

第7回環境DNA学会つくば大会

The 7th Annual Meeting of The eDNA Society



つくば国際会議場

2024.11.30 Sat. ~ 12.4 Wed.

30 Sat. 中高生オンライン発表会

1 Sun. 公開シンポジウム

2 Mon./3 Tue.

ポスター発表・企画集会・自由集会

4 Wed. 各種委員会

More accessible with eDNA

環境DNAでもっと身近に

茨城県にすむ生き物たち



要旨集
Abstracts

【P-01】

OBON: towards a global biomolecular observation network to help support ocean management and governance

梶田 忠¹, Margaret Leinen², Sophie Seeyave³, Beckman Fiona³, OBON Scientific Advisory Committee⁴
Tadashi Kajita¹, Margaret Leinen², Sophie Seeyave³, Fiona Beckman³,
OBON Scientific Advisory Committee⁴

1. TBRC, Univ Ryukyus, Japan, 2. SIO, UC San Diego, USA, 3. POGO, Plymouth, UK, 4. names and affiliations in poster

The Ocean Biomolecular Observing Network (OBON) is an international programme endorsed by the UN Decade of Ocean Science for Sustainable Development (“UN Ocean Decade”) that aims to transform how we sense, harvest, protect, and manage ocean life, which is currently threatened by multiple stresses including pollution, habitat loss, and climate change. OBON will also help communities detect biological hazards like harmful algal blooms and pathogens, and be a key component of next-generation ocean observing systems. To achieve this vision, together with our endorsed Projects we will ensure that biomolecular observations of the ocean are globally coordinated, harmonised, Findable, Accessible, Interoperable and Reusable (FAIR), and reliably flow into the global ocean observing system, as standard practice integral to sustainable ocean management. OBON acts as the strategic hub for a global biomolecular observatory in support of the UN Ocean Decade, bringing knowledge based on biomolecules and capacity to advance and broaden their application to diverse ocean users. The aim of OBON is to develop a programme that is the biological equivalent of the Argo network of profiling floats. OBON’s core pillars are to (1) Innovate technology and methodologies, delivering frameworks to advance biomolecular observations from the coastal to the open ocean, thus enabling broad-scale interpretations and scientific discovery; (2) Develop resources, networks and strengthen capacity globally, to advance observations and analyses while ensuring equitable access to ocean knowledge and resources; and (3) Enhance the use and interpretation of these data through FAIR data practices and model integration, and the creation of ocean knowledge. Together, this work informs ocean users and managers, ensuring sustainable interactions in support of a healthy ocean. This poster will provide an overview of the OBON programme, recent developments, and ways for the global biomolecular observation community to engage.

【P-02】

障がいのある市民が環境 DNA 分析を用いた市民科学に参加可能であることの検証

Verification that people with disabilities can participate in citizen science using environmental DNA analysis

佐賀 達矢¹, 木谷 亮太¹

Tatsuya Saga¹, Ryota P. Kitani¹

1. 神戸大学

1. Kobe University

環境 DNA 分析は生息種を簡便に推定できるため市民科学ツールとして注目されている。ただし、現状の環境 DNA 分析を用いた市民科学は健常者のみの参加を想定しており、障がい者の参加を想定した報告はない。市民科学は全ての市民に開かれることが望ましく、障がい者を含む幅広い市民が参加できるか検証することは重要である。本研究では軽度知的障がいと視覚障がいの生徒が通う特別支援学校 2 校の生徒、及び市民を対象として、環境 DNA 分析を用いた市民参加型調査を実施し、参加者のサンプリング能力を検証した。参加者は生態学や環境 DNA に関する基礎的な授業を受けた後、海岸での採水と現場ろ過を実施した。魚類メタバーコーディング解析の結果から、障がいのある参加者も環境 DNA 分析に十分な採水と現場ろ過を実施できることが明らかになった。本研究は環境 DNA 分析が、障がい者を含めた幅広い市民に対して有効な市民科学ツールであることを示す。

Environmental DNA (eDNA) analysis is attracting attention as a citizen science tool because it can estimate the species present simply by collecting water samples. However, currently most citizen science projects using eDNA analysis are designed for participation by people without disabilities, and there are no reports of the projects using eDNA analysis designed for participation by people with disabilities. It is important to verify that a wide range of citizens, including people with disabilities, can participate because it is desirable for citizen science to be open to all citizens. In this study, we conducted citizen participation surveys using eDNA analysis with students with mild intellectual disabilities and visual impairments from two special education schools and with citizens recruited through public advertisement to verify the sampling ability of people with disabilities. After receiving basic instruction in ecology and eDNA, survey participants collected and filtered water samples on site at the beach. The results of the fish metabarcoding analysis suggest that people with disabilities can adequately collect and filter water samples for eDNA analysis. This study shows that eDNA analysis is an effective citizen science tool for a wide range of citizens, including people with disabilities.

【P-03】

ミナミメダカ由来環境 RNA の複数のサイズ画分におけるシーケンス解析と皮膚 RNA との比較

Sequencing Analysis of Environmental RNA from Japanese Medaka at Multiple Size Fractions and Comparison with Skin RNA

日置 恭史郎¹, 相馬 寿明^{2,3}

Kyoshiro Hiki¹, Toshiaki Sohma Jo^{2,3}

1. 国立環境研究所, 2. 日本学術振興会, 3. 龍谷大学

1. NIES, 2. JSPS, 3. Ryukoku Univ.

環境 RNA はマクロ生物の生理状態を非侵襲的に評価できると期待されているが、実環境への応用のためには、生物体内の起源や粒子サイズなど、多くの基礎情報を明らかにする必要がある。本研究では、ミナミメダカ飼育水槽の水を 10 μm , 3 μm , 0.4 μm のろ紙で連続ろ過し、各画分の環境 RNA を網羅的にシーケンスした (>13 Gb/ サンプル)。さらに起源解析のため、皮膚 RNA もシーケンスに供した。結果、ミナミメダカ由来の環境 RNA の量および検出遺伝子数は 0.4~3 μm の画分で最も低く、3~10 μm の画分で最も多かった。0.4~3 μm の画分のみで特異的に検出される遺伝子は少なく、生理状態評価のための環境 RNA 解析は 3 μm のろ紙で実施するのが良いという示唆が得られた。また、環境 RNA から検出された遺伝子の 81% は皮膚からも検出され、皮膚が環境 RNA の主要な起源の一つであると確認できた。

Environmental RNA (eRNA) is emerging as a non-invasive tool for assessing the health of macro-organisms, but key information on its origin and particle sizes remains unclear. In this study, we performed comprehensive RNA-sequencing of eRNA (>13 Gb/sample) collected from water tank containing Japanese medaka, using sequential filtration through 10, 3, and 0.4 μm filters. Fish skin RNA was also sequenced to reveal the origin of eRNA. The results showed that the 3 – 10 μm fraction contained the highest amount of eRNA and the most detected genes, while the 0.4 – 3 μm fraction had the lowest. Only a small number of genes were unique to the 0.4 – 3 μm fraction, suggesting that a 3 μm filter is optimal for eRNA analysis. Furthermore, 81% of the genes detected in eRNA overlapped with skin RNA, indicating skin is a major source of eRNA.

【P-04】

両生類における発生段階識別用環境 RNA マーカーの開発に向けた検証

Validation of Environmentally Derived RNA Markers for Developmental Stage Identification in Amphibians

槌田 健太郎¹, 黒田 裕樹^{1,2}
Kentaro Tsuchida¹, Hiroki Kuroda^{1,2}

1. 慶大・環情, 2. 慶大・政メ

1. Env. Info., Keio Univ., 2. Grad. Sch. of Med. And. Gov., Keio Univ.

環境 DNA (eDNA) 解析のバイオモニタリングへの応用は、ここ数年で飛躍的に拡大している。しかし、eDNA を用いると、生物の存在以上の情報を得ることは困難である。一方で、環境 RNA (eRNA) 解析を用いることにより、生物の発生段階や活動状態などの情報を取得できる。しかし、eRNA は eDNA に比べて壊れやすいため、安定したデータを得るには、十分な発現量を持つバイオマーカーを特定する必要がある。そこで、我々はアフリカツメガエルの飼育水から eRNA を採取し、変態前後の RNA 変化を調査した。25 リットルの飼育水から核酸を濃縮し、プロトコルを工夫することで、1 リットルあたり平均 113.27 ng の Total RNA の抽出に成功した。RNA-seq 解析により、変態前後で発現量に有意差が見られる複数の遺伝子を特定した。これらの遺伝子をバイオマーカーとしてリアルタイム PCR で検証した結果を紹介する。

The application of environmental DNA (eDNA) analysis in biomonitoring has expanded dramatically in recent years. However, it remains difficult to obtain information beyond the presence or absence of organisms using eDNA. In contrast, environmental RNA (eRNA) analysis offers the potential to provide real-time information about organisms, such as their developmental stages and activity states. Nevertheless, eRNA is more fragile compared to eDNA, making it challenging to identify biomarkers with sufficient expression levels to obtain stable data. In response, we collected eRNA from the aquarium water of *Xenopus laevis* and investigated RNA changes before and after metamorphosis. By concentrating nucleic acids from 25 liters of aquarium water and optimizing the protocol, we successfully extracted an average of 113.27 ng of total RNA per liter. Through RNA-seq analysis, we identified several genes with significant differences in expression levels between the pre- and post-metamorphic stages. We plan to present the results of real-time PCR validation of these genes as potential biomarkers.

【P-05】

絶滅危惧種オキサンショウウオの成長段階を識別可能な環境 RNA 手法の開発

Development of eRNA methods for identifying their growth stages of the endangered Oki salamander *Hynobius okiensis*

原田 侑季¹, 客野 瑞月¹, 高原 輝彦¹

Yuki Harada¹, Mitsuki Kyakuno¹, Teruhiko Takahara¹

1. 島根大学

1. Shimane Univ.

島根県隠岐諸島の固有種であるオキサンショウウオは絶滅危惧種に指定されている。しかし、本種が変態して陸生へ移行した成体は発見が難しく、生息分布や繁殖などの詳しい生態についてはほとんどわかっていないため、効果的な保全が困難である。そこで本研究では、野外の水サンプルに含まれる mRNA (環境 RNA) を検出することができれば、本種の成体や幼生などの成長段階ごとの生息状況を明らかにすることができるのではと考えた。そこでこれまでに、幼生と亜成体を用いて、体組織の RNA-seq により各成長段階で特異的に発現する mRNA を同定し、mRNA 検出用のプライマーを作製した。現在、室内環境にて本種を飼育した水サンプルから各成長段階に特異的な mRNA が検出できるかどうかの検証を進めている。その後、実際に隠岐諸島の溪流において、開発した環境 mRNA 解析による生態調査を行い、本種の未知の生態を明らかにしたいと考えている。

The Oki Islands endemic *Hynobius okiensis* is classified as an endangered species. The adults of this species are difficult to find because they experience a metamorphosis and then shift to a terrestrial life stage. Accordingly, little is known about the ecological characteristics of this species, such as the distribution of its terrestrial habitat or its reproductive behaviors. The purpose of this study was to evaluate whether environmental RNA (mRNA) in water samples could identify this species at each growth stage, including adults. As a result, we were able to identify mRNAs that are specifically expressed in each growth stage by a RNA-seq with the tissue samples from larvae or subadults. At present, we are evaluating whether mRNA specific to growth stages can detect in incubation water samples with this species. To clarify the unknown ecology of *H. okiensis*, in the future, using the developed eRNA methods we will conduct a field survey in a mountain stream in the Oki Islands.

【P-06】

イベリアトゲイモリ実験系において繁殖活動を環境 RNA 解析により検出する

Detection of reproductive activity by environmental RNA analysis in an experimental model using *Pleurodeles waltl* (Iberian ribbed newt)

客野 瑞月¹, 高原 輝彦¹

Mitsuki Kyakuno¹, Teruhiko Takahara¹

1. 島根大学

1. Shimane University

有尾両生類の多くは生息地の破壊などの要因により減少傾向にある。希少種を保全するためには個体数だけでなく、繁殖により再生産が問題なく行われているかを把握する必要がある。本研究は、生息地の環境水に含まれる RNA（環境 RNA：eRNA）から有尾両生類の産卵時に放出される RNA を検出することで繁殖活動の有無を明らかにする手法の確立を目指した。そのためにモデル生物イベリアトゲイモリを用いて、全身組織のトランスクリプトームデータから成熟卵で特異的かつ高発現する転写産物を同定した。さらに、飼育下にて本イモリの産卵を誘導した後、飼育水から RNA を抽出し、RT-qPCR により卵特異的 RNA を検出した。これにより、産卵時には卵特異的 RNA である *birc7l*, *h2al* および *h2ax* が有意に検出されることがわかった。本研究は、飼育環境下において有尾両生類の繁殖活動を eRNA 解析により検出できることを初めて示した。

To conserve the endangered salamanders, it is necessary to monitor not only population size but also reproduction. Environmental RNA (eRNA) analysis is a method that can detect organisms' physiological states from environmental samples such as water. This study aimed to establish a method to detect reproductive activity of salamanders by eRNA analysis. We used a model organism, *Pleurodeles waltl* (Iberian ribbed newt), and identified transcripts that are highly and specifically expressed in mature eggs. Furthermore, we induced female newts to lay eggs in a tank experiment, extracted eRNA from their incubation water, and detected egg-specific eRNAs using RT-qPCR. A significant relationship was found between egg-laying and the detection of egg-specific RNA (e.g., *birc7l*, *h2al*, and *h2ax*). We have shown for the first time that reproductive activity of amphibian species can be detected by eRNA analysis under the experimental environment.

【P-07】

環境 RNA を用いた魚類の生殖行動発現の推定

Reproductive behavior in fish predicted by environmental RNA

網中 結仁¹, 黄 國成¹, 高木 互¹, 矢田 崇², 兵藤 晋¹

Yuto Aminaka¹, Marty Kwok-Shing Wong¹, Wataru Takagi¹, Takashi Yada², Susumu Hyodo¹

1. 東京大学 大気海洋研究所, 2. 水産研究・教育機構 水産技術研究所

1. AORI, The University of Tokyo, 2. Japan Fisheries Res. and Education Agcy.

eDNA は生物の分布や種組成の非侵襲的な調査手法として有効である一方、繁殖やストレス応答といった生理的な状態・行動の直接的な推定までは行えない。そこで各生理現象に対して特異的に産生される RNA に注目し、環境中の存在量から非侵襲的に生物の行動推定を行うことを考えた。本研究では実験的に扱いやすいメダカをモデルに、繁殖活動マーカーとなりうる RNA を選定、eRNA の効率的な抽出手法を確立した。繁殖行動を起こした水槽と起こしていない水槽の飼育水を調べたところ、精液、および精子に由来する RNA のなかで、繁殖行動特異的に検出される RNA を見出した。さらに、24 時間の経時的な採水を行い、この RNA の時間的な検出量の変化を調べたところ、照明点灯後に起こるメダカの繁殖パターンと一致する変化がみられた。本結果は、eRNA が非侵襲的な行動推定において効果的であることを示唆する。

Environmental DNA (eDNA) is an effective non-invasive survey method for investigating the distribution of organisms and species composition, but it cannot directly deduce physiological behaviors such as reproduction and stress responses. Therefore, we extract environmental RNA (eRNA) that may represent physiological phenomena from the water to predict the behavior of organisms non-invasively. In this study, we used medaka as a fish model and selected eRNA markers related to reproductive behavior. We also established an efficient method for extracting eRNA and compared the quantities of the reproductive markers between the tank water of mating and non-mating groups. The result revealed that the eRNA specific to semen and sperm was significantly higher in the water of the reproductive group. In addition, we examined 24-hour water samples continuously and analyzed the temporal changes of reproduction markers and found that the eRNA peaked at the beginning of the light cycle, a pattern that is consistent with the daily spawning cycle of medaka. The results suggest that eRNA is a valuable non-invasive method to predict organismal behavior in the wild.

【P-08】

環境エクソソーム：新たな環境指標となるか？

Environmental Exosomes : Whether does it become a new environmental indicator?

米澤 遼¹, 孟玲欣¹, 満山 進¹, 小林 敬典¹, 吉武 和敏^{1,2}, 木下 滋晴¹, ベイリー小林 菜穂子³, 橋本 直樹⁴, 前山 薫⁵, 永井 清仁⁴, 渡部 終五², 吉田 徹彦³, 浅川 修一¹

Ryo Yonezawa¹, Lingxin Meng¹, Susumu Mitsuyama¹, Takanori Kobayashi¹, Kazutoshi Yoshitake^{1,2}, Shigeharu Kinoshita¹, Nahoko Bailey-Kobayashi³, Naoki Hashimoto⁴, Kaoru Maeyama⁵, Kiyohito Nagai⁴, Shugo Watabe², Tetsuhiko Yoshida³, Shuichi Asakawa¹

1. 東大・院農, 2. 北里大・海洋, 3. 東亜合成(株)・先端科学研究所, 4. (株)ミキモト・真珠研究所, 5. 御木本製薬(株)

1. The University of Tokyo, 2. Kitasato University, 3. TOAGOSEI CO., LTD., 4. K. MIKIMOTO & CO., LTD., 5. Mikimoto Pharmaceutical CO., LTD.

エクソソームは真核生物が放出する細胞外小胞の一種であり、個体内で細胞間コミュニケーションに関与すると考えられている。水圏生物は組織・細胞が直接生息水と接していることから、生息水に機能的にエクソソームを放出するのではないかと考え、開放血管系かつ濾過摂食であるアコヤガイを用いてその飼育水中のエクソソームの有無を検証した。

その結果、アコヤガイ飼育水中に 50 ~ 200 nm の小胞の存在を確認し、それらから得た RNA 中にアコヤガイ由来の piRNA が豊富に検出されたことから、これらの小胞はアコヤガイが環境中に放出したエクソソームと判断した。エクソソームは放出個体の生理状態を反映していることが期待されるので環境をモニターする新たな指標としても期待できる。さらに多くの水圏生物で同様の現象が確認されれば、エクソソームの核酸分析は、生物種の分布を調査するうえで、環境 DNA を補完する役割を果たせるかもしれない。

Exosomes, which are extracellular vesicles secreted by eukaryotic cells, in intercellular communication within the individual. Since the tissues/cells of aquatic organisms are in physical contact with the environmental water, we hypothesized that they may release exosomes into their aquatic environment. In this study, we focused on bivalves, which have an open circulatory system and filter feed, and investigated the presence or absence of exosomes in the rearing water using the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata*.

We observed that there were abundant vesicles of 50-200 nm, like exosomes, in the rearing water. Furthermore, it was identified that piRNA derived from Akoya pearl oyster specimens are more abundant than miRNA. This time, we confirmed that numerous piRNA derived from pearl oyster specimens were present in the small RNA extracted from the microvesicle fraction. Consequently, we concluded that these extracellular vesicles are exosomes released into the environment by the pearl oyster specimens. Since exosomes are expected to reflect the physiological state of the individual that released them, environmental exosomes could also be applied as a new indicator for assessing environmental conditions. Moreover, if such a phenomenon is identified in various aquatic organisms, nucleic acid analysis of exosomes might complement environmental DNA in investigating species distribution.

【P-09】

環境 RNA を用いた生物群集解析に基づく化学物質の生態影響評価

Ecological effect assessment of chemical substances based on analysis of biological communities using environmental RNA

井上 泰彰¹, 宮田 楓¹, 山根 雅之¹, 本田 大士¹

Yasuaki Inoue¹, Kaede Miyata¹, Masayuki Yamane¹, Hiroshi Honda¹

1. 花王株式会社

1. Kao Corporation

単一種の毒性試験から化学物質の生態系への影響を予測する生態影響評価は、保守的な評価になりやすいことが指摘されている。近年、個体群以上の生物学的階層で生態影響評価を行う研究が報告されている。なかでも、野外調査（TFS）を用いた生態影響評価は、生態系の包括的な情報から化学物質の影響を評価できるため有望であるが、TFSは煩雑でコストや時間がかかるため、評価事例が非常に少ない。本研究では、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸類（LAS）が流入する河川において、生物群集を簡便に観察できる環境核酸を用いた節足動物の生物調査を実施し、生物群集とLAS濃度の関係を解析した。環境核酸解析はTFSと同様にLAS濃度に応答した群集の変化を捉えられることが示唆された。また、環境RNAは環境DNAよりも高感度にLASの影響を捉える可能性があり、群集の応答に基づいて生態系を保護するLAS濃度を推定できることを示した。

In the ecological risk assessment of chemical substances, the predicted no-effect concentration is calculated from the laboratory toxicity test data of single species by applying assessment factors, and is compared to the environmental concentration of chemical substance in order to assess the ecological risk. However, it has been pointed out that current ecological effect assessments, which predict ecosystem responses from ecotoxicity tests of single species, tend to be conservative because of the inherently large uncertainty. Recently, studies on ecological effect assessments at levels of biological organization higher than population have been reported. Among them, ecological effect assessments using traditional field survey (TFS) can evaluate the impacts of chemical substances based on comprehensive information on ecosystems, however TFS is complicated, costly, and time-consuming, resulting there are few examples of such assessments. In this study, we conducted ecological surveys of arthropods using environmental nucleic acids (eDNA and eRNA), which can conveniently observe the response of biological communities, in a river where effluents containing linear alkylbenzene sulfonate (LAS) have been flowing into, and analyzed the relationship between biological communities and LAS concentration. Environmental nucleic acids metabarcoding analyses could observe changes in community structure in response to LAS concentration, similar to TFS. Furthermore, eRNA analysis may be more sensitive than eDNA analysis in capturing the impacts of LAS, suggesting that LAS concentrations that protect ecosystems can be estimated based on changes in community structure. These results provide important insights for policy making in chemicals management and for validation of current ecological effect assessments methods.

