

一般社団法人 日本環境アセスメント協会

2021年度 第17回技術交流会（2021年12月10日）

環境DNA調査の誤差要因の整理と 調査記録票の考案

大日本コンサルタント株式会社
環境エネルギー推進部 計画室

小田正明○、石黒賢一、勝亦 修、吉田 豪、海老原学

○印：発表者

環境DNA調査の誤差要因の整理と調査記録票の考案

目次

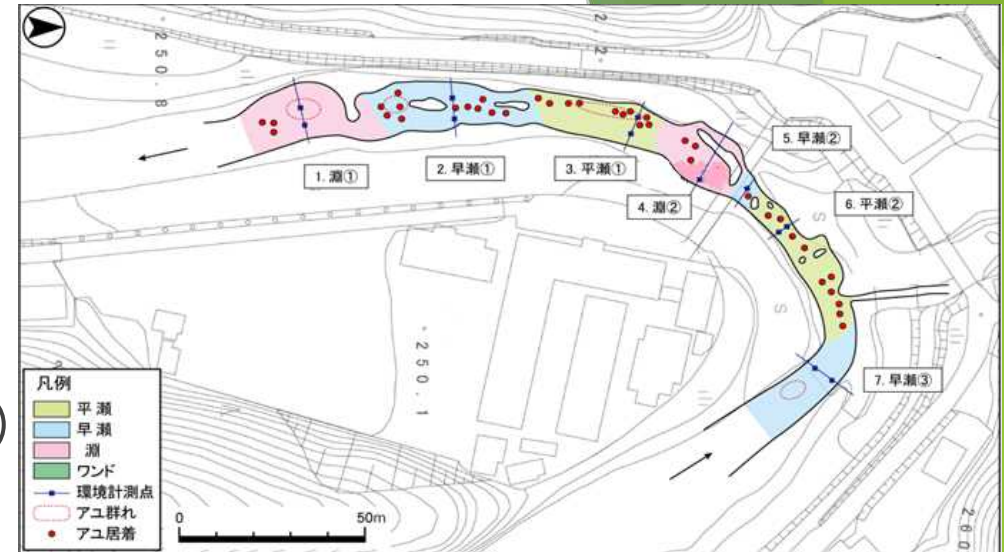
1. 材料と方法
2. 誤差要因の整理
3. アユの現存量の算定手順
4. 結果 1 : 採水場所の違いと分析誤差
5. 結果 2 : 現存量の推定方法による誤差
6. 近年の他事例との比較検討
7. 環境DNA調査記録票2019の考案
8. 参考 : 土研の記録様式2020の紹介

【概要】

近年、新技術として注目されている環境DNA調査は、河川水辺の国勢調査への導入が検討されるなど普及が進んでいるが、様々な要因で分析結果に誤差が生じることが知られているものの、分析誤差を検証する手法が確立されていない。そこで、調査分析の経緯を記録する記録票（案）と、分析誤差を検証した事例を紹介する。

材料と方法

- ▶ 場所：アユが遡上する溪流部
(標高約300m)
- ▶ 期間：R1年7～9月 (H29,30と比較)
- ▶ 方法



1. 潜水調査によるアユの個体数カウント
2. 捕獲調査を踏まえた現存量の推定
3. 環境DNA分析結果と推定現存量の相関分析 (3ヶ年)

