

令和 3 年度
江津湖地域における
環境 DNA 分析（魚類）調査業務委託

分 析 結 果 報 告 書

令和 4 年 3 月

株式会社静環検査センター

一目 次一

1. 業務概要	1
1-1 業務目的	1
1-2 業務概要	1
1-3 業務地域	1
1-4 業務内容	1
2. 事前準備	3
2-1 現地概査	3
3. 現地調査	4
3-1 採水	4
3-2 組織サンプル採取	17
4. 分析作業	19
4-1 環境 DNA 試水サンプルの濾過およびDNA抽出	19
4-2 網羅的解析法	20
4-3 種特異的検出法による定量分析および定量解析	21
5. 分析結果	24
5-1 網羅的解析法	24
5-2 種特異的検出法による定量分析	26
6. 定量解析	34
6-1 各ブロックにおける確認個体数と環境 DNA 濃度	34
6-2 各ブロックにおける推定生息個体数と環境 DNA 密度の比較	49
6-3 全域における定量解析	54
7. まとめ	59
8. 課題	60
8-1 生息個体数と環境 DNA 濃度について	60
8-2 環境 DNA の活用手法	60
9. 参考文献	61

1. 業務概要

1-1 業務目的

採水した水から DNA を抽出・定量解析を行うことで、江津湖地域に生息する熊本市指定外来魚 6 種（オオクチバス、ブルーギル、カダヤシ、ナイルティラピア、ジルティラピア、カムルチ）の推定生息数を把握し、本市が行っている外来魚駆除の効果検証を行うことを目的とした。また、定性解析も行うことで、江津湖地域全体での在来魚及び外来魚の分布状況を把握し、今後の対策のための基礎データを収集した。

1-2 業務概要

業務名：江津湖地域における環境 DNA 分析（魚類）調査業務委託

委託者：熊本市 環境局環境推進部環境共生課

〒860-8601 熊本中央区手取本町 1 番 1 号

TEL : 096-328-2352 FAX : 096-359-9945

受託者：株式会社 静環検査センター 九州支店

〒899-5116 鹿児島県霧島市隼人町内字中原 2265 番 7

TEL : 0995-43-8501 FAX : 0995-43-6475

委託期間：令和 3 年 10 月 18 日から令和 4 年 3 月 31 日まで

1-3 業務地域

調査の対象地域は、熊本市内の江津湖地域である。

業務地域を図 1-4-1 に示す。

1-4 業務内容

業務内容を表 1-4-1 に示す。

表 1-4-1 業務内容一覧

業務項目	単位	数量	摘要
事前準備	式	1	分析方法・調査地点の確認、調査機材準備
現地調査	回	2	採水、フィールドデータの記録(10 地点)
分析作業	回	2	網羅的解析法(10 サンプル×2 回:11 月、2 月) 種特異的検出法(6 種×10 地点×2 回:11 月、2 月)
報告書の作成	式	1	分析方法、分析結果、解析結果の考察
打合せ協議	回	2	業務着手時、納品時



図 1-4-1 業務地域位置図

2. 事前準備

2-1 現地概査

2021年10月27日に発注者の立会いのもと、現地概査を行った。

現地調査地点は、江津湖の流れに沿って魚類生息状況調査（熊本市別業務）の調査範囲（以下、捕獲調査範囲）を全体的に網羅できるように、また調査地点へのアクセス等を考慮し、全10地点（St. 1～St. 10）を設定した。調査地点位置図を図 2-1-1 に示す。

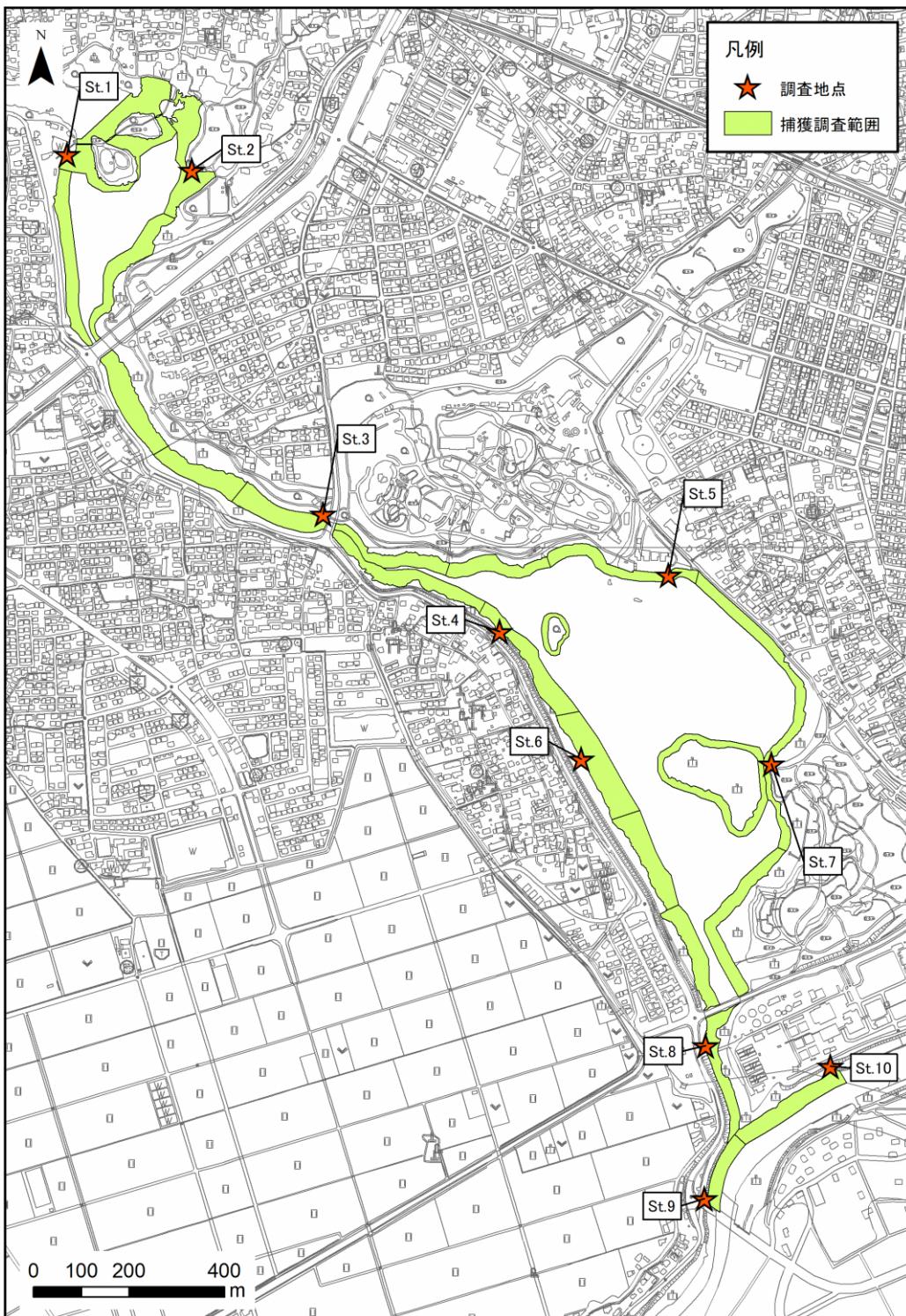


図 2-1-1 調査地点位置図（江津湖全域）

3. 現地調査

3-1 採水

江津湖地域の全 10 地点で採水を行い、記録票にフィールドデータを記録した。

また、魚類生息状況調査の調査員に GPS を貸与し、調査ルートを記録した。

各調査地点位置図を図 3-1-1 (1) ~ (6) に、各調査地点の環境写真を写真 3-1-1 (1) ~ (2) および写真 3-1-2 (1) ~ (2) に、フィールドデータ記録票を表 3-1-1 と表 3-1-2 に示す。



調査状況写真 (採水)

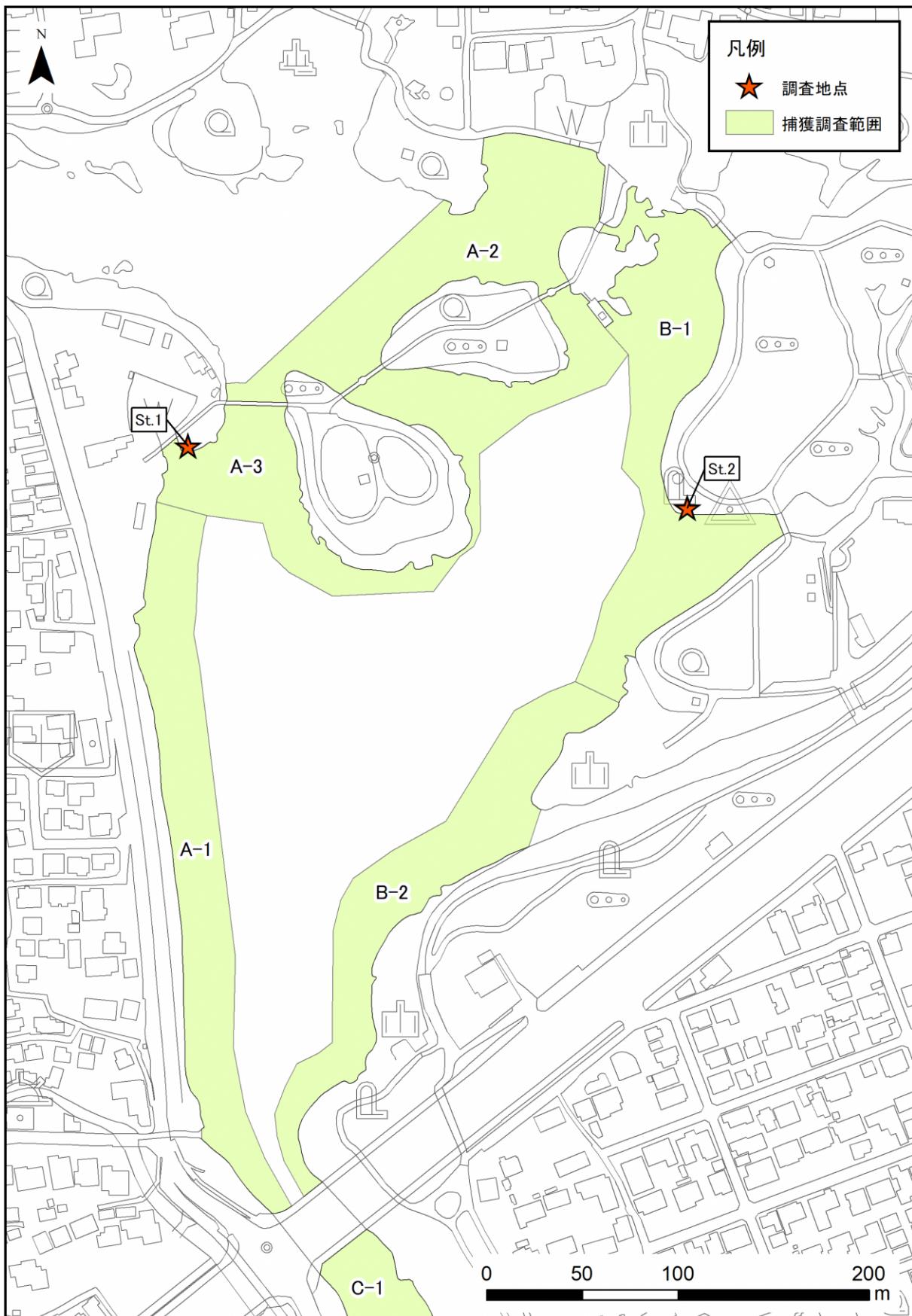


図 3-1-1 (1) 調査地点位置図 (St. 1, 2)

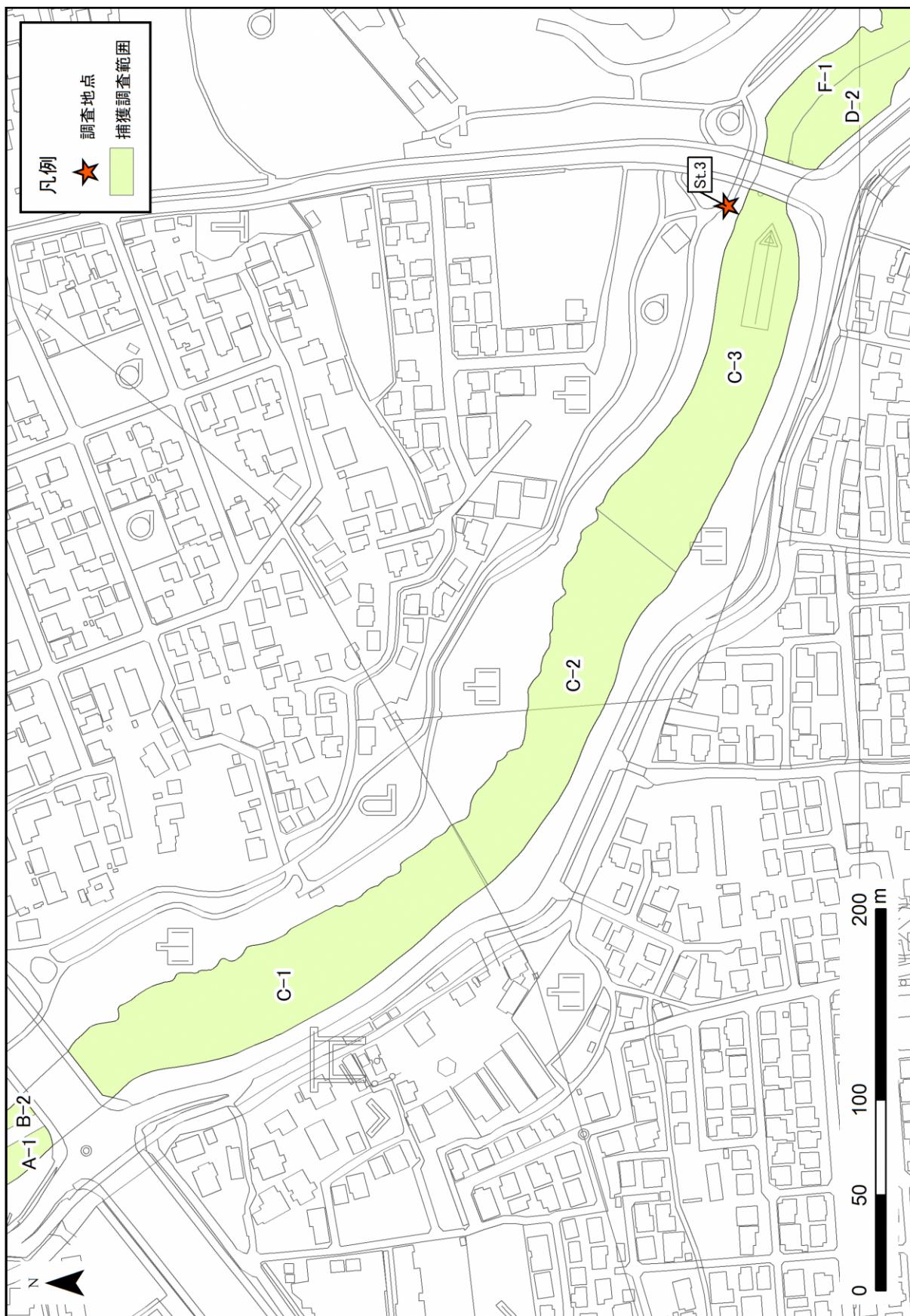


図 3-1-1 (2) 調査地点位置図 (St. 3)