【P-10】

環境 RNA-seq を用いたストレス応答解析の有用性 — 界面活性剤の生態影響評価を事例に —

The utility of environmental RNA sequencing for stress response analysis — case study on ecological effect assessment of a surfactant —

宮田 楓¹, 井上 泰彰¹, 山根 雅之¹, 本田 大士¹

Kaede Miyata¹, Yasuaki Inoue¹, Masayuki Yamane¹, Hiroshi Honda¹

1. 花王株式会社

1. Kao Corporation

環境 RNA (eRNA) は生息域の生物に悪影響を及ぼすストレスを早期に特定できる可能性があるが、検出される遺伝子数が限られることが課題である。本研究では、メダカに直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩を曝露し、eRNA がメダカの化学物質への応答を評価できる可能性を検討した。水槽水中の eRNA と生物由来の RNA (oRNA) を 12 時間以内に分析することで、高いマッピング率を達成し、既報よりも約 10 倍の発現変動遺伝子数を得ることができた。eRNA は、炎症反応に関与するスフィンゴ脂質やセラミドの生合成に関連する遺伝子に高い感度を示した。これらの結果は、oRNA で得られた結果と一致しており、水槽水を用いた eRNA-sequencing (eRNA-seq) は、生理的ストレスを解析するための貴重な非侵襲的ツールとして有用であることが示唆された。本技術は、生物多様性や生態系保全の取り組みに役立つと考える。

Metabarcoding, using environmental DNA (eDNA) from aquatic environments, has revolutionized ecological surveys. While eDNA metabarcoding provides information on species richness and abundance, it can lead to false positives. To address this issue, environmental RNA (eRNA), which degrades more rapidly than DNA, has been proposed as an alternative. Our previous studies have demonstrated the effectiveness of eRNA metabarcoding for ecological surveys with high predictive accuracy. However, detecting early-stage stresses involved in population decline or extinction through eDNA/RNA metabarcoding remains challenging. The utility of environmental RNA (eRNA) in capturing biological responses to stresses has been discussed previously; however, the limited number of genes detected remains a significant hindrance to its widespread implementation. Here, we investigated the potential of eRNA to assess the health status of Japanese medaka fish exposed to linear alkylbenzene sulfonate. Analyzing eRNA and organismal RNA (oRNA) in aquarium water for > 12 h, we achieved high mapping rates and 10 times more differentially expressed genes than previously reported. This advancement has facilitated the previously unattainable capability of gene ontology analysis. eRNA exhibited high sensitivity in responding to genes associated with sphingolipid and ceramide biosynthesis, which are involved in inflammatory responses possibly originating from impaired cells. This finding aligns with the observations made in oRNA. Conclusively, eRNA-sequencing (eRNA-seq) using aquarium water emerges as a valuable non-invasive tool for analyzing physiological stress. The findings of this study lay the foundation for further development of eRNA-seq technologies. Early identification of stresses that adversely affect habitat organisms can benefit effective ecosystem conservation efforts.

【P-11】

12 連 eDNA サンプラーの開発と実用化に向けた改良

Development of 12-channel eDNA Sampler and its Improvement for Practical Application

福場 辰洋¹, 小林 陽子², 濱崎 恒二²

Tatsuhiro Fukuba¹, Yoko Makabe-Kobayashi², Koji Hamasaki²

1. 国立研究開発法人海洋研究開発機構, 2. 東京大学大気海洋研究所

1. JAMSTEC, 2. AORI, The Univ. of Tokyo

我々はこれまで、海洋・湖沼・河川などの水環境での eDNA 試料の採取・保存を自動化することによる省力化・低コスト化を通して、eDNA 観測網の飛躍的な拡張に貢献することを目指して、完全自動の eDNA サンプラーの開発と改良を続けてきた。基本となる浮体式のモデルでは、予め設定したスケジュールで自動的に 12 種類のサンプルを使い捨てフィルタユニット上に濾過捕集し、DNA 保存試薬を投入できる。さらに多様なニーズに対応するため、これまでに幾つかの派生モデルの開発・評価を進めている。4G-LTE 通信機能を組み込んだモデルでは、インターネット経由の遠隔制御・モニタが可能である。また 1,000m までの海中での運用が可能モデルも試作している。ここでは、主に最新型の 12 連 eDNA サンプラーについて、特徴と実環境試験の結果を示す。またスタートアップ起業による eDNA サンプラーの実用化、社会実装の加速を計画している。

We have been developing and improving a fully automated eDNA sampler with the aim of contributing to the expansion of eDNA observation networks by automating the collection and preservation of eDNA samples in marine, lake, river, and other aquatic environments. The standard floating buoy model is capable of automatically filtering and collecting 12 samples on disposable filter units according to the pre-set schedule, and of supplying DNA preservation reagents such as RNAlater. To meet a variety of scientific needs, several derivative models have also been developed and evaluated. The 4G-LTE model allows remote control of the deployed eDNA sampler via the Internet. We are also working on a prototype model that can operate down to the water depth of 1,000 m. Here, we mainly present the features and results of field trials of the latest model of 12-channel eDNA sampler. We are also planning to accelerate the practical application and social implementation of our eDNA samplers by launching a start-up company soon.

【P-12】

海洋における魚類多様性調査にむけた環境 DNA パッシブサンプリング法の基礎的検討

Basic study of an environmental DNA passive sampling method for the monitoring of marine fish diversity

中尾 遼平¹, 乾 隆帝², 栗田 喜久³, 今村 史子⁴, 赤松 良久¹

Ryohei Nakao¹, Ryutei Inui², Yoshihisa Kurita³, Fumiko Imamura⁴, Yoshihisa Akamatsu¹

1. 山口大学, 2. 福岡工業大学, 3. 九州大学, 4. 日本工営株式会社

1. Yamaguchi University, 2. Fukuoka Institute of Technology, 3. Kyushu University, 4. Nippon Koei Co., Ltd.

近年、環境 DNA 分析を用いた調査方法のひとつとして、DNA 吸着素材を水中に浸漬するパッシブサンプリング法 (PS 法) が提案されている。本研究では、海洋の魚類相調査における PS 法の基礎的検討を目的として、浸漬層 (上層・中層・下層)、素材形状 (丸型・角型・破碎型)、浸漬時間 (1 ~ 24 時間) の違いによる魚類多様性の検出効率について比較した。その結果、浸漬層において中層や下層で高い多様性を示す傾向がみられた一方で、素材形状の違いでは大きな差はみられなかった。また、浸漬時間においては 6 時間や 9 時間で高い多様性を示したことから、最適な浸漬時間が存在することが示唆された。これは、浸漬素材が環境 DNA だけでなく DNA 抽出や PCR 阻害の要因となる物質も蓄積したためであると考えられた。また、PS 法は表層水とも同等もしくは高い多様性を示したことから、海洋においてもその有効性が示された。

Passive sampling method (PS method) by submerging DNA adsorption materials in water has been developed as one of the environmental DNA surveys. In this study, as a basic study of the PS method in the marine fish diversity survey, the effectiveness of the PS method in detecting fish diversity in different submerged layers (upper, middle and lower), material shapes (round, square and crushed) and submerged times (1-24 hours) was compared. Result of the PS method showed a trend of higher fish diversity in the middle and lower layers, while no differences were observed among the material shapes. In addition, the higher fish diversity was observed at two submerging times (six and nine hours), suggesting that there is an effective submerging period of PS material. This result indicated that the submerged material accumulated not only fish environmental DNA, but also substances to decrease the DNA recovery rate and PCR efficiency. The PS method also showed similar or higher diversity with surface water, indicating its effectiveness in marine waters.

【P-13】

Passive eDNA sampling facilitates biodiversity monitoring and rare species detection

Xiaoyu Chen¹, Sheng Li¹, Jindong Zhao¹, Meng Yao¹

1. Peking University

Environmental DNA (eDNA) technology has revolutionized biomonitoring, but challenges remain regarding water sample processing. The passive eDNA sampler (PEDS) represents a viable alternative to active, water filtration-based eDNA enrichment methods, but the effectiveness of PEDS for surveying biodiverse and complex natural water bodies is unknown. Here, we collected eDNA using filtration and glass fiber filter-based PEDS (submerged in water for 1 d) from 27 sites along the final reach of the Yangtze River and the coast of the Yellow Sea, followed by eDNA metabarcoding analysis of fish biodiversity and quantitative PCR (qPCR) for a critically endangered aquatic mammal, the Yangtze finless porpoise. We ultimately detected 98 fish species via eDNA metabarcoding. Both eDNA sampling methods captured comparable local species richness and revealed largely similar spatial variation in fish assemblages and community partitions between the river and sea sites. Notably, the Yangtze finless porpoise was detected only in the metabarcoding of eDNA collected by PEDS at five sites. Also, species-specific qPCR revealed that the PEDS captured porpoise eDNA at more sites (7 vs. 2), in greater quantities, and with a higher detection probability (0.803 vs. 0.407) than did filtration. Our results demonstrate the capacity of PEDS for surveying fish biodiversity, and support that continuous eDNA collection by PEDS can be more effective than instantaneous water sampling at capturing low abundance and ephemeral species in natural waters. Thus, the PEDS approach can facilitate more efficient and convenient eDNA-based biodiversity surveillance and rare species detection.

Development of a compact DNA extraction device using imidazolium-modified silica toward on-site extraction technology

柿倉 泰明¹

Yasuaki Kakikura¹

1. 大阪産業技術研究所

1. ORIST

環境 DNA 分析で一般的に用いられている前処理方法では、DNA 抽出は必要な物品が多く、コンパクトさに欠け、持ち運びの面で不便さを伴う。また現地で採取した試料は実験室まで輸送して分析するのが現状である。これをその場で完結できればフィールドデータ採取の効率向上が期待できる。本発表では、マイクロピペットチップに核酸吸着体を充填した前処理チップの作製、および場所を選ばず実行できる機器フリー DNA 抽出方法の検討結果を報告する。核酸吸着体はイミダゾリウムをシリカゲルに表面修飾し、静電相互作用により DNA が吸着されるよう設計した。これを用いて作製した前処理チップに対し、500 mL の模擬試料水を通液して ng/L オーダー濃度の DNA を吸着させた。吸着した DNA は、特定の組成の溶出液を用いて回収され、PCR 検出が可能であり、本技術のコンパクトなオンサイト DNA 前処理チップへの適用可能性を示唆している。

Imidazolium-modified silica (IMS) was prepared for use in a compact DNA extraction device, designed to filter and extract DNA at low concentrations, in the ng/L range. The IMS demonstrated the capability to specifically adsorb DNA through electrostatic interactions with the imidazolium groups, followed by the release of the adsorbed DNA. The results indicate that the developed method could be employed for compact nucleic acid testing.

【P-15】

分子認識スイッチ機能に基づく核酸センサアレイと環境由来 DNA の迅速簡便評価

Nucleotide sensor arrays based on molecular-recognition switches and application to rapid and simple evaluation of environmental DNA samples

青木 寛¹

Hiroshi Aoki¹

1. 国立研究開発法人産業技術総合研究所

1. AIST

環境に生息する生物から発せられる生体関連物質は、その生物が生息する環境の状態を雄弁に語る、いわば環境バイオマーカーである。我々は、標的核酸を非標識的に迅速簡便検出することを目的として、核酸認識に基づく信号スイッチ機能を有する核酸センシング法について研究してきた。本研究では、環境評価の重要な指標となる外来魚や在来魚について、環境由来 DNA 試料を 1 チップ上にて複数・同時に検出可能な核酸センサアレイを開発した。

ブルーギル検出センサアレイおよびアユ検出センサアレイでは、それぞれの cDNA に対して大きな応答を示した一方、互いの cDNA に対しては応答はわずかだった。環境由来 DNA 試料についても有意な配列選択的なセンサ応答を示した。本法は、PCR 法などの核酸増幅を特に行うことなく DNA 試料を検出できたことから、環境のその場評価に貢献する技術として期待される。

Biorelevant substances emitted from organisms inhabiting the environment are, so to speak, environmental biomarkers that eloquently tell us about the state of the environment. We have been studying nucleotide sensing methods with signal switch functions based on nucleotide recognition, aiming at rapid and simple detection of target nucleotides without labeling. In this study, we developed nucleotide sensor arrays that can simultaneously detect multiple environmental DNA samples on a single chip for invasive and native fish, which are important indicators of environmental assessment.

The bluegill detection sensor array and the Ayu detection sensor array showed a large response to each cDNA, but only a small response to each other's cDNA. They showed significant sequence-specific responses to environmental DNA samples. Besides, the sensor array was able to detect DNA samples without any nucleotide amplification such as PCR, and is expected to contribute to on-site environmental assessment.

【P-16】

水中環境 DNA サンプリングのための連続ろ過とその場酵素消化システム

Continuous filtering and in situ enzyme digestion system for underwater eDNA sampling

望月 康弘¹, 二井 信行¹, 牧野 暖登¹, 鈴木 秀斗¹, 野口 拓真¹

YASUHIRO MOCHIZUKI¹, Nobuyuki Fuai¹, Haruto Makino¹, Hideto Suzuki¹, Takuma Noguchi¹

1. 芝浦工業大学

1. Shibaura Institute of Technology

生物相モニタリングのための eDNA の標準的な採取方法として、細胞培養用培地のろ過滅菌用である Sterivex® が採用されている。しかし、環境水に含まれる固形により容易に目詰まりし、ろ過水量が 1L 程度と少量となる。環境水中の eDNA の分布が水深や時刻により不均一であることを考慮すると、採取できる DNA の由来となる生物の分布が不均一となるおそれがある。我々は、逆洗により連続ろ過が可能なファインウェッジ® フィルタによる eDNA 含有粒子の捕集と、eDNA の経時劣化を防ぐためその場酵素処理を組み合わせ、球型ドームに搭載したシステムを開発した。本システムは、豊洲運河での採水を伴う評価において、Sterivex® を用いた標準法に比べ、5 倍以上の体積の水を濾過し、そこから 2 倍以上の eDNA が得られた。また、その場酵素処理により、1000bp 以上の長鎖 DNA の収量が 2 倍以上に増加した。

The standard method for collecting eDNA for biota monitoring uses Sterivex®, a filter cartridge for cell culture media sterilization. Because it is easily clogged during filtering environmental water, it has a small filter capacity of 1 liter. The distribution of eDNA in ecological water varies depending on depth and time of day, leading to a potential non-uniform collection of DNA from organisms. We developed an underwater eDNA collection system in a 25-cm spherical capsule containing a Fine Wedge® filter that enables continuous filtration by backwashing and in situ enzyme digestion of residues that prevents DNA degradation. We evaluated the yield of DNA from this system in the Toyosu Canal. The system filtered more than five times the volume of water and obtained more than twice as much eDNA from the residue compared to the standard method using Sterivex®. In addition, in situ enzyme treatment more than doubled the yield of DNA longer than 1000 bp.

【P-17】

塩化ベンザルコニウムによる PCR 阻害と DNA 精製の効果

PCR inhibition by benzalkonium chloride and the effect of DNA purification

笹野 祥愛¹, 山下 洋¹

Sachia Sasano¹, Hiroshi Yamashita¹

1. 水産研究・教育機構

1. FRA

塩化ベンザルコニウム (BAC) は採水した試料の DNA 分解防止のためよく使用されるが, Proteinase K を用いた DNA 抽出の効率を低下させるという指摘もある。本研究では BAC が環境 DNA 定量に及ぼす影響を検証した。海産魚スジアラの飼育水と石垣島沿岸の海水について, BAC 添加・非添加の試料水から DNA を抽出し通常の PCR と定量 PCR に供した結果, 一部の PCR 酵素では BAC 添加試料で強い PCR 阻害が生じた。DNA 抽出中に遠心処理で BAC を含む水を除去しても阻害程度は変わらず, DNA 精製を経ても阻害は完全に除去されなかった。また, 抽出液中の DNA は精製過程で減少する場合があります, 減少率は都度ばらつくものの元の DNA 濃度が高いと大きくなる様子がみられた。採水調査に BAC を用いる際には BAC との相性を考慮して PCR 酵素を選択するなど, DNA 定量結果への影響を最小限にする分析方法の適用が推奨される。

Benzalkonium chloride (BAC) is known as an effective preventer of eDNA degradation in water samples. This solution, however, is reported to reduce the efficiency of DNA extraction using Proteinase K (e.g. Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit). In this study, we examined other effects of BAC on eDNA quantification. Endpoint PCR and Quantitative PCR were performed using eDNA samples with and without BAC taken from the rearing water of marine fish (*Plectropomus leopardus*) and the coastal water of Ishigaki Island. The result showed that strong PCR inhibition occurred with BAC samples when some PCR master mixes were used. The extent of PCR inhibition did not change with removal of BAC-containing water from filters by centrifugation during DNA extraction. A single DNA purification step was not enough to completely resolve the PCR inhibition. In addition, DNA purification sometimes reduced the amount of DNA in the extract. Although the reduction rate varied from case to case, it tended to be higher with higher original DNA concentration. PCR inhibition by BAC and DNA reduction by purification process could critically affect the quantitative results of eDNA. It is recommended to select PCR master mixes compatible with BAC to minimize the impact on eDNA quantification.

【P-18】

環境 DNA メタバーコーディングにおける PCR 阻害対策の手法比較

A comparison of approaches to prevent PCR inhibition in environmental DNA metabarcoding

釣 健司¹, 村岡 敬子¹, 服部 啓太¹, 田中 孝幸¹

Kenji Tsuru¹, Keiko Muraoka¹, Keita Hattori¹, Takayuki Tanaka¹

1. 土木研究所

1. PWRI

陸水域の環境 DNA メタバーコーディングでは腐食物質等の様々な要因に起因する PCR 阻害により分析が不調となる場合がある。PCR 阻害に対する対策は阻害に強い PCR 酵素の使用, 鋳型 DNA の希釈, 阻害物質除去キットによる鋳型 DNA の精製などが挙げられる。鋳型 DNA の希釈は簡便でよく用いられるが, 鋳型 DNA の濃度が低下するため検出感度が低下し偽陰性を招く可能性がある。また, 阻害物質除去キットによる精製では鋳型 DNA の希釈なしに PCR 阻害を回避できる可能性があり, 偽陰性の低減が期待できる。予備検討では PCR 阻害が認められるサンプルについて, 鋳型 DNA の希釈より鋳型 DNA 精製の方が種数は多い傾向がみられ, 鋳型 DNA の希釈による検出感度の低下がみられた。発表では複数の河川, 湖沼, ダム湖など PCR 阻害の要因が異なると考えられる水域において, これらの阻害対策手法間の検出種数の比較から各手法の評価を行う。

In environmental DNA metabarcoding of inland waters, PCR inhibition caused by various factors such as humic substances can lead to suboptimal analysis results. Several methods can be employed to prevent PCR inhibition, including the use of PCR enzymes with enhanced resistance to inhibitors, dilution of template DNA, and purification of template DNA using inhibitor removal kits. While dilution of template DNA is a simple and commonly used method to prevent PCR inhibition, it can lead to a decrease in detection sensitivity due to the reduced concentration of template DNA. This is thought to increase the likelihood of false negatives. Purification using an inhibitor removal kit has the potential to prevent PCR inhibition without diluting the template DNA, which is expected to reduce the likelihood of false negatives. Preliminary experiments revealed that PCR inhibition was mitigated by purifying template DNA rather than diluting it, leading to increased species detection. In this study, we compared the number of fish species in rivers, lake, and reservoir of dams using various approaches to mitigate PCR inhibition, and evaluated the effectiveness of each approach.