▶ 課題と工夫

1. 誤差要因のうち、採水場所 (流心・左岸・右岸) の違いによる誤差を検証
2. 現存量の推定方法を比較 (湿重量×体長自乗) ※

※体長自乗：体表面積の指標



誤差要因の整理

- ▶ 事前に土木研究所に聞き取り調査を実施。
- ▶ 環境DNA調査における変動要因と課題を整理。
- ▶ 採水位置、現存量の2項目について、検証計画を立案

表 環境 DNA 調査（リアルタイム PCR 法）における変動要因または課題

No.	変動要因または課題	内容	H31 内容
1	採水の水温	水温が高いと DNA 片の発生量は多くなるが、分解も早くなる。	記録
2	採水の時間帯	アユの活動が活発な午前中は DNA 量が多く、午後は少なく、日没後は変動が少ない。	記録 (課題)
3	採水の位置	流心と水際では検出値が異なる。	比較 実施
4	採水の量	採水中に含まれる DNA 量が少ないと差異が大きい。	前年 同様
5	採水の時期 (生態の活性)	産卵期・活性の高い時期・苦しんでいる時に DNA 量が増える。	前年 同様
6	採水の流況	早瀬では小さな遊泳魚が多く出るが、流れが巻いている淵の方が、種数は多く出る	記録
7	流量・流速	流れの速さにより、DNA 量に違いが出る。	記録
8	釣り人の有無	釣り人よりも上流側での採水が望ましい。	記録
9	採水場所の周辺施設	おとり鮎の飼育移設等が近くにあると、排水中の DNA 片が河川に流入して、生息量が過大に算出される。	前年 同様
10	採水後の濾過方法	土木研究所では「現地濾過」を推奨している。オスバン消毒液（塩化ベンザルコニウム）による DNA 固定は常温では効果が低いことが分かってきており、20° 以下の冷蔵が必要である。オスバンにより DNA 量が約 1 割減る。	前年 同様 (課題)
11	運搬・保管時の水温等	オスバンで固定する際には、水温ロガーなどで採水時、固定時、運搬時、保管時の水温を記録しておく、異常値が出た際に DNA 分解が進行した作業段階を特定できて良い。採水から濾過作業までの日数の記録も重要である。	記録
12	試薬の劣化等	分析結果が一定の範囲に収まるよう仕様を固める必要がある。	記録
13	分析者の技量	全く同じ時期・地点・方法で採水・分析しても、分析者の技量により、結果に大きな変動が出る。	記録
14	生息量比較の範囲	過年度は、採水地点より上流 200m 範囲の潜水調査の結果と比較しているが、流況によるものの上流 400 ~ 800m の DNA まで拾っているという報告がある。どのぐらい上流の DNA が採水されるか、放流次期の初期に実験してみることも考えられる。	前年 同様 (課題)
15	生息量比較の値	湿重量と DNA コピー数の関係よりも、水中の DNA 片の量は、体表面の大きさに比例することが分かってきたので、体長の 2 乗と相関した方が良いかも知れない。	比較 実施

注 1) 太文字は、今後の比較検討が必要と考えられる要因または課題。

注 2) 赤字は、上記のうち、本年度に比較検討を行う要因または課題。

アユの現存量の算定手順

▶ 潜水に基づく推定（流量当たり・体長区分別）

1. 捕獲個体の現存量 = 相関式（図1）に基づく平均湿重量（case1 : g/mL）
= 体長自乗の平均（case2 : mm²/mL）
2. 現存量（case1,2） = 潜水の確認個体数 × 捕獲個体の現存量