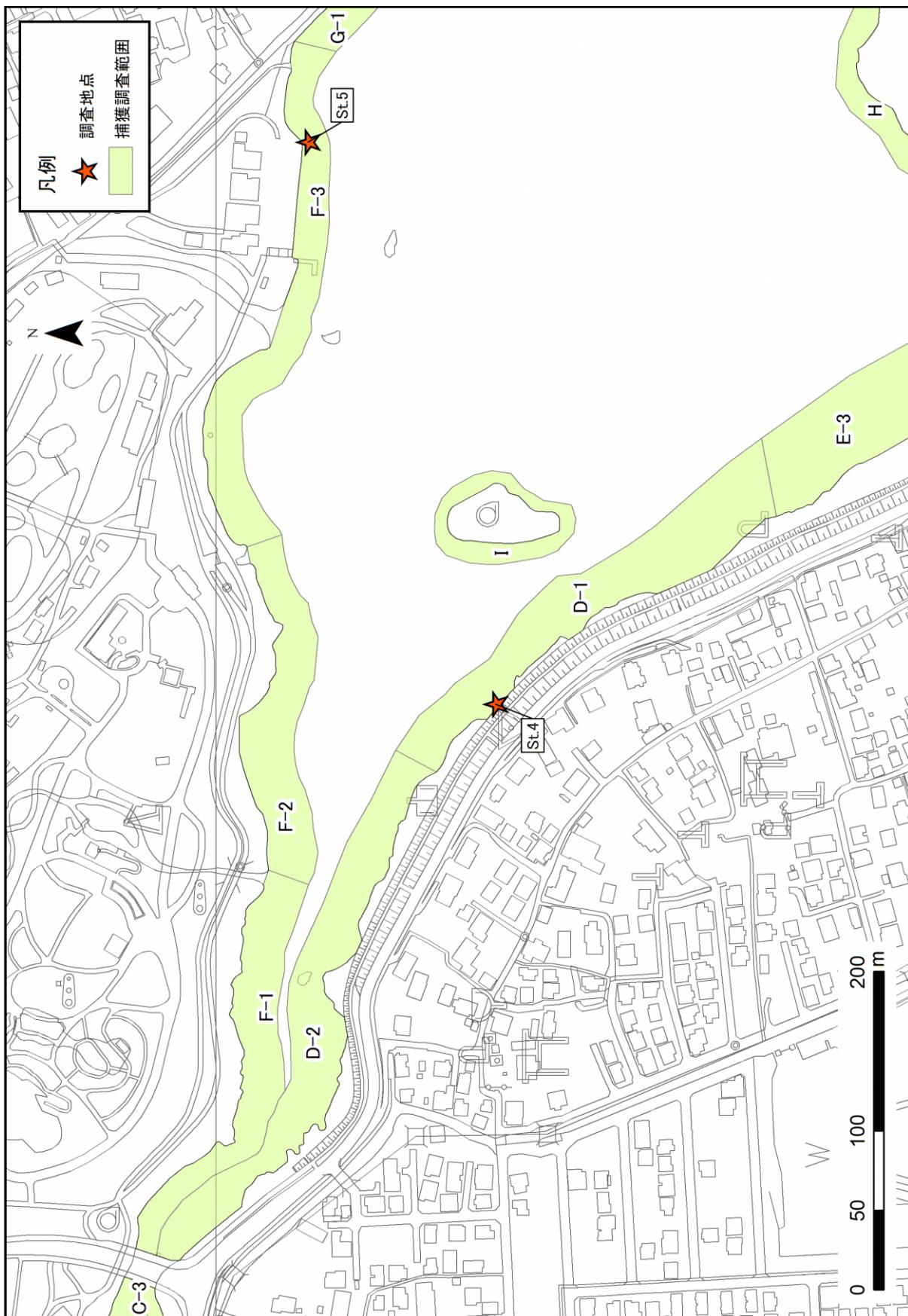


図 3-1-1 (3) 調査地点位置図 (St. 4, 5)

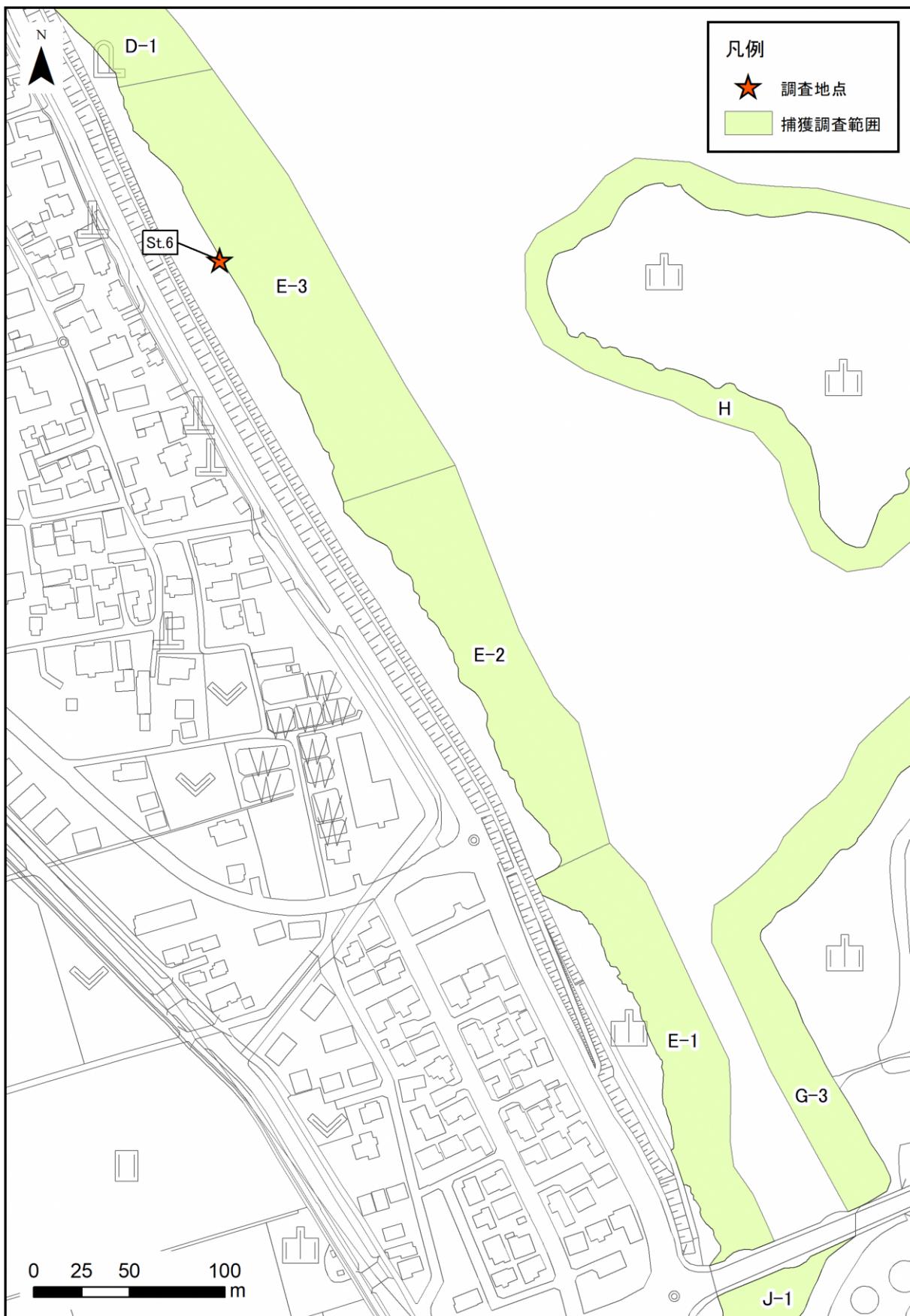


図 3-1-1 (4) 調査地点位置図 (St. 6)

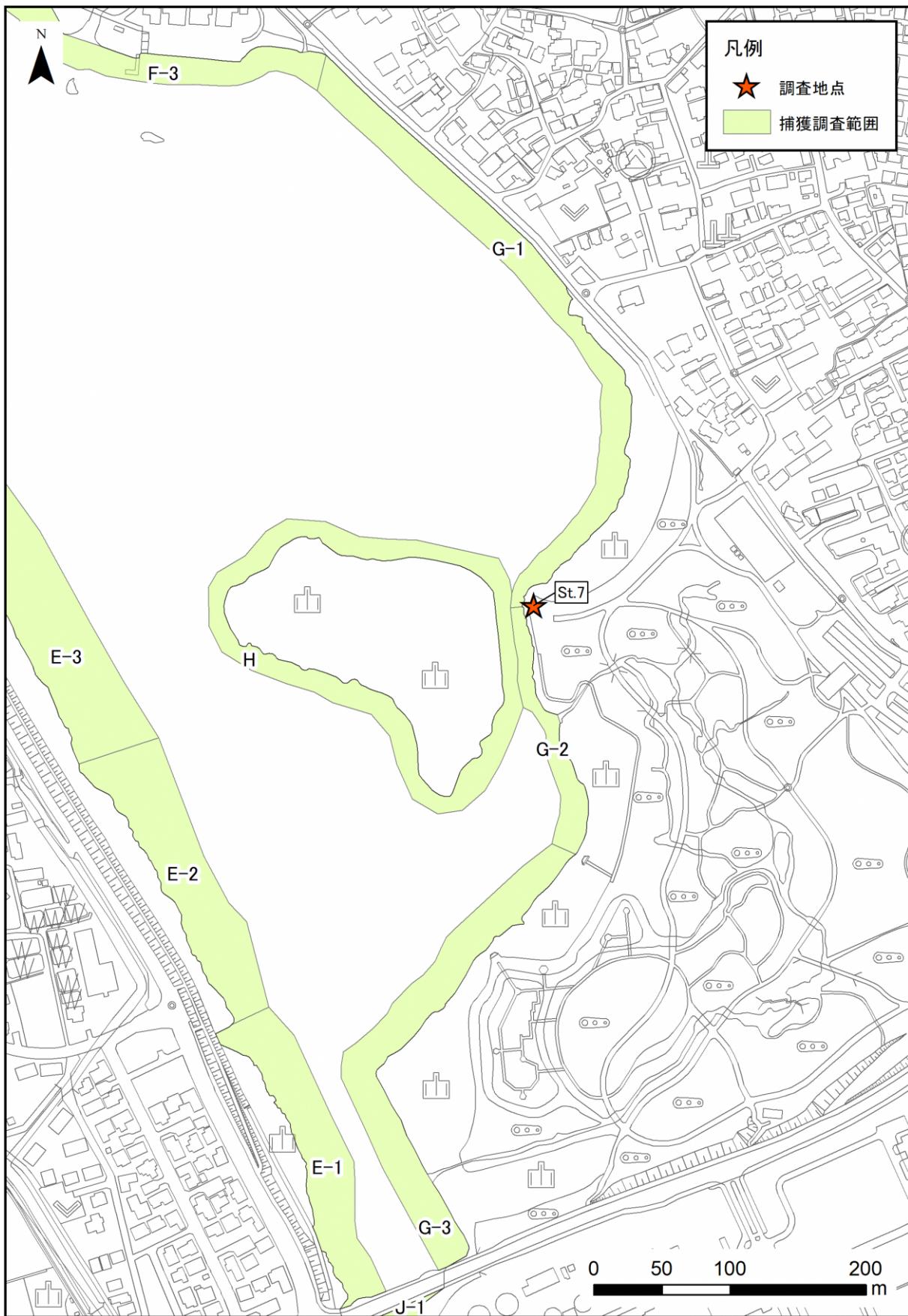


図 3-1-1 (5) 調査地点位置図 (St. 7)

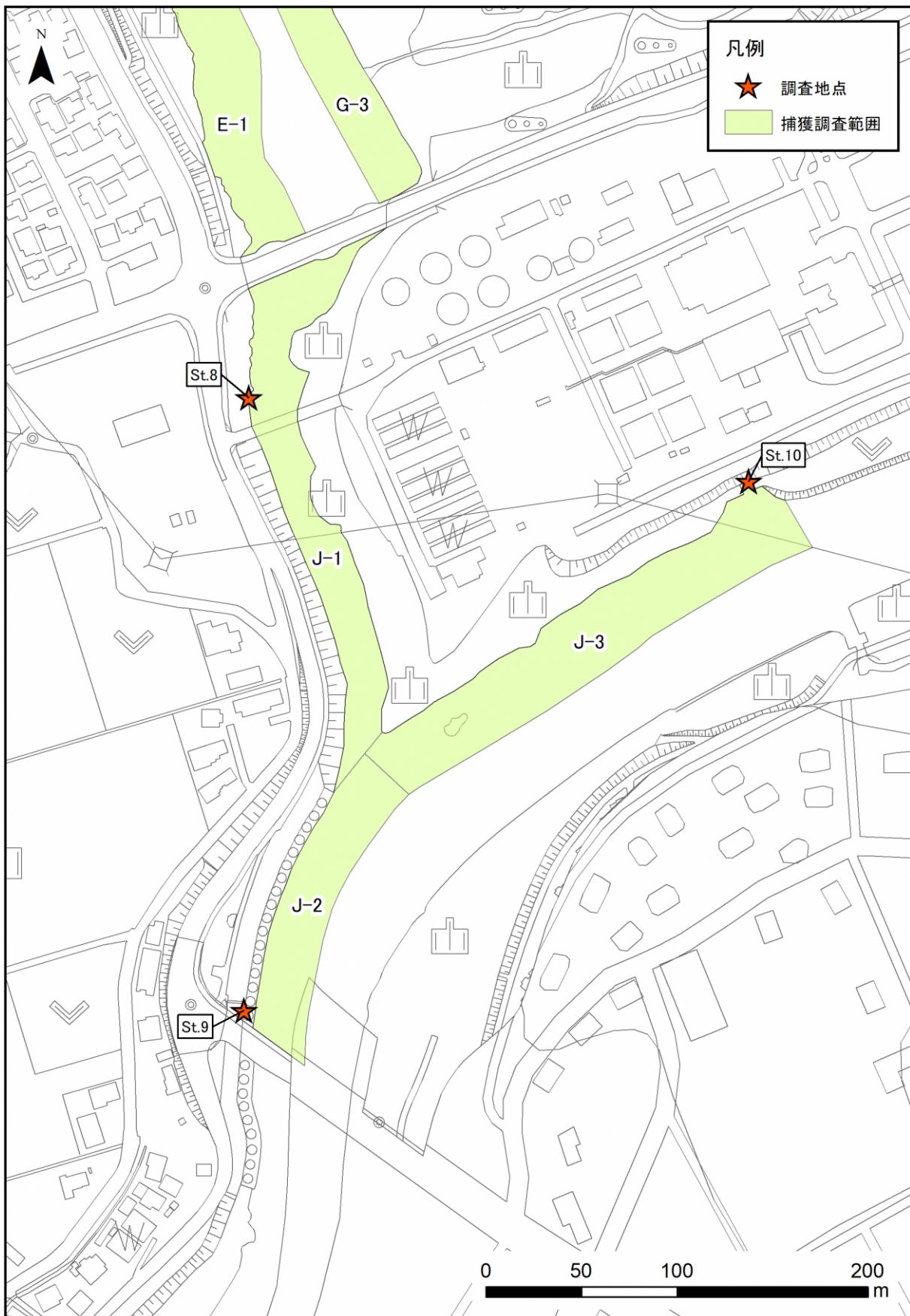


図 3-1-1 (6) 調査地点位置図 (St. 8, 9, 10)

