

パッシブサンプリング法による 環境DNA調査の可能性

1. パッシブサンプリング法の紹介

1-1. パッシブサンプリング法とは

- 環境DNAのサンプリング方法は水1Lを採水することが主流

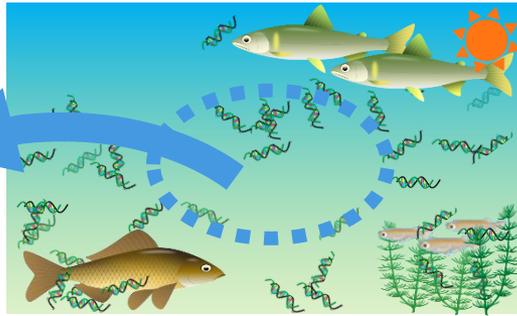
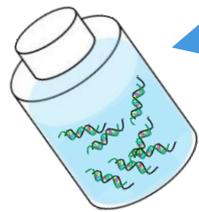
【課題】

- ・ 直接的に採捕等で確認された種の一部がMB解析で検出されない
- ・ 環境の時間変化が大きい感潮域において検出率が低下する

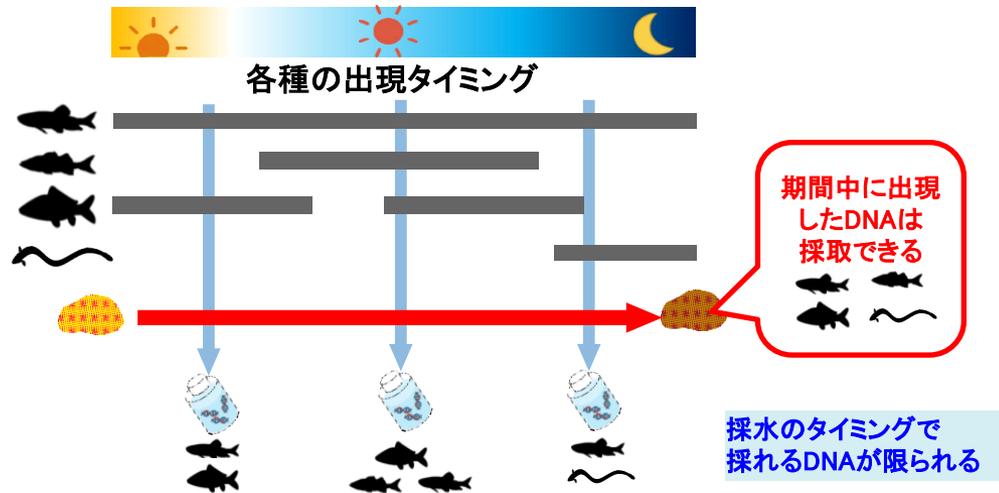
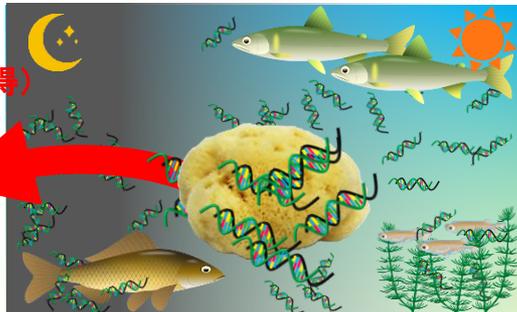
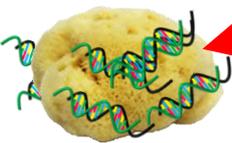
➡ 採水＝瞬間値の取得が原因のひとつ？

- 課題の解決策として、環境DNAを吸着する素材を環境中に設置し、一定期間後に回収するパッシブサンプリング法（以下、「PS法」。）が提案され始めている。
- PS法の特徴は、環境DNAの吸着材を一定期間環境中に設置（放置）するだけでよいため、
 - ①時間累積的な生物情報を得られる可能性が高いこと、
 - ②簡易的かつ省力的であること

採水法
(瞬間値を取得)



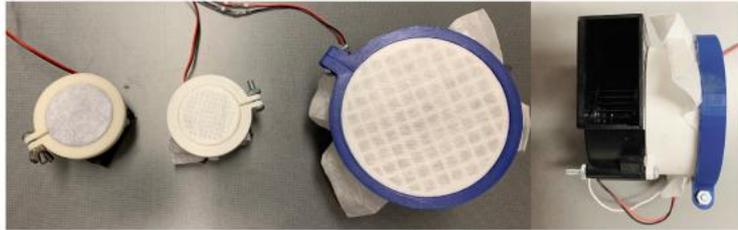
PS法
(時間積算値を取得)



1. パッシブサンプリング法の紹介

1-1. パッシブサンプリング法とは

GFF



Nina R et al. (2022). Environmental DNA.
DOI: 10.1002/edn3.385

セルロースナイトレート膜

Redden DJ, et al. (2023).
Science of the Total Environment.



Cindy Bessey et al. (2021).
COMMUNICATIONS BIOLOGY
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-01760-8>

天然乾燥海綿



Gert-Jan Jeunen a et al. (2024).
Science of the Total Environment
<https://doi.org/10.1016/j>



このほか、様々な素材で検討されている。。。

1. パッシブサンプリング法の紹介

1-2. パッシブサンプリングの実施状況

- 弊社を含む共同研究グループにおいても、天然乾燥海綿を用いて試行中
- 一昼夜を目安に捕集するため、ブイや錘、ロープ等を用いて設置
- 回収時に海綿をシリンジで圧搾・脱水して冷凍発送