▶ 環境DNA分析結果との相関分析

▶ 現存量とDNAコピー数/mLを比較

既往文献（図2）と同様に
DNA濃度とアユ現存量の
相関性が期待される

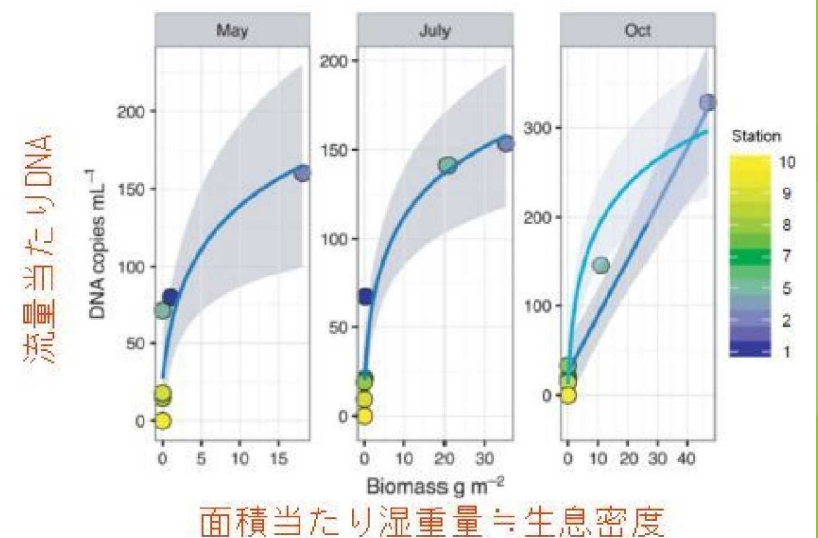
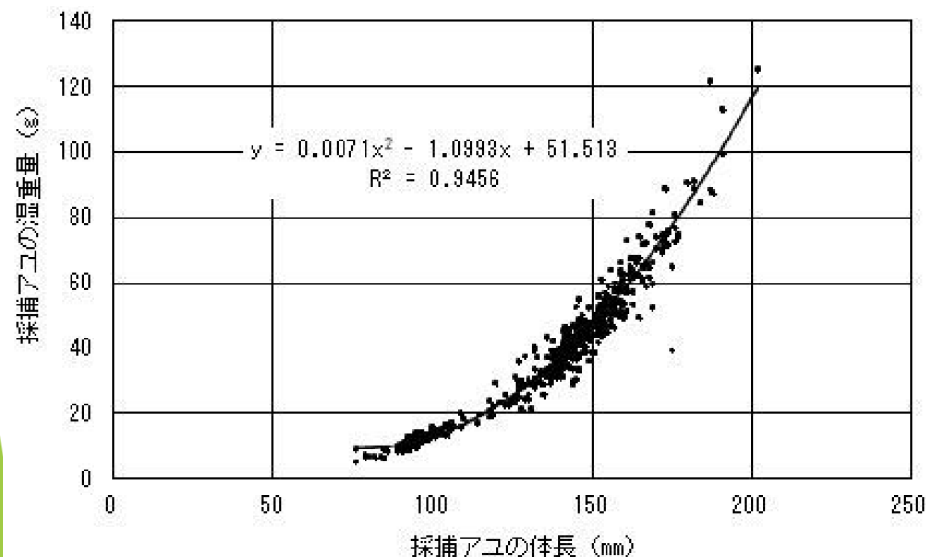