【P-19】

迅速，効率的，かつ電力不要な eDNA 濃縮手法 (QuickConc) の開発

Development of a rapid, efficient, and power-free eDNA concentration method (QuickConc)

黒板 智博^{1,2}, Wu Qianqian³, 岩本 遼^{1,2}, 源 利文³

Tomohiro Kuroita^{1,2}, Qianqian Wu³, Ryo Iwamoto^{1,2}, Toshifumi Minamoto³

1. 株式会社 AdvanSentinel, 2. 塩野義製薬株式会社, 3. 神戸大学大学院人間発達環境学研究所

1. AdvanSentinel Inc., 2. SHIONOGI & Co., Ltd., 3. Kobe University

環境 DNA (eDNA) 分析において、濃縮、抽出、保存の 3 つのステップが重要である。特に濃縮工程では、ガラス繊維フィルター (GF) や Sterivex などの方法が開発されているが、水の特性 (濁度など) や eDNA の存在量が異なるため、普遍的に適用できる方法は存在しない。これにより、汎用性の高い eDNA 濃縮方法の開発が求められている。本研究では、塩化ベンザルコニウムと分散ガラス繊維を組み合わせた新しい核酸濃縮方法「QuickConc」を紹介する。3 つの異なる環境で濃縮手法を評価した結果、qPCR およびメタバーコーディングを用いた評価では、QuickConc は GF や Sterivex と比較して 2 ~ 3 倍の eDNA 量を検出し、河川水ではより多くの魚種を検出した。QuickConc は、より感度が高く、容易に適用可能なアプローチを提供することで、生物多様性モニタリングや保全戦略に貢献することが期待される。

Environmental DNA (eDNA) analysis is effective for non-invasive biodiversity monitoring, as it reveals species distribution and abundance without ecosystem disruption. Concentration, extraction, and preservation are three essential steps in the eDNA analysis process. Among these, the concentration of eDNA has attracted significant research interest, particularly due to the variability of water samples used in studies. To date, various methods for eDNA concentration have been developed, including glass fiber filtration, Sterivex filters, and passive samplers; however, no single method is universally applicable because of the variabilities of eDNA presence and water characteristics including turbidity levels. Therefore, the development of alternative eDNA concentration methods is crucial for advancing eDNA research. This study introduces QuickConc, a novel nucleic acid capture method that combines benzalkonium chloride (BAC) with dispersed glass fibers. Our results indicate that this approach enhances eDNA capture sensitivity by likely improving the interaction between silica and eDNA. QuickConc was tested in three environments, using metabarcoding and qPCR. Species-specific qPCR results showed that QuickConc detected 2 to 3 times higher copy numbers compared to the glass fiber filter and Sterivex methods. Metabarcoding analyses using the MiFish method revealed that the number of fish species detected in river water was higher with QuickConc, compared to other methods, while in sea water, the number of fish species was at a similar level compared to other methods. QuickConc offers new options for eDNA analysis, providing a more sensitive and easily deployable approach to biodiversity monitoring and conservation strategies.

【P-20】

環境 DNA メタバーコーディングにおける地衣類の検出に及ぼす細胞破碎の影響評価

Influence of homogenization methods on lichen species detection from environmental DNA metabarcoding

坂田 歩美¹, 源 利文², 佐土 哲也¹, 宮 正樹¹

Ayumi Sakata¹, Toshifumi Minamoto², Tetsuya Sado¹, Masaki Miya¹

1. 千葉県立中央博物館, 2. 神戸大学

1. Natural History Museum & Institute Chiba, 2. Kobe University

環境 DNA メタバーコーディング法の陸上生物への適用には実験方法を改良する必要がある。eDNA 抽出の前処理として行う破碎は、抽出された eDNA の濃度と質の向上に影響することが知られている。本研究では、環境 DNA メタバーコーディングと定量 PCR を用いて、樹幹流中に含まれる地衣類を対象に、eDNA 抽出に対する破碎の影響を評価した。メタバーコーディング解析では、無処理試料から検出された種数が最も少なく、ビーズビーティングと凍結ビーズビーティングを行った試料では、検出された種数が無処理試料より多く、両手法による検出種数はほぼ同等であった。同様に、定量 PCR においても、無処理試料の DNA 濃度が最も低く、破碎を行った試料では、両方法ともに高い DNA 収量が得られた。コストと労力を考慮した場合、樹幹流からの地衣類の eDNA 検出には、凍結を伴わないビーズビーティング法が最も有効であることが示唆された。

Environmental DNA (eDNA) techniques are increasingly employed in biodiversity monitoring of terrestrial animals, plants, and fungi, holding great potential to revolutionize biodiversity assessments on land. However, sampling and basic laboratory protocols still require refinement to optimize DNA metabarcoding performance. Homogenization as a pretreatment for eDNA extraction has been shown to enhance the concentration and quality of extracted eDNA for some groups of organisms. We developed a simple and efficient method for capturing arboreal biodiversity using stemflow as a source of eDNA, but its performance with or without homogenization had not yet been compared. In this study, we evaluated the performance of two different homogenization methods using eDNA metabarcoding and qPCR assays. This study demonstrated that bead-beating as a pretreatment for eDNA extraction effectively increases both the yield of lichen DNA and the number of species detected in environmental samples. In contrast, the use of liquid nitrogen freezing before eDNA extraction, which is effective for DNA extraction from lichen tissue fragments, did not show any significant effect on the results of eDNA metabarcoding. Considering the time, effort, and cost associated with freezing, bead-beating alone appears to be sufficient as a pretreatment for extracting lichen eDNA. However, further research is needed to determine whether these findings are consistent across different environmental samples and other arboreal organisms. The application of this optimized method could enhance the accuracy and efficiency of biodiversity monitoring and conservation efforts involving lichens.

【P-21】

環形動物，刺胞動物，棘皮動物の環境 DNA メタバーコーディングのための 3つの PCR プライマーセットの開発

Development of three sets of PCR primers for environmental DNA metabarcoding of Annelida, Cnidaria and Echinodermata

中村 匡聡¹，白子 智康¹，相馬 理央¹，内野 透¹，横岡 博之¹

Masatoshi Nakamura¹，Tomoyasu Shirako¹，Rio Soma¹，Toru Uchino¹，Hiroyuki Yokooka¹

1. いであ株式会社

1. IDEA Consultants, Inc.

ベントスは海洋生態系を構成する主要な生物群である。ベントスは底質中の物質循環を促進してその浄化に寄与するとともに、海洋環境の変化に対して敏感な指標生物としても利用される。また、水産資源や他の大型生物の餌としても重要な種を含む。本研究では、ベントスの生物多様性を非侵襲的にモニタリングするために、環形動物、刺胞動物、棘皮動物のそれぞれを対象とした環境 DNA メタバーコーディングの検出系を開発した。プライマーは、環形動物では核 DNA の 28S rRNA 領域上に、刺胞動物及び棘皮動物ではミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域上に設計した。数十種の主要な海生生物から得られた組織抽出 DNA 混合液を用いて、各プライマーの分類群特異的な検出性能を評価した。今回開発したプライマーは、既報のプライマーと組み合わせることで、海域生態系をさらに詳細にモニタリングするためのツールとしての活用が期待される。

Benthos are a key component of marine ecosystems. They contribute to the cycling of materials within the sediment, aiding in purification, and serve as sensitive indicator species for changes in the marine environment. Additionally, they include important species that are vital as food sources for fisheries and other larger organisms. In this study, we developed environmental DNA metabarcoding detection systems for annelids, cnidarians, and echinoderms to non-invasively monitor benthic biodiversity. Primers were designed to target the 28S rRNA region of nuclear DNA for annelids and the 16S rRNA region of mitochondrial DNA for cnidarians and echinoderms. We evaluated the taxon-specific detection performance of the three primer sets using a mock sample made from DNA extracts of dozens of key marine organisms. The primer sets developed in this study are expected to be utilized as tools for more detailed monitoring of marine ecosystems when combined with previously reported primers.

【P-22】

メタバーコーディング解析における 2nd PCR の酵素の比較事例

A preliminary study of the comparison of polymerase biases at 2nd PCR of eDNA metabarcoding

中村 仁湖¹, 棟方 有桂¹, 古賀 暁洋¹, 岡田 衣里¹, 長谷部 勇太², 山崎 智美¹

Niko Nakamura¹, Yuka Munakata¹, Akihiro Koga¹, Eri Okada¹, Yuta Hasebe², Tomomi Yamazaki¹

1. 株式会社 環境総合リサーチ, 2. 神奈川県環境科学センター

1. ER & S co., Ltd., 2. Kanagawa Environmental Research Center

環境 DNA 分析のメタバーコーディング解析では、ライブラリ調製方法として 2-step tailed PCR 法が広く使用されているが、2nd PCR 時に使用する酵素によるバイアスを検証した研究例は少ない。今回 5 種類のユニバーサルプライマー (MiFish, Amph_16S, MiDeca, MtlInsect, fwhF2) を用いてライブラリ調製を行う際、2nd PCR 時に 2 種類の酵素 (KAPA, KOD One) を使用し、結果への影響について比較した事例を報告する。結果として、3 つのプライマー (MiDeca, MtlInsect, fwhF2) では 2nd PCR で使用する酵素の違いにより検出種数に違いが生じた事例があった。この結果は、これらプライマーの増幅領域の GC 含量と関係している可能性が示唆された。酵素の選択の他にもさらに検証すべきポイントがあり、引き続き検討を行いたい。

In the metabarcoding analysis of environmental DNA, the 2-step tailed PCR method is widely used as a library preparation method. However, as far as we know, there are only a few studies that have examined biases caused by polymerases used at a step adding indexes and adaptors to amplicons, called 2nd PCR. Here we would report a case in which the effects of the polymerase choice at the 2nd PCR step on sequencing results were compared. Two kinds of polymerases (KAPA and KOD One) were tested at 2nd PCR of library preparations derived from five pairs of universal primers (MiFish, Amph_16S, MiDeca, MtlInsect, and fwhF2). As a result, the polymerase choice at the 2nd PCR step differentiated the number of detected species when using some primers such as MiDeca, MtlInsect, and fwhF2. It was suggested that this result may be related to the GC content of the amplified regions of these primers. There are still other points that should be further verified in addition to the choice of polymerases, so we would like to continue our study.

【P-23】

環境 MIG-Seq に挑む：MIG-Seq が開くサンゴ環境 DNA の新展開

Challenging the eMIG-Seq: New Developments in Coral Environmental DNA Opened by MIG-Seq

夏非¹, 森田 椋人¹, 宝徳 日向¹, 菊地 泰生¹, 赫 英紅², 石川 直子², 陶山 佳久², 安田 仁奈¹
Fei XIA¹, Mukuto MORITA¹, Hyuga HOTOKU¹, Taisei KIKUCHI¹, Yinghong HE², Naoko ISHIKAWA²,
Yoshihisa SUYAMA², Nina YASUDA¹

1. 東京大学, 2. 東北大学

1. The University of Tokyo, 2. Tohoku University

サンゴ礁生態系の保全には、正確な種の同定とそれに基づく生物多様性の評価が不可欠である。しかし、従来の環境 DNA で使われるミトコンドリア遺伝子を用いた場合、生態系の基盤となるイシサンゴにおいては、せいぜい属までの同定しかできず、サンゴの種レベルでの検出が困難であった。この課題に取り組むため、本研究では既存の MIG-Seq (Multiplexed ISSR Genotyping by Sequencing) 技術をサンゴの環境 DNA 分析に初めて応用することを試みた。まず、多様なサンゴ種の正確な種同定ができる MIG-Seq データベースを基に、環境 DNA からの種識別に必要な各々の種独自の持つ基盤情報を整備した。次に、実験室内の水槽で環境水サンプルを採取し MIG-seq を用いることで種レベルでの同定の可能性が示唆された。今後は野外環境での種同定の実現に向けた研究を進める。

Accurate species identification and biodiversity assessment are essential for conserving coral reef ecosystems. However, traditional environmental DNA methods using mitochondrial genes can only identify reef-building corals to the genus level at best, making it difficult to detect coral species. To address this challenge, this study attempted to apply the existing MIG-Seq (Multiplexed ISSR Genotyping by Sequencing) technology to coral environmental DNA analysis for the first time. First, we developed a foundation of species-specific information necessary for species discrimination from environmental DNA, based on a MIG-Seq database capable of accurate species identification for diverse coral species. Next, we collected environmental water samples in laboratory tanks and used MIG-seq, which suggested the possibility of species-level identification. The potential for species-level identification was demonstrated by collecting environmental water samples in laboratory tanks and applying MIG-seq analysis. Future research will focus on achieving species identification in natural environments. This novel approach aims to overcome the limitations of traditional methods and provide more precise tools for monitoring and conserving coral biodiversity. By enabling species-level identification from environmental DNA, it could significantly enhance our understanding of coral reef ecosystems and inform more effective conservation strategies.

【P-24】

広島県絶滅危惧種ニホンリス (*Sciurus lis*) におけるモニタリング手法の構築

Development of Monitoring Methods for the Endangered Japanese Squirrel (*Sciurus lis*) in Hiroshima Prefecture, Japan

廣瀬 雅恵¹, 西堀 正英¹, 米澤 隆弘¹, 畑瀬 淳², 野田 亜矢子², 安江 博³

Masae Hirose¹, Masahide Nishibori¹, Takahiro Yonezawa¹, Jun Hatase², Ayako Noda², Hiroshi Yasue³

1. 広島大学大学院, 2. 広島市安佐動物公園, 3. 株式会社つくば遺伝子研究所

1. Hiroshima Univ., 2. Hiroshima City Asa Zoological Park, 3. Tsukuba Gene Technology Laboratories

ニホンリス (*Sciurus lis*) は本州と四国に生息する日本固有種である。中国地方では環境省レッドリストにより「絶滅のおそれのある地域個体群 (LP)」に指定され、広島県では広島レッドデータブック 2021 により絶滅危惧Ⅰ類に指定されている。しかし、広島県内の詳細な生息地は明らかではない。本研究では、広島県内におけるニホンリスの生息状況を明らかにするため、野外調査及び環境 DNA 調査を実施した。食痕調査やカメラ設置等の野外調査を行い、広島県北東部におけるニホンリスの動画撮影に成功し、その地点における生息を確認した。さらに、環境 DNA 手法を応用した大気中のニホンリス DNA 検出のため、特異的プライマーを設計し、生息状況の確認に十分な検出感度の高いシステムを確立した。加えて、アカマツ球果食痕から環境 DNA 検出に成功した。本研究により、特定の陸生哺乳類を対象とした環境 DNA 解析の有効性を検証した。

The Japanese squirrel (*Sciurus lis*), an endemic species to Japan, is found in the Honshu and Shikoku regions. This species plays a crucial ecological role as a seed disperser, contributing to forest regeneration by spreading tree seeds. However, it is listed as an Endangered species in the 2020 Red List of the Ministry of the Environment, particularly in Hiroshima Prefecture. Despite this, the distribution of Japanese squirrels in the Chugoku region remains unclear. Therefore, this study aims to evaluate the population status of the Japanese squirrel in Hiroshima Prefecture through a combination of field surveys and environmental DNA (eDNA) analyses. During the field survey, we employed camera trapping and collected feeding markers such as leftover pinecones. Our monitoring successfully confirmed the presence of Japanese squirrels in the northeastern area of Hiroshima. For molecular detection, we designed the species-specific PCR primers and a system was established to assess the sensitivity of the detection assay. We successfully detected Japanese squirrel eDNA from feeding markers of red pinecones. This study highlights the effectiveness of environmental DNA as a tool for detecting and monitoring mammalian species.

【P-25】

ローラー表面 eDNA 法と凝集剤を組み合わせた山林の生態調査

Ecological Survey of Mountain Forests using Roller Surface eDNA Methods and Flocculants

半田 佳宏¹, 梁田 椋也¹, 佐々木 明日菜¹, 土金 恵子¹, 濱谷 杏子¹, 野口 桂代子¹, 坂場 友香¹, 中野 江一郎¹

Yoshihiro Handa¹, Ryoya Yanada¹, Asuna Sasaki¹, Keiko Tsuchikane¹, Momoko Hamatani¹, Kayoko Noguchi¹, Tomoka Sakaba¹, Koichiro Nakano¹

1. 株式会社 生物技研

1. Bioengineering Lab. Co., Ltd.

環境 DNA 分析は、河川や海洋の生態調査において有力なツールになっている。これに伴い、山林や草地などの陸上環境においても環境 DNA 分析を導入したいという要望が高まっている。しかし、昨年ローラー表面 eDNA 法により高尾山でサンプリングを実施したが、泥水から環境 DNA が全く抽出できず、この方法の有用性を評価することが出来なかった。そこで私たちは、環境 DNA を濾過で濃縮するのではなく、凝集剤によって凝集させる方法に変更した。ポリ塩化アルミニウムを含む 5 つの凝集剤と物性の異なる泥水を準備し、環境 DNA の回収率が最も高い凝集剤を選定した。その後、ローラー表面 eDNA 法によって得られた山林の泥水に対し、選定した凝集剤を添加することで、環境 DNA を凝集させた。その後、凝集物から DNA を抽出し、メタバーコーディング解析を行った。発表では、凝集剤の有用性や問題点について議論したい。

Environmental DNA (eDNA) analysis has become a powerful tool in ecological research for aquatic ecosystems, including rivers and oceans. This success has led to a growing demand in applying eDNA analysis to terrestrial environments such as mountain forests and grasslands. However, during our sampling last year on Mt Takao using the roller surface eDNA method, we were unable to extract any eDNA from the muddy water, limiting our ability to assess the method's effectiveness. As a result, we modified our approach by flocculating the eDNA with flocculants rather than concentrating it through filtration. We prepared five different flocculants, including polyaluminium chloride, and tested them on muddy water samples with varying physical properties to determine which achieved the highest eDNA recovery rate. Once the most effective flocculant was identified, we applied it to muddy water collected from the mountain forest using the roller surface eDNA method. The flocculated eDNA was then extracted and analyzed via metabarcoding. In this presentation, we will discuss the effectiveness of the flocculants and the challenges encountered during the process.

【P-26】

樹幹流を用いた環境 DNA メタバーコーディングによる哺乳類相モニタリング法の検討

Collection of environmental DNA from stemflow for detecting terrestrial mammals

石原 湧也¹, 青木 香澄², 坂田 歩美³, 宮 正樹³, 浜野 杏平⁴, 坂田 雅之⁵, 邬 倩倩⁴, 源 利文⁴
Yuya Ishihara¹, Kazumi Aoki², Ayumi Sakata³, Masaki Miya³, Kyouhei Hamano⁴, Masayuki K Sakata⁵,
Qianqian Wu⁴, Toshifumi Minamoto⁴

1. 神戸大・国際人間科学, 2. 神戸市立王子動物園, 3. 千葉県立中央博物館, 4. 神戸大・院・人間発達, 5. 北海道大・院・農
1. Fac. Glob. Hum. Sci., Kobe U., 2. Kobe Oji Zoo, 3. Nat. Hist. Mus. Inst., Chiba, 4. Grad. Sch. Hum. Dev. Env., Kobe U.,
5. Grad. Sch. Agr., Hokkaido U.

環境 DNA (eDNA) による陸上哺乳類の検出は、これまで様々なサンプリング法で試されてきたが、決定的な手法はいまだ未確立である。近年、樹木の幹を伝う雨水である樹幹流中に eDNA が存在していることが明らかとなり、生物モニタリングに利用され始めている。本研究では、樹幹流を採水し eDNA メタバーコーディング法によって陸上哺乳類の検出を試みることで、陸上哺乳類相モニタリングに対する樹幹流を用いた eDNA 解析の有効性と、距離的な検出可能範囲を検証する。サンプリングは神戸市立王子動物園の樹木 11 本を対象とした。集めた樹幹流を、MiMammal プライマーを用いた eDNA メタバーコーディングによって解析した結果、動物園内の哺乳類を複数種検出することができた。これらの結果から、樹幹流を用いた陸上哺乳類相モニタリングの可能性と今後の展望について議論する。

Recently, various sampling methods of eDNA have been attempted to detect terrestrial mammals. However, no established method has been reported until now. A recent study reported that eDNA exists in stemflow on trees and is useful as eDNA samples. In this research, we aimed to demonstrate the effectiveness and the detectable distance of stemflow eDNA for detecting terrestrial mammals. We conducted sampling from 11 trees in the Kobe Municipal Oji Zoo where mammal species and their range of action are clear. As results, we detected multiple mammal species in the zoo from stemflow eDNA with eDNA metabarcoding using MiMammal primers. Based on the results, we discuss possibilities of monitoring terrestrial mammals from stemflow with eDNA metabarcoding and its prospect.

【P-27】

イシガイ類の定量メタバーコーディングの試み

Quantitative Metabarcoding of Unionid Mussels

大井 和之¹

Kazuyuki Ooi¹

1. 一般財団法人九州環境管理協会

1. Kyushu Environ. Eval. Assoc.

タナゴ類の産卵母貝であるイシガイ類は河川生態系の中で重要な役割を果たしているが、その生息状況把握は容易ではない。環境 DNA 分析は、調査において貝類を採集する必要がなく、非侵襲的に生息状況を把握できる有望なツールである。環境 DNA の分析法には、対象種を絞って量的評価を行う種特異的解析（定量 PCR）とイシガイ類各種の在不在を一括して評価する網羅的解析（メタバーコーディング）があるが、いずれも一長一短がある。魚類の定量メタバーコーディング（qMiSeq）にならって人工 DNA を濃度標準として添加することで、リード数を標準化してサンプル間の比較を可能にし、イシガイ類の定量的メタバーコーディング解析法を構築した。

Unionid mussels, vital spawning hosts for bitterlings, play a crucial role in maintaining river ecosystems. However, assessing their habitat status has been challenging due to difficulties in detecting and monitoring these species. Environmental DNA (eDNA) analysis offers a non-invasive solution, allowing researchers to evaluate mussel habitats without physically collecting specimens. There are two primary methods of eDNA analysis: species-specific approaches like quantitative PCR, which enable the quantification of a target species, and metabarcoding, which provides a comprehensive assessment of species presence. We have developed a novel quantitative metabarcoding approach for Unionid mussels, adapting the quantitative metabarcoding technique used in fish studies (qMiSeq). By incorporating artificial DNA as a concentration standard, this method allows for standardization of read counts across samples, enabling accurate comparisons. This advancement enhances the ability to monitor and conserve Unionid mussel populations, offering a reliable tool for understanding their ecological status and contributing to better conservation strategies.

