway, and it was found that the utilization of eDNA is an effective alternative method for fishway catching surveys.

PP067

環境 DNA 解析を用いたチャネルキャットフィッシュの生息調査

Environmental DNA analysis to investigate Channel catfish survival

* 近野 真央、藤井 明美、近藤 昭宏、中村 昌文 (株式会社 日吉)、田口 貴史、石崎 大介、岡本 晴夫 (滋賀県水産試験場)、山中 裕樹 (龍谷大学)

* Mao CHIKANO, Akemi FUJII, Akihiro KONDO, Masafumi NAKAMURA (Hiyoshi Corporation), Takashi TAGUCHI, Daisuke ISHIZAKI, Haruo OKAMOTO (Shiga Prefectural Fisheries Experiment Station), Hiroki YAMANAKA (Ryukoku University)

チャネルキャットフィッシュ (*Ictalurus punctatus*) は北米原産の特定外来生物であり、1971 年に水産目的で日本に導入されて以降、各地で分布を拡大している。滋賀県では、琵琶湖南湖および瀬田川において 2001 年に本種の生息が確認され、2018 年から駆除活動が行われている。我々は、環境 DNA 解析の情報を生息調査に活用できないか検証するため、2019 年 9 月から月に 1 ~ 2 回、琵琶湖南湖および瀬田川の最大 11 地点で延縄調査を行い、同地点で採水を行った。採水した水は環境 DNA 解析に供し、本種の DNA の有無を調査した。2020 年 9 月までの調査では、ほとんどの回で本種が採捕され、対応するように本種の DNA も多地点で検出されたが、10 月以降は採捕が全くない中で、環境 DNA 解析では依然として本種の DNA が確認された。結果より、本種の生息数はごくわずかであるが、撲滅したわけではないと推測される。

Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is an adventive species native to North America. In Shiga, the habitat of this species was confirmed in Lake Biwa and Seta River in 2001, and extermination activities have been carried out since 2018. In order to use information from environmental DNA analysis for habitat surveys, we conducted fishing surveys from September 2019 in Southern part of Lake Biwa and Seta River and collected water for eDNA analysis. In the survey, although this species has not been captured at all since October, the DNA of this species was still confirmed by eDNA analysis. The result infers that though the population is very small, it has not been completely eradicated.

PP068

全球規模の海底堆積物中古環境 DNA 分析と地球システム科学への適用可能性について

A perspective on global-scale paleoenvironmental DNA analysis in marine sediment and its applicability in Earth system science

* 星野 辰彦 (JAMSTE・高知コア研究所)、肖 楠、稲垣 史生 (JAMSTEC・研究プラットフォーム運用開発部門)

* Tatsuhiko HOSHINO, Nan XIAO, Fumio INAGAKI (JAMSTEC)

海嶺で形成される海洋プレートが海溝に沈み込むまでの数千万年以上もの間、表層海水中に生息

する珪藻や放散虫などの真核プランクトンの遺骸は、深海から堆積物へと埋没していく。それらの化石分析は、堆積物の年代指標や古生物の進化と環境適応、古海洋環境の復元による地球システム変動の理解において重要な役割を果たしてきた。現在、海洋堆積物中に微量ながら真核プランクトン等に由来する古環境 DNA が検出されている。しかし、その体系的な研究は端緒に付いたばかりである。本研究では、世界各地の海洋底から採取した堆積物の凍結コア試料から DNA を抽出し、真核生物由来の遺伝子断片の増幅および iTaq シーケンシングを行い、年代指標化石の検出頻度やバイオマーカー等による古海洋復元データとの比較分析を行った。それらの結果を基に、海底堆積物を用いた古環境 DNA 分析の適用性や有用性について議論する。

Over millions of years, eukaryotic planktons such as diatoms and radiolarians in surface seawaters have submerged to the deep sea and then buried into marine sediment. Analysis of their microfossils has played essential roles in understanding Earth system dynamics through diagnostic dating and reconstructing paleoenvironments. Although trace paleoenvironmental DNA derived from eukaryotic planktons has been detected in marine sediments, systematic studies have only begun. This study extracted eDNA from deep-frozen sediment samples collected from global oceanographic settings. We performed iTag amplicon sequencing of eukaryotic DNA and then compared sequence data with paleoceanographic meta-data, including distribution of diagnostic fossils, biomarker proxies, etc. Based on these results, the perspective on analytical possibilities of paleoenvironmental DNA in marine sediment will be extensively discussed.