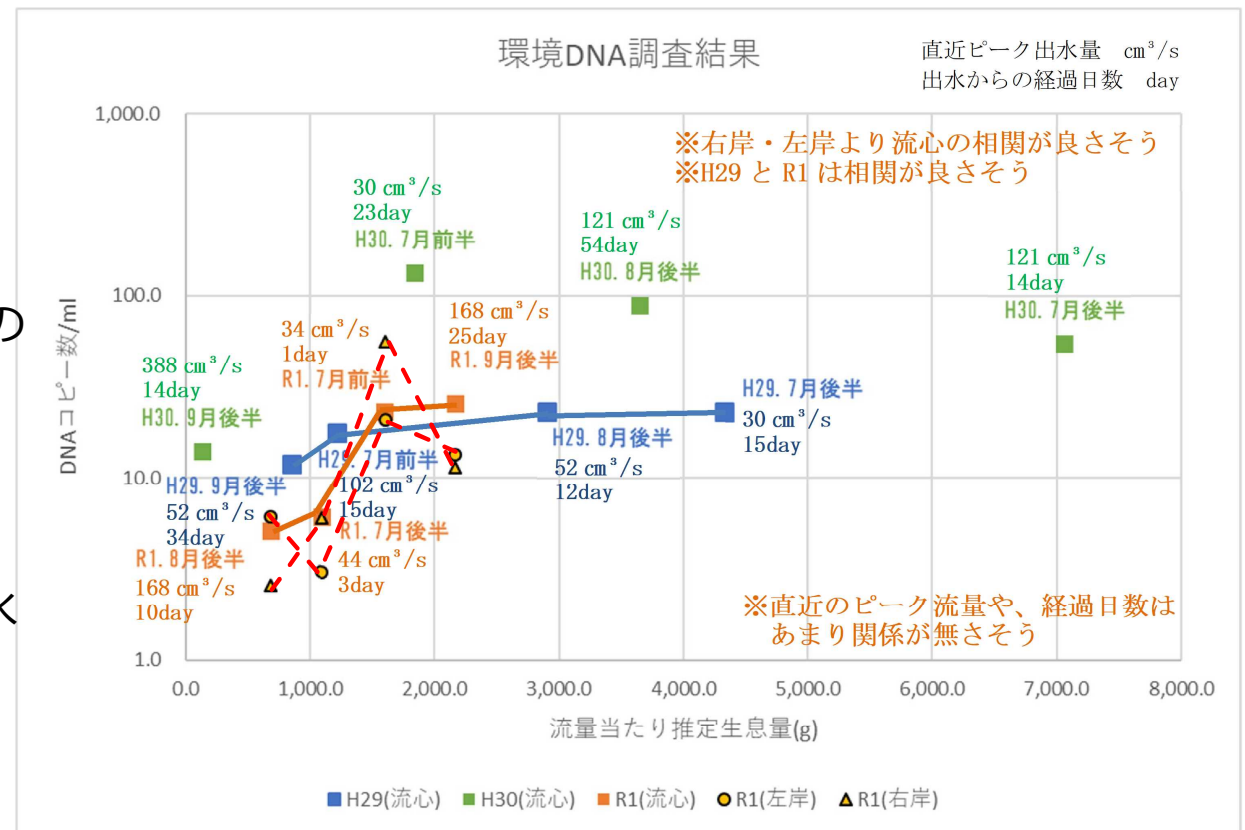
図1.採捕アユの体長と湿重量の相関式（3ヶ年） 図2.アユ生息量とDNA濃度の関係（Doi et.al,2017）

図2は、Doi et.al(2017) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, Freshwater Biology62: 30-39より

結果1：採水場所の違いと分析誤差

- ▶ 流心での採水データは、**H29**, **R1**は右肩上がりで、**相関が良い**と言える。
- ▶ 左岸・右岸の採水データは、値が上下しており、相関が良くない。

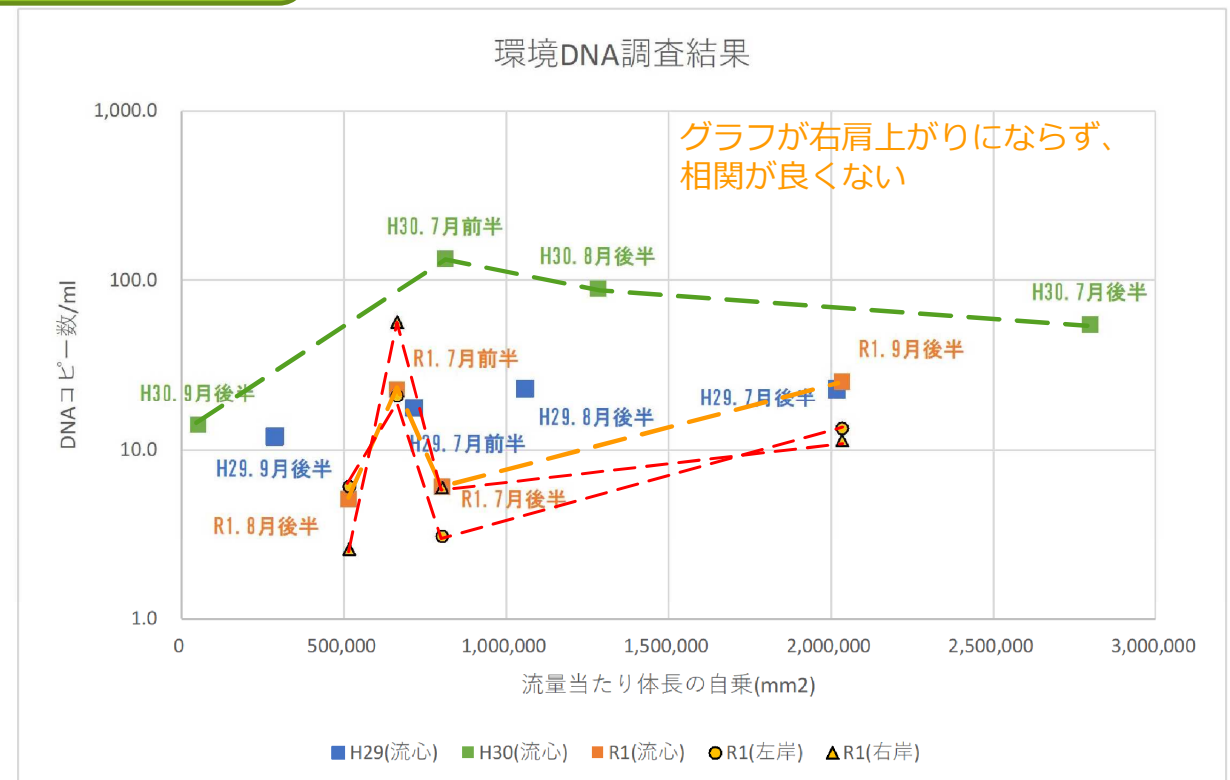
- その他の誤差要因
 - ▶ 採水直前のピーク流量：関係なさそう
 - ▶ 採水日のピーク流量からの経過日数：関係なさそう
 - ▶ アユの遡上数・放流数：関係なさそう
 - ▶ 潜水調査の範囲（DNA採水箇所の上流200m区間）：今後の課題