今回は、1gにカットした海綿を1地点につき4個ずつカゴ等に入れ設置した。



効率的な分析手法は、特許出願中です。
PCT/JP2023/036721

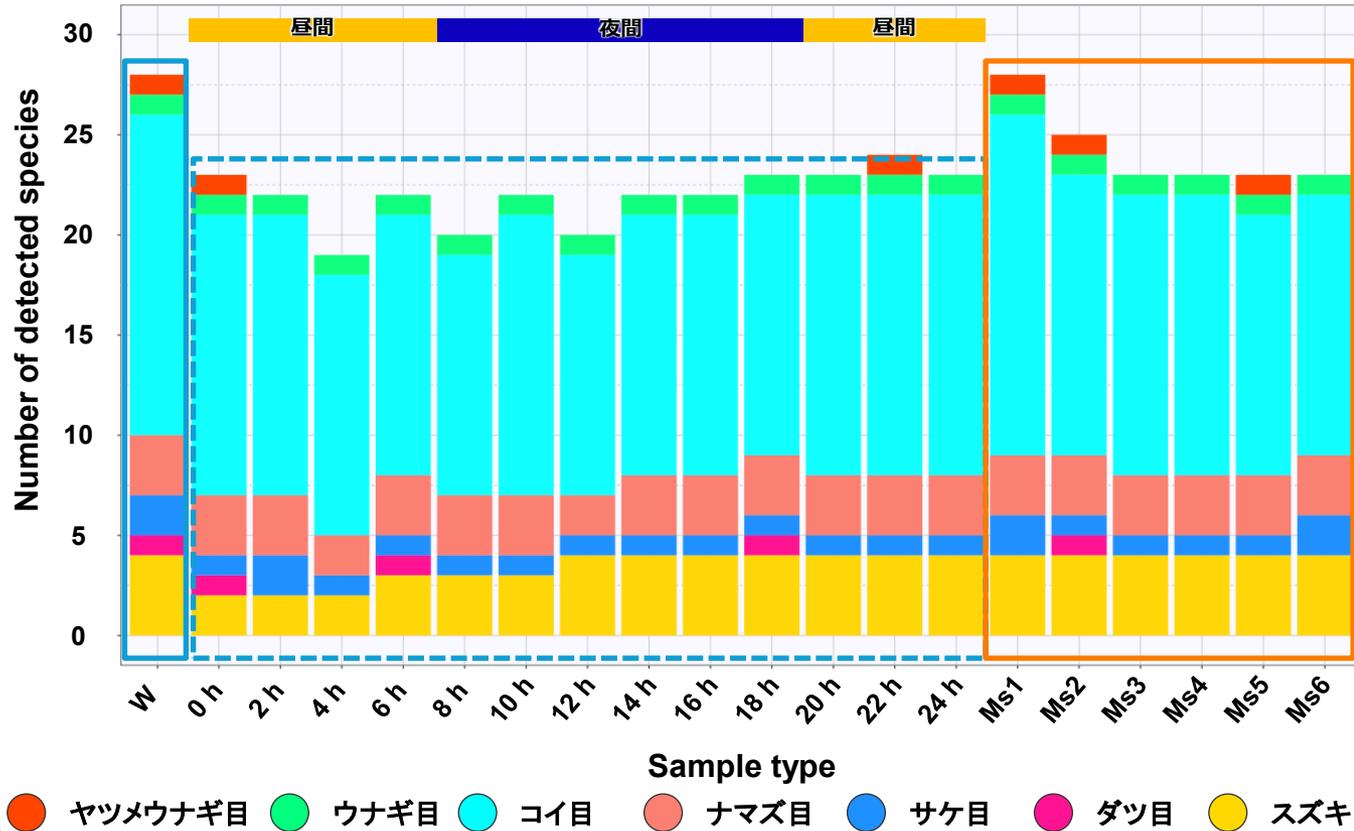


- 冷凍状態で分析室へ発送
- 環境DNA分析へ

1. パッシブサンプリング法の紹介

1-2. パッシブサンプリングの実施状況

- 2時間おきに採水したサンプルと24時間設置したPS法を比較



Sample type

W : 河川水 (全時間)
(n = 39の累積)

0-24h : 河川水 (時間別)
(各n = 3の累積)

Ms : PS法 (海綿スポンジ)
(各n = 3の累積)