PP069

気候変動に対する流域におけるアユ分布域の応答予測 ～中国地方の一級河川を対象として～
Estimation of distribution changes of Ayu along climate change in the first class rivers in the Chugoku region

* 小林 勘太、宮園 誠二（山大院・創成科学）、乾 隆帝（福工大・社会環境）、中尾 遼平、赤松 良久（山大院・創成科学）

* Kanta KOBAYASHI, Seiji MIYAZONO (Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Innov. Yamaguchi Univ.), Ryutei INUI (Fac. of Socio- Environ. Stu. Fukuoka Inst. of Tech.), Ryohei NAKAO, Yoshihisa AKAMATSU (Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Innov. Yamaguchi Univ.)

近年、気候変動に伴う河川水温の上昇が予想されており、将来的な河川の水産資源の管理を考えるうえで、水温の上昇に伴う河川魚類の分布変化を検討することが重要となる。そこで本研究では、中国地方の一級河川である江の川、及び太田川を対象に、環境 DNA 分析を用いて、河川水温の上昇に伴うアユの分布変化について検討した。2019/9 以降、流域網羅的に水温の連続的な測定を行った。また、各定点において 2020/8/29 ～ 9/1 に環境 DNA サンプルを採水し、環境 DNA の定量評価を行った。アユの環境 DNA 濃度と水温との関係について一般化線形モデルを用いた検討を行った後、d4PDF の将来気温を基に得られた将来水温から、対象水系におけるアユの環境 DNA 濃度分布の将来予測を行った。その結果、江の川の上流域、太田川の中下流域の数地点において、水温の上昇に伴いアユの環境 DNA 濃度が低下し、アユの生息域の減少が推察された。It is needed to estimate the future distribution changes of riverine fishes along water temperature increases caused by global climate changes. In this study, we used environmental DNA (eDNA) analysis to examine the spatial distribution changes of a native fish (*Ayu Plecoglossus altivelis altivelis*) along future water temperature increases in the Gonokawa and Ota rivers in the Chugoku district in Japan. Our results indicated that the eDNA concentrations of Ayu would decrease with the water temperature increases in the upstream river segments of the Gonokawa River and in the middle-downstream of the Ota River, suggesting that the distribution range of Ayu in certain areas would decrease with the global climate change.

PP070

市民とともに生態系への理解を深める環境 DNA 調査イベントの開発と実践

Development and Implementation of an Environmental DNA Research Program to Deepen Citizens' Understanding of Ecosystems

* 三井 広大、増田 到、上田 羊介、山本 朋範（日本科学未来館）、宗像 恵太（現：（株）S'UIMIN/元：日本科学未来館）、相川 直美、小林 望、三ツ橋 知沙、谷村 優太、詫摩 雅子（日本科学未来館）、笠井 亮秀（北大院・水産科学）、近藤 倫生（東北大院・生命科学）、佐土 哲也（千葉中央博）、清野 聡子（九州大院・工学）、宮 正樹（千葉中央博）

* Hiromasa MITSUI, Itaru MASUDA, Yosuke UEDA, Tomonori YAMAMOTO (Miraikan), Keita MUNAKATA (S'UIMIN Inc./Miraikan), Naomi AIKAWA, Nozomi KOBAYASHI, Chisa MITSUHASHI, Yuta TANIMURA, Masako TAKUMA (Miraikan), Akihide KASAI (Fac. Fish. Sci. Hokkaido Univ.), Michio KONDOH (Grad. Sch. Life Sci. Tohoku Univ.), Tetsuya SADO (CBM), Satoquo SEINO (Grad. Sch. Eng. Kyushu Univ.), Masaki MIYA (CBM)

生態系の保全や利活用を進めるには、市民自身が地域の生態系を把握し考えていくことが大事である。従来、手法の煩雑さなどから非専門家が生態系を把握する敷居は高かったが、近年、環境 DNA 技術の発展によってこの敷居が低くなってきた。そこで我々は、非専門家を対象として、①環境 DNA 技術を用いて地域の魚類を把握し、②人間を含めた生態系について考える——の 2 点を目的としたイベントを開発・実施してきた。イベントでは、参加者自身が環境 DNA 調査を実際に体験し、さらに得られた魚種データを外来種や絶滅危惧種等の項目で整理したうえで注目した魚について他の参加者や研究者と議論した。この議論を通し、参加者が、魚そのものや魚の棲息環境への理解を深め、意識を高めることにつながった。この取り組みをより発展させることで、市民自身が地域の生態系を調べ、学びを深めながら保全や利活用を進める仕組み作りにつながる可能性がある。

To promote the conservation and management of ecosystems, it is important for citizens to understand their local ecosystems. However, it is difficult for non-specialists to research ecosystems due to the complexity of the usual methods. Environmental DNA technology has a potential to reduce that difficulty. Therefore, we have developed and implemented a program for non-specialists with two focused objectives: 1) to understand local fish species using environmental DNA technology, and 2) to reconsider ecosystems. Through this program, participants are able to deepen their understanding and raise their awareness of the local fishes and their habitat. By advancing this event, we expect that citizens themselves will be able to research their local ecosystem and promote conservation and eco-friendly management.