【P-28】

ダム湖の湖底に生息する甲殻類を環境DNA分析で把握するための試み

Attempt to understand crustaceans inhabiting the bottom of a dam reservoir by eDNA analysis.

稲川 崇史¹, 岡本 理央², 鵜 倩倩², 大杉 奉功³, 沖津 二郎¹, 坂本 正吾¹, 東 信行⁴, 梅田 信⁵, 源 利文²
TAKASHI INAGAWA¹, Rio OKAMOTO², Qianqian WU², Tomonori OSUGI³, Jiro OKITSU¹,
Shogo SAKAMOTO¹, Nobuyuki AZUMA⁴, Makoto Umeda⁵, Toshifumi MINAMOTO²

1. 応用地質株式会社, 2. 神戸大学, 3. 一般財団法人水源地環境センター, 4. 弘前大学, 5. 日本大学

1. OYO Corporation, 2. kobe Univ., 3. WEC, 4. Hirosaki Univ., 5. Nihon Univ.

ダム湖の湖底（水深：約 10～30 m）においてスジエビの生息を確認するとともに、生息密度の季節変化を確認した。このスジエビについて、環境 DNA 分析で生息の有無や生息密度の季節変化を検出可能か検討した。調査は 2023 年～2024 年に福島県の阿武隈川水系に位置する三春ダムで行った。環境 DNA 分析には、ダム湖内の 9 地点でバンドーン採水器を用いて採水したサンプルを使用した。採水は、採水地点の水深に応じ、表層～湖底付近までの複数の水深で行い、スジエビを対象とした種特定の分析を行った。スジエビの生息状況は、採水地点のうち 2 地点で、ソリネットを用いて確認した。本発表では、スジエビの捕獲結果と環境 DNA 分析結果を比較し、ダム湖におけるエビ類の生息調査における環境 DNA 分析の適用の可能性を報告する。

We confirmed the presence of lake prawn at the bottom of the dam reservoir (water depth: approx. 10-30 m) and seasonal changes in habitat density. We examined the possibility of detecting the presence or absence of lake prawn and seasonal changes in the density of lake prawn by eDNA analysis. The survey was conducted from 2023 to 2024 at Miharu Dam, located in the Abukuma River system in Fukushima Prefecture. Samples of water collected at nine points in the dam reservoir using a Van Dorn sampler were used for eDNA analysis. Water sampling was conducted at multiple depths from the surface to near the bottom, depending on the water depth at the sampling sites, and species-specific eDNA analyses were conducted for lake prawn. The habitat conditions of lake prawn were confirmed using sledge net at two of the water sampling sites. We compare the results of lake prawn captures with the results of eDNA analysis and report on the potential application of eDNA analysis in shrimp habitat surveys in dam reservoirs.

【P-29】

Comparison of Fish Assemblages Based on eDNA and Field Survey Results in Various Aquatic Environments

KYU JIN KIM¹, Jun-Hee Kwon¹, Keonhee Kim², Min-Ho Jang¹

1. Kongju National University, 2. Konkuk University

Environmental DNA (eDNA) enables the detection of organisms without direct specimen capture, significantly reducing the manpower and time needed for habitat and distribution surveys. This study aimed to compare fish species detected by eDNA-based surveys and field surveys across various aquatic environments. In April 2024, both survey methods were conducted in rivers (18 sites), estuaries (8 sites), and lakes (6 sites). Water samples for eDNA analysis were collected, filtered, and concentrated using CN and GF/F filters, with eDNA extracted and analyzed via metabarcoding of mitochondrial 16S rDNA on the Illumina MiSeq platform. Field surveys followed biological monitoring network guidelines. eDNA detected 1.6, 2.9, and 1.8 times more species in rivers, estuaries, and lakes, respectively, than field surveys, with significant differences in fish assemblages between the two methods. In lakes, *Luciogobius guttatus* was found in field surveys but not detected by eDNA. The dominant and subdominant species differed between the methods in most environments, except for *Zacco temminckii* as a subdominant species in rivers. Community similarity was more distinct in rivers and estuaries, while lakes showed 40% similarity. eDNA's ability to detect species through nucleotide sequences highlights its resolution advantage over traditional methods, but factors like water flow and external DNA sources may account for discrepancies between survey results.

A comparison of zooplankton eDNA survey methods and their application to genus-level indices in lake ecosystems

Yerim Choi¹, Hye-Ji Oh¹, Geun-Hyeok Hong¹, Dae-Hee Lee¹, Keun-Sik Kim², Keonhee Kim³, Jeong-Hui Kim⁴, Min-Ho Jang⁵, Ju-Duk Yoon², Kwang-Hyeon Chang¹

1. Kyung-Hee Univ., 2. National Institute of Ecology, 3. Human and Ecocare center, 4. EcoResearch Incorporated, 5. Kongju National Univ.

The eDNA analysis method has been actively utilized in the field of ecology, alongside rapid technological advancements, lower costs and effort, and reducing dependence on the skill level of the investigator. However, limitations remain in applying current eDNA analysis techniques for species-level surveys, due to issues like the lack of library data and the absence of primers suitable for organisms and taxonomic groups inhabiting the monitored regions.

Zooplankton, with their short life cycles and sensitivity to complex interactions between physical, chemical, and biological factors that cause community changes, can serve as effective bioindicators for assessing the health of lake ecosystems. For such bioindicators, indices can be constructed by combining indicator species, allowing the calculation of the index through genus- or family-level identification, which has lower resolution compared to species-level monitoring. Therefore, applying eDNA analysis for zooplankton can enhance the efficiency of monitoring and assessment when used for index calculation purposes.

In this study, to review methods for eDNA investigation and evaluation of zooplankton suitable for Korea's lake ecosystems, samples were collected from six lakes using four methods (littoral site, central surface/mid/bottom layer mixed, central full-depth net towing, and central full-depth individual alcohol extraction). The zooplankton species detected by metabarcoding from eDNA samples collected using each method were compared with those identified through microscopic analysis. Furthermore, zooplankton indices were calculated based on the OTU read counts of each genus identified via metabarcoding.

The analysis revealed that, at the species level, eDNA-based analysis detected more species than microscopic analysis across all sampling methods. The concordance rate between eDNA-based and microscopic analysis results was very low. Additionally, when comparing community indices, the differences among survey methods decreased compared to simple comparisons of species numbers and individual counts. In conclusion, while eDNA analysis has limitations in species-level biomonitoring, it shows potential for application in index-based assessments.

【P-31】

南三陸町内の河川における魚類相の把握とオオクチバスの移入状況

Investigation of the fish fauna and introduction of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) in four rivers in Minamisanriku Town using environmental DNA metabarcoding

鈴木 将太¹, 阿部 拓三¹

Shota Suzuki¹, Takuzo Abe¹

1. 南三陸ネイチャーセンター

1. Minamisanriku Nature Center

宮城県北部太平洋岸に位置する南三陸町には、志津川湾に流入する小規模な9河川が存在する。町中心部を流れる八幡川では採集と環境DNA法による魚類相調査が行われているが、他の河川は情報がほとんどない。2023年6月、町北部を流れる伊里前川より町内河川で初めてオオクチバスが捕獲され、魚類相の把握が急務となった。そこで2023年11月、町内を流れる伊里前川、八幡川、水尻川、水戸辺川で、魚類相とオオクチバスの移入の有無を、環境DNAメタバーコーディング法により調査した。採水は各河川それぞれ下流域、中流域、上流域を選定し、1-4地点で行った。その結果、伊里前川で23OTU、八幡川で6OTU、水尻川で18OTU、水戸辺川で20OTUが検出された。オオクチバスは、伊里前川の全地点で検出されたが、他の河川では検出されなかった。今後も、伊里前川を含む町内の他の河川における魚類相モニタリング及び監視は必要である。

There are nine small streams in Minamisanriku Town, Miyagi Prefecture. In Hachiman River which flows through the center of the town, a survey of the fish fauna has been conducted using hand net collection and environmental DNA methods, but little is known about another river. In 2023, Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) were caught for the first time from Isatomae river in the northern part of the town, indicating the importance of understanding the fish fauna. So, in November 2023, we investigated fish fauna and introduction of Largemouth Bass using environmental DNA metabarcoding in the Isatomae, Hachiman, Mizusiri, and Mitobe Rivers that flow through the town. Water samples were collected at 1-4 site, selecting downstream, midstream and upstream of each river respectively. As a result, 23 OTU were detected in the Isatomae River, 6 OTU in the Hachiman River, 18 OTU in the Mizusiri River, and 20 OTU in the Mitobe River. Largemouth Bass were detected at all sites in the Isatomae River, but not in the other rivers. Monitoring and surveillance of fish fauna in other rivers in the town, including the Isatomae River, will continue to be necessary.

【P-32】

岡山平野における在来および外来タナゴ類の分布に関する研究

Study on the distribution of native and non-native bitterling fish in the Okayama Plain

藤野 栞太¹, 源 利文¹

Kanta Fujino¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学

1. Kobe university

近年、淡水生態系における生物多様性の減少が著しくみられる。岡山平野のスイゲンゼニタナゴの生息域では、国内外来種であるカゼトゲタナゴや国外外来種である *R. notatus* による侵入や3種の交雑が問題となっており、スイゲンゼニタナゴの個体数の減少がみられる。しかし、3種は類似しているため目視による判別は困難である。そこで、本研究では在来種であるスイゲンゼニタナゴ、外来種であるカゼトゲタナゴ、*R. notatus* を対象として、環境DNAを用いて複数の対象種を同時に検出することができるマルチプレックスプローブ法を用いて実験を行い、3種の分布調査を行った。本発表では、岡山平野の砂川や吉井川、その周辺水路で採水を行い、在来種と外来種の生息域の境界線を調査について報告する。さらに在来種であるスイゲンゼニタナゴの生息域に外来種であるカゼトゲタナゴ、*R. notatus* を侵入させないための方策について考察する。

In recent years, there has been a marked decline in biodiversity in freshwater ecosystems. In the habitat of the *Rhodeus atremius suigensis* in Okayama Plain, invasion and hybridization by the domestic invasive species, *R. atremius*, and the exotic invasive species, *R. notatus*, have become problems. There has been a decline in the pure population of the *R. atremius suigensis*. However, visual identification of the three species is difficult because of their similarity. Therefore, in this study, we conducted experiments using eDNA based multiplex probe method, which can simultaneously detect multiple target species for the native *R. atremius suigensis*, and the non-native species, *R. atremius* and *R. notatus*, and surveyed the distribution of the three species. Water sampling was conducted in the Sunagawa and Yoshii-gawa Rivers and their surrounding waterways in Okayama Plain to investigate the invasion front of non-native species. Furthermore, we will discuss countermeasures to prevent the invasion of the non-native species into the habitat of the native species.

ENVIRONMENTAL DNA METABARCODING (eDNA) AS A TOOL FOR BIODIVERSITY MONITORING AND RESOURCE MANAGEMENT IN NAKAMA RIVER, IRIOMOTE ISLAND, OKINAWA, JAPAN

Marizka Juliano^{1,2}, Bernadeth Grace Pananganan^{1,3}, Saki Sugawara^{1,3}, Yukinobu Isowa¹, Tadashi Kajita^{1,3}

1. TBRC Iriomote, Univ. Ryukyus, Japan, 2. IMBRSea, Universiteit Gent, Belgium, 3. UGSAS, Kagoshima Univ., Japan

Effective conservation relies not only on the community with strong sense of management but also on timely baseline data availability. Environmental DNA (eDNA) has been increasingly used as a biodiversity assessment tool that can provide fast, accurate and cost-effective data. Iriomote Island has been listed as a UNESCO World Heritage Site due to its unique biodiversity, and 90% of the island is protected as a National Park. Mangrove rivers are essential landscape shaping the unique nature of Iriomote Island, but no regular fish census and monitoring have been conducted. We used eDNA metabarcoding by MiFish Primers to identify fish biodiversity in Nakama River that fosters the largest mangrove area in Iriomote Island and highly managed by local community. Water samples were collected in December 2023 and April 2024, and a total of 237 fish OTUs in which 145 fish species, 115 genera and 52 family were annotated, including endangered species (*Anguilla japonica*, *Toxotes jaculatrix*, *Mesopristes argenteus*, *Stiphodon imperorientis*, etc), and exotic/invasive species (*Oreochromis sp.*) were detected. Both samplings showed similar trends wherein the peak number of species detected were at mid-river sites (mix mangroves and *Brugiera gymnorhiza* dominated), followed by marine (river mouth and port), and fresh water (river head) recorded the fewest. The study is successful in providing relevant and useful baseline data on fish biodiversity, particularly reinforcing the need to protect and conserve the mangrove ecosystem in Nakama River due to its high biodiversity. It also showed that eDNA metabarcoding can be used for future monitoring activities.

[P-34]

Exploring Fish Biodiversity in Urauchi River Mangroves: An eDNA Metabarcoding Study of Longest River in Okinawa, Japan

Bernadeth Grace Suerte Pananganan^{1,2}, Yukinobu Isowa², Maria Daniela Artigas Ramirez², Tadashi Kajita^{1,2}

1. UGSAS Kagoshima University, 2. TBRC University of the Ryukyus

Mangrove ecosystems play a crucial role in supporting fish biodiversity, particularly in tropical and subtropical regions. This study investigates the ichthyofaunal diversity of the Urauchi River, the longest river in the Ryukyu Archipelago, in Iriomote island listed as a UNESCO World Natural Heritage site. Urauchi river is recognized for its complex ecosystems that harbor numerous endemic and endangered fish species. Despite its ecological importance, comprehensive assessments of biodiversity in this river using advanced molecular techniques have been limited. We conducted a study on fish biodiversity by sampling at ten locations along the river, from the estuary to the waterfall, complemented by two tidal sampling points to examine variations in community composition. Environmental DNA (eDNA) was collected using Sterivex filters, extracted using Qiagen PWS protocols, and sequenced with MiFish primers on the Illumina NovaSeq 6000 platform (PE150). Data analysis was performed using the QIIME 2 pipeline to identify operational taxonomic units (OTUs). Our findings identified 362 Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) across 62 families and 188 genera, including five species classified as Vulnerable(VU), one as Endangered(EN), and six as Critically Endangered(CR) by the Ministry of the Environment in Japan. Species distribution varied significantly along the river gradient, with higher OTU richness observed at the river mouth. Tidal sampling alone yielded 250 OTUs, with greater detection during spring compared to neap tide, underscoring the ecological significance of mangrove habitats. This research demonstrates the efficacy of eDNA metabarcoding as a rapid assessment tool for fish biodiversity in complex riverine ecosystems.

【P-35】

迷惑な外来珪藻ミズワタクチビルケイソウ検出ツールの開発と分布解析

Development of a detection tool and distribution analyses for the nuisance alien diatom *Cymbella janischii*

鶴木(加藤)陽子¹, 洲澤多美枝², Tran Thu Trang¹, 源利文³, 増田賢嗣⁴, 坪井潤一⁴, 清野聡子¹
Yoko Kato-Unoki¹, Tamie Suzawa², Trang Tran Thu¹, Toshifumi Minamoto³, Yoshitsugu Masuda⁴,
Jun-ichi Tsuboi⁴, Satoquo Seino¹

1.九州大学, 2.(有)河川生物研究所, 3.神戸大学, 4.水産研究・教育機構

1. Kyushu Univ., 2. Institute of River Biology Ltd., 3. Kobe Univ., 4. FRA

Cymbella janischii is an alien diatom species that has recently invaded Japan. Its algal blooms raise concerns about their impact on the ecosystem. In a previous study, we developed specific detection assays that distinguish a single-base difference at the 3' end of the primer for *C. janischii* from benthic environmental DNA. However, these assays are sometimes difficult to perform in river water samples with admixture DNA and low target DNA. Hence, in this study, we developed an additional probe for an existing assay and attempted to verify the accuracy of the probe-based detection and investigate the distribution in two river systems, the Kase River and the Chikugo River systems. Reagent used were common ones, with UNG (Uracil-DNA Glycosylase) system. This newly developed assay revealed improved specificity and sensitivity. Although detection can be opportunistic if the abundance is very low, it showed positive correlations with microscopic observation results. From monitoring and distribution analyses, we found that some rivers were less likely to form colonies even after invasion, whereas others repeated the blooms when conditions were right, even once they disappeared. Currently, *C. janischii* monitoring has been attempted using environmental DNA archives with this detection assay, showing good results. This detection tool will help to understand the ecology and the blooming factors of *C. janischii*.

【P-36】

耕作放棄地におけるセトウチサンショウウオの分布を規定する要因の推定

Estimation of environmental factors regulating the distribution of Setouchi salamanders in abandoned farmland

松本 奈々¹, 坂田 雅之², 國政 祐太¹, 山本 優奈¹, 源 利文¹

Nana Matsumoto¹, Masayuki K. Sakata², Yuta Kunimasa¹, Yuna Yamamoto¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学, 2. 北海道大学

1. Kobe Univ., 2. Hokkaido Univ.

ため池は農業用水の確保だけでなく、希少種の隠れ家として生物多様性保全に重要な役割をはたしている。しかし近年、農業従事者の高齢化や後継者不足によってため池を含む農地の耕作放棄が進み、豊かな生物多様性が失われる可能性がある。現在、耕作放棄が小型サンショウウオ類の分布にどのような影響を与えるのかはよくわかっていない。そこで本研究は、神戸市の耕作放棄地におけるセトウチサンショウウオをモデルとして、その分布を規定する要因を推定することを目的とした。11のため池を1年にわたり月1回調査し、本種のeDNAの有無を調べるとともに水質項目を測定した。結果、すべてのため池で本種のeDNAが検出されたが、ため池の溶存酸素濃度が低下すると本種のDNA検出が有意に下がることが示された。このことから、耕作放棄に伴いため池が管理されず溶存酸素濃度が低下すると、本種の幼生の生残に悪影響を与えている可能性が示唆された。

Agricultural ponds play an important role in preserving biodiversity by providing shelter for rare species. In recent years, however, the aging of farmers and the lack of successors have led to the abandonment of farmland, including ponds, which may result in the loss of rich biodiversity. Currently, it is not well understood how abandoned farmland affects the distribution of small salamanders. The objective of this study was to estimate the factors that determine the distribution of the small salamander species in abandoned fields. The 11 ponds were surveyed once a month for one year using eDNA analysis to determine the presence or absence of eDNA of *Hynobius setouchi*, and water quality parameters were measured. As a result, eDNA of this species was detected in all ponds; however, the eDNA detection significantly decreased as the dissolved oxygen concentration in the ponds decreased. This suggests that the survival of larvae of this species may be negatively affected when the ponds are not managed due to abandonment of cultivation and the concentration of dissolved oxygen is lowered.

【P-37】

瀬田川におけるチャンネルキャットフィッシュの分布とその季節変化

Distribution of channel catfish in the Seta River and its seasonal changes

石田 結子¹, 堀江 怜平², 松田 涼², 中村 昌文², 石崎 大介³, 山本 充孝³, 山中 裕樹¹
Yuiko Ishida¹, Ryouhei Horie², Ryo Matuda², Masafumi Nakamura², Daisuke Ishizaki³,
Michitaka Yamamoto³, Hiroki Yamanaka¹

1. 龍谷大学, 2. 株式会社日吉, 3. 滋賀県水産試験場

1. Ryukoku University, 2. Hiyoshi Corporation, 3. Shiga Pref. Fisheries Experiment Station

特定外来生物に指定されているチャンネルキャットフィッシュは、琵琶湖から流れ出る瀬田川に生息しており、生態系や周辺水域の漁業において大きな問題を引き起こしている。瀬田川や、その下流にある天ヶ瀬ダムでの繁殖が懸念されているが情報は少なく、また瀬田川と琵琶湖の間には洗堰しか障壁となるものがないため、それを境とした上下流での分布特性を知る必要がある。

そこで、瀬田川における同種の分布と季節動態を明らかにする目的で、2023年4月から12月にかけて琵琶湖南湖から天ヶ瀬ダム下流までの27地点で月1～2回、計18回の環境DNA調査を行った。

その結果、堰の下流側ではチャンネルキャットフィッシュの環境DNAが季節と場所に寄らず遍在し恒常的に検出された一方で、上流側では格段に検出頻度が低かった。よって検出率が高い堰下流でのコントロールが重要であると考えられる。

The channel catfish, designated as an invasive alien species, inhabits the Seta River, which flows out of Lake Biwa, causing significant issues for the ecosystem and fisheries in surrounding water bodies. While concerns are pointed out about its reproduction in the Seta River and downstream at the Amagase Dam, available information is limited. Furthermore, the Seta Weir, which separates the Seta River and Lake Biwa, is considered as the only physical barrier preventing the movement of the fish between the two habitats, so the understanding of the distribution characteristics of this species both upstream and downstream of the weir is crucial.

To clarify the distribution and seasonal dynamics of the species in the Seta River, an environmental DNA (eDNA) survey was conducted 18 times from April to December 2023, at 27 locations from the southern part of Lake Biwa to downstream of the Amagase Dam, with 1-2 surveys per month.