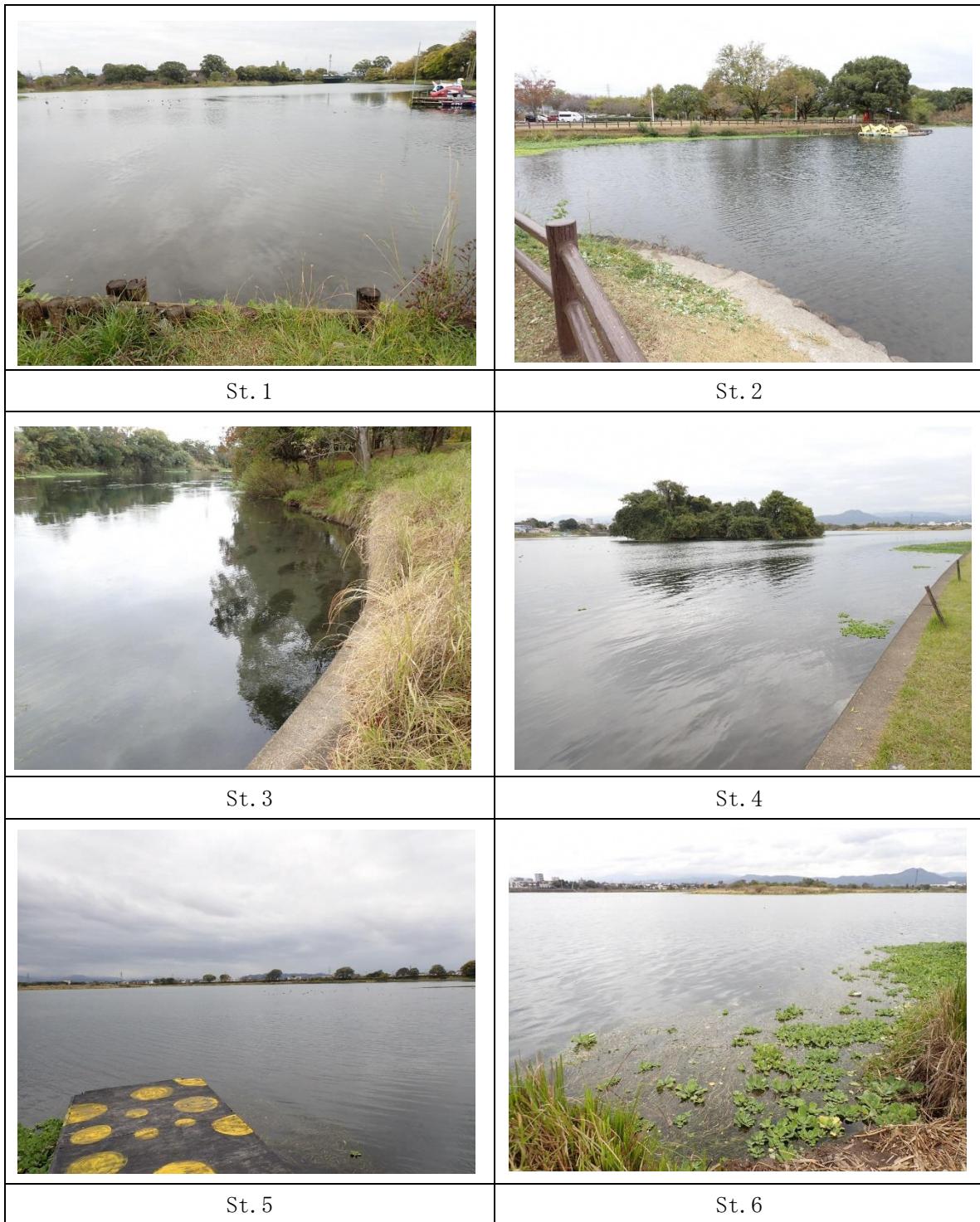


写真 3-1-1 (1) 調査地点環境 (11月) (St. 1~St. 6)

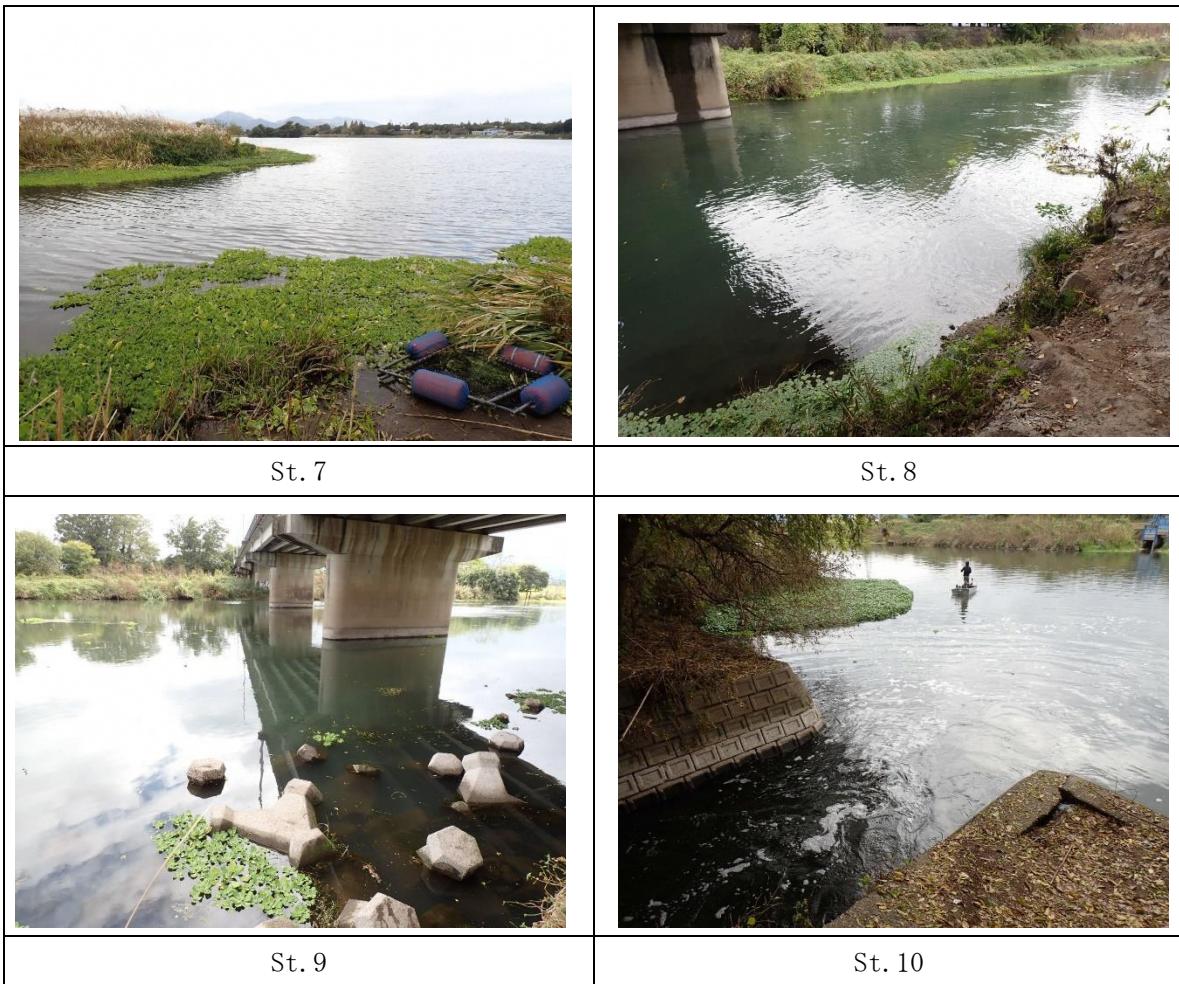


写真 3-1-1 (2) 調査地点環境 (11月) (St. 7～St. 10)



写真 3-1-2 (1) 調査地点環境 (2月) (St. 1～St. 6)



写真 3-1-2 (2) 調査地点環境 (2月) (St. 7~St. 10)

表 3-1-1 フィールドデータ記録票（11月）

地点名	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
採水者	岡本、坪口									
採水日	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9	2021/11/9
採水時間	9時 45分	9時 38分	10時 05分	10時 15分	12時 20分	10時 55分	12時 00分	10時 37分	11時 23分	11時 40分
天候	曇り	曇り	曇り	曇り	晴れ	曇り	曇り	晴れ	曇り	曇り
気温/水温	13.0/18.0	13.0/18.0	13.0/18.0	12.0/17.5	14.0/17.0	12.5/17.5	13.0/17.0	12.0/17.5	15.0/17.5	14.0/22.5
GPS (変更あり)										
水深 (cm)	39	47	53	46	96	77	30	31	149	73
採水水深 (cm)	5	20	20	5	38	5	5	5	5	20
採水機材	ペケツ／ひしゃく／ ^{直接} （○）	ペケツ／ひしゃく／直接（○）								
採水容器	ペットボトル									
採水量 (L)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
塗作ベンザルコニウム 添加量 (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
透視度	100<	100<	100<	100<	93	100	100	100	100	100
外観	無色透明	無色透明	無色透明	淡褐色透明	無色透明	無色透明	無色透明	淡綠色透明	淡褐色透明	
採水後の保管	クーラーボックスタイプ									
写真	<input checked="" type="checkbox"/>									
特記事項										

表 3-1-2 フィールドデータ記録票（2月）

地点名	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
採水者	坪口									
採水日	2022/2/2	2022/2/2	2022/2/2	2022/2/2	2022/2/2	2022/02/	2022/02/	2022/2/2	2022/2/2	2022/2/2
採水時間	9時 14分	9時 28分	9時 50分	10時 04分	12時 00分	10時 43分	11時 41分	10時 22分	11時 04分	11時 23分
天候	曇り									
気温/水温	4.0/14.5	3.5/15.0	6.0/14.0	5.5/13.0	6.5/12.0	6.0/13.5	7.0/11.0	4.0/12.0	6.5/12.0	7.0/15.5
GPS (変更あれば)										
水深 (cm)	19	26	41	33	89	66	26	35	130	56
採水水深 (cm)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
採水機材	バケツ/ひしゃく ^(直接)									
採水容器	ペットボトル									
採水量 (L)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
塩化ベンゼルコニウム 添加量 (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
透視度	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<	100<
外観	無色透明	濁褐色透明								
採水後の保管	クーラーボックスタイプ									
写真	<input checked="" type="checkbox"/>									
特記事項										

3-2 組織サンプル採取

熊本市指定外来魚 6 種について、11 月に実施された魚類生息状況調査で捕獲された個体から DNA サンプルとして組織片を採取した。

捕獲対象種を表 3-2-1 に示す。

複数個体ずつ(カダヤシを除く 5 種は、11 月以降の魚類生息状況調査等で捕獲された個体)、組織片を DNA サンプルとして採取し、定量分析の指標に使用した。代表的な個体写真を写真 3-2-1 に示す。

表 3-2-1 組織サンプルを採取した対象種

種名	区分	組織片採取数
オオクチバス	熊本市指定外来魚	3 個体程度
ブルーギル		
カダヤシ		
ナイルティラピア		
ジルティラピア		
カムルチー		



写真 3-2-1 熊本市指定外来魚の代表写真

4. 分析作業

4-1 環境 DNA 試水サンプルの濾過および DNA 抽出

江津湖地域の全 10 地点において採水した試水サンプルの濾過および DNA 抽出を行った。

濾過にはメルク・ミリポア社のステリベクス（カートリッジ式フィルター 孔径 $0.45 \mu\text{m}$ ）を使用し、DNA 抽出にはキアゲン社の DNeasy Blood & Tissue Kit を使用した。DNA 抽出物は、網羅的解析法、および種特異的検出法に使用した。

また、定量解析の指標に使用する熊本市指定外来魚 6 種の組織サンプルの DNA 抽出もキアゲン社の DNeasy Blood & Tissue Kit を使用した。

分析作業において、使用した機材などを表 4-1-1 に示す。



分析状況写真（濾過）

表 4-1-1 分析における使用機材

分析作業	商品名	その他（メーカーなど）
試水サンプルの濾過	ステリベクス (カートリッジ式フィルター)	メルク・ミリポア社 孔径 $0.45 \mu\text{m}$
試水サンプルの DNA 抽出	DNeasy Blood Tissue Kit	キアゲン社
組織サンプルの DNA 抽出		
網羅的解析法	次世代シーケンサー (MiSeq)	illumina 社
種特異的検出法	リアルタイム PCR 装置 (QuanStudio)	Thermo Fisher 社

4-2 網羅的解析法

次世代シーケンサー (MiSeq:illumina 社) を使用し、各地点における魚類相を解明した。

基本的な手法については、「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 2 版 (環境省自然環境局生物多様性センター)」と「環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.2 (一般社団法人環境 DNA 学会)」に準拠した。

PCR 増幅には、ミトコンドリア DNA の 12 S 領域をターゲットとした MiFish プライマーを使用した。今回の解析に使用した MiFish プライマーの種類を表 4-2-1 に示す。

また、分析後に BLAST 検索を行い、生物種の同定を行った。この同定結果の精査には、「MiFish 法に係る誤同定チェックシート (環境省自然環境局生物多様性センター)」を使用した。

表 4-2-1 網羅的解析に使用した MiFish プライマーの種類

プライマーナイ	プライマーの説明
MiFish-U-F/R	硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー
MiFish-L-F/R	円口類 (ヤツメウナギ科) に最適化したプライマー

4-3 種特異的検出法による定量分析および定量解析

リアルタイム PCR 装置 (QuanStudio 1:Thermo Fisher 社) を使用し、熊本市指定外来魚 6 種について種特異的検出による定量分析および定量解析を行った。

基本的な手法については、「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 2 版 (環境省自然環境局生物多様性センター)」と「環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.2 (一般社団法人環境 DNA 学会)」に準拠した。

PCR 増幅には、各魚種に適したミトコンドリア DNA の特定の領域をターゲットとした種特異的プライマーおよびプローブを使用した。各魚種に対してターゲットとした領域を表 4-3-1 に示す。

オオクチバス、ブルーギル、カムルチーについては、受託者所有の種特異的プライマーおよびプローブと既存文献¹⁾²⁾³⁾に記載されている種特異的プライマーおよびプローブを、江津湖産個体由来の塩基配列を対象に、優位性を検証した。

カダヤシ、ナイルティラピア、ジルティラピアについては、既存文献が無いため、受託者所有の種特異的プライマーおよびプローブの効果を、江津湖産個体由来の塩基配列を対象に効果を検証した。結果を図 4-3-1 (1) ~ (4) に示す。

オオクチバス、ブルーギル、カムルチーは、受託者所有の種特異的プライマーおよびプローブの方が優れており、カダヤシ、ナイルティラピア、ジルティラピアは受託者所有のもので問題なく検出できたため、それらを定量分析に使用することとした。

なお、ナイルティラピアについては、GenBank に登録されているナイルティラピアおよび同属種であるカワスズメの C01 配列と比較したところ、江津湖から得られたナイルティラピアと思われる個体は、カワスズメに最も近い事が分かった。既存文献⁴⁾から、江津湖南の加勢川において、ティラピア属の半数以上がナイルティラピアとカワスズメの交雑個体であることが報告されており、同文献内の手法で、江津湖から得られたナイルティラピアと思われる個体を調べたところ、ナイルティラピアとカワスズメの交雑個体に最も近いことが分かった。

また、定量解析により、環境 DNA 濃度と今年度実施された「江津湖地域における外来魚駆除及び魚類生息状況調査業務委託」において捕獲された熊本市指定外来魚 6 種毎の捕獲数や湿重量等の調査結果（貸与資料）との間の相関関係により推定生息数が見出されるか検討した。

表 4-3-1 各魚種におけるターゲット領域

種名	ミトコンドリアDNAの領域	種特異的プライマー出典元
オオクチバス	チトクロームB (cytb) 領域	既存文献 ¹⁾ : LMB、受託者 : Bass qPCR
ブルーギル	チトクロームB (cytb) 領域	既存文献 ²⁾ : Bluegill、受託者 : Blue qPCR
カダヤシ	チトクロームCオキシターゼサブユニット1 (CO1) 領域	受託者 : Gaff qPCR
ナイルティラピア	チトクロームCオキシターゼサブユニット1 (CO1) 領域	受託者 : Nile qPCR
ジルティラピア	チトクロームCオキシターゼサブユニット1 (CO1) 領域	受託者 : Zill qPCR
カムルチー	チトクロームB (cytb) 領域	既存文献 ³⁾ : Kamu 16S、受託者 : Carg qPCR