PP071

農業水路における国内希少野生動植物種スイゲンゼニタナゴの環境 DNA 検出

Detection of an endangered bitterling fish *Rhodeus atremius suigensis* using environmental DNA in an agricultural channel

* 大槻 華乃子（岡山大院環境）、濱田 麻友子（岡山大理臨海）、小出水 規行（農研機構）、坂本 竜哉（岡山大理臨海）、中田 和義（岡山大院環境）

* Kanoko OTSUKI, Mayuko HAMADA (Okayama Univ.), Noriyuki KOIZUMI (NARO), Tatsuya SAKAMOTO, Kazuyoshi NAKATA (Okayama Univ.)

演者らは、国内希少野生動植物種のスイゲンゼニタナゴに特異的なプライマーとプローブを作成し、本種の環境 DNA 検出系を開発した。本種が生息する農業水路の 48 地点で採水および魚類採捕調査を行い、各地点の環境 DNA 濃度と採捕結果を比較したところ、本種の採捕地点より下

流側の最寄り地点において DNA 濃度が最大となった。このことから、環境 DNA 濃度が実際にスイゲンゼニタナゴの分布を反映していることを示している。以上から、演者らが開発したスイゲンゼニタナゴの環境 DNA 分析手法は、野外での本種の生息分布の推定に有効であることが示された。

Rhodeus atremius suigensis is an endangered bitterling fish designated as a Nationally Endangered Species of Wild Fauna and Flora by the Ministry of Environment of Japan. We previously developed the semi-quantification of environmental DNA (eDNA) of *R. atremius suigensis* with the species-specific primers and probe set. Here, to validate this further, we sampled the water and subsequently set fish traps at 48 points in an agricultural channel where *R. atremius suigensis* inhabits. The eDNA concentration was highest at the nearest point downstream where *R. atremius suigensis* was captured, suggesting the eDNA concentration actually reflected distribution of *R. atremius suigensis*. These results indicate that our eDNA method is effective in estimating the distribution of *R. atremius suigensis* in the field.

PP072

定量 PCR 法による絶滅危惧種アカヒレタビラの生息域推定

Identifying habitats of critically endangered species, *Acheilognathus tabira erythropterus* using quantitative PCR

* 福森 香代子、今藤 夏子 (国環研)、萩原 富司 (地球・人間環境フォーラム)、渡邊 未来 (国環研)、小松 一弘 (信州大)、山口 晴代、中川 恵、松崎 慎一郎 (国環研)

* Kayoko FUKUMORI, Natsuko I. KONDO (NIES), Tomiji HAGIWARA (GEF), Mirai WATANABE (NIES), Kazuhiro KOMATSU (Shinshu Univ.), Haruyo YAMAGUCHI, Megumi NAKAGAWA, Shin-ichiro S. MATSUZAKI (NIES)

アカヒレタビラはコイ科タナゴ亜科に属する淡水魚である。近年、外来タナゴ類の急増や環境悪化などにより本種の生息地は激減しており、茨城県では絶滅危惧 IB 類に指定されている。本種は個体数が少ないために野外での捕獲調査ではほとんど採取できず、生息地の把握が困難であった。本研究では、本種の種特異的なプライマーセットを開発し、環境 DNA による生息地推定を行うことを目的とした。霞ヶ浦流域において本種が生息すると思われる一河川から採水し、生息地調査を行った結果、41 地点中 3 地点のみで本種の環境 DNA が検出された。過去に分布が確認されていた地点からは本種の環境 DNA は検出されなかった。これより、対象流域の生息河川では個体数の減少が加速していることが示唆された。今後は、他の外来・在来タナゴ類や産卵母貝の生息調査も行うことにより、本種の個体数減少の要因解明と絶滅を防止するための対策をとることが望まれる。

Acheilognathus tabira erythropterus is a freshwater fish of the family Cyprinidae. Habitats of this species have been rapidly reduced due to increase of alien bitterling species and deteriorated environments, resulting in difficulty in identifying individuals in natural habitats. We developed the species-specific primer sets of this species and sampled environmental DNA (eDNA) in Lake Kasumigaura basin. The eDNA was detected only three out of 41 sites, while it was not detected at sites where this species has been previously recorded. These results suggested that their abundance decreased rapidly in the study stream. Our findings can guide future studies to investigate the habitats of other bitterling species and freshwater mussels as a spawning substrate, and highlight the importance of conservation efforts to prevent the extinction of this endangered species.