**24時間の累積種数と同等の魚種数を安定的に検出
河川環境におけるPS法(海綿スポンジ)の有効性を示した**

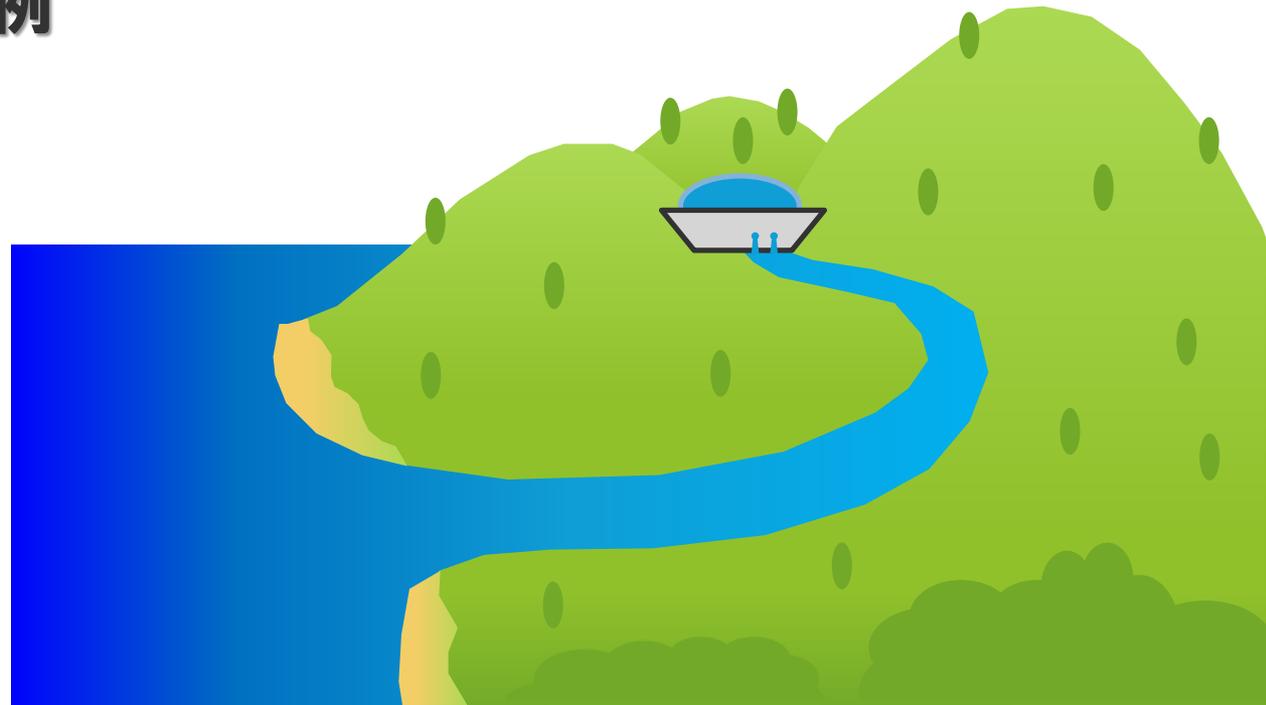
どんなところで成果をあげてきたか

ダム湖の事例

河川の事例

河川(汽水域)の事例

海域の事例



2. パッシブサンプリング法の事例

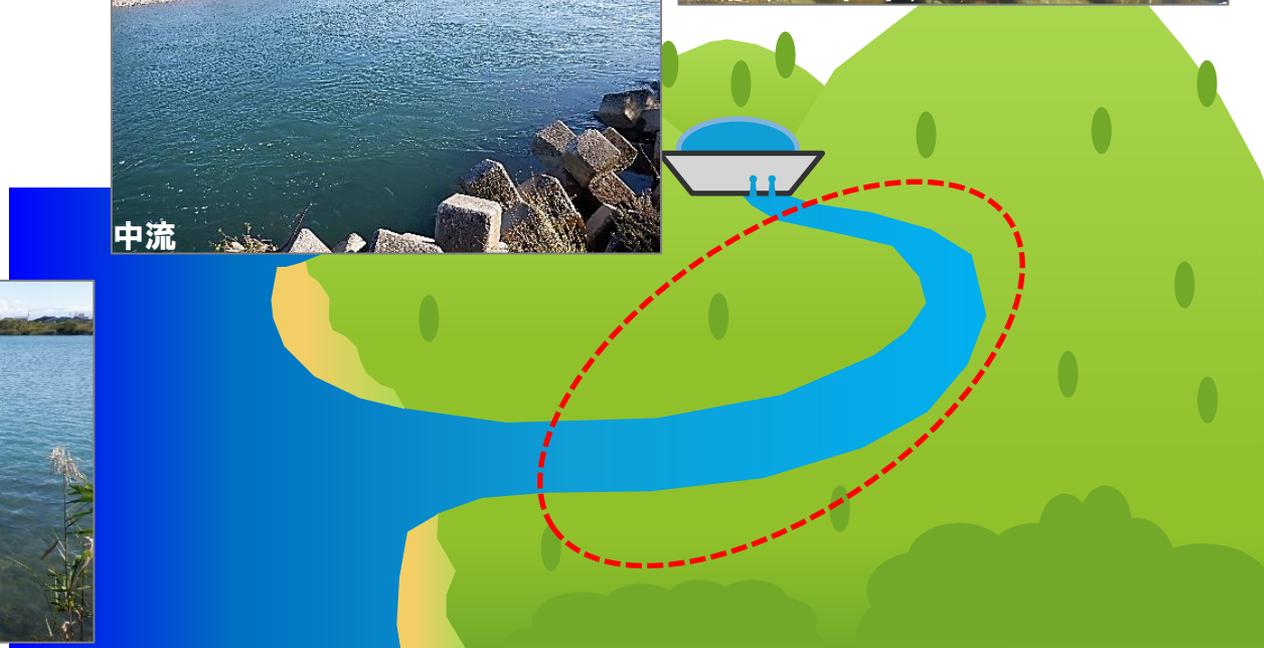
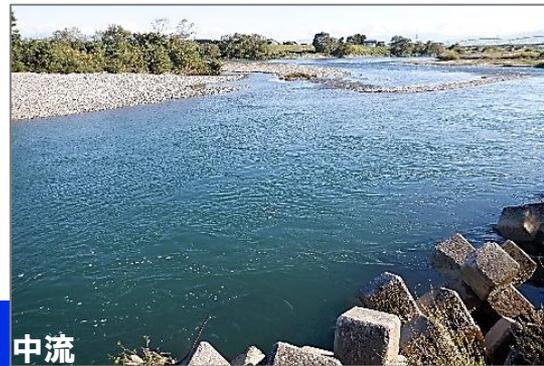
2-1. 河川の事例(砂礫河川:庄川)

ダム湖の事例

河川の事例

河川(汽水域)の事例

海域の事例



2. パッシブサンプリング法の事例

2-1. 河川の事例(砂礫河川:庄川)

- 庄川の直轄管理区間（5地区）にて、採捕、採水、パッシブサンプリングの3手法で調査
- 地区1～5のすべてでPS法の確認種数が採捕、採水法を上回った。
- PS法で検出されなかった種はオオクチバス、ブルーギルやカムルチー等、止水域や緩流の生息種が含まれており、ワンド等他で実施したPS法の結果を加えることで概ねカバーされることも確認している。