The results showed that channel catfish eDNA was ubiquitously and consistently detected downstream of the weir, regardless of season or location, while the detection frequency was significantly lower upstream. Therefore, controlling the population downstream of the weir, where the detection rate is higher, is deemed crucial.

【P-38】

環境 DNA を用いた流域網羅的な魚類多様性の季節変化に関する検討

A Study on the Seasonal Change of Basin-wide Fish Diversity Using Environmental DNA

滝山 路人¹, 宮園 誠二¹, 中尾 遼平¹, 赤松 良久¹

Michihito Takiyama¹, Seiji Miyazono¹, Ryohei Nakao¹, Yoshihisa Akamatsu¹

1. 山口大学大学院

1. Yamaguchi University

本研究では、流域網羅な魚類多様性の季節変化を把握するために、2022年の春と秋に高津川、高梁川で環境 DNA 調査を実施し、環境 DNA 定量メタバーコーディング法で得られた複数魚種の環境 DNA 濃度を用いて、魚種数、Simpson 多様度指数、河川環境健全性指標を算出した。魚種数は季節間で大きな空間分布の変化はなく、高梁川の本川で魚種数が多い傾向であった。一方で、Simpson 多様度指数は春から秋にかけて高津川の下流で顕著に減少し、種の在不在のみでは把握できない季節的な魚類多様性の変化を把握可能であった。また、魚類の生物学的指数を用いた河川環境健全性指標は春の高津川で顕著に高い傾向であり、秋の高津川、高梁川では流域全体で低いことが明らかとなった。以上より、広域かつ複数季節における環境 DNA 調査を実施し、魚類多様性を定量的に評価することで、季節間の魚類多様性の変化を把握可能であることが明らかとなった。

In this study, we aimed to understand the seasonal change in fish diversity across river systems by conducting environmental DNA (eDNA) survey in the Takatsu River and Takahashi River in the spring and fall of 2022. Using eDNA quantitative metabarcoding, we measured the eDNA concentrations of multiple fish species and calculated fish species richness, Simpson's diversity index, and a river health index based on biological indicators. The results showed that the spatial distribution of species richness did not significantly differ between the seasons, and the main channel of the Takahashi River had the highest species richness. In contrast, Simpson's diversity index significantly decreased in the downstream region of the Takatsu River from spring to fall, suggesting that seasonal changes in fish diversity were not captured by species presence alone. Additionally, the river health index was notably higher in the Takatsu River during spring, but lower across the entire watershed in both rivers during fall. These findings demonstrate that comprehensive eDNA surveys across broad spatial areas and multiple seasons can effectively capture seasonal changes in basin-wide fish diversity.

【P-39】

環境 DNA を用いた結氷期の厚岸湖における魚類相推定

Estimate of Fish Fauna Under the Ice in Lake Akkeshi Using Environmental DNA

西谷 航平¹, 坂田 雅之¹, 神戸 崇¹, 小林 由美¹, 荒木 仁志¹

Kohei NISHITANI¹, Masayuki K SAKATA¹, Takashi KANBE¹, Yumi KOBAYASHI¹, Hitoshi ARAKI¹

1. 北海道大学

1. Hokkaido Univ.

結氷した汽水湖の下でどのような魚類が生息しているかを網羅的に調べた研究は極めて少ない。本研究では、北海道東部に位置する厚岸湖における結氷期の魚類相を明らかにするため、2021年1月から3月にかけて月ごとに湖内8地点での環境水採取を行い、MiFish 環境 DNA メタバーコーディング解析を実施した。その結果、結氷期のサンプル全体から18種以上の魚類由来 DNA が検出された。また、非結氷期にあたる2020年7月から12月に同一地点で採取したサンプルと比較した解析結果から、結氷期の種数や種構成の違いが、非結氷期と異なる傾向を持つ可能性が示唆された。

Few studies have examined the fish species that inhabit brackish lakes under the ice cover. In this study, we conducted monthly environmental water sampling at eight sites in Lake Akkeshi, eastern Hokkaido, Japan, from January to March 2021, to estimate the fish fauna during the ice-covered period using MiFish eDNA metabarcoding analysis. As a result, we detected more than eighteen fish species during the ice-covered period. In addition, the comparison with samples from the non-ice-covered period (July to December, 2020) suggested different trends in fish species composition, including variations in species richness and relative proportions compared to the ice-covered samples.

【P-40】

三陸地方の沿岸魚類群集を特徴づける要因

Factors characterizing coastal fish communities in the Sanriku region

辛海渡¹, 宮本 竜也¹, 元松直馬¹, 田辺 晶史¹, 岩崎 藍子¹, 村上 弘章¹, 星川 莞爾¹, 深澤 陸¹, 笠原 剛樹¹, 岩下 源¹, 太田 圭祐¹, 三田村 碧¹, 篠原 直登², 笠田 実³, 近藤 倫生¹

Kaito Shin¹, Tatsuya Miyamoto¹, Naoma Motomatsu¹, Akifumi Tanabe¹, Aiko Iwasaki¹, Hiroaki Murakami¹, Kanji Hoshikawa¹, Riku Fukasawa¹, Goki Kasahara¹, Gen Iwashita¹, Keisuke Ohta¹, Aoi Mitamura¹, Naoto Shinohara², Minoru Kasada³, Michio Kondoh¹

1. 東北大学, 2. 京都大学, 3. 北海道大学

1. Tohoku University, 2. Kyoto University, 3. Hokkaido University

沿岸の生態系は、日本の水産業を中心とした産業に大きな影響を与える生態系である。沿岸域は沖合や河川からの水の流入や、それに伴う生物の移出入が行われるため、その生物群集の成り立ちは複雑になっている。三陸地方はリアス式海岸によって多数の湾が構成されており、湾ごとに開口度や河川流入の量などが異なっている。そこで本研究では、三陸地方の18湾54地点で環境DNA採水調査を行い、メタバーコーディング法によって各地点の沿岸魚類群集の組成を明らかにし、魚類群集やその多様性を決める要因を調べることにした。解析の結果、ある1シーズンでは検出した種の過半数が、検出した地点が3地点以下となるなど、希少種が大部分を占めることがわかった。また、頻出した種で群集組成の類似度を調べた結果、湾内や近い湾の群集組成が似る、などの地点間の関係が群集に反映することを示唆する結果が得られた。

In Japan, ecosystem in coastal area is important for fisheries and other industries. Coastal areas are connected with rivers and offshore, then Fish community are formed through complex processes. The Sanriku region is composed of many bays along the rias coast, which each bay are different in water flow amount and other environmental factor. In this study, we conducted environmental DNA metabarcoding surveys at 54 sites in 18 bays in the Sanriku region, and investigate which factor detect each community's composition. First we revealed that the majority of species detected were rare species, which detected in less than 3 site in one season. The results of community composition similarity for major species indicated that community compositions were similar within bays and in nearby bays, suggesting that geological structure reflect community compositions.

【P-41】

藻場における環境 DNA 量の年間推移

An Annual trends of Environmental DNA quantity in algae bed.

牧野 健一¹, 横田 雅弘¹, 藤井 俊樹¹, 阿部 由克¹, 飯塚 徹谷¹, 前田 傑¹, 金谷 智¹, 日野 淳郎¹
Kenichi MAKINO¹, Masahiro YOKOTA¹, Toshiki FUJII¹, Yoshikatsu ABE¹, Tetsuya Iiduka¹, Takashi MAEDA¹,
Satoshi KANATANI¹, atsurou HINO¹

1. 公益財団法人ひょうご環境創造協会

1. Hyogo Environmental Advancement Associat

藻類は CO2 固定に寄与しており, カウントすれば将来的にブルーカーボンとしてクレジット化につながる。一方で, 藻類の広範囲な潜水目視調査は多大な労力を伴うため, 面積の確からしさ (クレジット算定で申告する藻場有無の判別精度) を空中写真の併用で担保するなど, 効率化が望まれている。我々は既存調査を補う簡便で効率的な手法として, 環境 DNA 分析で藻類の実態把握が可能か調査した。対象は大阪湾フェニックスセンター埋立処分場の代表種シダモク, タマノハキモク, ワカメ, マクサの 4 種。調査地は, 神戸沖と大阪沖の埋立処分場でそれぞれ 40 地点。加えて, 藻類は生活史の中で大きく姿が異なるため, 須磨海岸の藻場 2 ヶ所で通年調査を実施した。結果として, 埋立処分場では, マクサ, タマノハキモクの環境 DNA 量分布と潜水目視調査の結果に大幅な乖離はなかった。須磨海岸では, 環境 DNA 量の年間推移から, それぞれの藻類の採水適期がわかった。

Algae contributes to fix CO₂, and to count it, will be credit as blue carbon. However, in wide underwater survey requires expensive deal and effort, thus aerial photographs and other methods are used together to efficiently ensure the accuracy of the area (the accuracy of determining the presence or absence of algae beds to be declare in the credit calculation). We investigated whether environmental DNA can be used to grasp the actual state of algae as a simple and efficient survey method to supplement existing survey methods. Targets are four representative species of algae at the Osaka Bay Phoenix Center landfill site: *Sargassum filicinum*, *Sargassum muticum*, *Undaria pinnatifida*, and *Gelidium elegans*. The survey sites are each 40 respectively upon KOBE and OSAKA landfill sites. And at SUMA beach in tow algae beds, we survey environment DNA quantity around year because appearance of algae varies greatly during their life cycle. As a result, at landfill site, *Gelidium elegans* and *Sargassum muticum* had no significant discrepancy was found between distribution of the environmental DNA quantity and underwater survey. At Suma Beach, the optimal season to gusher environmental DNA sample for each algae species was identified.

【P-42】

環境 DNA を用いた特定外来生物カワヒバリガイの分布調査と環境 DNA 濃度の評価

Distribution Survey of the Invasive alien Species *Limnoperna fortunei* Using Environmental DNA and Evaluation of eDNA Concentration

平田 真二¹, 滝澤 将弥¹, 井上 綾佳¹, 伊藤 健二²
Shinji Hirata¹, Masaya Takizawa¹, Ayaka Inoue¹, Kenji Ito²

1. 株式会社エコー, 2. 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

1. ECOH CORPORATION, 2. NARO

霞ヶ浦では特定外来生物カワヒバリガイの分布が 2010 年代に急速に拡大し、農業用水路網などを通じて他水系に拡散する被害を生じている。これら拡散を早期に発見する手法として、環境 DNA の活用が期待されている。本研究では、カワヒバリガイを特異的に検知できるプライマーを用い、霞ヶ浦及び周辺水系の環境 DNA 調査を行うとともに、浮遊幼生数、親貝の個体密度を調査し、それぞれの相関を検討した。この結果、環境 DNA を用いることで、高い感度でカワヒバリガイの有無を検出できること、環境 DNA 濃度はカワヒバリガイの個体密度調査をダイレクトに表わさず、値が大きくばらつくこと等が確認された。また、霞ヶ浦湖岸や河川の一部でカワヒバリガイの密度・環境 DNA 濃度共に低い水域が確認された。これらの水域を選択的に水源とすることで、霞ヶ浦の水を利用する現場での被害を抑制できる可能性が考えられた。

The distribution of *Limnoperna fortunei*, the invasive alien species, has rapidly expanded in Lake Kasumigaura and to the other river systems through agricultural irrigation channels since the 2010s causing several environmental damages. Environmental DNA (eDNA) is expected to be an effective indicator for the early detection of such expansion. In this study, we examined correlations among eDNA concentration in and around the Lake Kasumigaura surveyed with the use of species-specific primers for *Limnoperna fortunei*, the number of floating larvae, and the parents' population density. The results showed that using eDNA makes it feasible to detect the presence of *Limnoperna fortunei* at a highly sensitive level. However, it was also found that eDNA concentration does not directly correlate with the population density of *Limnoperna fortunei*, showing the significant variability. Additionally, some areas of the lakeshores or rivers were identified as having both at a low level, population density and eDNA concentration. Therefore, it is implied that selecting these areas as water sources leads to mitigate the damages by *Limnoperna fortunei* when it comes to the water use of Lake Kasumigaura.

【P-43】

琵琶湖におけるブラックバス類の時空間的分布動態の解明

Elucidating the spatiotemporal distribution dynamics of black bass species in Lake Biwa

岡田 淳史¹, 脇村 圭², 内井 喜美子², 邬 倩倩¹, 源 利文¹

Atsushi Okada¹, Kei Wakimura², Kimiko Uchii², Qianqian Wu¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学, 2. 大阪大谷大

1. Kobe Univ., 2. Osaka Ohtani Univ.

北米原産のブラックバス類は、世界各地に移入され、捕食や競争を通じて現地の在来種に大きな影響を与えている。日本では、1925年に導入されたオオクチバスが全国に定着し、さらにはフロリダバス、コクチバスが急速に分布を拡大し、深刻な問題となっている。本研究では環境DNA分析を用いて、琵琶湖においてこれらブラックバス類の環境DNA定量、およびミトコンドリアD-loop領域のハプロタイプ解析を通じて、その分布解明を目指す。定量には、オオクチバス、コクチバスについては既存の検出系を用い、フロリダバスについては種特異的検出系を新たに作成した。ハプロタイプ解析は既報のプライマーを用いた。琵琶湖の21地点で3季節の採水を実施し、過去の同地点・同季節サンプルと比較することで時空間的に分布動態を解明する。これらの結果から、今後の琵琶湖におけるブラックバスの防除および施策効果の測定に役立つ方法について議論する。

Black bass species, a freshwater fish native to North America, have been introduced to many areas of the world, greatly affecting local native species through predation and competition. In Japan, the largemouth bass, introduced in 1925, has become established throughout the country, but in recent years, the rapid expansion of the distribution of Florida bass and smallmouth bass has become a serious problem. In this study, we aim to elucidate the distribution of these black bass species at multiple sites in Lake Biwa by quantifying their eDNA and haplotyping their mitochondrial D-loop regions. For Florida bass, a new species-specific assay was developed. Haplotype analysis was conducted using primers previously reported. Three seasons of sampling were conducted at 21 sites in Lake Biwa to elucidate spatiotemporal distribution dynamics by comparing with past same-site and season samples. From these results, we will discuss methods that will be useful for future control of black bass species in Lake Biwa and for measuring the effectiveness of measures.

【P-44】

HydroGen: Integration of DNA-based assessment tools into water quality and biodiversity monitoring with a focus on invertebrates and microbes

Robert Moise¹, Michael Connell¹, Jens Carlsson¹, Mary Kelly-Quinn¹

1. University College Dublin

Traditional monitoring surveys often face challenges due to difficulties in species identification, low detection probabilities, and invasive methods. This research aims to assess the potential of DNA-based methods to complement and enhance traditional monitoring for the European Water Framework Directive across various biological quality elements and regulatory targets. This is one of two PhDs within the EPA-funded HydroGen project, which monitors 40 freshwater sites across Ireland with seasonal and annual sampling to assess species distributions. This study focuses on two critical groups: invertebrates and microbial communities, both essential to ecosystem health. Invertebrates play key roles in nutrient cycling, habitat formation, and food webs, besides being used as bioindicators of water quality. Microbial communities, while crucial for a number of reasons, are still rarely used in biomonitoring. DNA-based methods, such as metabarcoding, promise to offer scalable and accurate results for biodiversity evaluation. This study is guided by four hypotheses, testing whether eDNA reveals greater species richness, investigating if it can support water quality assessments, exploring if it correctly identifies human and animal contributions to microbial composition (MST), and evaluating if it outperforms traditional methods in terms of efficiency and cost. The scope of the project is to compare traditional and genetic approaches, while also developing new DNA-based metrics and generating novel data on Irish species. This approach offers an opportunity to expand the scale and frequency of current monitoring efforts, supporting regulatory bodies and progressing the understanding of species diversity and distribution in Irish waters.

【P-45】

環境 DNA を用いた沿岸養殖が魚類群集に与える空間的影響の評価

Assessment of the Spatial Impact of Coastal Aquaculture on Fish Communities Using Environmental DNA

星川 莞爾¹, 近藤 倫生¹

Kanji Hoshikawa¹, Michio Kondoh¹

1. 東北大学大学院生命科学研究所

1. Tohoku University

沿岸養殖が周辺の海洋生態系にさまざまな影響を与えることは知られているが、広範囲かつ多地点での比較や評価は十分ではない。本研究では、環境 DNA メタバーコーディングを用いて、日本沿岸の 552 地点における魚類群集を解析し、養殖が魚類群集に与える影響を空間的に評価した。養殖のタイプを給餌の有無に基づいて分類し、一般化加法モデルを用いた解析を行った結果、養殖は特定の生息地における種多様性に影響を与えることが確認された。本研究は、広域的な生態系管理や持続可能な養殖の指針策定に貢献する重要な知見を提供する。

Coastal aquaculture is known to have various impacts on surrounding marine ecosystems, yet large-scale and multi-site comparisons remain insufficient. In this study, we analyzed fish communities at 552 coastal sites in Japan using environmental DNA metabarcoding to spatially assess the effects of aquaculture on fish communities. We classified aquaculture types based on the feeding and applied a generalized additive model for analysis. The results confirmed that aquaculture affects species diversity in specific habitats. This study provides insights that contribute to broad-scale ecosystem management and the development of guidelines for sustainable aquaculture.

【P-46】

環境 DNA 網羅的解析に基づく河川生息魚種情報の提供と水環境・生物多様性保全への展開

Provision of Fish Species Information Based on Comprehensive Environmental DNA Analysis in Rivers and Its Application to Water Environment and Biodiversity Conservation

木持 謙¹, 田中 仁志¹, 渡邊 圭司¹, 環境部 水環境課²

Yuzuru Kimochi¹, Hitoshi Tanaka¹, Keiji Watanabe¹, Dept. of Env. Water Env. Div.²

1. 埼玉県環境科学国際センター, 2. 埼玉県

1. Center for Env. Sci. in Saitama, 2. Saitama Prefectural Government

埼玉県では河川水質の改善が進み、魚類等の生物多様性の保全や回復が重要な位置づけとなっている。そこで本県では、河川等での水生生物の生息実態の詳細な把握のための有望な調査法として、環境 DNA 分析の導入に取り組んできた。公共用水域水質常時監視事業の河川での調査地点を中心に、魚類環境 DNA 網羅的解析を行った結果を「埼玉県川のおさかな環境 DNA マップ」として水環境課が公開している。このマップでは、地点ごとの DNA 検出魚種、対象魚種 DNA の検出地点、の 2 種類の出力ができる。私たちは、県政出前講座・環境学習・各種イベント等で、環境 DNA 生物調査技術やマップの紹介を通じて、住民の水環境や水生生物への興味の引き起こしや、河川・生物愛護活動への積極的な参加を図っている。河川愛護団体等が生物調査を実施する際、環境 DNA 分析による魚類調査の依頼も舞い込むようになった。今後も幅広く技術や成果の広報を行っていく。

In Saitama Prefecture, river water quality, evaluated mainly from BOD, has improved, and the preservation and restoration of biodiversity, including fish species, has become increasingly important theme. To this end, we have been working on the introduction of environmental DNA (eDNA) analysis as a promising method for obtaining detailed information on the habitats of aquatic organisms in rivers and other water bodies. Focusing on survey points in rivers monitored under the Water Quality Continuous Monitoring Program in Public Waters, we conducted comprehensive eDNA analysis of fish species. The results have been made publicly available by the Water Environment Division as the "Saitama Prefecture River Fish Environmental DNA Map." This map allows users to output two types of information: detected fish species at each location and locations where specific fish species' DNA has been detected. Through outreach lectures, environmental education, and various events, we aim to increase public interest in water environments and aquatic organisms by introducing eDNA biological survey techniques and the "eDNA map". As a result, more requests for fish surveys using eDNA analysis have been received from river conservation groups conducting biological surveys. We will continue to widely promote the technology and its findings in the future.

【P-47】

陸水の環境試料を用いた環境 DNA による陸生・水生生物調査方法の検討

Investigation of a method for surveying terrestrial and aquatic organisms using environmental DNA from terrestrial waterside samples

平川 周作¹, 更谷 有哉¹, 石間 妙子¹, 金子 洋平¹, 中島 淳¹, 香月 進¹

Shusaku Hirakawa¹, Yuya Saratani¹, Taeko Ishima¹, Yohei Kaneko¹, Jun Nakajima¹, Susumu Katsuki¹

1. 福岡県保健環境研究所

1. FIHES

陸域の水辺における環境試料について、環境 DNA メタバーコーディング分析による陸生・水生生物調査方法を検討した。本研究では、河川及び池の環境水、採水地点の底質（土壌）を試料として用いた。試料ごとに MiFish, MiBird, MiMammal プライマーでメタバーコーディング分析を実施した結果、検出された種の総数は各プライマーが標的とする生物群が最も多かったものの、標的生物群と異なる種も複数検出された。また、調査時に目視で観察できた種や自動撮影カメラでの撮影回数が多かった種は、環境試料の媒体に関わらず環境 DNA による検出率も高かった。発表では、試料の状態やサンプリング時の状況の違いから得られた知見についても紹介する。本研究の一部は、厚生労働行政推進調査事業費補助金 21HA2006 及び JSPS 科研費 JP22K04390 の助成を受けて実施した。

Methods for surveying terrestrial and aquatic organisms using environmental DNA metabarcoding analysis of samples from terrestrial water bodies were examined. This study used environmental samples of water from rivers and ponds, as well as bottom sediment (soil) at the water sampling points. Metabarcoding analysis using the MiFish, MiBird, and MiMammal primers for each sample revealed that the total number of species detected was highest for the organism group targeted by each primer, whereas several nontarget species were also identified. Species that were visually observed during the survey and frequently captured by camera traps had higher DNA detection rates, regardless of the environmental sample medium. At the presentation, findings from different sample conditions and sampling situations will also be presented. This research was partially supported by Health, Labour and Welfare Policy Research Grants 21HA2006 and JSPS KAKENHI Grant Number JP22K04390.