PP073

北極海におけるバイオエアロゾルの起源を環境 DNA から探る

Finding the origin of bioaerosol in the Arctic Sea using eDNA approach

* 植竹 淳 (北海道大学)、ジェシー クリミアン (コロラド州立大学)

* Jun UETAKE (Hokkaido Univ.), Jessie CREAMEAN (Colorado State Univ.)

大気中に浮遊する生物由来の粒子（バイオエアロゾル）は、大気上層や極域に存在する氷雲の形成を促している。これは微生物の膜タンパクをはじめとする有機物が、氷晶の凝結温度を著しく上昇させることによって引き起こされる。近年温暖化の影響を強く受けている北極海周辺では氷晶の研究が少なく、その核となるエアロゾルの起源に関する情報も少ない。そこで本研究では、北極海および周辺の海域に飛来するエアロゾルの起源を明らかにするために、ベーリング海からチュクチ海に至る航海で 24 時間ごとにバイオエアロゾルを採取し、16S 18S ITS の解析を行った。その結果、陸地に近いベーリング海峡周辺ではコケの葉緑体が多く検出され、陸地から飛来してきたコケの胞子の影響を受けていると考えられた。一方で、チュクチ海ではこれら陸域起源のバイオエアロゾルは少なく、地域によってバイオエアロゾルの組成が異なることが明らかとなった。Biological airborne particles (bioaerosol) promote the formation of icy clouds in the upper atmosphere or the polar region. This phenomenon is caused by the membrane protein of microorganisms or the organic substance in the environment. However, there are very limited studies about icy cloud formation in the arctic and information about the origin of airborne particles, which can be nuclei of ice crystals. Therefore, we took bioaerosol samples taken every 24 hours during the cruise from the Bering Sea to the Chukchi Sea and analyzed the spatial changes of 16S, 18S, and ITS metabarcoding sequences. The results show the high relative abundance of moss spores chloroplast 16S in the Bering Sea, where is relatively closer to the terrestrial area. On the other hand, fewer terrestrial bioaerosol in the Chukchi Sea shows the spatial difference of origin of bioaerosol.

PP074

環境 DNA と従来のモニタリング手法で明らかになった絶滅危惧種のイシガイ科淡水二枚貝種個体群の縮小

Population decline of an endangered unionid in streams is revealed by eDNA and conventional monitoring approaches

* 畑 啓生 (愛媛大・院・理工)、小笠原 康太、山下 尚希 (愛媛大・理・生物)

* Hiroki HATA (Grad. Sch. Sci. Eng. Ehime Univ.), Kota OGASAWARA, Naoki YAMASHITA (Dep. Sci. Biol. Ehime Univ.)

環境 DNA (eDNA) は、水サンプルから水生生物の存在を検出するのに有効で、特に希少種や隠蔽性の高い種に対して有効である。西南日本の松山平野では、過去 30 年の間に 2 種の淡水性イシガイ類が急速に減少し、絶滅の危機に瀕している。我々は、マツカサガイの COI 領域を標的とした種特異的な eDNA マーカーを設計し、2020 年に、これを用いた調査と、従来のモニタリング調査を実施した。その結果、マツカサガイの分布域は 2013-2014 年と 2020 年との間で変化しなかったが、密度は 99% 減少していた。さらに、マツカサガイが採取されていないが、生息が予想される 5 つの地点でも eDNA が検出された。この研究により、マツカサガイの種特異的な eDNA マーカーが確立され、この希少で隠蔽性の高い種の分布調査に有効であることが検証された。

The environmental DNA (eDNA) approach is useful to detect the presence of aquatic organisms from water samples, especially for rare and cryptic species. Two freshwater unionid mussel species have rapidly declined within the last three decades and are now threatened with extinction on the

Matsuyama Plain, southwestern Japan. We designed a species-specific eDNA marker targeting the COI region of *Pronodularia japonensis*. We show that the distribution area of *P. japonensis* did not change between 2013–2014 and 2020, but their density decreased by 99%. eDNA of *P. japonensis* was detected, with 100% success, from sites where this species was collected by hand. Furthermore, eDNA was detected at five sites where *P. japonensis* was not collected but was expected to occur. This study has established a species-specific eDNA marker for *P. japonensis* and this eDNA marker has been validated as effective for surveying the distribution of this rare and cryptic species.