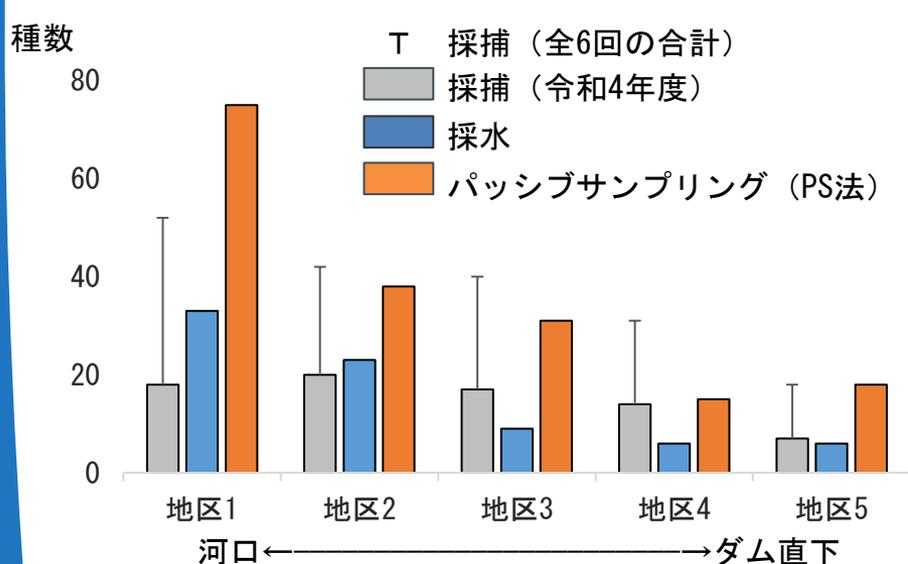


図 地区別の確認種数

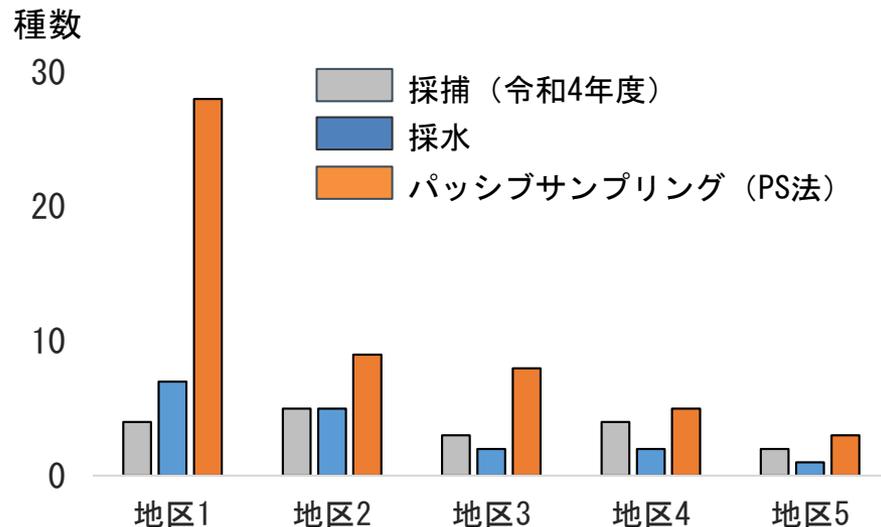


図 夜行性種の地区別・調査方法別の確認種数

PS法により、採捕と比較しても十分、採水法とも差別化できる時間累積的な成果を得た

2. パッシブサンプリング法の事例

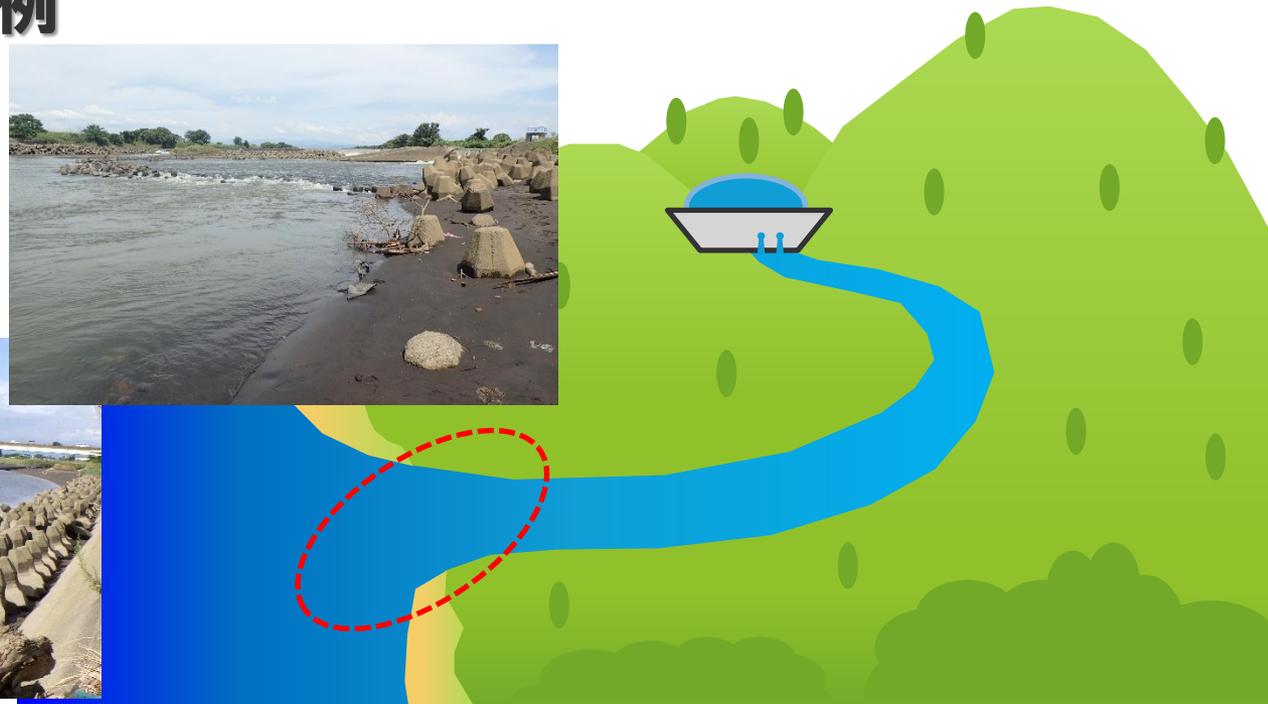
2-2. 河川(汽水域)の事例(泥河川:白川・緑川)

ダム湖の事例

河川の事例

河川(汽水域)の事例

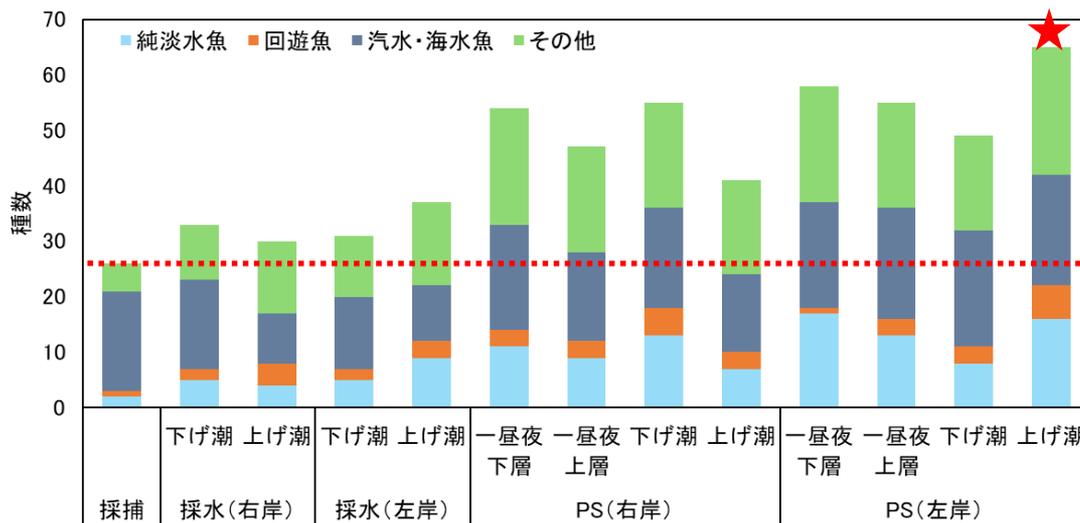
海域の事例



2. パッシブサンプリング法の事例

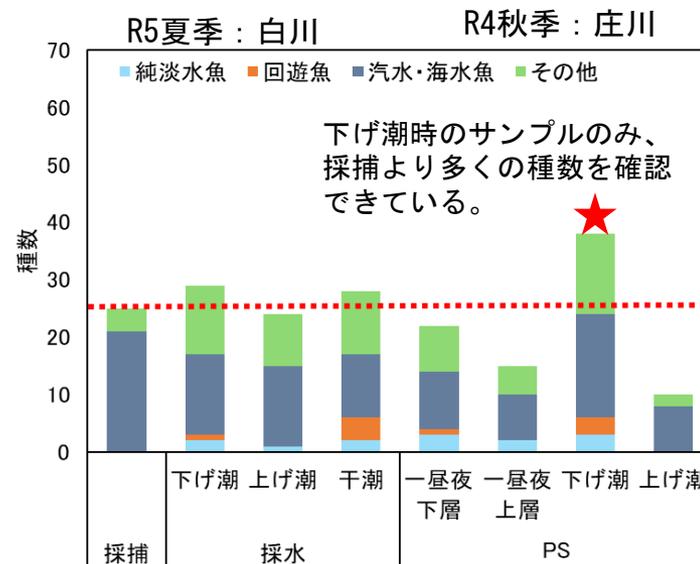
2-2. 河川(汽水域)の事例(泥河川:白川・緑川)

- 白川・緑川の河口部にて、採捕、採水、パッシブサンプリングの3手法で調査
- 最も多くの種を確認したのは緑川、白川ともにPS法(図中★)であった
- 回収時のサンプルの状況から、上げ潮時等の濁りによる目詰まりの影響が大きいことが考えられた。



注1) 属止めの種等、生活型が不明瞭な種は「その他」とした。
 注2) ★は最も種数が多く検出できたサンプル。

図 設置方法別・生活型別 確認種数 (R5秋季：緑川河口部)



注1) 属止めの種等、生活型が不明瞭な種は「その他」とした。
 注2) ★は最も種数が多く検出できたサンプル。

図 設置方法別・生活型別 確認種数 (R5秋季：白川河口部)

2. パッシブサンプリング法の事例

2-2. 河川(汽水域)の事例(泥河川:白川・緑川)