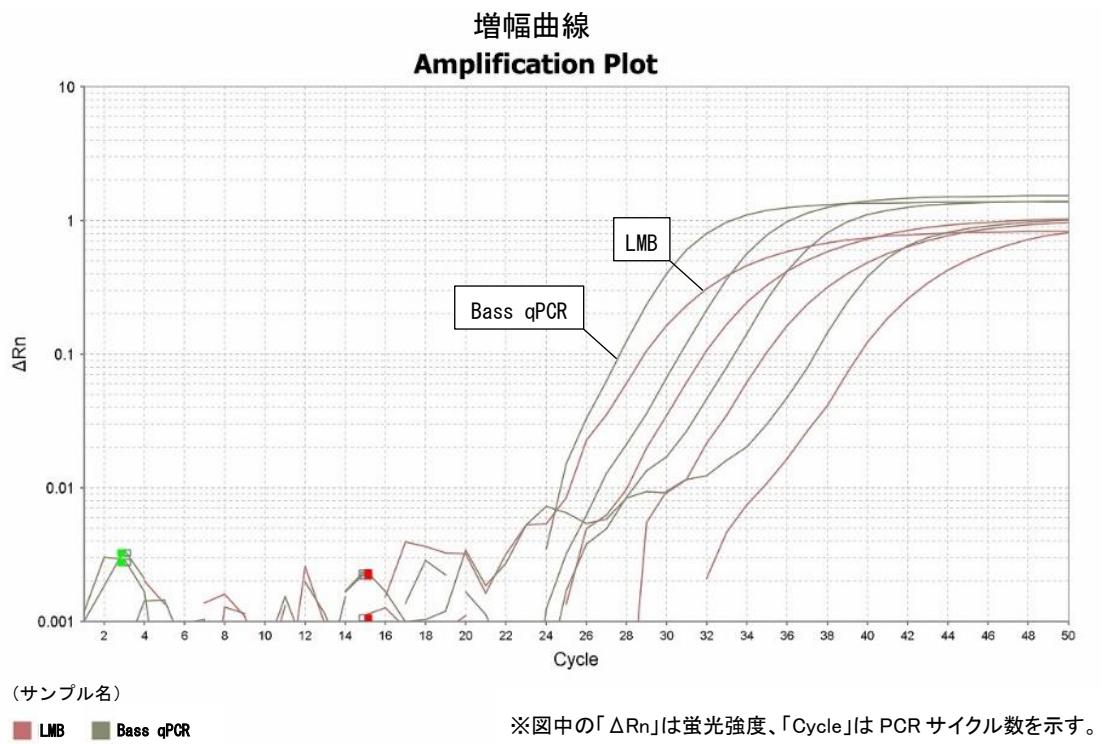


図 4-3-1 (1) 種特異的プライマーおよびプローブの効果検証結果（オオクチバス）

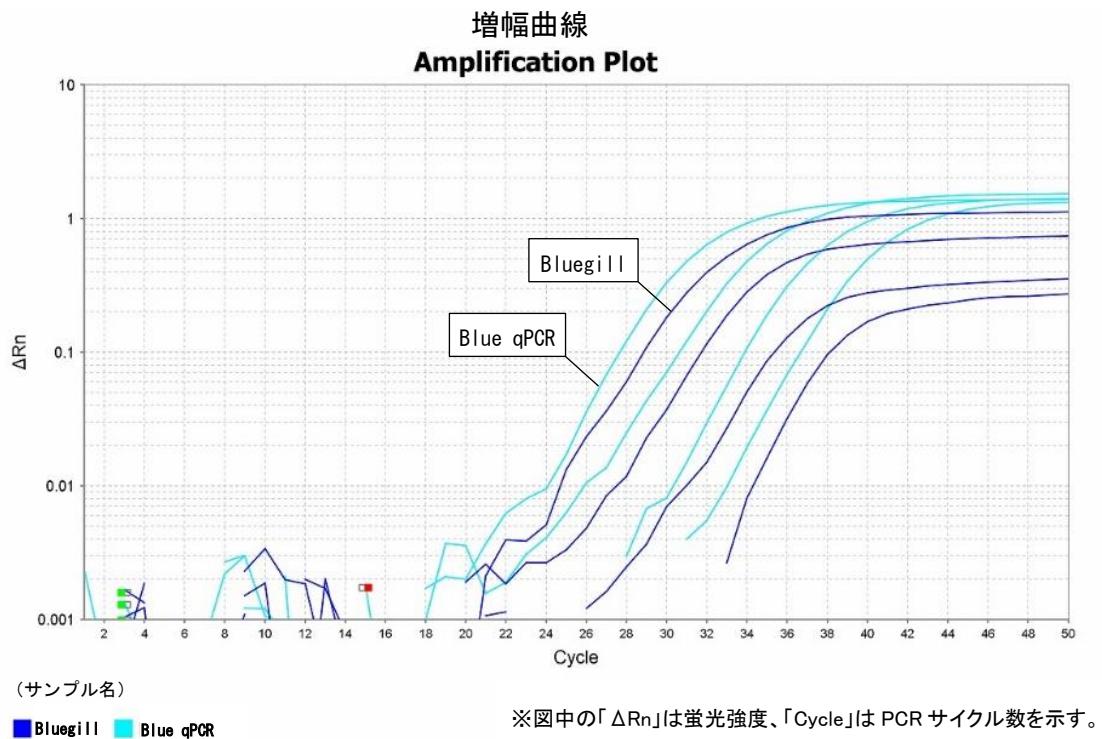


図 4-3-1 (2) 種特異的プライマーおよびプローブの効果検証結果（ブルーギル）

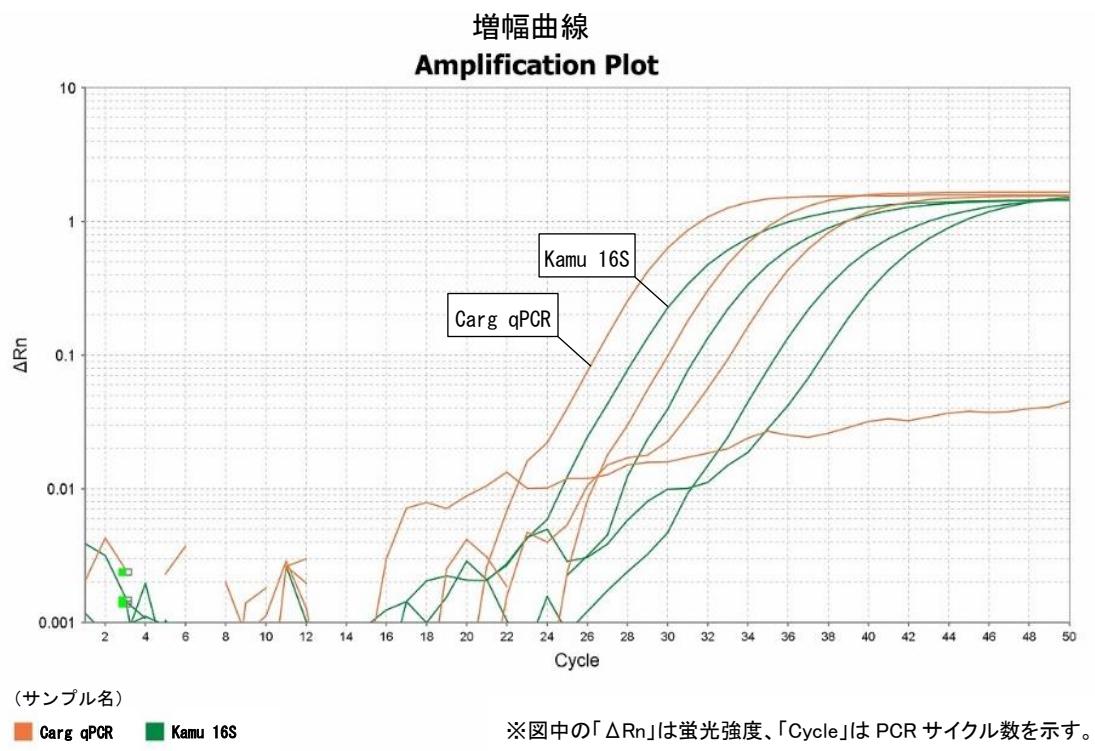


図 4-3-1 (3) 種特異的プライマーおよびプローブの効果検証結果（カムルチー）

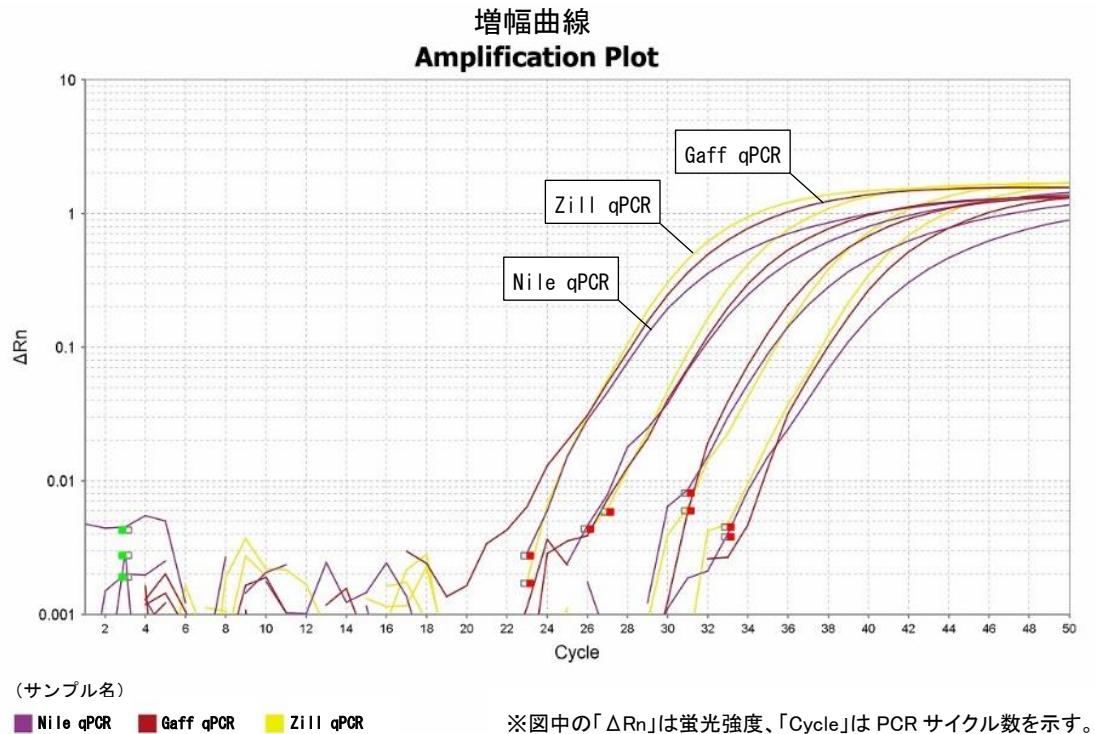


図 4-3-1 (4) 種特異的プライマーおよびプローブの効果検証結果
(カダヤシ、ナイルティラピア、ジルティラピア)

5. 分析結果

5-1 網羅的解析法

11月および2月において、各調査地点から得られた試水サンプルを用いて、網羅的解析を行った。

結果、全10地点合計で9目19科45種の魚種が検出された。

種同定の精査の結果、スズキ属の一種について、種同定の精査の結果、推奨和名がスズキではなく、「タイリクスズキ/スズキ（有明海産）」とされるものが一部見られ、スズキと同一種の可能性があるため、検出種数に加算していない。

一方、「イトモロコとスゴモロコ属の一種」や「ゴクラクハゼとヨシノボリ属の一種」について、MiFish法で区別できるため、検出種数に加算している。

「ナイルティラピアとカワスズメ属の一種」について、検出された塩基配列に違いが見られた（7塩基差）。ナイルティラピアのBlast結果は、相同性100%のナイルティラピアのみだったが、カワスズメ属の一種のBlast結果は、相同性100%のナイルティラピアとカワスズメが混在するという結果だった。この塩基差が、何が原因で生じているか（遺伝的多様性や交雑による影響など）判断しかねるため、カワスズメ属の一種は検出種数に加算していない。

今回の解析において、検出された属の一種の誤同定チェックシートによる推奨和名を表5-1-1に示す。

ナイルティラピアおよびカワスズメ属の一種について、ナイルティラピアは10地点中4地点で、カワスズメ属の一種は10地点中9地点で検出され、江津湖内においてナイルティラピアよりもカワスズメ属の一種が多く検出された。

また、コノシロやフクドジョウ、グッピーなど、今までの捕獲調査では確認されていない魚類4種のDNAが確認されたが、一方でスナヤツメ南方種やカネヒラ、カゼトゲタナゴなど、今までの捕獲調査で確認されているが、網羅的解析では検出されなかった種も7種確認された。

なお、表5-1-1に示しているような、捕獲調査で確認されており、推奨和名に含まれているギンブナのような種については、網羅的解析ではフナ属の一種として検出されていると考えた。

まとめると、捕獲調査では50種が確認されているが、網羅的解析では45種が検出された。網羅的解析検出種と捕獲調査確認種を比較した表を表5-1-2に示す。

なお、今までの捕獲調査において確認された魚種については、熊本博物館の清水氏がまとめた記録⁵⁾を参照した。

表5-1-1 誤同定チェックシートによるMiFish解析の結果として採用を推奨する和名

No.	定性解析検出種一覧に記載している和名	誤同定チェックシートによるMiFish解析の結果として採用を推奨される和名
4	フナ属の一種	ギンブナ / キンブナ / オオキンブナ / ニゴロブナ / キンギョ / フナ属の1種（琉球列島）
16	ヒガイ属の一種	カワヒガイ / ビワヒガイ
18	タモロコ属の一種	タモロコ / ホンモロコ
21	ニゴイ属の一種	ニゴイ / コウライニゴイ
23	スゴモロコ属の一種	スゴモロコ / デメモロコ / コウライモロコ
27	ナマズ属の一種	ナマズ / イワトコナマズ / タニガワナマズ / ナマズ属の一種[海外]
-	スズキ属の一種	タイリクスズキ / スズキ（有明海産）
37	クロダイ属の一種	クロダイ / ミナミクロダイ
43	ヨシノボリ属の一種	トウヨシノボリ / クロヨシノボリ / オオヨシノボリ / カズサヨシノボリ / オウミヨシノボリ / シマヒレヨシノボリ / ルリヨシノボリ / クロダハゼ