SP001#

環境 DNA 定量解析を用いた長良川のアユ仔魚降下量の推定

Estimating the amount of larval Ayu descent on the Nagara River by environmental DNA quantitative analysis

森 毅志、小澤 利就（岐阜高校自然科学部生物班）

Takeshi MORI, Toshinari OZAWA (Gifu High School)

アユ仔魚をペットボトルに入れて放出する環境 DNA 量を計測したところ、平均値は 3270copies/(L・h・匹) であった。環境 DNA 濃度と仔魚密度 (匹/m³) の調査から、産卵場におけるアユ仔魚の降下のピークは、金華橋付近で 12 月初旬、忠節橋付近で 11 月中旬、合渡橋付近で 11 月初旬であることが明らかになった。しかし、最も下流にある大藪大橋では仔魚を採取することができず、環境 DNA 濃度も低かった。このことから、上流で孵化したアユ仔魚が下流まで降下できていないと考えられる。これは、1995 年から運用されている長良川河口堰による流速の低下が原因の一つだと考えられる。忠節橋において 15 時から 22 時まで 1 時間ごとの環境 DNA 定量解析と仔魚採集の結果は、おおよそ既知のアユの動態と一致していたことから、アユの動態を把握できたといえる。今後は、生態や死体の環境 DNA 放出量も計測し、アユ仔魚の個体数を詳細に把握することに迫りたい。

SP002#

富山県氷見市の希少種を探せ！～環境 DNA 分析を利用した仏生寺川・万尾川水系の生物相（魚種）調査

～ Detection of unknown rare species in Himi City, Toyama Prefecture ~ Survey of biota (fish species) in the Busshoji and Moo river systems using environmental DNA analysis ~

* 岩田 健希、* 伊藤 未悠、加治 苺、小竹 智也、西村 愛花、大野 忠晴、野田 拓夢、和田 直季（大阪高校科学探究部）、谷脇 鉄平（大阪高校）、山崎 裕治（富山大学）

* Takeki IWATA, * Miyu ITOU, Ichigo KAJI, Tomoya KOTAKE, Aika NISHIMURA, Tadaharu OHNO, Takumu NODA, Naoki WADA (Osaka High School Science Research Club), Teppei TANIWAKI (Osaka High School), Yuji YAMAZAKI (University of Toyama)

大阪高校科学探究部は、富山大学と共同研究（高大連携）で、富山県氷見市内の仏生寺川・万尾川水系の河川水（2020 年 3 月、5 月、6 月、9 月及び 10 月）から環境 DNA 分析を利用して生物相（魚種）の網羅的調査を行った。その結果、これまで富山県内では確認されていない「ニッポンバラタナゴ（環境省レッドリスト：絶滅危惧ⅠA 類）」をはじめとする様々な希少種や外来種が検出された。ニッポンバラタナゴの分布は、近畿地方以西で確認されている。本研究では、ニッポンバラタナゴの検出要因について、「どのような経路で移入されたのか（ニッポンバラタナゴがドブガイ類の中に産卵しそのドブガイ類が移入、釣り目的としたゲンゴロウブナ（ヘラブナ）の放流に混入）」、「どのような形で移入されたのか（ニッポンバラタナゴが移入し今も現存、ニッポンバラタナゴが移入先でタイリクバラタナゴと交雑、すでに交雑した個体群が移入）」の可能性を考察した。

SP003#

ウナギの生息環境における植生の特徴

Vegetation characteristics in eel habitat

* 小川 愛理、賀来 碧、松田 健佑、高坂 駿友、南 聡一郎（天王寺高校）

* Airi OGAWA, Midori KAKU, Kensuke MATSUDA, Syunsuke KOUSAKA, Soichiro MINAMI (Tennoji High)

ニホンウナギの生息域には特有の植生が見られ、ニホンウナギの生育に何らかの影響を及ぼしているのではないかと仮説を立てた。植生との関係を見出すことでニホンウナギの保全に貢献できると考える。兵庫県および奈良県のため池 10 か所で 1L の水を採取し、分析を行った。また植生の調査は画像データで保存し後日大阪市立自然史博物館で同定を行った。

It was hypothesized that the habitat of Japanese eels has peculiar vegetation and may have some influence on the growth of Japanese eels. We believe that finding a relationship with vegetation can contribute to the conservation of Japanese eels. 1 L of water was collected at 10 ponds in Hyogo and Nara prefectures and analyzed. The vegetation survey was saved as image data and later identified at the Osaka Museum of Natural History.

SP004#

ウナギの生息環境における COD およびリン酸塩濃度の関係

Relationship between COD and phosphate concentration in eel habitat

* 櫻井 奈々、加瀬 忍、吉原 慈、山本 小鈴（天王寺高校）

* Nana SAKURAI, Sinobu KASE, Megumi YOSHIHARA, Korin YAMAMOTO (Tennoji High)

ニホンウナギの生息場所における COD およびリン酸塩濃度を測定することで、その生息場所の水質汚染のレベルを比較することを検討した。兵庫県および奈良県のため池 10 か所で 1 L の水を採取し分析した。また水質調査は現地で検査キットを用いて実施した。

By measuring the COD and phosphate concentrations in the Japanese eel habitat, we considered comparing the levels of water pollution in that habitat. 1 L of water was collected and analyzed at 10 ponds in Hyogo and Nara prefectures. The water quality survey was conducted locally using an inspection kit.