- 海綿の目詰まりが著しかった白川河口部のサンプルについて、沈着物の分析を行った
- 結果、海綿からはあまり種数が確認できなかったサンプルについても多くの種を確認することができた

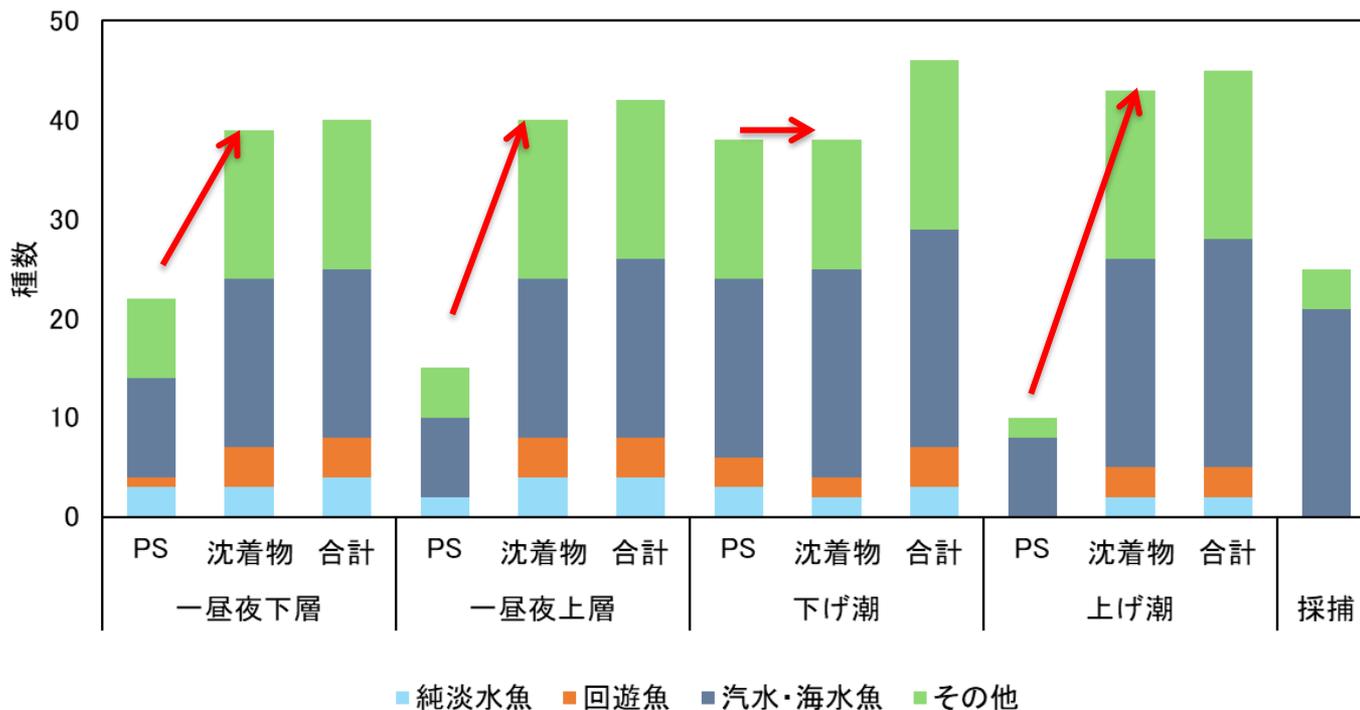


図 沈着物の分析結果 (白川河口部)

濁り等により海綿が十分な環境DNAを捕捉できない場合、沈着物を分析することで多くの種を確認できる可能性がある。

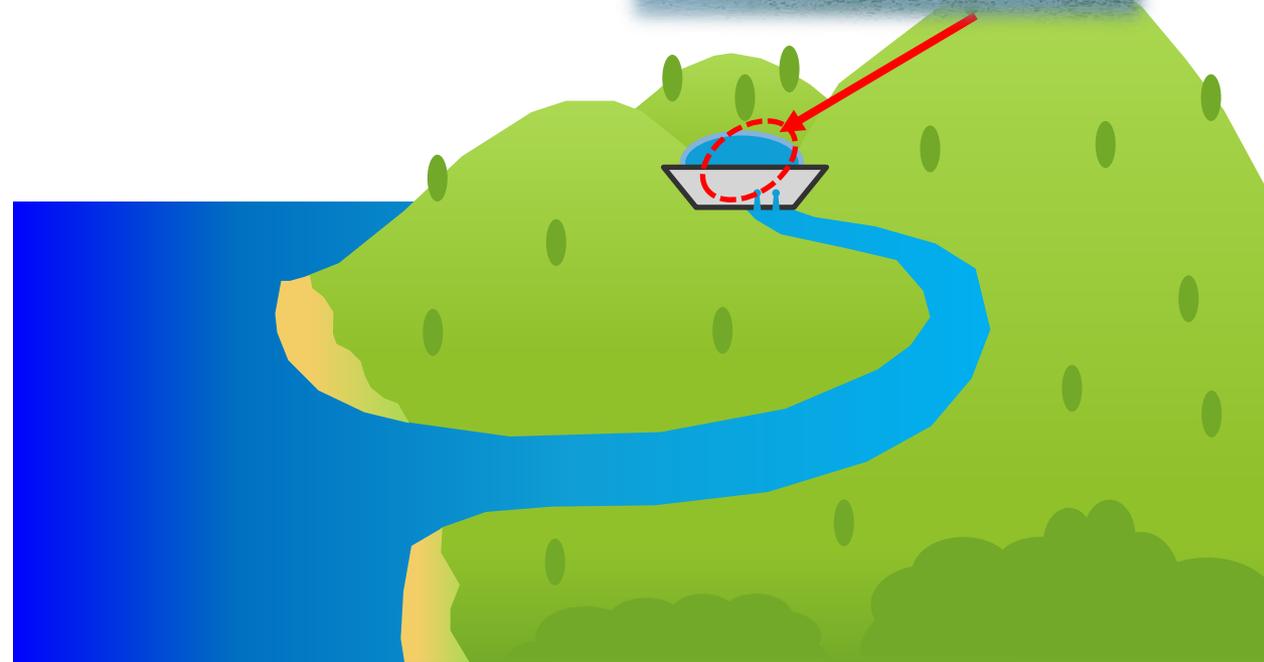
2-3. ダムの事例

ダム湖の事例

河川の事例

河川(汽水域)の事例

海域の事例



2. パッシブサンプリング法の事例

2-3. ダムの事例



曳航した海綿が暴れて、期待したようにDNAが取れず . . .
(改良方法の検討中. . .)