結果2：現存量の推定方法による誤差

- ▶ 体長自乗と流心データの比較では、**H30**, **R1**が右肩上がりにならず、**相関が良くない**と言える。
- ▶ 左岸・右岸の採水データも、値が上下しており、**相関が良くない**。

流心データとアユ現存量（湿重量）の相関が良いと結論づけた。



近年の他事例との比較検討

流心データとアユ現存量（湿重量）の相関が良いという結果に関連し、、、

▶ 環境DNAの実用化に向けた共同研究 最終報告会 （土研、R3年6月30日）

▶ 個体数推定の課題：リアルタイムPCR法

▶ **別河川との比較**が未確立（神戸大学 源利文）

▶ 多種検出の留意点：メタバーコーディング法

▶ 汽水域の採水（株エコー 平田真二）

▶ **流心より河岸の方が**、表層より低層の方が、**種が多く検出**。

▶ 上流域の採水（パシフィックコンサルタンツ(株) 渡部建）

▶ 1箇所での採水量より、箇所を増やすと種数把握に効率的

▶ 2Lの採水で検出種数が頭打ちになる⇒1L×2箇所が良いかも。

▶ 採水場所（流心・河岸・瀬・淵）の選択よりも、
採水量（採水箇所数）が種数や希少種の検出率を上げるのに有効。

・ 河岸は流速が遅く、
多様なDNAが残留

※村岡敬子：河川環境調査への環境DNAの展開に向けた共同研究発表会、
日本水産学会誌、86巻3号、p.232、2020.