表 5-1-2 網羅的解析検出種と捕獲調査確認種の比較

No.	目名	科名	学名	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6	St.7	St.8	St.9	St.10	確認 DNA	文献 ^{a)}	備考
1	ツバメ科	ツバメ科	ツバメ科未確認	Arthropoden sp. 5												
2	ウナギ科	ウナギ科	ニホンウナギ		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	ニシン科	ニシン科	コノシロ	Konosirus punctatus		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	コイ科	コイ科	コイ属(魚鱗)	Cyprinus carpio											○	○
-				Cyprinus sp.												○
5			コイ属(魚鱗)	Ctenopharyngodon idellus												○
6	シジミ科	シジミ科	シジミ属	Corbicula sp.		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
-				Corbicula sp.												○
7	アブ科	アブ科	アブ属	Abrasus sp.		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8				Tanakia luteosticta												○
9	カネヒメジタ科	カネヒメジタ科	カネヒメジタ科	Aplochitonidae												○
10	アサガホリビタ科	アサガホリビタ科	アサガホリビタ科	Asaphidae												○
11	カヌリヒメジタ科	カヌリヒメジタ科	カヌリヒメジタ科	Callichitonidae												○
12	カミツレヒメジタ科	カミツレヒメジタ科	カミツレヒメジタ科	Calymeneidae												○
-				Calymeneidae												○
13	カセドリヒメジタ科	カセドリヒメジタ科	カセドリヒメジタ科	Calymeneidae												○
14	リクダ科	リクダ科	リクダ属	Ichthyurus stenorhynchus												○
15	ハス科	ハス科	ハス属	Osteogaster macrolepidotus												○
16	オイカワ科	オイカワ科	オイカワ属	Ostreidae												○
17	ワニムシ科	ワニムシ科	ワニムシ属	Cardita communis												○
18	カブトムシ科	カブトムシ科	カブトムシ属	Dytiscidae												○
19	カブトムシ科	カブトムシ科	カブトムシ属	Hydrophilidae												○
20	カブトムシ科	カブトムシ科	カブトムシ属	Psephenidae												○
21	カワセヒメガイ科	カワセヒメガイ科	カワセヒメガイ属	Sarcocelliidae												○
-	ヒガマガイ科	ヒガマガイ科	ヒガマガイ属	Sarcocelliidae												○
22	ムカシヒラコ科	ムカシヒラコ科	ムカシヒラコ属	Limnephilidae												○
23	ムカシヒラコ科	ムカシヒラコ科	ムカシヒラコ属	Limnephilidae												○
24	モロコシ属の一種	モロコシ属の一種	モロコシ属	Oryzopsis sp.												○
25	モロコシ属の一種	モロコシ属の一種	モロコシ属	Oryzopsis sp.												○
26	ニゴイ科	ニゴイ科	ニゴイ属	Pendulodioctes noctilimus												○
27	ニゴイ科の一種	ニゴイ科の一種	ニゴイ属	Pendulodioctes parvus												○
28	コロラモチロコ科	コロラモチロコ科	コロラモチロコ属	Synclisis arcuella												○
29	ムカシヒラコ科	ムカシヒラコ科	ムカシヒラコ属	Synclisis arcuella												○
30	モモヒメ属の一種	モモヒメ属の一種	モモヒメ属	Sutillina sp.												○
31	モモヒメ属の一種	モモヒメ属の一種	モモヒメ属	Sutillina angustifrons												○
32	ナマズ科	ナマズ科	ナマズ属	Sutillina angustifrons												○
-	ナマズ科	ナマズ科	ナマズ属	Sutillina angustifrons												○
33	アコノ	アコノ	アコノ	Trichoptera												○
34	アコノ	アコノ	アコノ	Trichoptera												○
35	カダヤシ	カダヤシ	カダヤシ	Gambusia affinis												○
36	カダヤシ	カダヤシ	カダヤシ	Gambusia affinis												○
37	メダガ	メダガ	メダガ	Gambusia affinis												○
38	メダガ	メダガ	メダガ	Gambusia affinis												○
39	スズキ科	スズキ科	スズキ属	Gymnophorus intermedius												○
40	スズキ科	スズキ科	スズキ属	Gymnophorus intermedius												○
-	スズキ科	スズキ科	スズキ属	Gymnophorus intermedius												○
41	サツコソシヌカ	サツコソシヌカ	サツコソシヌカ	Lophostoma microcephalum												●
42	タケ	タケ	タケ	Micropodus seychellensis												○
43	タケ	タケ	タケ	Micropodus seychellensis												○
44	タケ	タケ	タケ	Micropodus seychellensis												●
-	タケ	タケ	タケ	Micropodus seychellensis												●
45	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
46	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
47	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
48	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
49	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
50	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
51	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
52	カワセヒメ科	カワセヒメ科	カワセヒメ属	Monopterus albus												○
53	カムシカ科	カムシカ科	カムシカ属	Channa argus												○
-	10目1科	1科	1科	Channa argus												○

1.1) 俗名、学名、その分類等が判明したとして「令和元年1月1日現在」にしたところ。

注2) ●、●は、原則として「MFR試験に陽性結果を示す個体」の種を示す。

注3) 黄色●、青色○、同じ色で個体の種を示す。

注4) No.は、標識的解剖結果を示す。

注5) 文獻)：江津湖の魚類相～文獻ショーカー編から算出した。

注6) 文獻)：江津湖の魚類相～文獻ショーカー編から算出した。

注7) 外来種には、「江津湖生態系における外来種の防除に関する条例」による指定水生動物に記しきつた。

5-2 種特異的検出法による定量分析

11月および2月において、各調査地点から得られた試水サンプルを用いて、熊本市指定外来魚6種を対象として種特異的検出法による定量分析を行った。

分析の際は、1検体につき、3反復行った。環境DNA濃度は、3反復のDNAのコピー数の平均値から試水サンプル1L中のコピー数を算出し、copies/mLに換算した。3反復のうち1回でもDNAの増幅が確認された場合、平均値が定量下限値未満となった場合でも「不検出」とはせず、「検出」扱いとした。

定量下限値は、0.3 copies/mLとした。

定量分析結果を表 5-2-1 (1) ~ (2) に示す。

表 5-2-1 (1) 定量分析結果 (11月)

11月採水	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
オオクチバス	ND	1.0	ND	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	51.1	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	ND
ブルーギル	ND	ND	ND	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	0.5	検出 (<0.3)	ND	検出 (<0.3)	ND
カダヤシ	検出 (0.3)	検出 (<0.3)	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	ND
ナイルティラピア	検出 (0.3)	検出 (<0.3)	0.3	検出 (<0.3)	4.3	検出 (<0.3)	0.6	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	0.4
ジルティラピア	0.7	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	8.3	1.9	6.4	1.3	ND	ND
カムルチー	検出 (<0.3)	ND	検出 (<0.3)	ND	0.4	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	ND	ND

注1) ND : 検出なし

注2) 単位は、copies/mL

注3) 定量下限値は、0.30copies/mLとする

注4) ■は最高値、■は次点値を示す。

表 5-2-1 (2) 定量分析結果 (2月)

2月採水	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
オオクチバス	検出 (<0.3)	ND	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	ND	ND	ND	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	ND
ブルーギル	ND	ND	ND	検出 (<0.3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
カダヤシ	ND	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	0.3	ND	ND	ND	ND	検出 (<0.3)	ND
ナイルティラピア	ND	0.4	検出 (<0.3)	ND	検出 (<0.3)	1.3				
ジルティラピア	1.4	検出 (<0.3)	0.4	検出 (<0.3)	検出 (<0.3)	ND	検出 (<0.3)	0.4	0.4	1.6
カムルチー	ND	ND	ND	検出 (<0.3)	ND	検出 (<0.3)	ND	ND	ND	検出 (<0.3)