2. パッシブサンプリング法の事例

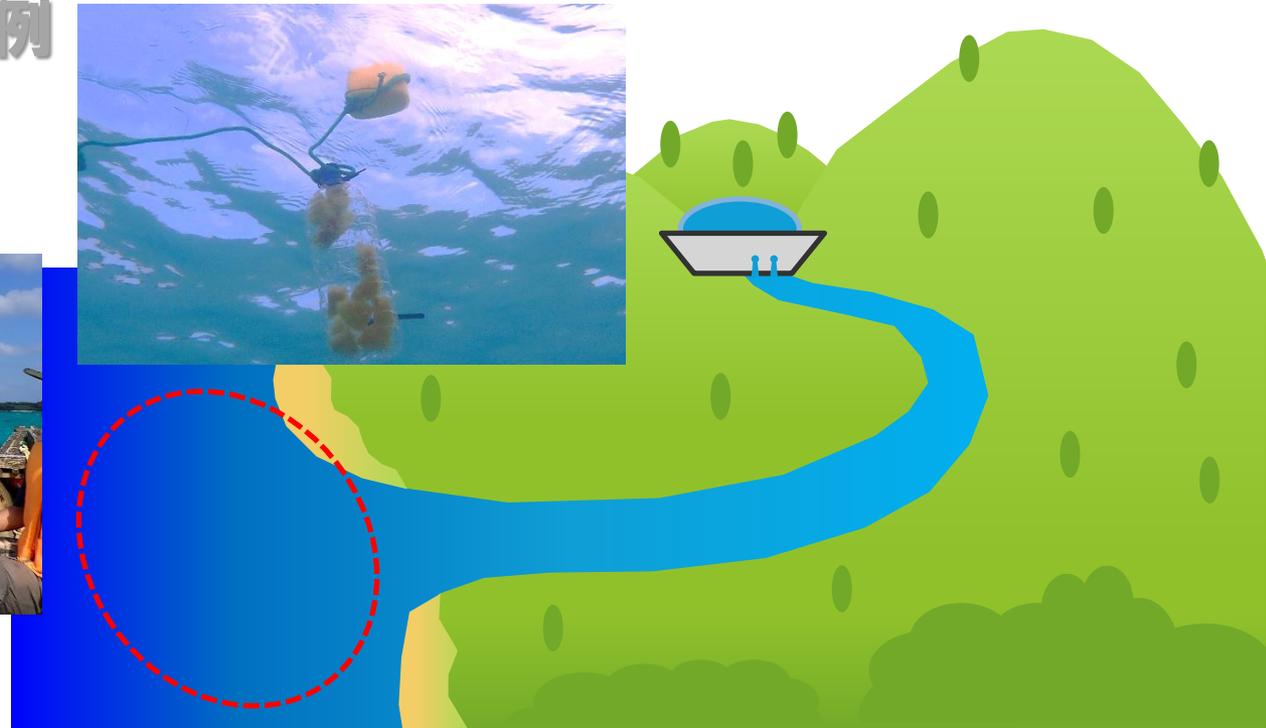
2-4. 海域の事例：①内湾(ジュゴン)

ダム湖の事例

河川の事例

河川(汽水域)の事例

海域の事例①内湾



2. パッシブサンプリング法の事例

2-4. 海域の事例：①内湾(ジュゴン)

- ジュゴンの目撃情報のある海域で海綿を約半年間、2日おきに設置回収
- ジュゴンによるものと思われるトレンチ跡や時化後の62サンプルを分析
- 2サンプル（62サンプル中）でPCR増幅を確認

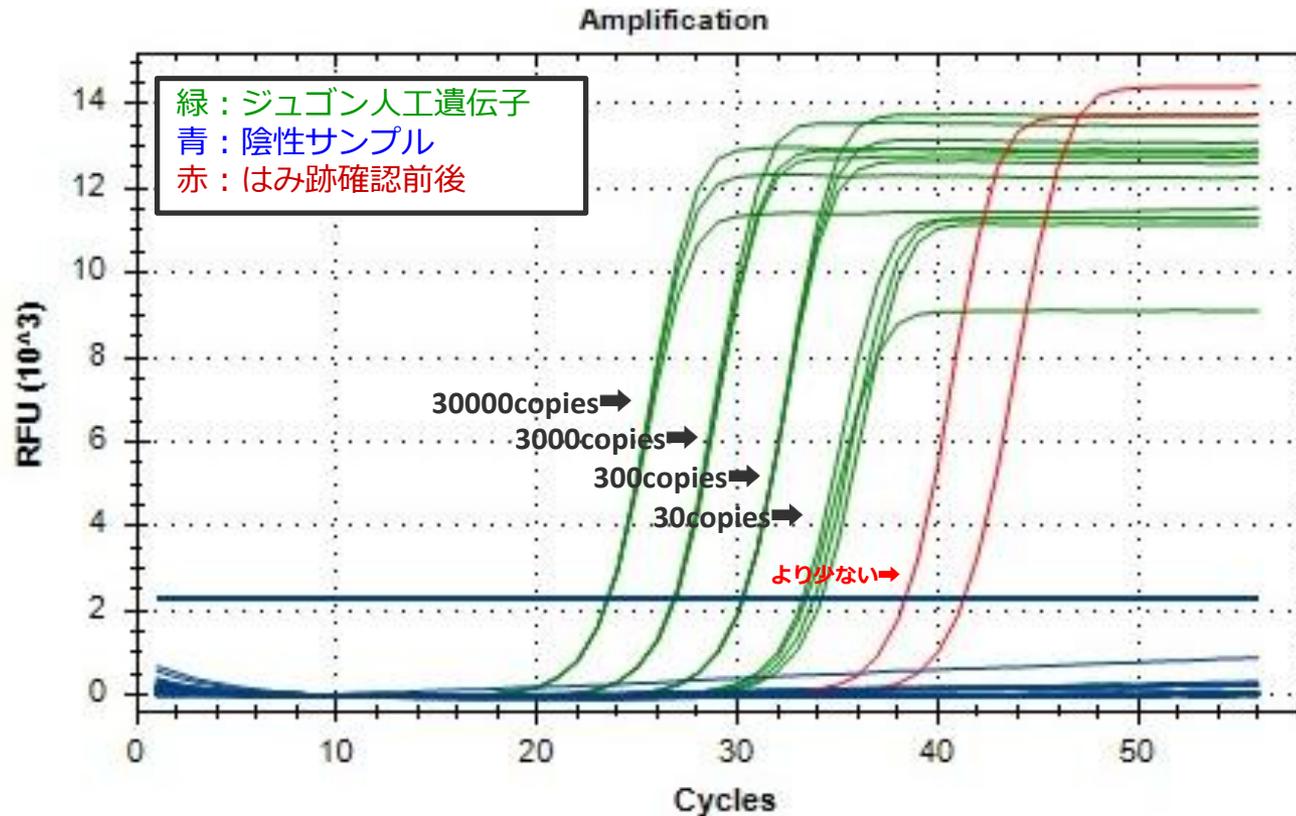


図 定量PCR分析結果 (TaqMan probe法)