R1年10月の
中間報告は
公表中

環境DNA調査記録票2019の考案

- ▶ 経年比較のためには当時の手法の把握が重要
- ▶ 調査及び分析の記録を残す様式2019を考案

翌年に土研版の
様式2020が公表

【採水・運搬】2019

環境DNA調査記録票(1/4)[採水～運搬]		サンプルNo.	190722-02	
採水日	令和元 年 7 月 22 日	調査員名	石橋	
天候	雨	採水場所	清瀬橋	
緯度	35° 03'56.6"N	経度	137° 32'28.8"E	
◆採水				
採水時間	10 時 10 分	採水地点	() 左岸側・右岸側・その他()	
採水場所の周辺施設(例)おとり鮎の飼育施設有無等	無	採水時の河川の水質	18.3 °C	62.4 cm/s
採水した水深	cm	採水量	1 L	
河川水の透明度	(透明) ササ濁り・濁り	採水時の流況	早瀬・平瀬() その他()	
釣り人の有無・人数	0 人	その他	潜水調査の(前) (後) に採水	
◆現場運搬の場合				
運搬開始時刻	時 分	運搬終了時刻	時 分	
運搬方法	シリジ・アスピレーター・その他()			
◆DNA固定の場合				
固定開始時刻	10 時 20 分			
DNA固定液	スパン(塩化ベンザルコニウム)	固定液濃度	0.01 %	ロット番号 190722-02
固定終了時刻	10 時 25 分	固定終了時、サンプルの水温	18.3 °C	
◆搬送				
サンプルの搬送方法	クーラーボックスに入れ、普通自動車で運輸会社まで運び、クール宅急便で分析所まで搬送 ペンダント式水温計をクーラーボックスの上側に設置し午前11時よりモニタリングを実施			
サンプル搬送用のボックス投入時の時間	10 時 45 分	サンプル搬送用のボックス温度		
※オスパン(塩化ベンザルコニウム)は0.01%になるように添加。1Lの場合は1ml添加する。 ※搬送は冷蔵指定にて。冷蔵の場合はDNAが細分化され検出出来ないことがあります。 ※クーラーボックスに入れた温度計ロガーはそのままの状態で保管をお願いします。				

環境DNA調査記録票(2/4)[採水～運搬]		サンプルNo.	190722-02	
【図面】●採水場所				
【写真】●採水場所・採水方法・釣り人の状況等				
【コメント欄】●採水・運搬時				
クラボックスにはペットボトルに水を準備し固定後直ぐにクラボックスに保存した。 クラボックス内の温度のモニタリングは10時から計測開始するようにセットした。				

【保管・分析】2019

環境DNA調査記録票(3/4)[分析所到着～分析]		サンプルNo.		
分析所到着日	2019 年 7 月 23 日	分析者氏名(経験年数)	芝田直樹 ()	
分析所到着時の時間(サンプルボックス開封時間)	9 時 10 分	保管温度	°C	
◆運送				
運送開始時刻	2019 年 7 月 23 日	10 時 5 分		
運送方法	ガラスファイバーフィルター・カートリッジフィルター・その他()	塩素処理液 品名		
塩素処理濃度	10 %	フィルターの孔径	0.7 μm	
運送したサンプルの保管方法	() その他	運送したサンプルの保管温度	-20 °C	
◆DNA抽出				
DNA抽出方法	カートリッジ式フィルター・グラスフック①・フィルター	DNA抽出キット名(ロット番号)	()	
【カートリッジ式フィルターでの抽出の場合】				
スクリューボックスを取り付けたローター(例)10rpmで58℃で20分間凍結	スクリューボックスを入れたコニカルチューブの凍結方法	例) 6.000gで1分間凍結		
【グラスファイバーフィルターでの抽出の場合(タンパク質の分解処理)】				
恒溫槽での保溫処理方法	58℃で30分間保溫処理	サンプルの凍結方法	6.000gで2分間凍結	
◆DNA精製				
精製方法(取扱マニュアル・版)	標準版「環境DNA調査・実験マニュアル」			
精製後のDNA濃度	100	μL		
◆DNA分析				
DNA分析開始時刻	時 分	DNA分析方法	リアルタイムPCR・Mifishメタバーコーディング	
塩基配列情報の入手先	NCBI・BOLD	プライマーの特異性確認方法	Primer-BLAST () その他()	
使用装置の型名(メーカー)	Quantstudio 3	PCR酵素名(ロット番号)	()	
PCRサイクル数	35	DNA分析終了時刻	時 分	

参考：土研の記録様式2020の紹介

- ▶ 国立研究法人 土木研究所 河川生態チーム
 - ▶ 環境DNA情報 報告書記載様式 案 Ver_1.2.1 (様式1～11)
 - ▶ 調査にあたっての留意事項 (暫定版)
 - ▶ 2020年12月11日公表
 - ▶ https://www.pwri.go.jp/team/rrt/topic/2020/201211_01.html