【P-48】

ラオスサバナケット州におけるタイ肝吸虫の分布要因の推定

Estimation of distribution factors of *Opisthorchis viverrini*, in Savannakhet province, Lao PDR

松尾 莉子¹, Prasayasith Phoyphaylinh², Valencia Joseph², Revolteado Mark June², Adisakwattana Poom³, Yoonuan Tippayarat³, Phuphisut Orawan³, Limpanont Yanin³, Sato Marcello⁴, サトウ 恵², Pongvongsa Tiengkham⁵, 源 利文¹

Riko Matsuo¹, Phoyphaylinh Prasayasith², Joseph Evangelista Valencia², Mark June Valiente Revolteado², Poom Adisakwattana³, Tippayarat Yoonuan³, Orawan Phuphisut³, Yanin Limpanont³, Marcello Otake Sato⁴, Megumi Sato², Tiengkham Pongvongs⁵, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学, 2. 新潟大学, 3. マヒドン大学, 4. 新潟薬科大学, 5. ラオス国サバナケット保健局

1. Kobe Univ., 2. Niigata Univ., 3. Mahidol Univ., 4. Nupmls, 5. Savannakhet Provincial Health Department

タイ肝吸虫によって引き起こされるタイ肝吸虫症は、東南アジア諸国の風土病であり感染によって胆管癌のリスクが高まるため、大きな健康問題となっている。しかし、タイ肝吸虫は中間宿主が複数存在する複雑なライフサイクルをもつため、従来の方法で感染リスクを迅速にモニタリングすることは困難である。そこで、そのリスクを評価する手法の開発の第一歩として、環境水から寄生虫と中間宿主の環境 DNA を検出・定量することを目的に研究を行った。調査はラオスサバナケット州で行い、これまでに開発した Multi-gene assay を用いたタイ肝吸虫の環境 DNA 検出を行った。ヒトへの感染率の高いエリアで重点的な調査を行い、ヒトの感染率とタイ肝吸虫の検出率を比較した。また、中間宿主である貝や魚の環境 DNA の検出系の確立を目指す。本研究ではこれらの結果をもとにタイ肝吸虫の分布を生態学的な観点から捉え、分布を規定する要因を議論する。

Opisthorchiasis, caused by *Opisthorchis viverrini*, is endemic in Southeast Asian countries and is a major health problem because infection increases the risk of cholangiocarcinoma. However, the complex life cycle of *O. viverrini*, with multiple intermediate hosts, makes it difficult to rapidly monitor the risk of infection using conventional methods. Therefore, as a first step towards developing a risk assessment method, we conducted field surveys detect and quantify eDNA of the parasite from environmental water. The study was conducted in Savannakhet Province, Lao PDR, and used the previously developed multi-gene assay to detect environmental DNA of the *O. viverrini*. In particular, the study focused on areas with high human infection rates and compared the human infection rate with the *O. viverrini* detection rate. The aim of this study is also to establish detection systems for eDNA in shellfish and fish, which are first and second intermediate hosts, respectively. Based on these results, the distribution of *O. viverrini* will be considered from an ecological perspective and the factors that determine the distribution of *O. viverrinis* will be discussed.

【P-49】

メコン住血吸虫の環境 DNA 検出系の開発と野外への応用

Development of detection assay for *Schistosoma mekongi* eDNA and its application in the field

松村 奈桜¹, 松尾 莉子¹, サトウ 恵², Sato Otake Marcello³, Valencia Evangelista Joseph², Revolteado Valiente Mark June², Prasayasith Phoyphaylinh², Adisakwattana Poom⁴, Limpanont Yanin⁴, Phuphisut Orawan⁴, Yoonuan Tippayarat⁴, Sayasone Somphou⁵, 坂田 雅之⁶, 邬 倩倩¹, 源 利文¹
Nao Matsumura¹, Riko Matsuo¹, Megumi Sato², Marcello Otake Sato³, Joseph Evangelista Valencia², Mark June Valiente Revolteado², Phoyphaylinh Prasayasith², Poom Adisakwattana⁴, Yanin Limpanont⁴, Orawan Phuphisut⁴, Tippayarat Yoonuan⁴, Somphou Sayasone⁵, Masayuki K. Sakata⁶, Qianqian Wu¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大・院・人間発達, 2. 新潟大, 3. 新潟薬科医大, 4. マヒドン大, 5. ラオス熱帯医学公衆衛生研究所, 6. 北海道大・院・農

1. Kobe Univ., 2. Niigata Univ., 3. Nupmls, 4. Mahidol Univ., 5. Lao TPHI, 6. Hokkaido Univ.

住血吸虫症は「顧みられない熱帯病 (NTDs)」として定義される疾患の1つで、感染によって生じる経済と健康医療への影響が世界的に問題視されている。住血吸虫症は水中で淡水貝から遊出した住血吸虫属のセルカリアが経皮感染することで引き起こされる (WHO, 2020)。本研究では感染縮小に向け、環境 DNA 手法によりメコン住血吸虫の生息域を広範囲で明らかにし、感染リスクの高い場所の把握を目指す。まず熱帯の調査での環境 DNA 検出の感度向上に向け、安定した電源の確保に不安がありサンプルを冷凍できない状況を想定したサンプル保存法を検討した。また Multi-gene assay を開発し、その検出感度を確認した。次に、メコン住血吸虫の環境 DNA の野外検出に向けて、メコン住血吸虫の環境 DNA を水槽実験で検出した。その後、新しい検出系で、流行地ラオスにてメコン住血吸虫の環境 DNA 検出を試みた。

Schistosomiasis is listed as one of the “Neglected Tropical Diseases (NTDs)” and its economic and health consequences are of worldwide concern. Human transmission occurs through contact with water infested with larval forms (cercariae). We aim to examine the habitats of *Schistosoma mekongi* using eDNA assay and to identify highly infected areas. First, to improve the detection sensitivity of eDNA in tropical surveys, we compared the filtration systems including the gravity filtration which does not require electronic power. In addition, we examined the optimum way for store samples in our field, where it is sometimes difficult to secure stable power supply. Then, a multi-gene assay was developed and checked its detection sensitivity. Next, to detect *S. mekongi* DNA in the field, we examined tank experiments, and we subsequently applied the assay to an endemic area in Laos.

【P-50】

環境 DNA メタバーコーディングを活用した沿岸海域のベントス調査

Benthos surveys in coastal waters using environmental DNA metabarcoding.

白子 智康¹, 漆畑 岳¹, 横岡 博之¹, 内野 透¹, 三浦 誠矢², 高尾 航平¹, 中村 匡聡¹

Tomoyasu Shirako¹, Gaku Urushibata¹, Hiroyuki Yokooka¹, Toru Uchino¹, Tomoya Miura²,
Kouhei Takao¹, Masatoshi Nakamura¹

1. いであ株式会社, 2. 新日本環境調査株式会社

1. IDEA Consultants, Inc., 2. Shin-Nippon Environmental Research Co.

これまでの主な環境 DNA 調査は魚類が対象であったが、生態系を把握する際には、その他にも多くの分類群についての調査が必要不可欠である。特に沿岸海域における生態系調査では、ベントスが着目されることが多いが、調査対象となるベントスには多くの分類群が含まれる。そのため、ベントス調査に環境 DNA を活用するためには、多くの分類群を網羅的に検出する必要がある。近年では魚類以外にも活用されつつあるものの、ベントスを含む複数の分類群を対象とした環境 DNA 調査の事例はほとんどない。本研究では、沿岸海域のベントス調査で主に着目される軟体動物（二枚貝綱、腹足綱）、甲殻類、環形動物、棘皮動物、刺胞動物の 5 分類群を対象としてアマモ場付近の干潟、岩礁地帯において環境 DNA 調査を実施した。さらに、ベントスを対象とした採捕調査を実施し、環境 DNA 調査結果と比較することで、各分類群を対象とした環境 DNA 調査の精度を検証した。

Environmental DNA surveys have mainly focused on fish, but it is essential to study many other taxonomic groups to understand ecosystems. Benthos (benthic organisms) are often the focus of ecological surveys, particularly in coastal waters, and the benthos surveyed include many taxonomic groups. Therefore, in order to use environmental DNA in benthos surveys, it is necessary to cover many taxonomic groups comprehensively. Although survey coverage has expanded in recent years to include taxa other than fish, there are few examples of environmental DNA surveys covering multiple taxa, including benthos. In this study, an environmental DNA survey was conducted on mudflats and rocky reefs near seagrass beds, targeting five taxonomic groups that are the main focus of benthos surveys in coastal waters: molluscs (bivalvia, gastropods), crustaceans, annelids, echinoderms and cnidarians. In addition, a field sampling of benthos was carried out and compared with the results of the environmental DNA survey in order to test the accuracy of the environmental DNA survey for each taxonomic group.

【P-51】

止水域における昆虫類環境 DNA 調査手法開発にかかる基礎的検討

Fundamental study on the development of a method for environmental DNA survey of insects in stagnant water area

長谷部 勇太¹, 稲熊 あすみ², 運天 弘樹²

Yuta Hasebe¹, Asumi Inaguma², Hiroki Unten²

1. 神奈川県環境科学センター, 2. NEC ソリューションイノベータ

1. kanagawa environmental research center, 2. NEC Solution Innovators, Ltd.

河川等の流水域における昆虫類の環境 DNA 調査は、高精度な調査手法が開発されつつあるが、池を始めとした止水域は未開発である。そこで MtlInsects-16S を用いて止水域での環境 DNA 分析上の課題などを整理するために、DNA 抽出方法が結果に与える影響を検討した。その結果、一般的に利用されている環境 DNA 学会の方法では昆虫類の検出が悪く、新たに開発した手法を用いることで検出種数の増加が確認された。一方で新たな課題として全リードに対する昆虫綱のリード割合が低く、裸喉綱、貝虫綱、鰓脚綱といった非対象生物群のリード数が優先する地点が多くなった。今回の結果は DNA 抽出方法の重要性と同時に環境 DNA 調査における特異性の高い分析手法開発の必要性を示している。

Highly accurate environmental DNA surveys of insects in flowing water areas such as rivers are being developed, but not yet in stillwater areas such as ponds. Therefore, in order to sort out the issues involved in environmental DNA analysis in stillwater areas using MtlInsects-16S, the influence of the DNA extraction method on the results was examined. The results showed that insects were poorly detected by the commonly used environmental DNA society method, and that the newly developed method increased the number of species detected. On the other hand, a new issue was the low percentage of Insecta reads to total reads, and the number of reads from non-target groups such as Naked Throat, Shellworm and Gilled Legs was prioritised at many sites. The results show the importance of DNA extraction methods and the need to develop highly specific analytical methods for environmental DNA surveys.

【P-52】

Aquatic-terrestrial species detection using environmental DNA from turbid water during heavy rainfall events

徐晨¹, 三上優貴¹, 糠澤桂²

CHEN XU¹, Yuki Mikami¹, Kei Nukazawa²

1. 宮崎大学工学研究科, 2. 宮崎大学

1. Graduate School of Miyazaki University, 2. University of Miyazaki, Japan

eDNA analysis has been applied to monitor aquatic and terrestrial species. However, eDNA of the species with a small abundance or less contact with water bodies is barely detected and may cause a false negative result. To address this issue, sampling that includes eDNA materials transported from terrestrial realms via surface runoff would be promising. Here we sampled stormwater during different heavy rain events to simultaneously detect aquatic species as well as terrestrial species that do not frequently contact aquatic realms. Samples were obtained at the three rivers with different landuse, the Mizunashi, Oka, and Tagami Rivers in May, Sep, Nov 2022, Jun 2023 (12 samples in total). In addition, we also sampled stream water on a normal day without antecedent rainfall events. Following sampling, the filter GF/F and DNeasy PowerSoil Kit was used for DNA extraction, which yields higher eDNA recovery for turbid water. We applied DNA metabarcoding to identify the vertebrate species by amplifying ~100bp using slightly modified universal vertebrate primers 12SV5. As a result, in the Mizunashi River, compared with the detection of 5 vertebrate species on a normal day, 12, 8, and 7 species were detected from rain events. In the Tagami River, 5 vertebrate species were detected on a normal day; 17, 8, and 11 species were detected from rain events. In the Oka River, 13 vertebrate species were detected on a normal day; 16 and 8 species were detected from rain events, with one sample showing no detection of any species.

Utilization of Environmental DNA (eDNA) for the Detection of Freshwater Bivalves in the Nakdong River Mainstream

Jun-Hee Kwon¹, Kyu-Jin Kim¹, Keonhee Kim², Min-Ho Jang¹

1. Kongju National University, 2. Konkuk University

Freshwater bivalves inhabit the substrates of water bodies and have limited migration, making it challenging to identify individuals through quantitative sampling. Environmental DNA (eDNA), consisting of genetic material released by organisms, enables species detection without direct observation. This study aimed to validate a bivalve-specific mini-barcode primer for metabarcoding and investigate freshwater bivalves, including *Cristaria plicata* (an endangered species in Korea), in the Nakdong River using eDNA. Four sampling sites were selected, including one where *Cristaria plicata* was confirmed within the past five years. Water samples were collected from riversides and central areas at different depths using a Van Dorn sampler. To test the primer, eDNA was collected from two control sites in Gunsan and Cheongju. The eDNA was filtered, extracted, and analyzed using Illumina MiSeq. Bivalve DNA was amplified from both control sites, with *Cristaria plicata* detected only at the positive control site. In the Nakdong River, bivalve DNA from five species, including *Cristaria plicata*, was detected at two sites. The majority of bivalve DNA belonged to *Anodonta woodiana*, and at one site, the proportion of *Cristaria plicata* DNA was higher than *Corbicula leana*. Thus, eDNA is an effective tool for detecting freshwater bivalves and can help identify habitats of the endangered *Cristaria plicata*.

【P-54】

深海魚類を対象とした環境 DNA 調査手法の検討 ～最大水深 756 m からの採水～

Environmental DNA for fish communities from deep-sea waters

廣原 嵩也¹, 中道 友規¹, 岡村 嵩彦¹, 北橋 倫¹, 池上 拓志¹, 近藤 俊祐¹, 豊田 進介¹, 福原 達雄¹, 西川 崇範¹,
小野 真宏¹, 古島 靖夫²

Takaya Hirohara¹, Tomoki Nakamichi¹, Takahiko Okamura¹, Tomo Kitahashi¹, Takuji Ikegami¹,
Syunsuke Kondo¹, Shinsuke Toyoda¹, Tatsuo Fukuhara¹, Takanori Nishikawa¹, Masahiro Ono¹,
Yasuo Furushima²

1. 株式会社 KANSO テクノス, 2. 海洋研究開発機構 地球環境部門 海洋生物環境影響研究センター

1. KANSO TECHNOS CO., LTD., 2. JAMSTEC

海洋における中深層以深での深海魚類の調査は、ROV 等のカメラによる画像観察やトロール網を用いた採捕調査が実施されているが、調査コストが高く、高度な同定技能が必要となるため、近年、深海魚類調査への環境 DNA 技術の適用が期待されている。現在、魚類を対象としたメタバーコーディング法は、非侵襲的かつ簡便な調査手法として、急速に社会へ普及している。一方で海洋の中深層以深での調査条件については、研究が進められているものの、知見が不足している。また、中深層以深からの採水作業では、使用できる機材に制限があり、一度に少量しか採水できない場合が多い。本研究では、みえ尾鷲海洋深層水（水深約 415 m）および東青ヶ島海丘の水深 0.5 ～ 756 m で採取した海水試料（5 ～ 20 L）を用いて魚類のメタバーコーディング解析を実施し、中深層での環境 DNA 分析を用いた調査時のろ過量、採水繰り返しの調査手法について検討を行った。

Deep-sea fish surveys in the ocean are currently conducted using trawls and video cameras, but the survey costs are high and require advanced identification skills. Currently, environmental DNA metabarcoding for fish is rapidly spreading in society as a non-invasive and simple method. However, although research is being conducted on environmental DNA surveys deeper than the mesopelagic zone of the ocean, there is a lack of knowledge. Furthermore, when sampling water from the mesopelagic zone or deeper, there are limitations to the tools that can be used, and in many cases only small amounts of water can be collected at one time. In this study, we performed environmental DNA metabarcoding of fish using seawater samples (5–20 L) collected at depths of 0.5–756 m and examined the effects of filtration volume and repeated water sampling.

【P-55】

環境 DNA の降雨流出に着目した流域における哺乳類・鳥類相評価の可能性

Potential for assessment of mammalian and avian fauna in watershed focusing on rainfall-runoff of environmental DNA

岡田 経太¹, 大中 臨¹, 中尾 遼平¹, 赤松 良久¹

Keita Henry Okada¹, Nozomu Onaka¹, Ryohei Nakao¹, Yoshihisa Akamatsu¹

1. 山口大学

1. Yamaguchi University

雨水は流域の広範囲に生じ、地上植生や地表面を洗いながら流下し、河川へ流出するため、降雨時の河川水は流域に生息する生物の環境 DNA を包括する可能性がある。そこで本研究では、降雨時河川水の環境 DNA 分析により集水域の哺乳類・鳥類相を評価することを目的とした。中国地方の一級水系である佐波川で河川水を採水し、MiMammal および MiBird プライマーを使ったメタバーコーディングにより哺乳類・鳥類相を推定した。採水は降雨前（8/27）と降雨時（8/29, 8/30）の計 3 回行った。結果として、哺乳類 18 種と鳥類 28 種が検出され、検出種数は哺乳類、鳥類の両方で降雨前（8, 10 種）よりも、降雨時（8/29 が 13, 15 種, 8/30 が 15, 16 種）の方が多かった。降雨時河川水の分析で、より網羅的な生息状況を把握できることが示唆された。発表では海綿を素材としたパッシブサンプラーの結果との比較も紹介する。

Rainwater flows over a wide area of river basin, washing away aboveground vegetation and the ground surface, and eventually running off into rivers. In this process, river water during rainfall can encompass the environmental DNA (eDNA) of organisms inhabiting the watershed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the mammalian and avian fauna of a watershed area by analyzing the eDNA in river water during rainfall events. River water samples were collected from the Saba River, a first-class river in the Chugoku region, and the mammalian and avian fauna were estimated by metabarcoding using MiMammal and MiBird primers. Sampling was conducted three times: once before the rainfall (on Aug. 27th) and twice during the rainfall (on Aug. 29th and Aug. 30th). As a result, 18 species of mammals and 28 species of birds were detected. Species richness was higher during the rainfall (13 mammal species and 15 bird species on Aug. 29th, and 15 mammal species and 16 bird species on Aug. 30th) compared to before the rainfall (8 mammal species and 10 bird species). These findings suggest that eDNA analysis of river water during rainfall can provide a more comprehensive understanding of habitat conditions. The presentation will also include a comparison with the results of passive samplers using sea sponges as adsorption material.

Detection of High-Resolution Temporal Variation Patterns in Fish Populations and Communities through Environmental DNA Metabarcoding Surveys

太田 圭祐¹, 鈴木 将太², 阿部 拓三², 太齋 彰浩³, 岩下 源¹, 笠原 剛樹¹, 及川 浩人², 大室 宏平¹, 鈴木 麻友¹, 笠田 実⁴, 元松 直馬¹, 小林 翔吾³, 宮本 竜也¹, 近藤 倫生¹

Keisuke Ota¹, Shota Suzuki², Takuzo Abe², Akihiro Dazai³, Gen Iwashita¹, Gohki Kasahara¹, Hiroto Oikawa², Kouhei Ohmuro¹, Mayu Suzuki¹, Minoru Kasada⁴, Naoma Motomatsu¹, Syogo Kobayashi³, Tatsuya Miyamoto¹, Michio Kondoh¹

1. 東北大学, 2. 南三陸ネイチャーセンター, 3. サスティナビリティセンター, 4. 北海道大学

1. Tohoku Univ., 2. Minamisanriku Nature Center, 3. Center for Sustainable Society, 4. Hokkaido Univ.

環境 DNA は、生物量や分布を推定する手法として広く利用されている。しかし、その時間分解能は明確ではなく、数時間スケールでの生物の活動周期や群集構造変化など、高時間分解能が求められる研究への応用例は限られている。そこで本研究では、沿岸に設定された 2 つの観測点において 2 時間ごとの高頻度環境 DNA メタバーコーディング調査を行い、(i) 短い時間スケールで生じる群集構造変化の把握や (ii) 種特異的な概日周期や潮汐周期といった活動周期の推定可能性を検証した。その結果、観測される環境 DNA 量は日夜の群集構造の違いを敏感に捉え、種特異的な概日周期および潮汐周期を推定できる可能性が示唆された。また、同じ生物種では異なる地点でも類似した活動周期特性が確認された。これらの結果は環境 DNA が、高時間解像度での多種にわたる生物活動調査にも有用である可能性を示している。

Environmental DNA (eDNA) is a widely used method to estimate efficiently species distribution and biomass. However, it remains uncertain whether eDNA can effectively capture short-term temporal biological shifts. Due to this reason, there are limited applications in studies requiring high temporal resolution, such as those focused on activity rhythms of organisms and shifts in community structure on hourly timescales. In this study, we investigated the feasibility of (i) detecting shifts in community structure at high temporal resolution and (ii) estimating species-specific circadian and tidal activity rhythms using high-frequency eDNA metabarcoding surveys conducted every two hours at two coastal sites. Our results showed that the amount of eDNA might be able to sensitively reflect a shift in community structure between daytime and nighttime, and successfully estimate species-specific circadian and tidal rhythms. Furthermore, distinct activity rhythms were observed across species, with the same species demonstrating similar rhythms even at different locations. These results suggest that eDNA is a potential tool for monitoring species-specific activity rhythms and could facilitate multi-species studies of biological activity patterns with high temporal resolution in the field.