注1) ND : 検出なし

注2) 単位は、copies/mL

注3) 定量下限値は、0.30copies/mLとする

注4) ■は最高値、■は次点値を示す。

(1) オオクチバス

11月では、St. 6 が最も高く (51.1 copies/mL) 、次点で St. 2 であった (1.0 copies/mL)。

2月では、定量下限値を超えた地点はなかった。

定量分析結果を図面に記載したものを図 5-2-1 に示す。

(2) ブルーギル

11月および2月において、定量下限値を超えた地点はなかった。

定量分析結果を図面に記載したものを図 5-2-2 に示す。

(3) カダヤシ

11月では、St. 7 が最も高く (0.5 copies/mL) 、次点で St. 5 であった (0.5 copies/mL)。

2月では、定量下限値を超えた地点は St. 4 のみであった (0.3 copies/mL)。

定量分析結果を図面に記載したものを図 5-2-3 に示す。

(4) ナイルティラピア

11月では、St. 5 が最も高く (4.3 copies/mL) 、次点で St. 7 であった (0.6 copies/mL)。

2月では、St. 10 が最も高く (1.3 copies/mL) 、次点で St. 2 であった (0.4 copies/mL)。

定量分析結果を図面に記載したものを図 5-2-4 に示す。

(5) ジルティラピア

11月では、St. 5 が最も高く (8.3 copies/mL) 、次点で St. 7 であった (6.4 copies/mL)。

2月では、St. 10 が最も高く (1.6 copies/mL) 、次点で St. 1 であった (1.4 copies/mL)。

定量分析結果を図面に記載したものを図 5-2-5 に示す。

(6) カムルチー

11月では、定量下限値を超えた地点は St. 4 のみであった (0.4 copies/mL)。

2月では、定量下限値を超えた地点はなかった。

定量分析結果を図面に記載したものを図 5-2-6 に示す。

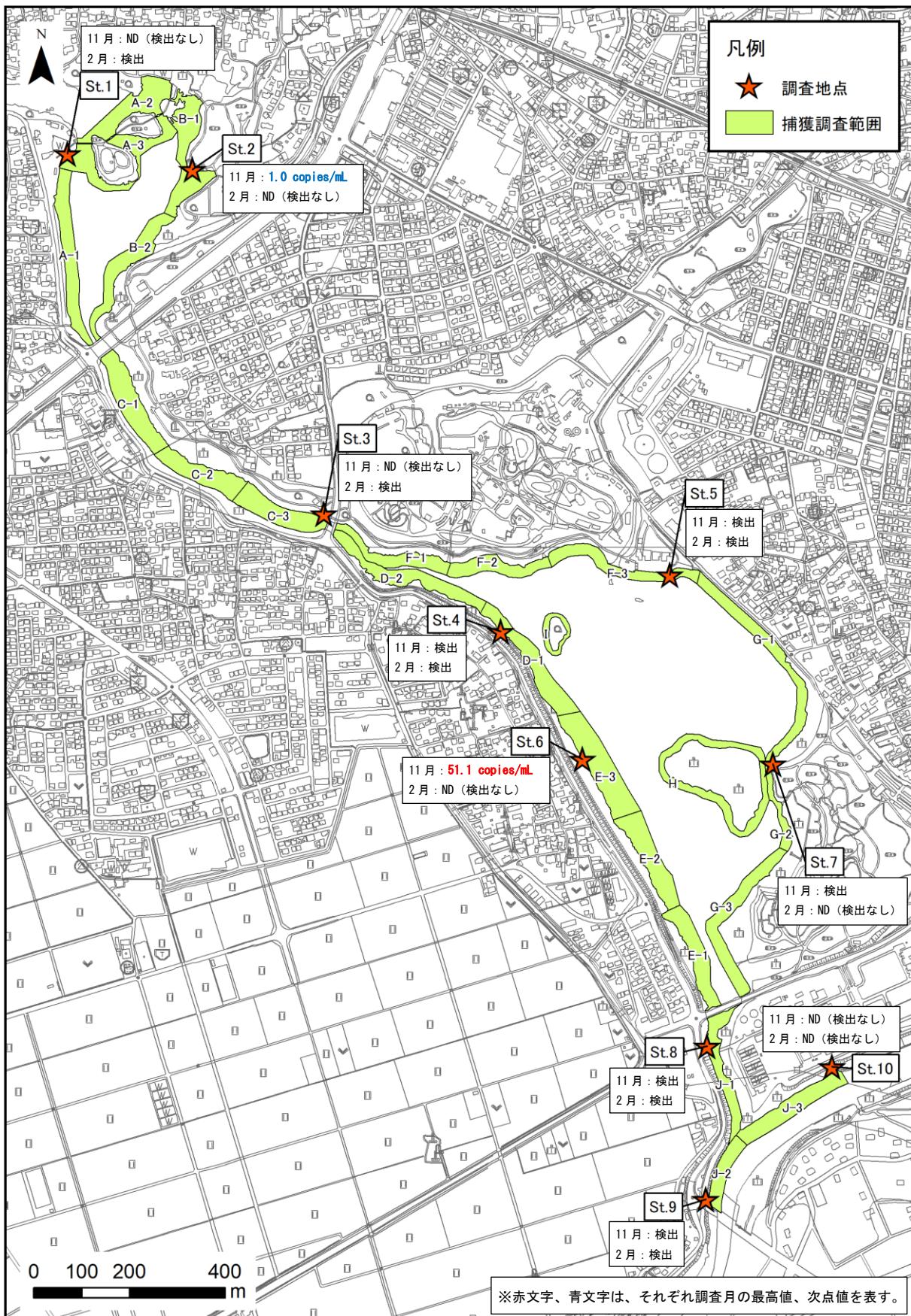


図 5-2-1 定量分析結果（オオクチバス）

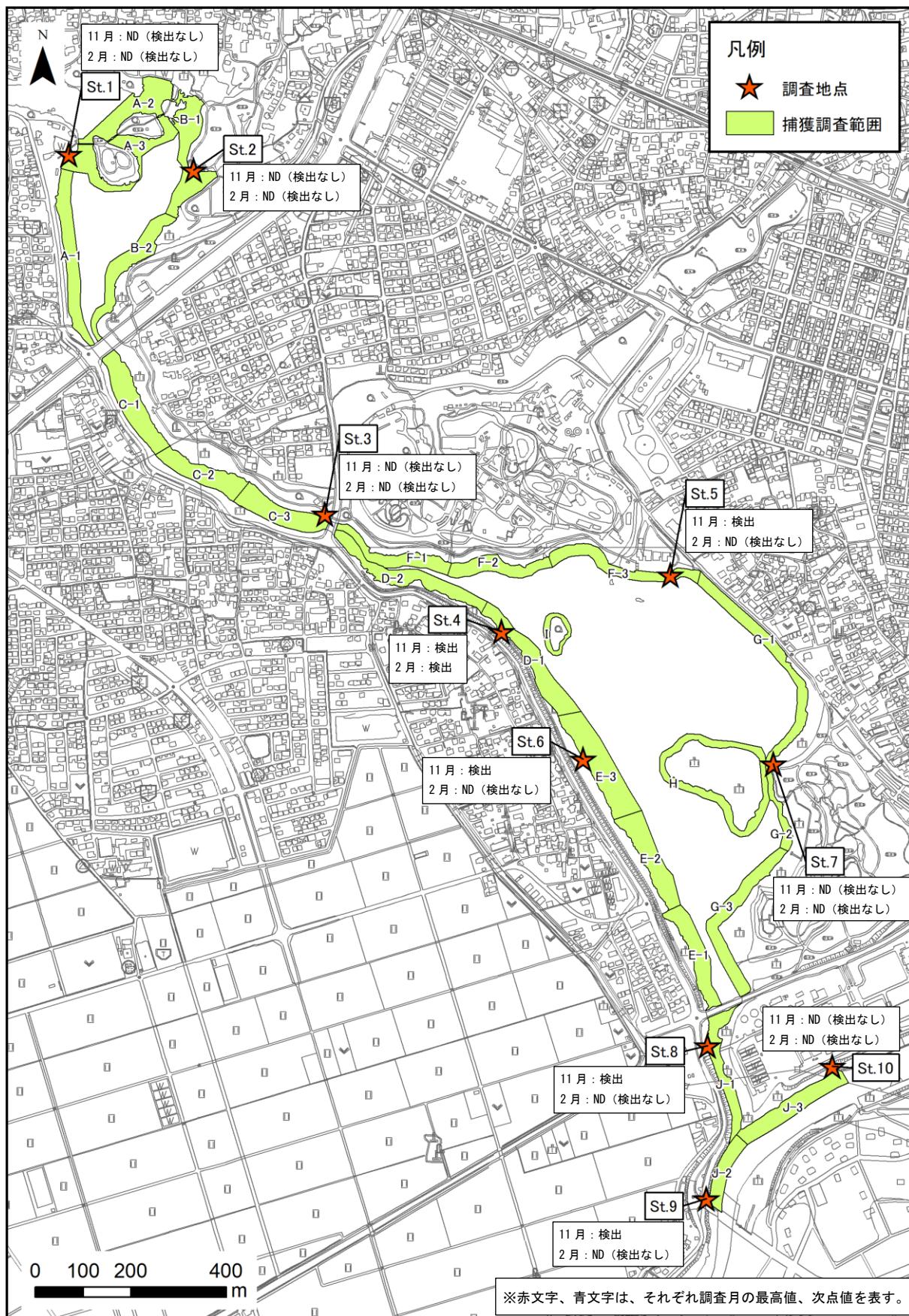


図 5-2-2 定量分析結果（ブルーギル）

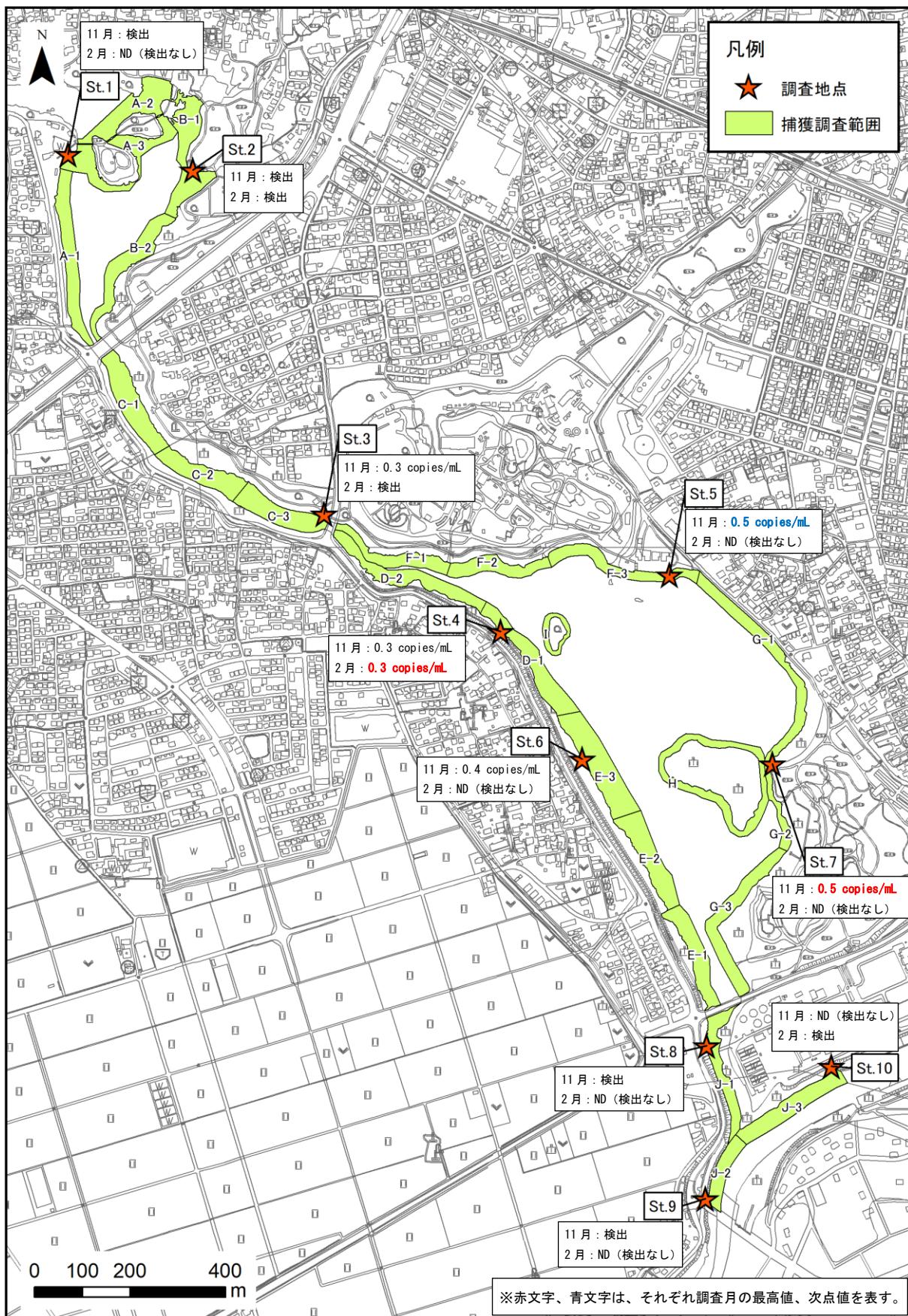


図 5-2-3 定量分析結果 (カダヤシ)

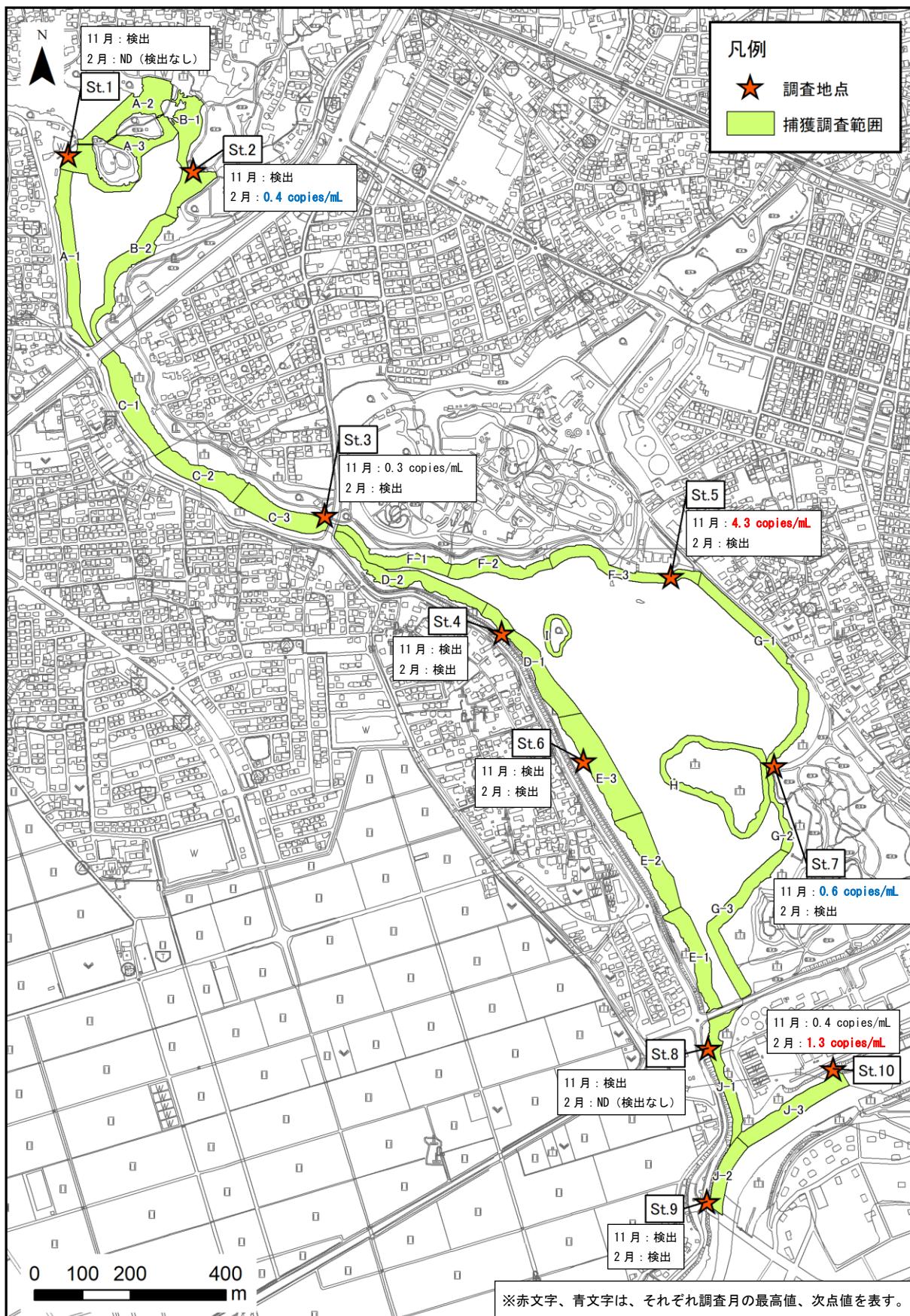


図 5-2-4 定量分析結果 (ナイルティラピア)

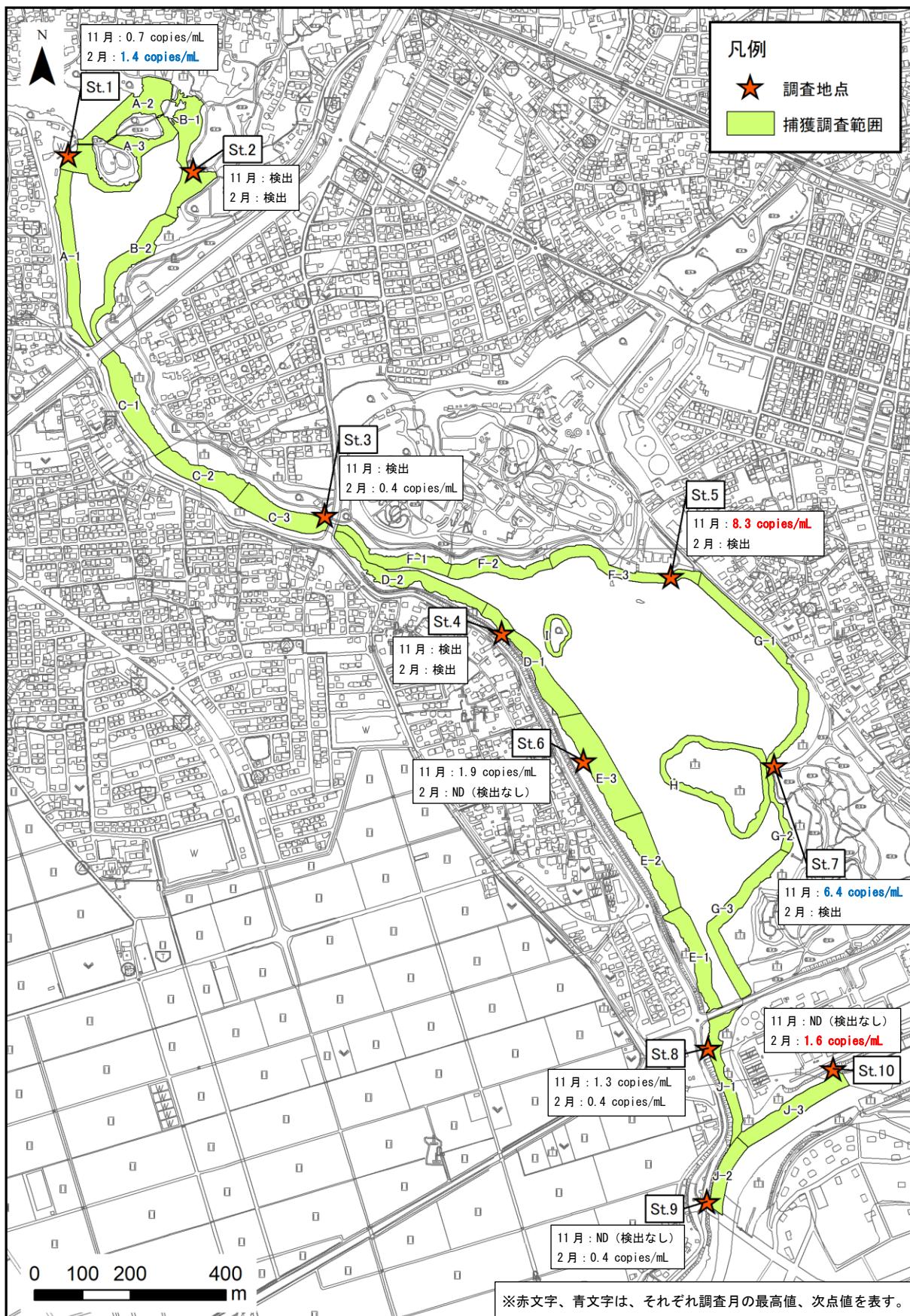


図 5-2-5 定量分析結果 (ジルティラピア)

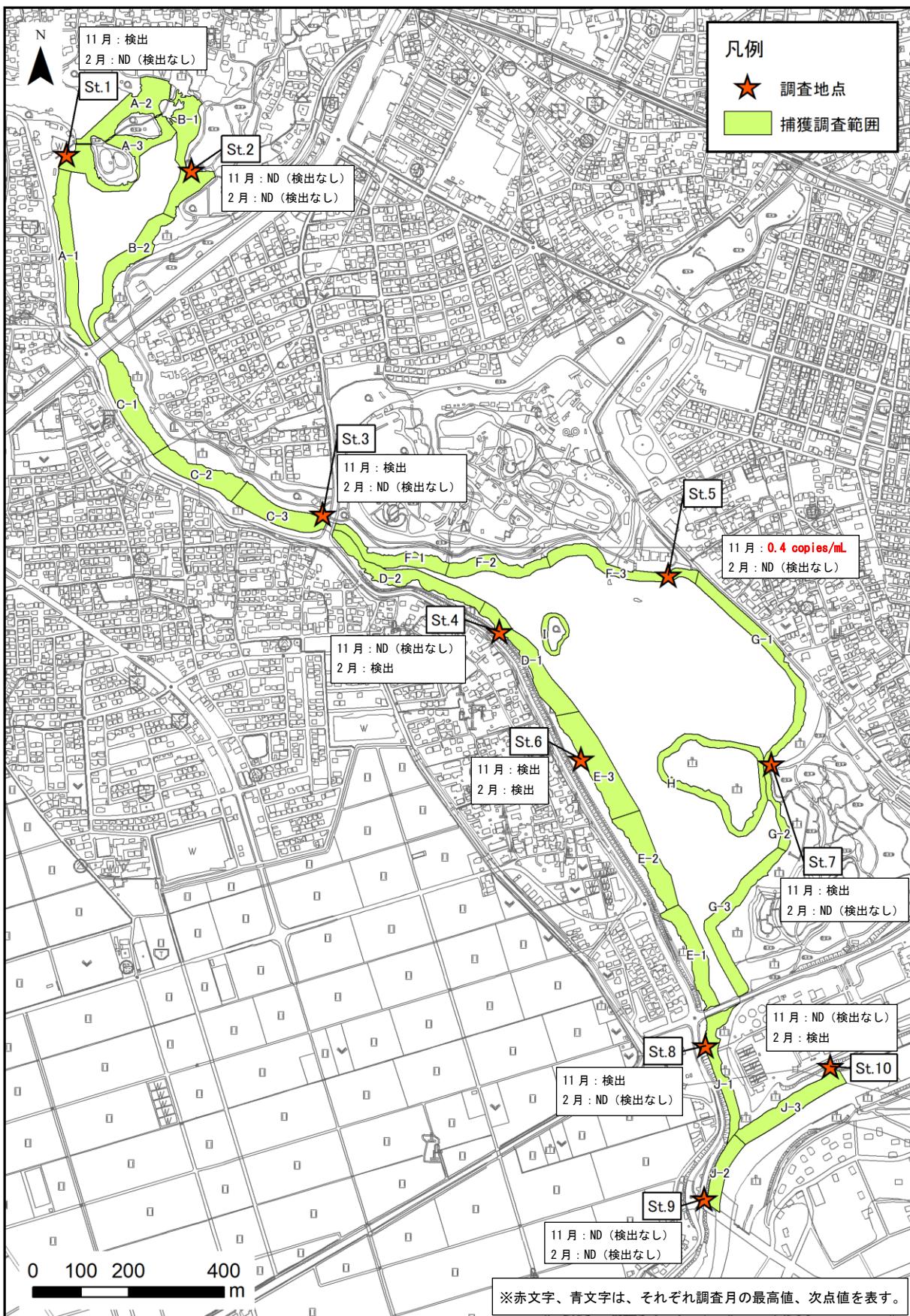


図 5-2-6 定量分析結果（カムルチー）

6. 定量解析

定量解析を行うにあたり、環境DNA濃度は、定量下限値未満が多数存在したため、定量下限値も一律使用した。

定量下限値未満の値を含む定量分析結果を表 5-2-1 (1) ~ (2) に示す。

表 5-2-1 (1) 定量分析結果 (11月)

11月採水	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
オオクチバス	ND	1.0	ND	検出 (0.1)	検出 (0.2)	51.3	検出 (0.2)	検出 (0.1未満)	検出 (0.1)	ND
ブルーギル	ND	ND	ND	検出 (0.1)	検出 (0.1未満)	検出 (0.1)	ND	検出 (0.1)	検出 (0.3)	ND
カダヤン	検出 (0.1)	検出 (0.1)	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	検出 (0.1)	検出 (0.1)	ND
ナイルティラピア	検出 (0.1)	検出 (0.1)	0.3	検出 (0.1)	4.3	検出 (0.2)	0.6	検出 (0.3)	検出 (0.1未満)	0.4
ジルティラピア	0.7	検出 (0.2)	検出 (0.2)	検出 (0.3)	8.3	1.9	6.4	1.3	ND	ND
カムルチー	検出 (0.1)	ND	検出 (0.1未満)	ND	0.4	検出 (0.1)	検出 (0.3)	検出 (0.1未満)	ND	ND