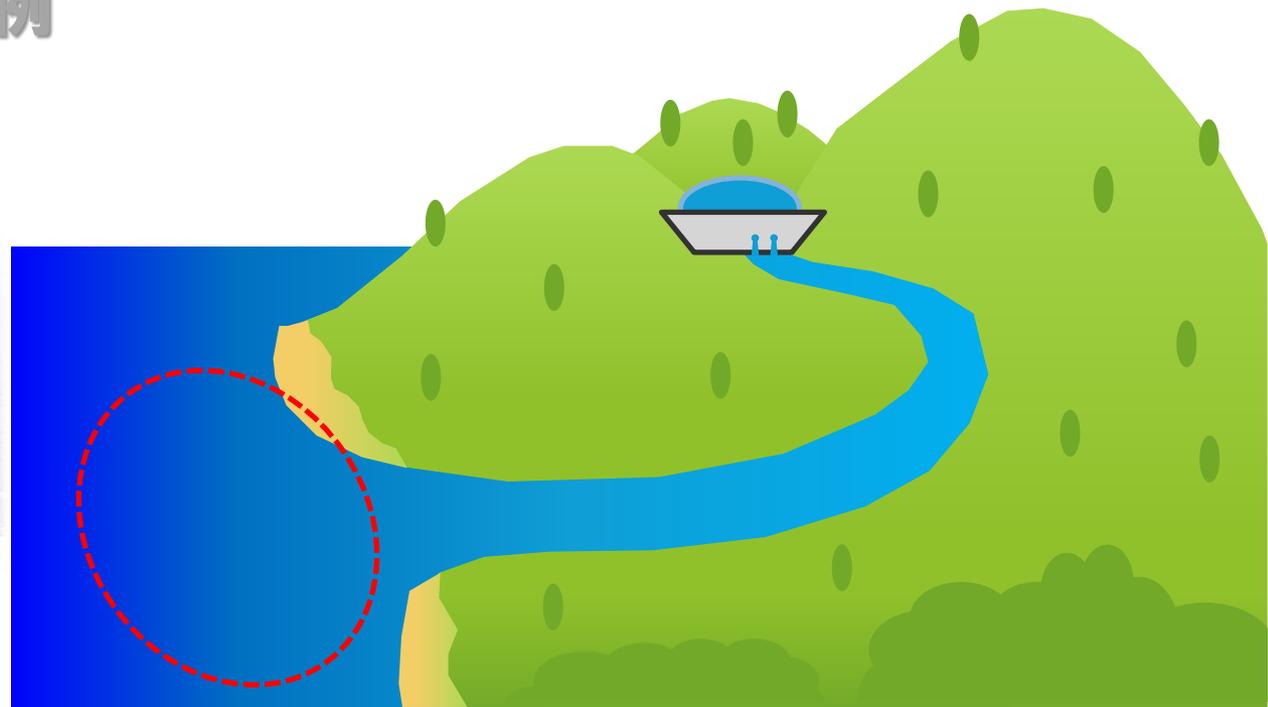
環境水からジュゴンのDNAを（低濃度ですが）検出に成功！

ダム湖の事例

河川の事例

河川(汽水域)の事例

海域の事例②外海

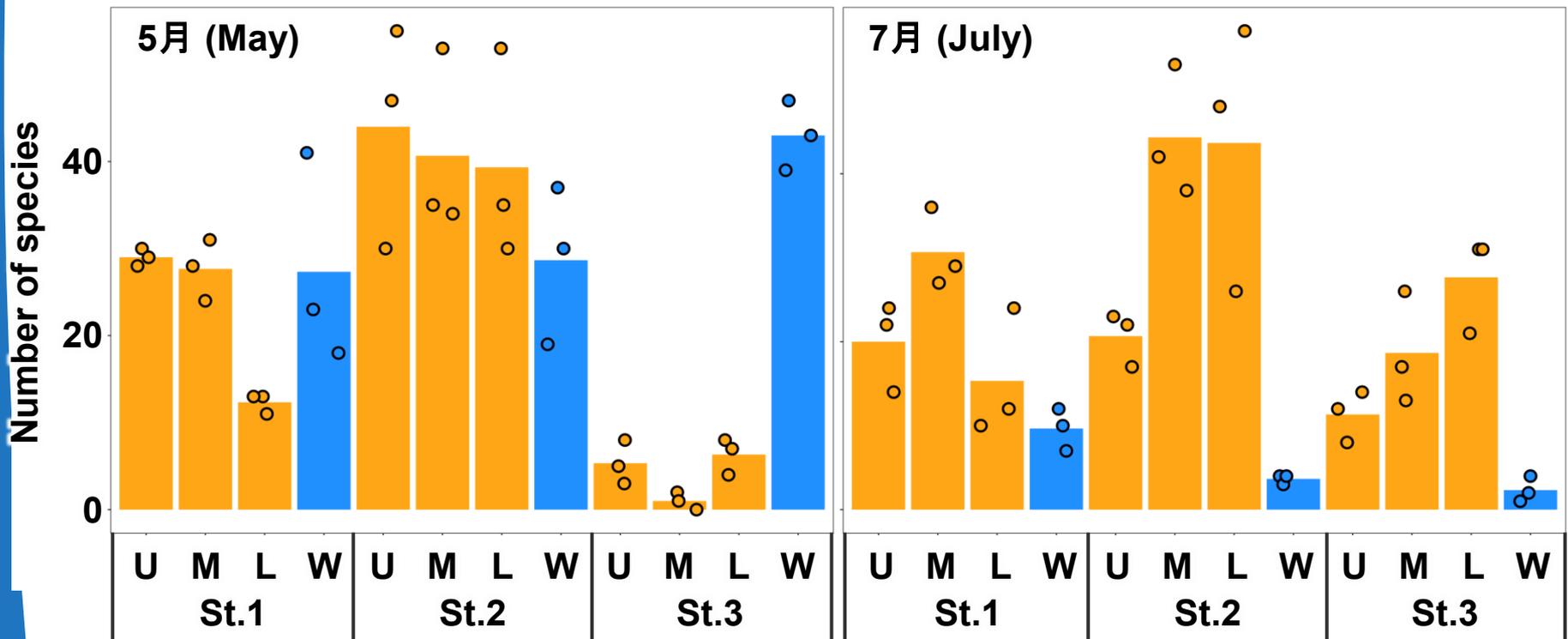


2. パッシブサンプリング法の事例

2-4. 海域の事例：②外海

- 3つの海域それぞれで3地点ずつ水深を変えてPS法を試行
- A海域（St.1～3）では、5月のSt.3を除きPS法が優位

●: PS method ●: Water sampling U: Upper M: Middle L: Lower



5月から7月にかけて水サンプルの検出種数が減少した

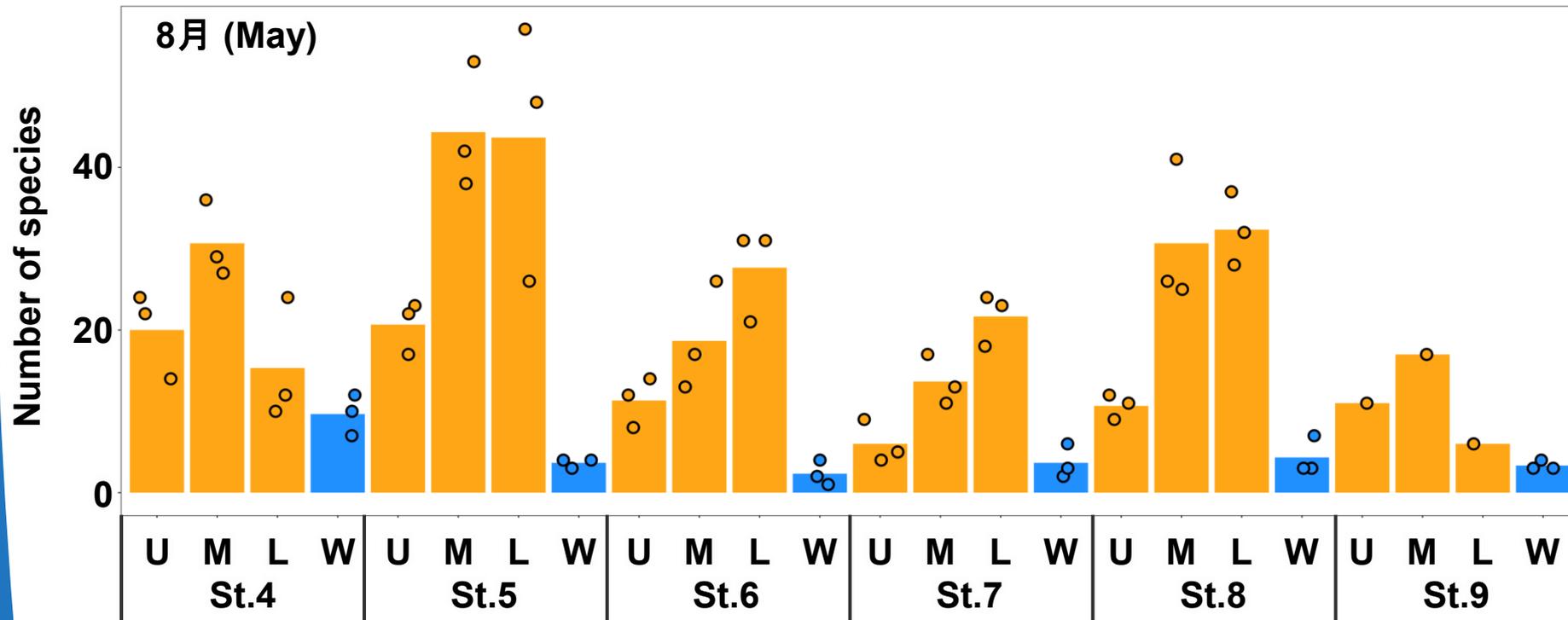
PS法ではSt.3で種数が増加し、すべての地点で水サンプルを上回る

2. パッシブサンプリング法の事例

2-4. 海域の事例：②外海

- 3つの海域それぞれで3地点ずつ水深を変えてPS法を試行
- B海域 (St. 4~6)、C海域 (St. 7~9) では、全ての地点でPS法が優位

● : PS method ● : Water sampling U: Upper M: Middle L: Lower



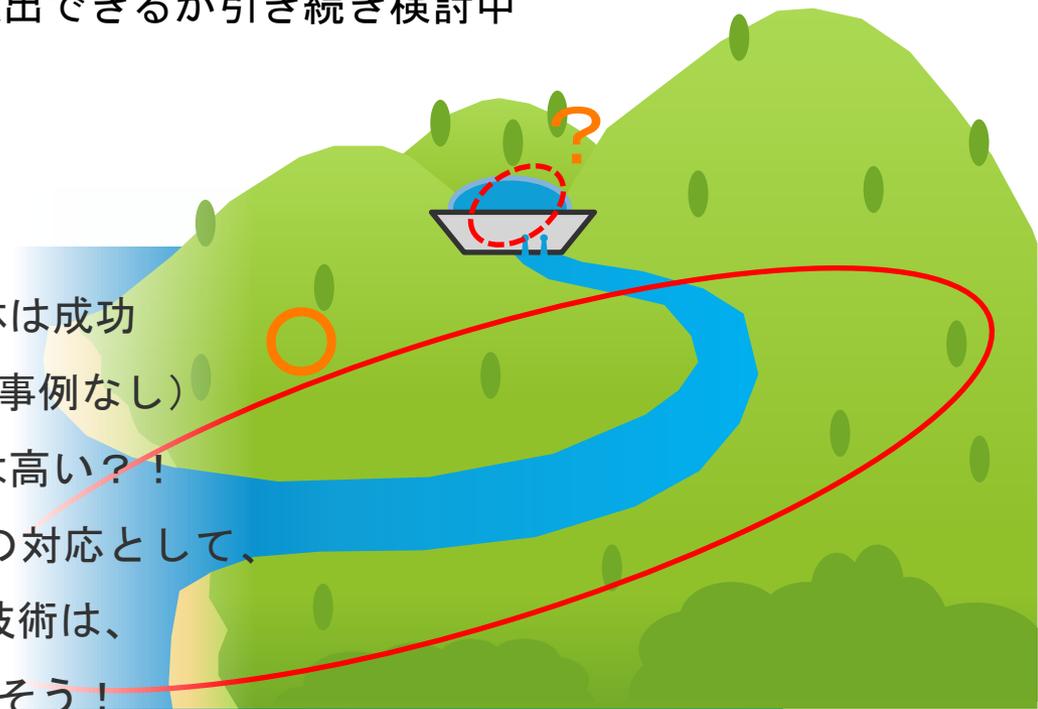