【P-57】

環境 DNA メタバーコーディングを用いた鯨類のモニタリングに向けて：鯨類特異的なユニバーサルプライマーの開発

Towards monitoring cetaceans using environmental DNA metabarcoding: Development of cetacean-specific universal primers

潮 雅之¹, 尾澤 幸恵², 岡 慎一郎², 佐土 哲也³, Kisero Robinson¹, Portor Lindsay⁵, Matrai Eszter⁴, 宮 正樹³

Masayuki Ushio¹, Sachie Ozawa², Shin-ichiro Oka², Tetsuya Sado³, Robinson Kisero¹, Lindsay Portor⁵, Eszter Matrai⁴, Masaki Miya³

1. 香港科技大学, 2. 沖縄美ら海財団, 3. 千葉県立中央博物館, 4. 香港海洋公園, 5. SEAMAR

1. Hong Kong Univ. of Sci. Tech., 2. Okinawa Churashima Foundation, 3. Nat. History Museum and Institute, Chiba, 4. Ocean Park Hong Kong, 5. SEAMAR

鯨類は海洋生態系において頂点捕食者として生態系動態の制御に重要な役割を担っている。しかし、多くの鯨類個体群は人間活動によって大きな負の影響を受けており、そのため、鯨類の保全を目的とした正確かつ頻繁な個体群調査法が求められている。本研究では、環境 DNA を用いて鯨類を効率的にモニタリングするための手法開発を行った。まず、公共データベースから 75 種の鯨類および近縁種のミトコンドリア配列全長を取得し、それらに基づいてユニバーサルプライマーの候補配列・領域を決定した。その後、それらの領域の増幅性能や増幅産物の種判別性能を計算機上で推定し、最終候補のプライマーを 4 セットに絞り込んだ。さらに、それら 4 プライマーセットを用いて実際に組織由来 DNA の増幅テストも行った。現在これらのプライマーで野外サンプルの分析を進めており、これらの結果に基づいて環境 DNA を用いた鯨類モニタリングの可能性について議論する。

Cetaceans are key players in marine ecosystem dynamics as top predators that regulate community dynamics. However, many cetacean populations are endangered by human activities, and thus, cetacean conservation efforts are urgently required. Effective cetacean conservation relies on accurate and frequent monitoring of cetacean occurrence and habitat use. Environmental DNA (eDNA), which is broadly defined as DNA that is directly extracted from environmental samples such as water samples, provides a promising method to effectively monitor cetacean populations in marine ecosystems. In this study, we aim to develop new, cetacean-specific universal primers to detect cetacean eDNA effectively because existing primers often amplify non-cetacean eDNA and may mask cetacean eDNA. First, we collected full-length mitochondrial DNA sequences from 75 cetacean species and identified possible primer regions in the 12S, 16S, and NAD3 regions. Second, we performed in silico evaluation of the candidate primers and identified four candidate primer sets that are highly specific to cetaceans and whose amplified products possess sufficient variations to distinguish most closely related cetacean species. Third, we performed in vitro evaluation and found that the four primer sets can amplify tissue-extracted cetacean DNAs. We are now applying the newly developed primers to aquarium and natural samples. We will discuss how the developed primers can contribute to the conservation of local cetacean species in Hong Kong, such as Chinese White Dolphins and Finless Porpoises.

[P-58]

Calculation of Diatom Pollution Indicator Values for Aquatic Ecosystem Health Assessment Based on Biofilm eDNA.

Keonhee Kim¹, Kyu-Jin Kim², Hyeonjin Cho³, Jeong-eun Na⁴, Min-Ho Jang²

1. Konkuk University, 2. Kongju National University, 3. Encounter the ecology Co., 4. Chonnam National University

The Trophic Diatom Index (TDI) is a biological water quality assessment tool that uses the sensitivity of benthic diatoms to dissolved inorganic phosphorus (PO⁴-P). In Korea, it is applied to assess aquatic ecosystem health. Traditional TDI analysis relies on identifying and counting attached diatoms via microscopy, which is time-consuming and prone to uncertainty due to diatom morphological variations and analyst expertise. eDNA metabarcoding offers an alternative, overcoming these limitations. This study analyzed diatom community structure using eDNA extracted from biofilm attached to river stones, evaluating TDI based on the results. Biofilm was collected at 210 sites across Korea's four major river basins, and DNA was extracted and analyzed via NGS, targeting the *rbcl* gene. A total of 43 genera and 220 species of diatoms were identified, with genera like *Achnanthes*, *Navicula*, *Nitzschia*, and *Fragillaria* being most common. The number of diatom species detected through eDNA was similar to that found using microscopy, though some sites revealed more species with the latter. The match rate between eDNA-based and microscopy-based communities was around 40%. However, eDNA-based health assessments showed strong correlations with TP and PO⁴-P concentrations ($r > -0.5$, $p < 0.001 \sim 0.01$). TDI values decreased as PO⁴-P concentrations increased. Thus, eDNA-based diatom health assessments accurately reflect water quality changes, making biofilm eDNA a valuable tool for such evaluations.

【P-59】

外来植物由来の二次代謝産物が土壤微生物群集に与える影響の評価

The alteration of soil microbiome by invasive plants thorough plants specific metabolites

中村 直人¹, 杉山 暁史¹

Naoto Nakamura¹, Akifumi Sugiyama¹

1. 京都大学

1. Kyoto university

外来植物は根から分泌される二次代謝産物を通じて土壤微生物群集を改変するが、そのメカニズムや影響は十分に理解されていない。発表者らは、東アジアを在来地とし米国で侵略的外来種となっているマンリョウを研究対象として、LC/MS、アンプリコンシーケンス及び土壌への代謝物添加法を用いて、(1) マンリョウに由来するサポニンの根からの滲出の有無、(2) マンリョウ由来のサポニンが土壤微生物群集に与える影響を評価した。LC/MS 解析の結果、マンリョウの根内と根圏土壌の両方から2種のサポニンが検出された。代謝物添加実験の結果、これら2種のサポニンは土壤細菌群集構造を変化させることが分かった。特に *Phenylobacterium* 属はサポニンを添加した土壌に特徴的であり、高濃度条件で相対存在量が増加した。本結果は外来種由来の二次代謝産物が特定の微生物の集積を介して根圏微生物群集形成に影響することを示す。

Invasive plants modify soil microbial communities through root-secreted plants specific metabolites, but the mechanisms and impacts are poorly understood. In this study, we focused on coral ardisia (*Ardisia crenata*), which is native to East Asia and an invasive plant in the USA. We used LC/MS, DNA amplicon sequencing and a method of "rhizosphere modelling" to determine (1) whether or not saponins are secreted from the roots *A. crenata*, and (2) the impact of saponins from *A. crenata* on the soil microbial community. LC/MS analysis showed that two saponins were detected both within the roots and in the rhizosphere soil of *A. crenata*. Furthermore, "rhizosphere modelling" showed that these two saponins altered the structure of the soil bacterial community. *Phenylobacterium* and *Novosphingobium* were characteristic of saponin-added soils, with increased relative abundance under high concentration of saponin treatment. The results of this study demonstrate that secondary metabolites from exotic species can influence rhizosphere microbiome through the accumulation of specific bacterial taxa.

【P-60】

北海道積丹半島に生息するヨシノボリ属 2 種の交雑とミトコンドリア遺伝子浸透

Hybridization and mitochondrial introgression of two *Rhinogobius* species in Shakotan Peninsula, Hokkaido

坂井 恭佳¹, 神戸 崇², 坂田 雅之², 荒木 仁志²

Kyoka Sakai¹, Takashi Kanbe², Masayuki K Sakata², Hitoshi Araki²

1. 北海道大学大学院農学院, 2. 北海道大学大学院農学研究院

1. Grad. Sch. Agriculture, Hokkaido Univ., 2. Res. Faculty Agriculture, Hokkaido Univ.

ヨシノボリ属 (*Rhinogobius*) 内では種間交雑とミトコンドリア遺伝子浸透が報告されており、交雑による集団遺伝的構造の変化や、希少種の絶滅の可能性などが指摘されている。本研究では、ヨシノボリ属の種間交雑の要因となる環境条件を解明すべく、トウヨシノボリ (*R. sp. OR*) とルリヨシノボリ (*R. mizunoi*) の分布の重複が報告されている北海道積丹半島の 12 河川で捕獲調査と環境 DNA サンプル採取を行った。採捕個体の mtDNA と核 DNA 解析の結果、全 314 採捕個体中、交雑個体が 16 個体、ルリヨシノボリにトウヨシノボリのミトコンドリア遺伝子が浸透している個体が 126 個体発見され、現在までの交雑の継続的な発生が示唆された。この交雑に河川横断工作物が及ぼす影響を明らかにするため、ヨシノボリ属の河川内空間分布を推定する環境 DNA 解析を行ったので、その結果を報告する。

Within *Rhinogobius*, interspecific hybridization and mitochondrial introgression on mainland Japan have been reported and these reports suggest changes in the population's genetic structure and the potential extinction of rare species due to hybridization. In this study, to understand environmental conditions that contribute to interspecific hybridization, capture surveys and environmental DNA sampling were conducted in 12 rivers on the Shakotan Peninsula in Hokkaido, Japan, where overlap in the distributions of *R. mizunoi* and *R. sp. OR* has been previously reported. Analysis of mtDNA and nuclear DNA markers of collected individuals revealed 16 hybrid individuals and 126 individuals with *R. sp. OR* mitochondrial genes introgressed into *R. mizunoi* out of 314 individuals. These results suggest that hybridization has occurred continuously to the present. In this presentation, we will report the results of environmental DNA analysis, which estimates the in-stream spatial distribution of *Rhinogobius* and discuss the effect of stream-crossing structures on hybridization.

【P-61】

Enhanced coastal monitoring through eDNA metabarcoding with updated functional harmful species database

Jinping CHENG¹, Linus Shing Him Lo¹

1. The Education University of Hong Kong

Coastal environments are increasingly threatened by harmful biota in mariculture and coastal areas, posing significant economic and public health risks through disease outbreaks and harmful algal blooms. Continuous monitoring is essential for effective coastal ecosystem management. Environmental DNA (eDNA) presents a promising biomonitoring tool for the detection of harmful agents such as bacterial pathogens, bloom-forming phytoplankton, and micro-eukaryotic protists. Effective screening for these harmful agents is crucial for identifying underlying risks to ecosystem biosecurity and is fundamental for translating extensive biological monitoring data into actionable risk assessments. This study outlines our ongoing efforts to enhance eDNA biomonitoring by developing accessible, functional databases with updated taxonomy for over 650 algae and bacterial pathogens harmful to various aquatic organisms, humans, and the environment. By implementing comprehensive screening protocols, we enable eDNA biomonitoring data to accurately characterize regional profiles of harmful biota and identify atypical spatiotemporal occurrences of pathogens like *Vibrio* and dinoflagellates such as *Karlodinium*. These occurrences, often linked to human activities and nutrient loads, may have been previously overlooked. Our study provides valuable insights for predicting and mitigating harmful events, thereby contributing to improved coastal ecosystem management.

【P-62】

Diversity of bacterial communities and occurrence of *Legionella pneumophila* in three water treatment plants

Gyuchoel Lee¹, Jae Hong Jeong¹, Min-jeong Kim¹, Min Young Kim¹, Gangmin Lee¹

1. K-water

The frequency of pathogenic bacteria that threaten the safety of drinking water has been increasing due to climate change. Rising temperatures have been shown to promote the growth of pathogenic bacteria like *Legionella* and *Mycobacterium*, leading to a higher incidence of infections. This study aims to ensure the safety of drinking water by proactively monitoring pathogenic bacteria such as *Legionella* in water treatment systems. Raw water, sedimentation water, filtered water, backwash water, treated water, and tap water were collected from three different water treatment plants (WTP) in February and August 2024. 16S rRNA amplicon sequencing was performed using the Ion Torrent PGM platform with the 16S Ion Metagenomics Kit. The results showed that the microbial diversity was highest in raw water, and no similarity in community structure was observed between the other sampling points. Proteobacteria accounted for more than 40% of the microbial composition across all samples, while Bacteroidota represented more than 15% in raw water but less than 10% in other samples. The *L. pneumophila* gene was detected in the process water of two WTP and tap water of one WTP, but it did not grow in cultures using buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar. These results suggest that the detected *L. pneumophila* DNA may originate from inactivated bacteria during the water purification process. Although pathogenic bacteria like *Legionella* are being treated through the water treatment process, continuous monitoring is required due to the persistent detection of their DNA to ensure the safety of drinking water.

【P-63】

大気デブリ中からヒトミトコンドリア配列の多型を探索する

Searching atmospheric debris for human mitochondrial sequence polymorphisms

増田 和志¹, 西堀 正英¹, 土井 考爾², 安江 博²

Kazushi Masuda¹, Masahide Nishibori¹, Koji Doi², Hiroshi Yasue²

1. 広島大学, 2. つくば遺伝子研究所 (株)

1. Hiroshima Univ., 2. Tsukuba Gene Technology Laboratories

哺乳動物を対象とする大気環境 DNA (eDNAir) 網羅的解析では, 検出される配列の大部分がヒトに由来する配列である。我々は昨年度本学会において eDNAir および eRNAir 網羅的解析による野生動物検出結果を示し, いずれの解析においても 10 万リード以上のヒト由来配列を報告した。これらは解析の混入配列とされ, 解析段階で機械的に排除される。しかし大気からヒト由来の配列が膨大に検出されるにも関わらず, これらの配列に着目した研究報告例はない。そこで, 大気中に存在するヒトミトコンドリア配列から多型が検出されるという仮説のもと, ヒトミトコンドリア配列を対象にデータの再解析を行った。その結果調査者のハプロタイプと推定される配列が再現性高く検出され, 調査者以外のハプロタイプも多数検出された。調査者および調査地点近隣住民の存在がこの結果に関与したと推察され, 本手法による法医学的検査への更なる応用も期待される。

In the metabarcoding analysis of atmospheric environmental DNA (eDNAir) in mammals, the majority of sequences detected are of human origin. We presented the results of wildlife detection using eDNAir and eRNAir metabarcoding analyses at this conference last year and reported more than 100,000 human-derived sequences in both analyses. These are considered to be contaminant sequences in the analysis and are mechanically removed at the analysis stage. However, despite the large number of human-derived sequences detected in the atmosphere, there have been no reports of studies focusing on these sequences. Based on the hypothesis that polymorphisms in human mitochondrial sequences can be detected in the atmosphere, we re-analysed the data for human mitochondrial sequences. The results showed a high degree of reproducibility in detecting sequences that could be considered haplotypes of the researcher, as well as many haplotypes other than that of the researcher. It is suggested that the presence of the researcher and local residents in the vicinity of the study site contributed to this result, and further application of this method to forensic examinations is also expected.

【P-64】

Potential use of eDNA analysis techniques for zooplankton diversity research: A focus on freshwater copepod species

Hye-Ji Oh¹, Yerim Choi¹, Dae-Hee Lee¹, Keonhee Kim², Keun-Sik Kim³, Jeong-Hui Kim⁴, Min-Ho Jang⁵, Ju-Duk Yoon³, Kwang-Hyeon Chang¹

1. Kyung Hee University, 2. Human and Ecocare center, 3. National Institute of Ecology, 4. EcoResearch Incorporated, 5. Kongju National University

Zooplankton are ubiquitous in aquatic ecosystems, but they have species-specific responses to environmental conditions, resulting in diverse community compositions depending on the habitat's geographical conditions, scale, food availability, and water quality. These occurrence characteristics have formed the foundation for studies of zooplankton index aimed at aquatic ecosystem environmental assessments, where high-resolution identification (species-level) of zooplankton has been required in the process. Additionally, because zooplankton species composing of the community have different feeding characteristics, their diversity can influence matter cycling and energy flow within aquatic food webs. In the case of copepods (crustacean), their morphological similarity across species compared to other zooplankton taxa requires a high level of expertise for accurate species identification using traditional methods (microscopic enumeration), raising concerns about the potential underestimation of copepod diversity in community analyses. Therefore, in this study, the availability of eDNA analysis techniques were examined as a method to complement the results of copepod species identification under a microscope. The results of copepod community analysis obtained through traditional survey and identification methods were compared with those from eDNA analysis for six lakes in Korea. Based on these comparisons, we aimed to identify issues and propose solutions that arise when using eDNA analysis techniques to supplement traditional zooplankton diversity assessments.

【P-65】

集団構造および水温に依存した環境 DNA 放出が生物量推定パフォーマンスにもたらす影響

Effects of eDNA production depending on population structure and water temperature on the performance of abundance estimation based on eDNA

相馬 寿明^{1,2}

Toshiaki S Jo^{1,2}

1. 龍谷大学, 2. 日本学術振興会

1. Ryukoku University, 2. JSPS

環境 DNA に基づく正確な生物量推定は未だ難しい。近年、生態学の代謝理論に基づき、環境 DNA 放出の集団構造・水温依存性の重要性が示唆されているが、このことが環境 DNA 濃度と生物量の関係にどのように影響するかはよく分かっていない。本研究は、集団構造や水温によって環境 DNA 濃度と生物量の関係 (R^2 値および傾き) がどのように変化するかを、数値シミュレーションによって評価した。集団内の体サイズのばらつきが大きくなるほど R^2 値は低下した一方、この傾向は生物量をアロメトリーで補正することで見られなくなった。水温は R^2 値と傾きの両方と正の相関を示したが、環境 DNA 放出シナリオによって傾きの水温依存性は大きく変化した。本研究は、環境 DNA 濃度と生物量の関係における不確実性を説明する新たな洞察を与えると共に、環境パラメータや個体の生理状態を生物量推定のフレームワークに組み込む重要性を指摘している。

Precise estimation of organism abundance based on eDNA is still difficult. Recently, the metabolic theory of ecology has suggested the importance of the dependence of eDNA production on population structure and water temperature, albeit it is not well understood how these factors affect the relationship between eDNA concentration and organism abundance. This study used numerical simulations to assess how the eDNA-abundance relationship varies with population structure and water temperature. The results showed that R^2 values in the relationship were underestimated by increasing variation in body size within the population, but this trend was not confirmed by using allometrically scaled mass. In addition, water temperature positively affected both the R^2 values and regression slopes, but the temperature-dependency of the slopes greatly differed depending on the scenarios of eDNA production. This study provides new insights into explaining the uncertainty inherent in the eDNA-abundance relationship and indicates the importance of incorporating environmental parameters and physiological conditions into a framework for abundance estimation.

【P-66】

Eukaryotic variation of the Eastern Red Sea across 5000 years using sedaDNA

Diego Elihu Rivera Rosas¹, Sofia Frappi¹, Elisa Laiolo¹, Kah Kheng Lim¹, Carlos Angulo Preckler¹, Christopher Hempel¹, Chuancheng Fu¹, Pere Masque², Mohammed Qurban³, Vincent Peroni⁴, Carlos Manuel Duarte¹

1. KAUST, 2. ECU, 3. NCW, 4. OceanX

The Red Sea holds one of the most diverse marine ecosystems worldwide, with it presenting an opportunity of acting as a “natural laboratory” for evaluating its unique warm conditions across the water column and natural gradients of temperature, salinity and turbidity from north to south. However, little information is known about the history of its biodiversity and how it has responded to both anthropogenic and natural influences. Sedimentary ancient DNA (sedaDNA) is a valuable tool for reconstructing past biodiversity and allows a comparison of the ecological communities through time. We sampled 7 sediment cores across three unique zones of the Red Sea from 700 to 2200 meters in depth, sliced them, and performed sedaDNA sequencing with two universal metabarcoding primers for a total of 175 samples. We coupled this with C-14 dating to perform geochronology and assign a time to each sample to then determine how eukaryotic communities have changed over time. Our results cover communities from the 30th century BC. to 2010 AD, spanning important Holocene climatic events and various human developments. The reconstructed communities present a presumably stable ecosystem with high diversity and with low community turnover of taxa over time. We find the North, Central and South Red Sea to present uniquely different communities dominated by different taxa. Using Generalized Additive Models, we examine the effect of sea level rise and temperature over these communities. Overall, these results demonstrate the potential for sedaDNA coupled with geochronologies to improve the understanding of the Red Sea as a system.