注1) ND: 検出なし

注2) 単位は、copies/mL

注3) 定量下限値は、0.30copies/mLとする

注4) ■は最高値、■は次点値を示す。

表 5-2-1 (2) 定量分析結果 (2月)

2月採水	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	St. 9	St. 10
オオクチバス	検出 (0.1未満)	ND	検出 (0.1未満)	検出 (0.2)	検出 (0.1未満)	ND	ND	検出 (0.1)	検出 (0.1未満)	ND
ブルーギル	ND	ND	ND	検出 (0.1未満)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
カダヤン	ND	検出 (0.1)	検出 (0.3)	0.3	ND	ND	ND	ND	検出 (0.1未満)	ND
ナイルティラピア	ND	0.4	検出 (0.1)	検出 (0.1)	検出 (0.1)	検出 (0.1未満)	検出 (0.1未満)	ND	検出 (0.1未満)	1.3
ジルティラピア	1.4	検出 (0.1未満)	0.4	検出 (0.1)	ND	検出 (0.2)	ND	検出 (0.1)	0.4	0.4
カムルチー	ND	ND	ND	検出 (0.1未満)	ND	検出 (0.1未満)	ND	ND	ND	検出 (0.1未満)

注1) ND: 検出なし

注2) 単位は、copies/mL

注3) 定量下限値は、0.30copies/mLとする

注4) ■は最高値、■は次点値を示す。

6-1 各ブロックにおける確認個体数と環境DNA濃度

(1) 解析手法

全10地点の調査地点(採水)の環境DNAがどの捕獲調査範囲から影響したものかを予測・組み合わせを行い、各調査地点の環境DNA濃度(copies/mL)とそれに対応する捕獲調査範囲の結果(捕獲個体数と目視個体数を合計した確認個体数)から得られた個体数密度を比較した。なお、ナイルティラピアおよびジルティラピアは、捕獲できず目視確認にとどまった個体がティラピア属としてまとめられているため、捕獲個体数の比率でそれぞれに割り振り、確認個体数とした。

捕獲調査範囲の組み合わせパターンは、2通りの組み合わせを検討した。

また、密度を算出するための体積は、捕獲調査の実施面積(捕獲調査ラインの両側2.5mずつ)、または都市計画図1/2500(令和2年作成)を基にGISで算出した江津湖の全水域の面積と各捕獲調査範囲内の任意の地点で計測した水深(2022年2月9日、10日測定)から算出した。

2通りの組み合わせパターンを表6-1-1(1)~(2)、図6-1-1(1)~(2)に、捕獲調査実施ラインを図6-1-2(1)~(2)に、各捕獲調査範囲内の任意の地点で計測した水深を表6-1-3に、水深測定位置図を図6-1-3に、11月および2月の確認個体数および捕獲調査実施体積を表6-1-3(1)~(5)に示す。

表 6-1-1 (1) 捕獲調査範囲の組み合わせパターンA

調査地点	捕獲調査範囲
St. 1	A-1, A-2, A-3
St. 2	B-1, B-2
St. 3	C-1, C-2, C-3
St. 4	D-1, D-2, I
St. 5	F-1, F-2, F-3
St. 6	E-1, E-2, E-3
St. 7	G-1, G-2, G-3, H
St. 8	J-1
St. 9	J-2
St. 10	J-3

表 6-1-1 (2) 捕獲調査範囲の組み合わせパターンB

調査地点	捕獲調査範囲
St. 1	A-2, A-3
St. 2	B-1
St. 3	A-1, B-2, C-1, C-2, C-3
St. 4	D-1, D-2
St. 5	F-1, F-2, F-3
St. 6	E-3, I
St. 7	G-1, G-2, H
St. 8	E-1, E-2, G-3, J-1
St. 9	J-2
St. 10	J-3

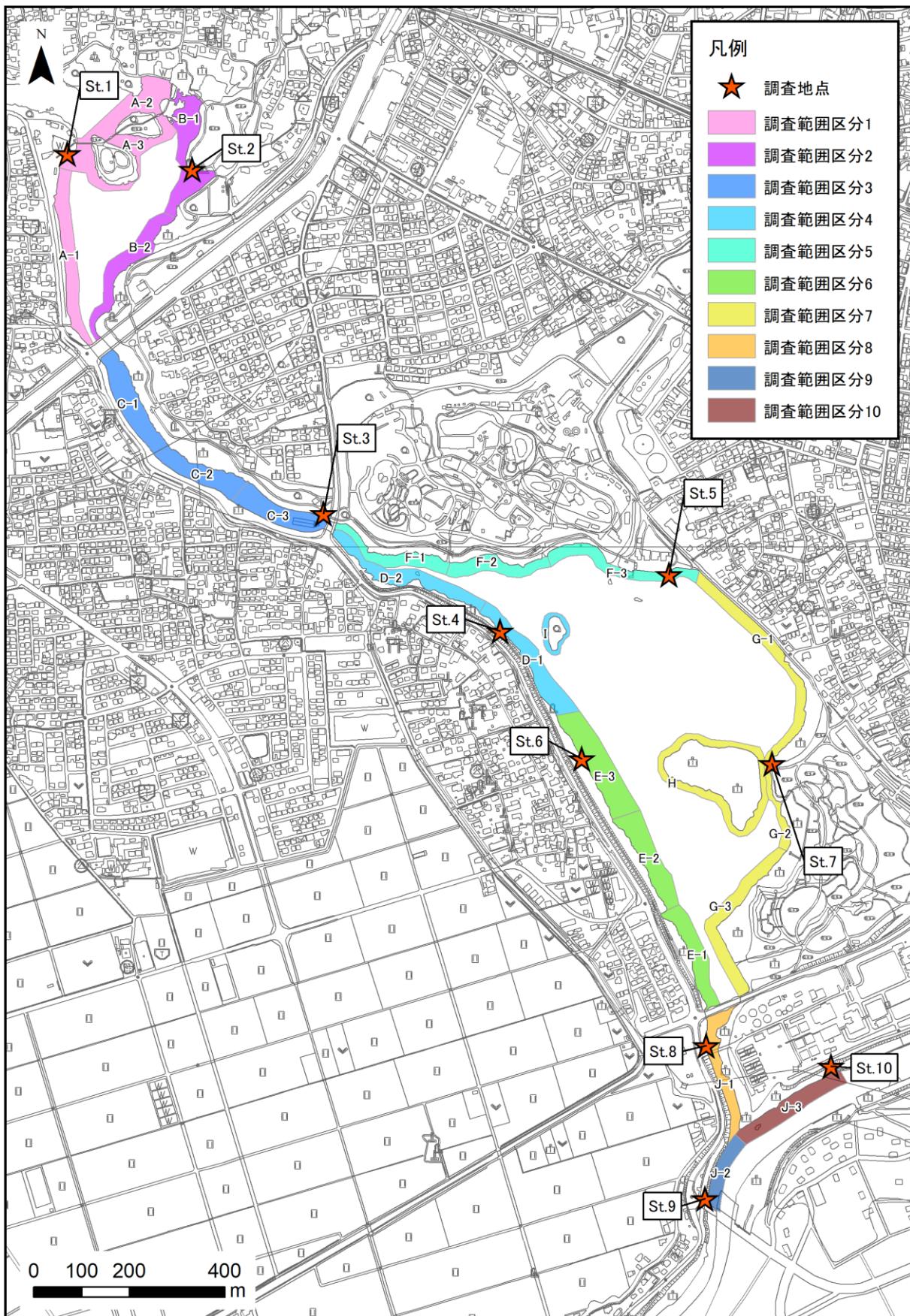


図 6-1-1 (1) 捕獲調査範囲組み合わせパターンA

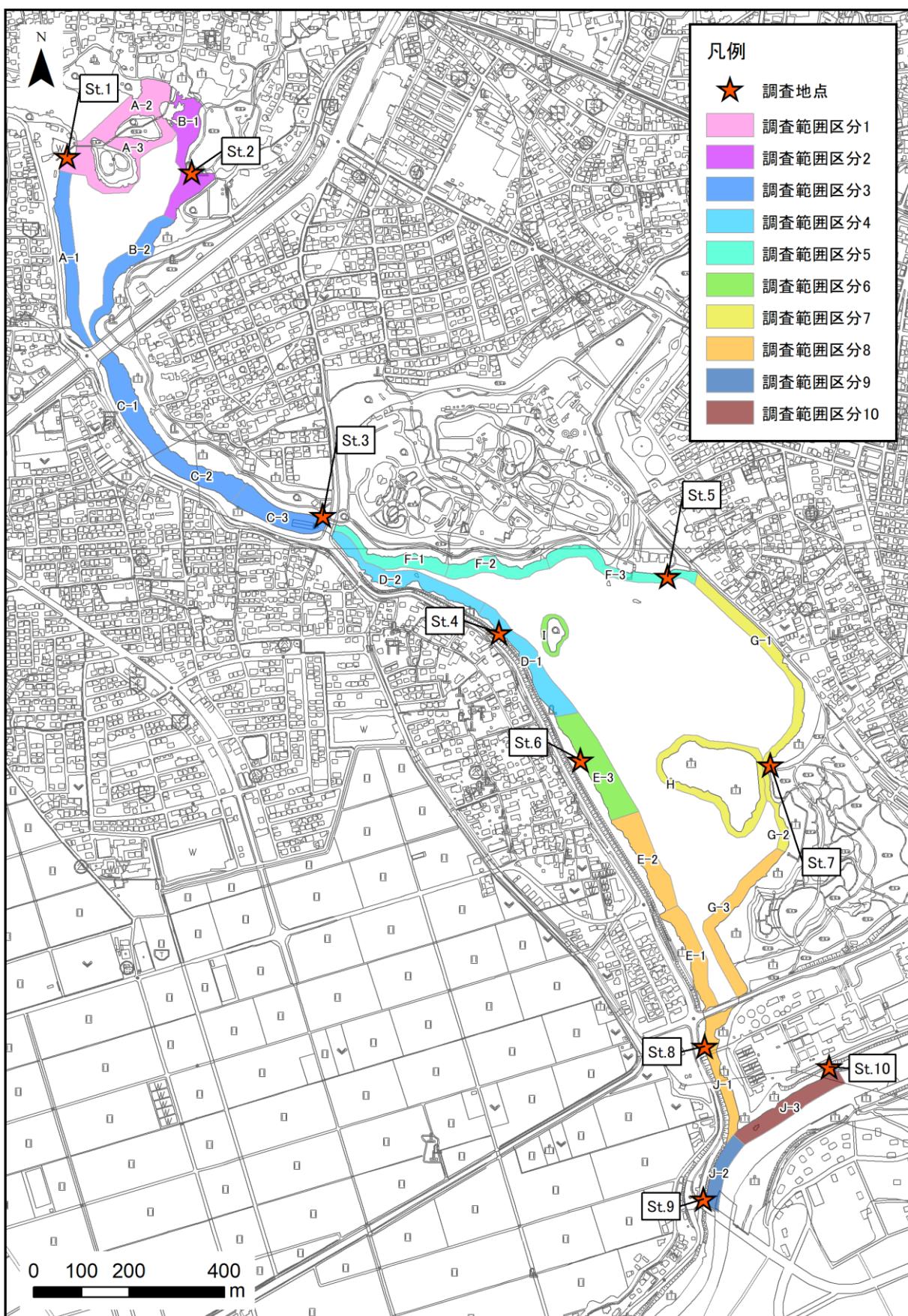


図 6-1-1 (2) 捕獲調査範囲組み合わせパターンB

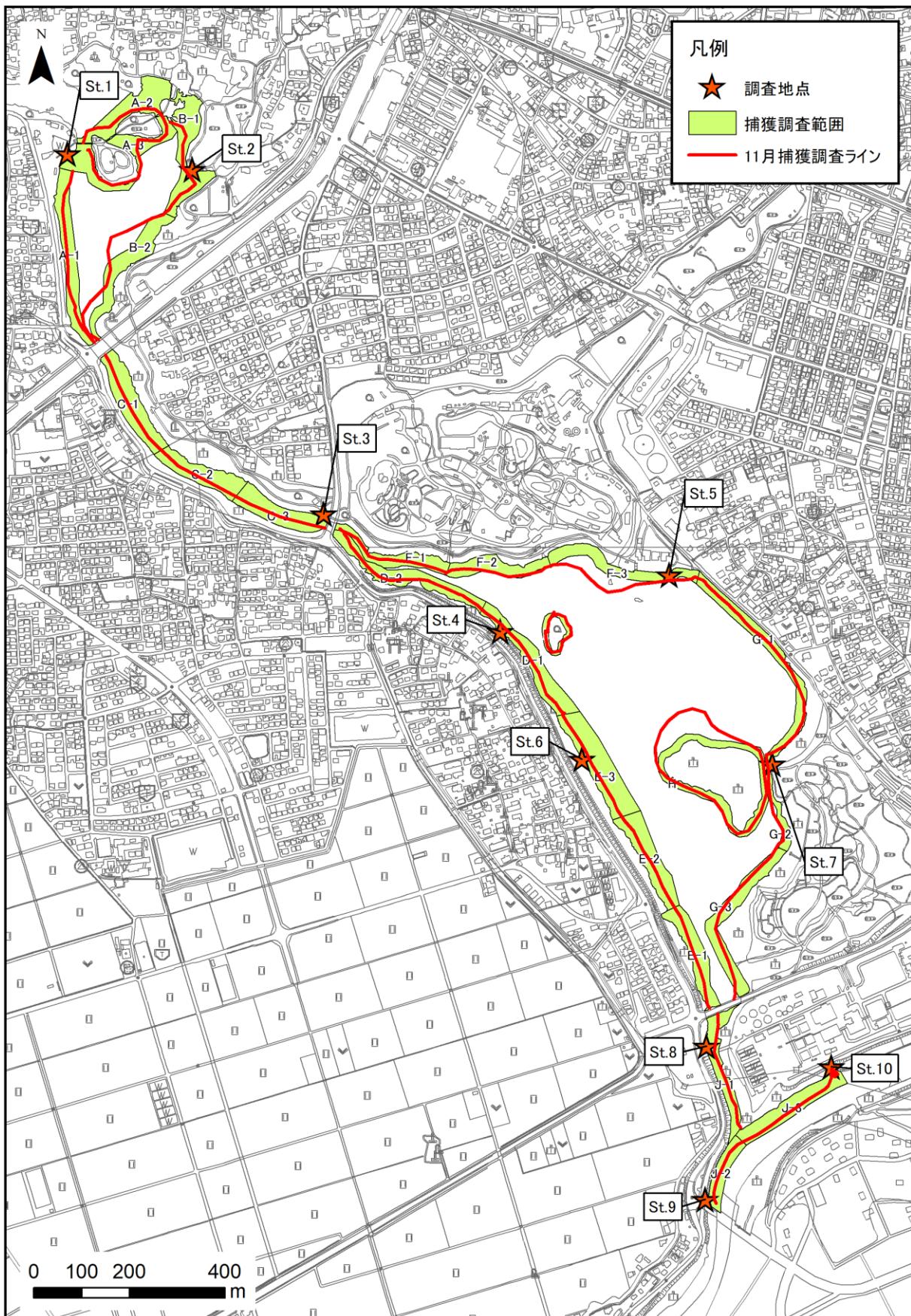


図 6-1-2 (1) 捕獲調査実施ライン (11月)