様式一覧

様式名	様式番号
基礎情報	様式-1
採水地点情報(流況)	様式-2-1
採水地点情報(地形)	様式-2-2
地点写真	様式-3
ろ過情報・DNAの抽出	様式-4
網羅解析分析条件	様式-5 [※]
プライマー情報(記載論文有)	様式-6-1 [※]
プライマー情報(記載論文無)	様式-6-2 [※]
インデックス配列情報	様式-7 [※]
ライブラリーの濃度・電気泳動結果	様式-8 [※]
解析方法(代表配列の決定方法、種の判定基準等)	様式-9 [※]
遺伝配列と該当種の決定	様式-10 [※]
確認情報一覧表(生物リスト)	様式-11 [※]
その他	
様式-2に記入する情報を現地で記載するための現地野帳	参考 現地野帳
報告書記載様式内の専門用語の説明	参考 用語説明

[※]様式5以降は、種網羅解析を対象としています。

基礎情報 (入力例)

様式-1

項目	氏名	氏名	氏名
採水関連情報	氏名：採水 太郎	氏名：水環境株式会社	
採水日時	様式-2	情報なし	備考
地点座標データ	様式-2	情報なし	備考
採水機材	様式-2	情報なし	備考 記録なし
採水量	様式-2	情報なし	備考
試薬の添加	様式-2	情報なし	備考
環境データ(水温等)	様式-2	情報なし	備考 一部欠測あり
採水後の保管	様式-2	情報なし	備考
試料名、合計数	試料名：A-1～23、B-1～10、採水-い～ぬ	合計数：43	
地点写真	様式-3	情報なし	その他
ろ過関連情報	氏名：ろ過 二郎	氏名：水環境株式会社	
ろ過日時	様式-4	情報なし	備考
ろ過場所	様式-4	情報なし	備考
ろ過機材	様式-4	情報なし	備考
ろ過水量等	様式-4	情報なし	備考
試薬の添加	様式-4	情報なし	備考
ろ過後の保管	様式-4	情報なし	備考

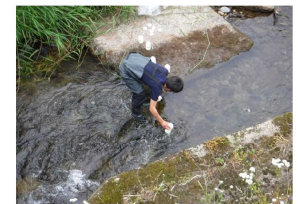
DNA抽出

項目	氏名	氏名	氏名
DNA抽出	氏名：分析 健太	氏名：水環境株式会社	
抽出日時	様式-4	情報なし	備考
抽出	様式-4	情報なし	備考
抽出後の濃度	様式-4	情報なし	備考
DNAの保管	様式-4	情報なし	備考

種網羅解析

項目	氏名	氏名	氏名
分析日時	開始：2019/10/3 10:00	終了：2019/10/10 17:00	
分析者	氏名：分析 三郎	氏名：環境分析株式会社	
使用機材	PCR	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient(TaKaRa)	
定置	Syngene™H1(BioTek)		
電気泳動	Fragment Analyzer(Advanced Analytical Technologies)		
NGS	MiSeq(Illumina)		
試薬情報	PCR	TaKaRa Ex Taq(TaKaRa)、10×Ex Tag Buffer (Mg2+plus)(TaKaRa)、dNTP Mixture(TaKaRa)	
精製	Agencourt AMPure XP(BECKMANCOULTER)		
定量	Quantifluor dsDNA System(Promega)		
電気泳動	dsDNA 915 Reagent Kit(Advanced Analytical Technologies)		
NGS	MiSeq Reagent Kitv3(Illumina)		
プライマー情報	様式-7-1(論文有)	様式-7-2(論文無)	その他
分析条件	1st(PCR/反応液組成)	様式-5	情報なし 非公開 備考
	1st(PCR/反応条件)	様式-5	情報なし 非公開 備考
	2nd(PCR/反応液組成)	様式-5	情報なし 非公開 備考

点写真



採水地点：A2
採水日：2020/3/3
コメント：

採水地点がわかるような写真

採水地点：
採水日：
コメント：