【P-67】

古代土壌ゲノム解析にむけた DNA メタバーコーディング法の最適化

Optimization of the DNA metabarcoding method for sedimentary ancient genome analysis

近藤 奈穂¹, 飯塚 文枝², 夏木 大吾¹, 森先 一貴¹, 出穂 雅実³, 渡部 裕介¹, 熊谷 真彦⁵, 覚張 隆史⁴, 小金淵 佳江¹, 太田 博樹¹

Naho Kondo¹, Fumie Iizuka², Daigo Natsuki¹, Kazuki Morisaki¹, Masami Izuho³, Yusuke Watanabe¹, Masahiko Kumagai⁵, Takashi Gakuhari⁴, Kae Koganebuchi¹, Hiroki Oota¹

1. 東京大学, 2. ウィスコンシン大学マディソン校, 3. 東京都立大学, 4. 金沢大学, 5. 農研機構

1. The University of Tokyo, 2. University of Wisconsin-Madison, 3. Tokyo Metropolitan University, 4. Kanazawa University, 5. NARO

古代土壌には、過去の植物や動物、ヒトの DNA が微量かつ断片化した状態で残っている。欧米では、次世代シーケンサ（NGS）技術を応用した洞窟遺跡などの堆積土壌ゲノム解析により、古環境復元や古代型ホモ族の痕跡が報告されている。一方、温暖湿潤かつ火山島である日本列島では DNA の保存条件が悪いこともあり、報告例は極めて少ない。私たちは、こうした自然環境での古代土壌ゲノム解析の可能性を検証する目的で、後期旧石器時代～縄文時代草創期の北海道、岩手県、鹿児島県の 4 遺跡の堆積土壌を対象としたメタバーコーディング法を実施した。抽出 DNA を葉緑体ゲノムの *trn L* 遺伝子のイントロンの一部領域を対象としたプライマーをもちいて PCR 増幅し、効率と外部環境（土壌の pH、降水量、気温）との関連を検討した。また、その PCR 産物を NGS で解析し、検出された植物と遺跡のある地域の環境との蓋然性を検討する。

Ancient sediments contain trace amounts of highly fragmented DNA from past plants, animals, and humans. In Europe and the United States, ancient environmental reconstructions and evidence of archaic Hominins have been reported through the analysis of cave sediments using next-generation sequencing (NGS). However, in Japan, where the warm and humid climate combined with its volcanic nature creates poor conditions for DNA preservation, such studies are extremely limited. To explore the potential of sedimental ancient genome analysis in these challenging environments, we applied a DNA metabarcoding approach to sedimental samples from four archaeological sites dating from the Upper Paleolithic to the Incipient Jomon period, located in Hokkaido, Iwate, and Kagoshima prefectures. DNA was extracted from these soil samples and PCR-amplified using primers targeting a portion of the chloroplast *trn L* gene intron. We examined the amplification efficiency in relation to external environmental factors such as soil pH, precipitation, and temperature. Additionally, the PCR products were analyzed with NGS to identify plant species, and the plausibility of the results was evaluated in relation to the local environments of the archaeological sites.

【PS-01】

環境 DNA 分析における濾過法の低コスト化について ～重力濾過システム導入に向けた検証～

藤原 悠己¹

1. 大阪高等学校 科学探究部

環境 DNA 分析を利用した研究事例は年々増えているが、学校教育現場に環境 DNA 分析が広く普及するには、まだまだハードは高い。理由として、環境 DNA 分析の第一工程である環境水の濾過において、例えば、グラスファイバーフィルターを用いた濾過法は、アスピレーターのような高額機材を導入する必要がある。そのような実情の中、環境 DNA 学会に参加し情報収集する過程で、カートリッジ式フィルター（以下、ステリベクス）を用いた濾過法を発展させた高額機材を必要としない「重力濾過」という新手法を知るに至った。本研究では、グラスファイバーフィルター（ワットマン社 GF/F、孔径 0.7 μ m）を用いた濾過法とステリベクス（メルク社 SVHV010RS、孔径 0.45 μ m）を用いた重力濾過法で抽出した DNA サンプルの DNA 濃度、並びに DNA 量を比較検証した結果、重力濾過法の方が労力やコスト面も含めて魅力ある可能性が得られた。

【PS-02】

ヒグマの生息が及ぼす生態系への影響

稲村 湊¹, 邢 天宇², 湯野 大智¹, 小西 璃空¹, 谷藤 里音¹, 平井 智大¹

1. 立命館慶祥高等学校 2. 杭州外国語学校

本校に隣接する野幌森林公園にはヒグマは生息しないと考えられてきたが、2019年に78年ぶりにヒグマが目撃された。それ以降、毎年のように、ヒグマが目撃されるようになったが、その度に注意報が解除されることから、ヒグマは野幌森林公園に生息しているのではなく、近隣の森林から迷い込んだものと考えられる。しかし、今後ヒグマが野幌森林公園に住み着くことも考えられる。そこで、ヒグマの生息が与える生態系への影響を調査することにした。ヒグマが生息する森林と生息しないとされる森林の河川または池から環境DNAを採取し、ヒグマとニッチが被る可能性のある哺乳類の生物相あるいは、ヒグマが餌とする魚類の生物相についてメタバーコーディング解析を行う計画である。

【PS-03】

環境 DNA 解析でひもとく京都府由良川水系の魚類群集構造

塩見 真優¹, 由良 真菜佳¹, 田中 義家¹, 荒谷 武諒¹, 鈴木 理允¹, 藤田 純太¹

1. 京都府立福知山高等学校

由良川は、流路延長 146 km、流域面積 1880 km² の京都府北部を代表する一級河川である。本研究では、由良川水系の上流から下流までを対象として、環境 DNA 解析により淡水魚類の多様性を捉えることを目的とした。2023 年と 2024 年の夏季に、由良川本流 6 地点と支流 12 地点で採水・ろ過を行い、魚類汎用 PCR プライマー MiFish-U (Miya et al. 2015) を用いた環境 DNA メタバーコーディング解析を行ったところ、56 OTU (Operational taxonomic units) の魚類を検出することができた。地点ごとのリード数をもとにクラスター分析を行ったところ、由良川本流の下流部、本流の上流部、水系全域の支流上流を表すクラスターに分類され、カワアナゴなどの下流環境を好む魚種は本流のみに生息し、支流にはほとんど分布していないことが明らかになった。

【PS-04】

海洋ゴミと環境 DNA 解析による静岡県焼津の魚類相の季節変動の推察

An inference of seasonal change of fish diversity in Yaizu, Shizuoka prefecture based on fishing debris and environmental DNA metabarcoding

谷澤 陸斗¹, 増田 翔和¹, 藏園 陽生², 櫻井 真輝¹, 濱田 久温¹, 松永 陸¹, 山口 佳蓮¹, 高林 直生¹

1. 静岡県立焼津中央高等学校, 2. 岐阜県立大垣南高等学校

近年、地球温暖化に伴い、海水の温度が上昇している。その影響で、各地の魚類相が大幅に変化しており、特定の地域にいるはずの魚が、他の地域で目撃される事例が数多く報告されている。本研究では、地元、焼津市石津浜海岸の魚類相が年間を通してどのような状態かを環境DNAメタバーコーディング解析した。また、狙う魚、実際に釣れる魚の種類と時期のアンケート調査と海中清掃で回収するルアーを解析し、釣り人の動向と魚類相変化の相関を考察した。環境DNA解析の結果、魚類相の大きな変化をつかむことはできなかった。アンケートの結果より、環境の変化を釣り人たちは感じており、釣れる魚の時期や場所をSNS情報などを利用して把握しているということが示された。また、釣り人の狙う魚と使用するルアーと回収したルアーの分析結果は概ね一致しており、回収したルアーから釣り人の動向を予測することが可能であると考えられる。

In recent years, global warming has caused the temperature of seawater to rise. As a result, the fish diversity of various areas has been drastically changing, and many cases have been reported in which fish that are supposed to be found in particular areas are sighted in other areas. In this study, environmental DNA metabarcoding analysis was conducted to determine the state of fish diversity at Ishizuhama beach in Yaizu City, Shizuoka Prefecture, Japan, throughout the year. In addition, we conducted a questionnaire survey on the types of fish targeted, the types of fish actually caught, and the time of year, and analyzed lures collected during underwater cleanups to examine the correlation between angler trends and changes in the fish diversity. The results of the environmental DNA analysis did not reveal any significant changes in the fish diversity. The results of the questionnaire indicated that anglers are aware of changes in the environment and use SNS information to understand the timing and location of fish that can be caught. The results of the analysis of anglers' target fish, the lures they use, and the lures collected were generally consistent, suggesting that it is possible to predict anglers' trends based on the lures collected.

【PS-05】

環境 DNA による能登地域の河川の魚類相調査

Investigation of the fish fauna of rivers in the Noto area using environmental DNA

浅田 遥音¹, 金沢 寧々¹, 竹澤 翔¹, 田中 竣¹, 延田 考聡¹, 山口 色葉¹

1. 石川県立七尾高等学校

河川における生物多様性は、様々な人為的活動により低下している。生物多様性の保全には、魚類などの生物相を調査し、その変化を評価する必要がある。石川県では、大規模な魚類相の調査は1996年以降実施されていない。本研究では淡水魚類相の変化を評価することを目的として、能登地域で環境DNAによる魚類相調査を行った。採水は1996年の調査と同じ地点（21水系、50地点）で、2023年の夏（7、8月）と秋（10、11月）の2回採水した。このサンプルを用い、①ドジョウとアユを対象とした種特異的解析と②網羅的解析を行った。ドジョウもアユも、1996年に比べ確認地点が増加し、網羅的解析では新たに23種が記録された。網羅的解析では、注目種として、キタノメダカ、キタドジョウ、ニッポンバラタナゴなどRDB記載種が15種記録され、緊急対策外来種であるブルーギルとオオクチバスの分布拡大が明らかになった。

【PS-06】

日本固有種であるニホンイシガメの保全と環境 DNA の活用

Conservation of the Japanese pond turtle (*Mauremys japonica*), and the use of eDNA

近藤かりん¹, 清水 茉¹, 清水 礼花¹, 阿部 慧流¹, 金島 姫依¹, 小松原 奏穂¹, 清水 まどか¹, 内田 るみか²

1. 神戸山手女子高等学校, 2. 神戸山手女子中学校

本校では、神戸市内の淡水ガメ調査と準絶滅危惧種 Near Threatened である日本固有種のニホンイシガメ *Mauremys japonica* の保全活動を、旧神戸市立須磨海浜水族園（2023年5月営業終了）にご協力頂き、2011年から行っている。そして淡水ガメを題材として、地域のイベントや自治体主催の生物多様性の維持に関するイベントに参加し、啓発活動を行ってきた。

またそれに並行して、神戸市立相楽園の協力を得て、ニホンイシガメの域外飼育を2012年から行っている。淡水ガメの生息の有無は目視または捕獲しなければわからなかったが、環境DNAによる調査の手法を知り、生息個体数が判明している相楽園の池で環境DNAの検出の可否を調査している。水中に含まれる環境DNAの検出は、冬期では困難だったので、新たに池の泥からの検出を試行している。

Since 2011, our school has been working with the former Kobe City Suma aquarium (close in May 2023) to conduct surveys of freshwater turtles in Kobe City and conservation activities for Japanese pond turtle (*Mauremys japonica*), Near-Threatened species endemic to Japan. We have also participated in local events and events organized by local governments to maintain biodiversity, using freshwater turtles as a subject of awareness-raising activities.

In parallel with this, with the cooperation of Kobe City Sorakuen, we have been breeding Japanese pond turtles outside of their habitat since 2012.

The presence or absence of freshwater turtles could only be determined by sight or capture, but now that we have learned survey methods using eDNA, we are investigating whether it is possible to detect eDNA in the ponds of Sorakuen, where the population of turtles is known. Since it was difficult to detect eDNA in the water during the winter, we are now trying to detect it from the mud in the pond.

【PS-07】

環境 DNA を用いた国宝松江城のカメ類調査 ～松江堀川の健全な生態系回復を目指して～

長尾 祐希¹, 原田 侑季², 客野 瑞月², 源 利文³, 高原 輝彦²

1. 島根県立松江北高等学校, 2. 島根大学生物資源科学部, 3. 神戸大学大学院人間発達環境学研究科

島根県の松江城の堀川では外来種のみししっぴアカミミガメが定着しており、在来種のみししっぴガメの生息が脅かされるなど、生態系への影響が危惧されている。これまでにアカミミガメの駆除活動が精力的に行われているが、水中で活動することの多いカメ類は捕獲や目視での調査が難しく、生息数などを把握するのは容易ではない。そこで、環境 DNA 分析を用いることで、松江城周辺におけるカメ類の生息状況を簡便に明らかにできるのではないかと考えた。そのために、アカミミガメ、クサガメ、イシガメを対象にして、2023 年 12 月からの偶数月に 1 回、堀川周辺 7 地点から水 1L を採取し、濾過・DNA 抽出処理後、定量 PCR で環境 DNA を測定した。カメ類の環境 DNA 濃度は、冬季は低く、水温上昇とともに高くなった。アカミミガメでは多くの地点で環境 DNA 濃度が顕著に高く、イシガメではほとんど検出されないこともわかってきた。

【PS-08】

厚別南緑地における動物相の解明

A study to investigate the fauna of Atsubetsu Minami Forest Park

高橋 愛音¹, 大河内 杏実¹, 白井 心葵¹, 為安 柚花¹

1. 札幌日本大学中学校高等学校

厚別南緑地は本校に近接する 7.27 ha の自然公園で、かつては野幌森林公園（都市近郊では日本最大規模の自然公園）と接続していた夏緑 - 針葉混交林である。本校科学部のこれまでの調査から、特に夏緑樹林地帯では郊外の自然林に迫るほどのバイオマスをもち種多様性も高いことが示唆されている。その原因として、住宅地に囲まれていることからエゾシカやアライグマなどの大型哺乳類が侵入していないことが考えられる。そこで本研究では、緑地に存在する 3 つの水源を用いてメタバーコーディング解析（哺乳類）を行い、緑地の哺乳類相を調べる。また、野幌森林公園では侵入したアライグマが両生類を食害していることがすでに報告されている。厚別南緑地にアライグマが侵入していないと仮定すると、両生類相にも特徴がみられる可能性がある。それを調べるために、まずは自前でエゾアカガエルやエゾサンショウウオの単一種解析をできるように試行する計画である。

【PS-09】

環境 DNA 分析を用いた淡路島のため池でのミナミメダカの生息環境調査

脇本 純名¹

1. 白陵高等学校

ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) は環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類に指定され、保全が急務である。本研究は、環境 DNA 分析を用いてミナミメダカの生息状況を調べ、ミナミメダカが生息しやすい環境要因を特定することを目的とした。対象地域は兵庫県淡路島の 9 か所の重ね池（各重ね池は 3～7 個のため池から構成、計 40 か所で採水）とした。上流から下流へと 1 次元的に分布する重ね池をグループ化し、周辺の土地利用の影響を整理した。採水調査の結果、同じ重ね池に属する 3 か所のため池が陽性、他 37 か所が全て陰性であった。ヒトがほとんど立ち入ることのない池でも陰性となったため、一概に自然が残るため池がメダカにとって生息しやすいとは言えないかもしれない。陽性の池が少なく、メダカが生息しやすい条件を特定することはできなかったが、生息しにくい池の環境要因（水が濁っている、釣り人がいる等）について議論した。

【PS-10】

キタノメダカ及びミナミメダカの生息域継続調査

土屋 心宇¹, 末野 莉子¹, 富樫 和真¹

1. 山形県立米沢興譲館高等学校

日本には2種類の野生メダカが生息している。キタノメダカとミナミメダカである。しかし、両者は環境省のレッドリストにおいて絶滅危惧Ⅱ類に指定されており、山形県内には本来キタノメダカのみが生息しているとされている。

本校の先行研究では環境DNAを用いて山形県米沢市、南陽市、小国町での生息域調査が行われ、キタノメダカのみでなく、ミナミメダカの環境DNAが確認された。本研究では、昨年度と同じ地点で再度調査を行い、キタノメダカ及びミナミメダカの生息域がどのような変容を遂げたかを把握していく。

現在の時点では、山形県米沢市において、昨年度キタノメダカが生息していると示唆された4地点中3地点で再びキタノメダカの環境DNAを確認し、ミナミメダカが生息していると示唆された7地点中5地点でミナミメダカの環境DNAを確認した。今後は環境要因等を詳しく調査したうえで、両メダカの生息域の分布及び変容を明らかにしていく。

【PS-11】

ニッポンバラタナゴ保護池におけるタイリクバラタナゴの侵入調査

Survey of *Rhodeus ocellatus ocellatus* invasion in *Rhodeus ocellatus kurumeus* conservation pond

岡本 美羽¹, 門田 はな¹, 井上 樹¹, 堀川 知恵¹

1. 大阪府立高津高等学校

純粋なニッポンバラタナゴ（ニッパラ）は絶滅危惧 IA 類であり、その生息地は、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減少している。現在では一部地域でニッパラ保護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、目視での保全個体群へのタイバラの侵入調査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。そこで本研究では、環境 DNA 分析を用いた。今回は以前開発したニッパラとタイバラのプライマーを使用し、既に保全されているニッパラ保護池へのタイバラの侵入調査を目的としておこなった。今後も引き続き、開発した検出系を用いて、定期的なニッパラ保護池へのタイバラ侵入調査に加えて未知のニッパラ生息地の発見に取り組んでいきたい。

【PS-12】

環境 DNA 分析を用いた兵庫県におけるトゲナベブタムシの生息域調査

日野友晴¹, 源利文²

1. 淳心学院高等学校, 2. 神戸大学

水生昆虫のトゲナベブタムシは絶滅危惧2類に指定されており、保全が急務である。近縁種のアベブタムシは全国的に生息していることが知られているが、トゲナベブタムシについては生息域が把握できておらず保全上問題である。昨年度開発したトゲナベブタムシに特異的な環境DNA検出系を用いて、本研究では兵庫県中南部を中心に河川70地点で生息域調査を行った。野外での環境DNA調査の結果、70地点中15地点で生息が確認された。今までにトゲナベブタムシが発見された記録のある地点では高い確率で環境DNAを検出することができた。興味深いことに、今まで生息が確認されていない河川においても環境DNA調査では検出することができた。

今後は、今回生息が分かった地点での採捕調査を行い、希少性の高いトゲナベブタムシの新たな生息域を解明し、保全に貢献していきたい。



第7回 環境DNA学会つくば大会実行委員

Organizing Committee of The 7th Annual Meeting of The eDNA Society

小出水規行（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）[大会長]
Noriyuki Koizumi (National Agriculture and Food Research Organization) [Congress President]

今藤夏子（国立研究開発法人 国立環境研究所）[実行委員長]
Natsuko Kondo (National Institute for Environmental Studies) [Congress Chair]

石井弓美子（国立研究開発法人 国立環境研究所）
Yumiko Ishii (National Institute for Environmental Studies)

太田宗宏（株式会社建設環境研究所）
Munehiro Oota (KenKan Consultants Co., Ltd.)

沖津二郎（応用地質株式会社）
Jiro Okitsu (OYO Corporation)

郡司未佳（日本工営株式会社）
Mika Gunji (Nippon Koei Co., Ltd.)

小坂井干夏（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）
Chinatsu Kozakai (National Agriculture and Food Research Organization)

坂田雅之（北海道大学大学院農学研究院）
Masayuki Sakata (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

芝池博幸（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）
Hiroyuki Shibaike (National Agriculture and Food Research Organization)

竹村武士（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）
Takeshi Takemura (National Agriculture and Food Research Organization)

釣 健司（国立研究開発法人 土木研究所 / 株式会社建設環境研究所）
Kenji Tsuru (Public Works Research Institute / KenKan Consultants Co., Ltd.)

中島颯大（地方独立行政法人 北海道立総合研究機構）
Souta Nakajima (Hokkaido Research Organization)

深谷肇一（国立研究開発法人 国立環境研究所）
Keiichi Fukaya (National Institute for Environmental Studies)

堀 正和（国立研究開発法人 水産研究・教育機構）
Masakazu Hori (Japan Fisheries Research and Education Agency)

村岡敬子（国立研究開発法人 土木研究所）
Keiko Muraoka (Public Works Research Institute)

山川 央（公益財団法人 かずさ DNA 研究所）
Hisashi Yamakawa (Kazusa DNA Research Institute)

山本哲史（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）
Satoshi Yamamoto (National Agriculture and Food Research Organization)

渡部恵司（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）
Keiji Watabe (National Agriculture and Food Research Organization)

生駒優佳（学会事務局）
Yuka Ikoma (The eDNA Society)

小林有季子（学会事務局）
Yukiko Kobayashi (The eDNA Society)



第7回 環境DNA学会つくば大会実行委員

Organizing Committee of The 7th Annual Meeting of The eDNA Society

2024年11月13日発行

Published on November 13, 2024

発行元：一般社団法人環境DNA学会 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1-5 龍谷大学内

Issued by: The eDNA Society, c/o Ryukoku University, 1-5 Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

e-mail: office@ednasociety.org

Homepage: <https://ednasociety.org/>

Copyright 2024 The eDNA Society, Japan, All rights reserved（無断転載不可）