SP005#

希少種ベッコウトンボの生息地の特定を目指してー特異性を持つプライマーの設計ー

Aiming to identify the habitat of the rare species *Libellula angelina* :Designing Primers with Specificity

榛葉 大翔、森下 蓮、松村 征弥（掛川西高校自然科学部）

Haruto SHIMBA, Ren MORISHITA, Seiya MATSUMURA (Kakegawanishi High School, Nature and Science club)

静岡県磐田市に位置する桶ヶ谷沼は絶滅危惧種ベッコウトンボの県内唯一の生息地として知られ、長年地域の方による保護活動が行なわれてきた。保護活動に少しでも貢献したいと考え、2021 年より人工池の整備、人工池での羽化の準備、抽水植物の浚渫による産卵場所の確保をはじめとする活動に参加した。また、希少トンボの生息確認等に役立てるためにベッコウトンボの環境 DNA 回収を目指し、プライマー設計、環境 DNA 回収装置の製作を行った。プライマーは、Tm 値やアニーリング温度などの条件を独自に設定して設計を行った。ベッコウトンボの死体を

用いて PCR を行い、ベッコウトンボプライマーの特異性を示すことに成功した。環境 DNA 回収装置については本校の先行研究により、フクロウ、マツタケの空中環境 DNA の回収に成功した。本研究ではベッコウトンボが飛翔する温度域、湿度域で装置が稼働するようプログラミングを行っている。

Okegayanuma wetland in Iwata city, Shizuoka Prefecture is known as the only place in the Prefecture where *Libellula angelia* is distributed. Local people have conserved the wetland for a long time. We have participated in *Libellula angelia* conservation such as doing maintenance of an artificial lake, preparing for *Libellula angelia*'s birth and dredging emergent plants to give them places to lay eggs, since March 2021. A previous research group in our school created a machine for collecting environmental DNA from air. We are updating that machine so that it can collect DNA from *Libellula angelia*. We programmed the machine to get it available in the condition of the temperature range and the humidity range of only *Libellula angelia*'s life, using Arduino Uno, Solid State Relay (SSR), ACM1602A and HIH6130. HIH6130 perceives temperature and humidity. SSR turns the machine on/off, depending on the information from HIH6130. ACM1602A makes it possible to show whether the machine is on/off. Arduino Uno is the circuit board which has on/off ports and sketches. It can be used widely, depending on how we set electronic components and circuits. Also, we are designing a primer in order to collect its environmental DNA and identify the area where endangered dragonflies live. We are setting conditions such as Tm value and PCR annealing temperature as we design the primer. We have succeeded in showing that the primer is effective by PCR, using DNA derived from *Libellula angelia* individual.

SP006#

環境 DNA を用いた福井県在来希少種イトヨの検出

Detection of environmental DNA in the water in Fukui, where native rare species, *Gasterosteus aculeatus*, live

沖 颯太、島野 好未、真柄 圭佑、山崎 正一（藤島高校）

Sota OKI, Konomi SHIMANO, Keisuke MAKARA, Masaichi YAMAZAKI (Fujishima High School)

陸封型イトヨは福井県大野市が日本での生息南限とされ、国天然記念物の指定を受けている。1960 年頃からの湧水の減少によりイトヨの個体数は減少していたが、市民の積極的な取り組みで現在は個体数が回復してきている。私たちは、環境 DNA を用いて新たなイトヨ生息地を発見したいと考え研究に取り組んでいる。コロナウィルス感染拡大による休校等の影響もあり、まだ有意義な結果は出せていないが、研究者の方々のアドバイス等いただけると幸いである。

SP007#

ニッポンバラタナゴの保全に向けた環境 DNA 検出系の開発

Towards the conservation of Rosy bitterling *Rhodeus ocellatus kurumeus* : Development of detection system for environmental DNA

津田 歩風、山口 空輝、平安 陸斗、福井 達也、竹本 月乃、笠谷 悠一郎（高津高校科学部）、唐谷 ゆふ、河野 健、藤村 直哉（高津高校）、芝田 直樹（（株）環境総合リサーチ）、辻 冴月（京大院理）、中尾 遼平（山口大院創成）、川瀬 成吾（琵琶博）

Honoka TSUDA, Soraki YAMAGUCHI, Takato HIRAYASU, Tatsuya HUKUI, Tsukino TAKEMOTO, Yuichiro KASATANI (Kozu HS. Sci. Club), Yu KARATANI, Ken KAWANO, Naoya FUJIMURA (Kozu HS.), Naoki SHIBATA (ER&S.), Satsuki TSUJI (Grad. Sch. Sci. Kyoto Univ.), Ryohei NAKAO (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Yamaguchi Univ.), Seigo KAWASE (LBM.)