**B、C海域すべての調査地点・水層で採水法よりも高い種数を示した
全体として中層や下層で検出種数がやや高くなる傾向がみられた**

■現在までに実証できていること

- 流れのある環境（河川、海域）では、捕集材（海綿）を用いたPSにより、従来の採水と同程度またはそれ以上の成果が期待できる！
- 止水域等の流れのない環境では暴露量をあげる工夫が必要か？
- ダム湖については、曳航することで検出できるか引き続き検討中

■海域における適用可能性

- 生息密度の低いジュゴンすら検出自体は成功
（これまで採水法では国内で検出事例なし）
- 定量性は採水に劣るものの、検出力は高い？！
- 時間変動の考慮や移動性のある種への対応として、時間積算的なデータが取得できる本技術は、今後の調査技術の1つとして期待できそう！



本研究の遂行にあたり、以下の方々に多大なるご協力をいただきました。
心より感謝申し上げます。

九州大学 農学研究院
栗田 喜久 准教授

一般財団法人 沖縄県環境科学センター
小澤 宏之 様

京都大学 大学院情報学研究科
辻 冴月 助教

株式会社 蟹蔵
吉浜 崇浩 様

福岡工業大学 社会環境学部
乾 隆帝 教授

公益財団法人 リバーフロント研究所
都築 隆禎 様
内藤 太輔 様

山口大学 大学院創成科学研究科
赤松 良久 教授
中尾 遼平 特命准教授