ニッポンバラタナゴ（ニッパラ）の純粋な生息地は、外来亜種であるタイリクバラタナゴ（タイバラ）の侵入や交雑によってごくわずかとなっている。現在では一部地域で環境保全団体がため池にわずかに残された個体群を保全しているのみであるが、根気強い探索によりごく稀に未知の個体群生息地が発見されることがある。しかし、両亜種の形態は酷似していることから、保全個体群へのタイバラの侵入察知や、未知の個体群が純粋なニッパラであるどうかの判別は困難を極める。本研究では、環境 DNA 分析により簡便に二亜種を判別できる検出系を開発し、最終的に本亜種の保全に貢献することを目的とした。各亜種に特異的なプライマーを開発し、両亜種および同所的に生息するその他近縁種の組織 DNA を用いた種特異性確認を行った。今後は、開発した検出系を用いて、ニッパラ保全個体群へのタイバラ侵入検知や未知のニッパラ生息地の発見に取り組みたい。

Pure populations of Rosy bitterling *Rhodeus ocellatus kurumeus* (ROK) are decreased by the invasion and hybridization of the exotic subspecies, *Rhodeus ocellatus ocellatus* (ROO). Currently, some populations are conserved by conservancies; however, unknown habitats are occasionally discovered with persistent investigations. The problem in the conservation of ROK is that it is difficult to distinguish from ROO because of the similarities of morphological characteristics between two subspecies. Therefore, it is difficult to notice the unintentional introduction of ROO and/or hybrids. When an unknown population of ROK are found, sequencing of tissue DNA of all individuals is necessary to confirm their genetic purity. The purpose of this study is to develop a detection system that can easily distinguish two subspecies through environmental DNA analysis and to contribute to the conservation of ROK. We designed the subspecies-specific primer sets for each subspecies. The specificity test of the designed two primer sets was performed by PCR using tissue DNA of ROK, ROO, and some other related species, which sympatrically inhabit Osaka, Hyogo, and Nara prefectures, Japan. In the future, we hope to work on the assessment of the genetic purity of ROK in conservation ROK populations and the searching for unknown remaining habitats.

SP008#

Tube (DNA LoBind, Protein LoBind) の違いによる DNA 濃度の減少率の比較検証

Comparative verification of DNA concentration decrease rate due to differences in Tube (DNA LoBind, Protein LoBind)

* 野田 拓夢、* 和田 直季（大阪高校科学探究部）、谷脇 鉄平（大阪高校）

* Takumu NODA, * Naoki WADA (Osaka High School Science Research Club), Teppei TANIWAKI (Osaka High School)

大阪高校科学探究部は、2017 年から環境 DNA 分析を利用して河川の生物相（魚種）の網羅的調査を行ってきた。これまで環境 DNA 学会が作成した「環境 DNA 調査・実験マニュアル」に沿って取り組んできた。ところが、DNA 抽出したサンプルの保存を本来 DNA LoBind Tube を使用すると、Protein LoBind Tube を使用していたことが 2021 年 7 月に判明した。本研究では、冷凍保存（－20℃以下）した DNA サンプルを、BioPhotometer D30(Eppendorf 社製)、DNA LoBind Tube(Eppendorf 社製)と Protein LoBind Tube(Eppendorf 社製)を用いて、3～4 日間毎に DNA 濃度を測定し、それぞれの DNA 濃度の減少率を比較検証した。なお、DNA サンプルはカワムツの体表及びヒレから採取したものをを用いた。

SP009#

兵庫県内における環境 DNA 分布を用いた淡水性二枚貝の分布状況の把握

Understanding the distribution of freshwater bivalves using environmental DNA analysis

in Hyogo Prefecture

* 西村 愛花（大阪高校科学探究部）、谷脇 鉄平（大阪高校）、土居 秀幸（兵庫県立大学大学院情報科学研究科）

* Aika NISHIMURA (Osaka High School Science Research Club), Teppei TANIWAKI (Osaka High School), Hideyuki DOI (Graduate School of Information Science University of Hyogo)

コイ科タナゴ亜科は、淡水性二枚貝類の鰓内に産卵する特徴的な産卵生態を示す純淡水魚である。タナゴ類は開発や環境悪化など人間活動の影響、魚食性外来種の捕食による影響を強く受けて、多くの種が絶滅の危機にある。さらに、都市化の影響により二枚貝類が減り、その結果としてタナゴ類に顕著な影響が確認され、タナゴ類の個体数と二枚貝類の生息密度の間には、正の相関性が認められている。イシガイ科二枚貝類は現在世界的に数多くの種がその生息数・生息域を減少させており、イシガイ科二枚貝類は 20 種のうち 11 種が日本のレッドリストに記載されている。そこで、本研究では淡水性二枚貝の分布状況を把握するために、特にドブガイ、マツカサガイに着目してそれらの兵庫県内における分布を推定するための手法を開発し、兵庫県内における環境 DNA 分析を用いた二枚貝類の分布調査を行うと共に、有効な保全方法について考察する。

SP010#

環境 DNA を用いた京都市高野川流域におけるブルーギルの分布調査

Examining the Distribution of Bluegill in Takano River by Using eDNA

中野 開、安達 京右、吉田 夏（洛北高校）

Kai NAKANO, Keisuke ADACHI, Natsu YOSHIDA (Rakuhoku High School)

石田（2007）によると、ブルーギルの存在が確認されている琵琶湖の水が疎水を通して流れ込む京都市高野川にはブルーギルが生息していないとされている。しかし、近年降雨後などに高野川でも目視でブルーギルが確認される事例があると聞く。そこで、私たちは eDNA を用いてブルーギルの生息確認及び分布域の調査を実施することにした。なお、実験は採水とグラスファイバーを用いた実験室での濾過、及びグラスファイバーフィルターからの DNA 抽出する方法で実施している。現在は、高野川の複数地点で採水及び水質調査を終え、環境水から DNA を抽出し PCR を行い、電気泳動で増幅の有無を確認する方法を模索しているところである。

SP011#

大垣市に生息するマホロバサンショウウオ (*Hynobius guttatus*) の生活史の解明 II

Life cycle of Mahoroba salamander (*Hynobius guttatus*) in Ogaki City, Gifu II

浅野 公聖、鹿野 龍浄、山田 千隼、棚瀬 瑛祐（大垣北高校自然科学部マホロバサンショウウオ班）

Kosei ASANO, Ryujo SHIKANO, Chihaya YAMADA, Eisuke TANASE (Ogaki-Kita Senior High School Nature Science Club Mahoroba Salamander Team)

岐阜県大垣市内のマホロバサンショウウオの生息地に、ヒダサンショウウオと共存する沢、マホロバサンショウウオのみが生息する沢がある。その原因を明らかにするため、各沢のイワナ、アマゴ等の捕食者の魚類の有無を調査した。その結果、マホロバサンショウウオは魚類の有無に関係なく生息し、ヒダサンショウウオは捕食者となる魚類（イワナ・アマゴ）が生息していない沢に生息していることが分かった。マホロバサンショウウオは伏流水中で産卵し、幼生が成長するため、捕食者の魚類がいる沢でも幼生が捕食される危険性が低い。一方、ヒダサンショウウオは沢の石の下等で産卵し、孵化した幼生が泳ぎだすため、捕食者の魚類が生息する沢では捕食される危険性が高いためであると考えた。また、両者の生息地の 3 地点の沢で、マホロバサンショウ

ウオとヒダサンショウウオの環境 DNA の解析を試みた.

SP012#

オオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) の生息条件の解明 ～なぜ揖斐川にオオサンショウウオはいないのか？

Study on the habitat of Japanese Giant Salamander (*Andrias japonicus*). ～ Why are there no giant salamanders in the Ibi River ? ～

太田 悠梧、杉本 巧翔、伊藤 力他、金森 愛子 (大垣北高校自然科学部オオサンショウウオ班)

Yugo OTA, Takuto SUGIMOTO, Rikiya ITO, Aiko KANAMORI (Ogaki-Kita Senior High School Nature Science Club Giant Salamander Team)

国の特別天然記念物に指定されているオオサンショウウオは、岐阜県以西の本州・四国・九州に分布する界最大級の両生類である。岐阜県では、木曽三川の長良川水系や木曽川水系に生息しているが、木曽三川の最も西を流れる揖斐川には生息していないと言われている。そこで、揖斐川と長良川の複数の地点でオオサンショウウオとチュウゴクオオサンショウウオの環境 DNA の検出を試みた。また、揖斐川と他のオオサンショウウオの生息が確認されている河川の傾斜を比較し、オオサンショウウオの生息に適した傾斜やその他の地形について調べた。さらに、河川周辺の地質を分析することによって、オオサンショウウオの移動が活発であった時代の木曽三川の環境や規模を推測した。



The 4th annual meeting of the eDNA Society