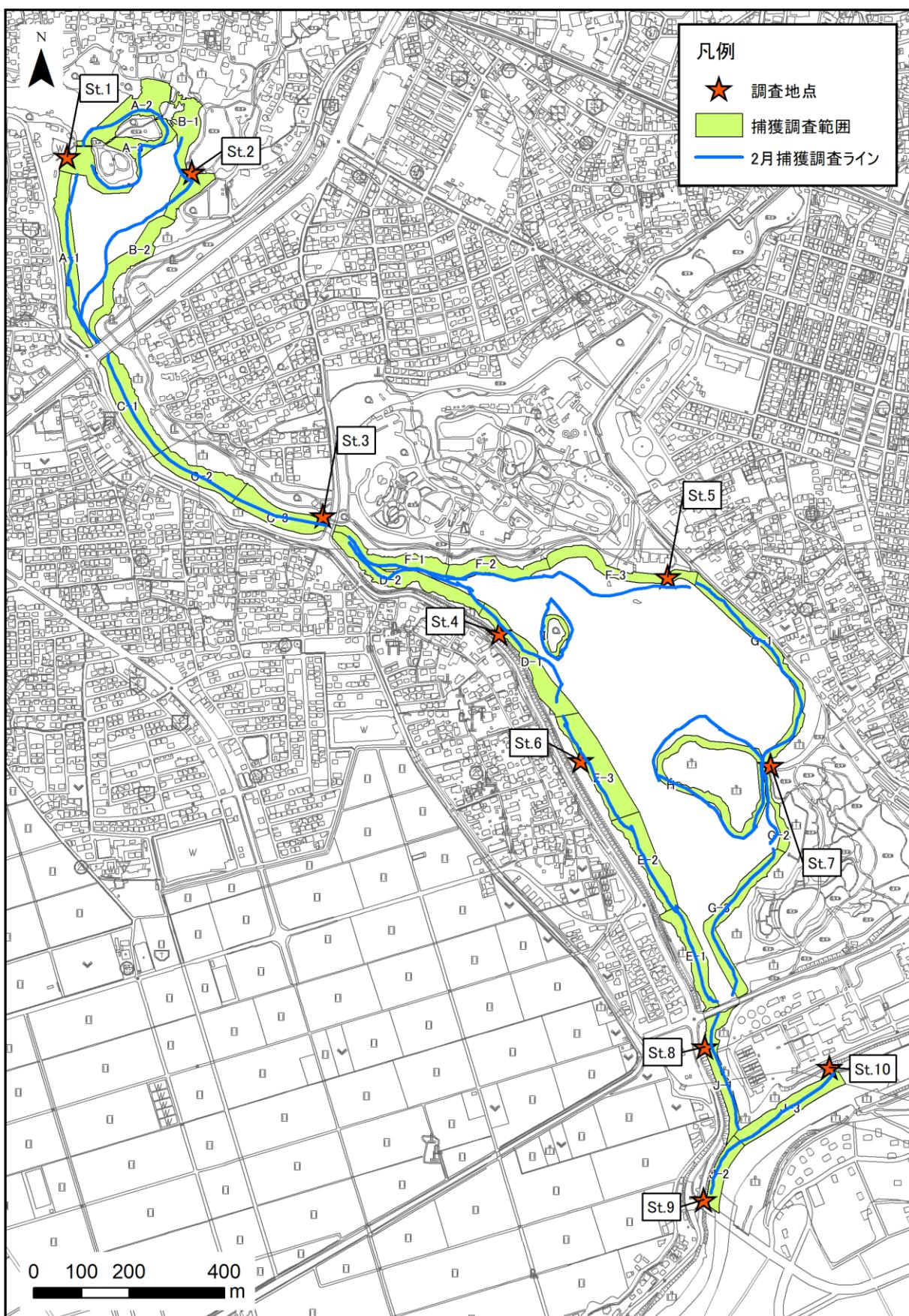


図 6-1-2 (2) 捕獲調査実施ライン（2月）

表 6-1-2 捕獲調査範囲の水深一覧

捕獲調査範囲名	水深 (m)	捕獲調査範囲名	水深 (m)	捕獲調査範囲名	水深 (m)
A-1	1.45	I	1.00	H	1.60
A-2	0.60		1.30		1.80
	1.00		平均 : 1.15		0.80
A-3	1.00	F-1	1.60		2.00
	平均 : 0.87		2.50		平均 : 1.55
	0.90		0.60	J-1	1.40
B-1	1.40	F-2	平均 : 1.57		0.60
	1.20		1.20		平均 : 1.00
	0.90		0.90	J-2	1.20
B-2	平均 : 1.10		平均 : 1.05		1.40
	1.70	F-3	0.60		平均 : 1.30
	1.45		1.00		1.00
C-1	平均 : 1.58		平均 : 0.80		0.90
C-2	1.40	G-1	0.90	J-3	1.00
	1.90		1.40		平均 : 0.97
C-3	0.85		0.80		
	平均 : 1.38		平均 : 1.03		
	0.50	G-2	1.30		
D-1	0.55		1.60		
	1.20		平均 : 1.45		
D-2	0.90	G-3	1.90		
	平均 : 0.88		1.00		
	0.95		0.80		
E-1	1.10		平均 : 1.23		
	平均 : 1.03	E-2	1.00		
	1.50		1.50		
E-2	1.20		平均 : 1.25		
	0.90	E-3	1.30		
	平均 : 1.20		1.70		
E-3	1.80		平均 : 1.50		
	0.90		1.70		
	1.80		1.50		
F-1	平均 : 1.50		平均 : 1.60		

※橙色塗りつぶしは、体積計算に使用した数値を示す。

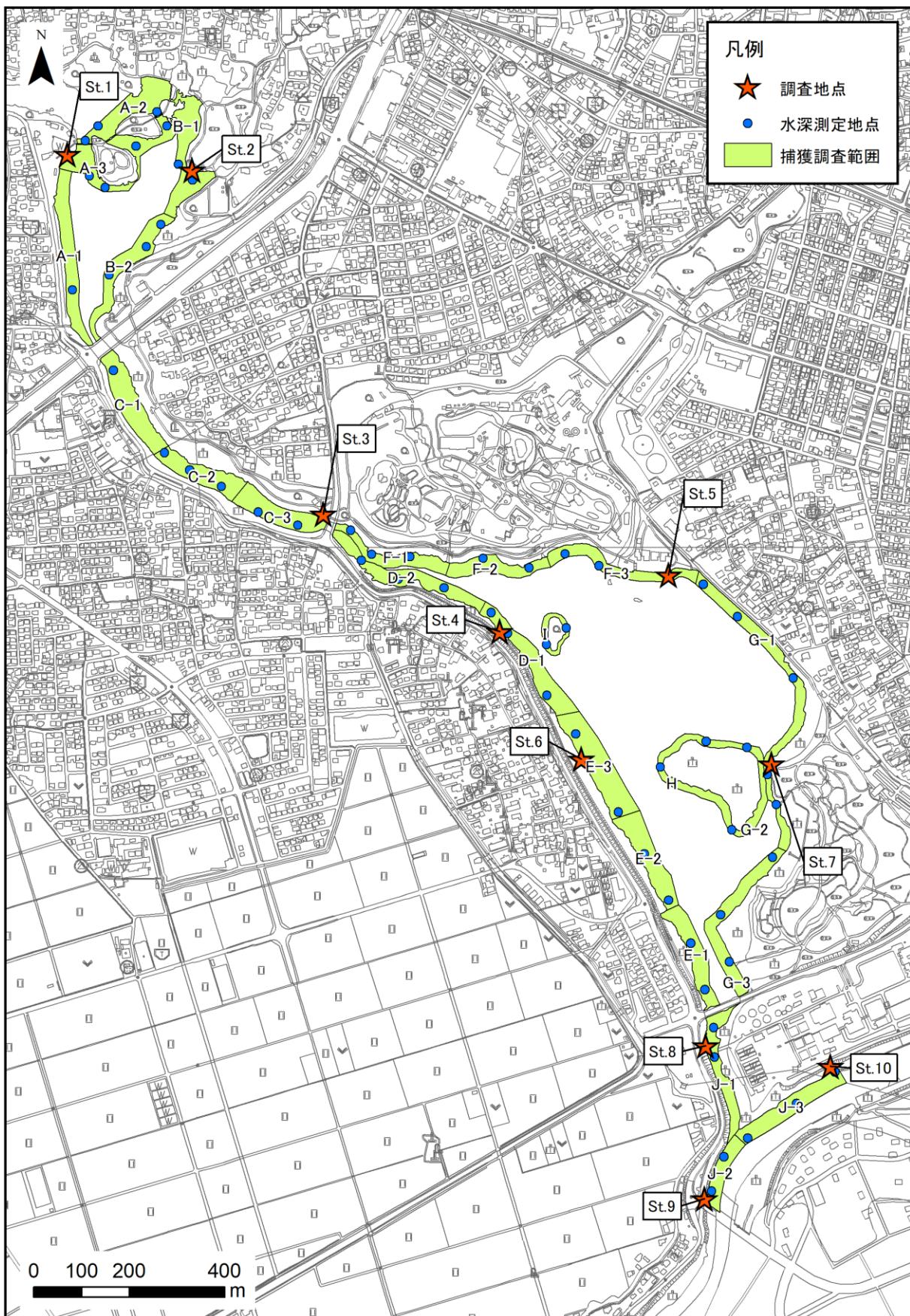


図 6-1-3 水深測定地点位置図

表 6-1-3 (1) 確認個体数および捕獲調査実施体積（オオクチバス）

地点名	11月確認 個体数 (匹)	2月確認 個体数 (匹)	11月 調査体積 (m ³)	2月 調査体積 (m ³)
A-1	0	0	2783.84	2859.36
A-2	0	0	871.91	874.32
A-3	0	0	1938.22	1721.24
B-1	0	0	1990.51	1636.22
B-2	0	0	2612.87	2559.16
C-1	0	0	592.58	596.86
C-2	0	0	836.73	833.92
C-3	0	0	1039.40	1042.66
D-1	0	0	1730.20	1696.55
D-2	0	0	2671.79	2775.34
I	8	2	1320.26	1780.08
F-1	0	0	2028.89	1859.11
F-2	0	0	1203.75	1329.11
F-3	0	0	1353.31	1248.12
G-1	0	0	2694.77	2689.62
G-2	0	0	1364.58	1335.23
G-3	0	0	2326.46	2309.43
E-1	0	0	1432.08	1558.09
E-2	0	0	1683.04	1795.25
E-3	0	0	2014.73	2071.19
H	2	1	5907.30	5961.08
J-1	1	1	1276.35	1303.11
J-2	0	0	1000.46	870.73
J-3	0	0	1388.30	1201.26

表 6-1-3 (2) 確認個体数および捕獲調査実施体積（ブルーギル）

地点名	11月確認 個体数 (匹)	2月確認 個体数 (匹)	11月 調査体積 (m ³)	2月 調査体積 (m ³)
A-1	0	0	2783.84	2859.36
A-2	0	0	871.91	874.32
A-3	0	0	1938.22	1721.24
B-1	0	0	1990.51	1636.22
B-2	0	0	2612.87	2559.16
C-1	0	0	592.58	596.86
C-2	0	0	836.73	833.92
C-3	0	0	1039.40	1042.66
D-1	0	0	1730.20	1696.55
D-2	0	0	2671.79	2775.34
I	2	0	1320.26	1780.08
F-1	0	0	2028.89	1859.11
F-2	0	0	1203.75	1329.11
F-3	0	0	1353.31	1248.12
G-1	0	0	2694.77	2689.62
G-2	0	0	1364.58	1335.23
G-3	0	0	2326.46	2309.43
E-1	0	0	1432.08	1558.09
E-2	0	0	1683.04	1795.25
E-3	0	1	2014.73	2071.19
H	0	0	5907.30	5961.08
J-1	0	0	1276.35	1303.11
J-2	0	0	1000.46	870.73
J-3	0	0	1388.30	1201.26

表 6-1-3 (3) 確認個体数および捕獲調査実施体積（ナイルティラピア）

地点名	11月 確認 個体数 (匹)	2月 確認 個体数 (匹)	11月 調査体積 (m ³)	2月 調査体積 (m ³)
A-1	0	0	2783.84	2859.36
A-2	0	0	871.91	874.32
A-3	0	0	1938.22	1721.24
B-1	0	0	1990.51	1636.22
B-2	0	0	2612.87	2559.16
C-1	0	0	592.58	596.86
C-2	0	0	836.73	833.92
C-3	0	0	1039.40	1042.66
D-1	8	4	1730.20	1696.55
D-2	0	0	2671.79	2775.34
I	6	2	1320.26	1780.08
F-1	0	1	2028.89	1859.11
F-2	2	1	1203.75	1329.11
F-3	11	2	1353.31	1248.12
G-1	52	7	2694.77	2689.62
G-2	0	0	1364.58	1335.23
G-3	2	0	2326.46	2309.43
E-1	2.5	0	1432.08	1558.09
E-2	0	1	1683.04	1795.25
E-3	0	0	2014.73	2071.19
H	0	0	5907.30	5961.08
J-1	0	0	1276.35	1303.11
J-2	0	0	1000.46	870.73
J-3	22	6	1388.30	1201.26

表 6-1-3 (4) 確認個体数および捕獲調査実施体積（ジルティラピア）

地点名	11月 確認 個体数 (匹)	2月 確認 個体数 (匹)	11月 調査体積 (m ³)	2月 調査体積 (m ³)
A-1	2	0	2783.84	2859.36
A-2	0	0	871.91	874.32
A-3	0	0	1938.22	1721.24
B-1	0	0	1990.51	1636.22
B-2	0	0	2612.87	2559.16
C-1	4	0	592.58	596.86
C-2	2	1	836.73	833.92
C-3	0	5	1039.40	1042.66
D-1	3	7	1730.20	1696.55
D-2	9	2	2671.79	2775.34
I	8	11	1320.26	1780.08
F-1	18	8	2028.89	1859.11
F-2	2	2	1203.75	1329.11
F-3	21	4	1353.31	1248.12
G-1	19	0	2694.77	2689.62
G-2	13	1	1364.58	1335.23
G-3	2	3	2326.46	2309.43
E-1	2.5	7	1432.08	1558.09
E-2	0	4	1683.04	1795.25
E-3	0	0	2014.73	2071.19
H	4	1	5907.30	5961.08
J-1	11	2	1276.35	1303.11
J-2	0	0	1000.46	870.73
J-3	0	0	1388.30	1201.26

表 6-1-3 (5) 確認個体数および捕獲調査実施体積（カムルチー）

地点名	11月確認 個体数 (匹)	2月確認 個体数 (匹)	11月 調査体積 (m ³)	2月 調査体積 (m ³)
A-1	0	0	2783.84	2859.36
A-2	0	0	871.91	874.32
A-3	0	0	1938.22	1721.24
B-1	0	0	1990.51	1636.22
B-2	0	0	2612.87	2559.16
C-1	0	1	592.58	596.86
C-2	0	0	836.73	833.92
C-3	0	0	1039.40	1042.66
D-1	0	0	1730.20	1696.55
D-2	0	0	2671.79	2775.34
I	0	0	1320.26	1780.08
F-1	0	0	2028.89	1859.11
F-2	0	0	1203.75	1329.11
F-3	0	1	1353.31	1248.12
G-1	1	0	2694.77	2689.62
G-2	0	0	1364.58	1335.23
G-3	0	1	2326.46	2309.43
E-1	0	0	1432.08	1558.09
E-2	0	1	1683.04	1795.25
E-3	0	0	2014.73	2071.19
H	0	1	5907.30	5961.08
J-1	0	0	1276.35	1303.11
J-2	0	0	1000.46	870.73
J-3	0	0	1388.30	1201.26

(2) 解析結果

1) 組み合わせパターン A

組み合わせパターン A では、環境 DNA 濃度との間に相関関係は見られなかった。

熊本市指定外来魚 6 種毎のグラフを図 6-1-4 (1) ~ (6) に示す。

左軸に確認個体数密度 ($\text{匹}/\text{m}^3$) 、右軸に環境 DNA 濃度 (copies/mL) を示す。

なお、カダヤシについて、確認個体数のデータが得られなかつたため、環境 DNA 濃度 (copies/mL) のみ示す。

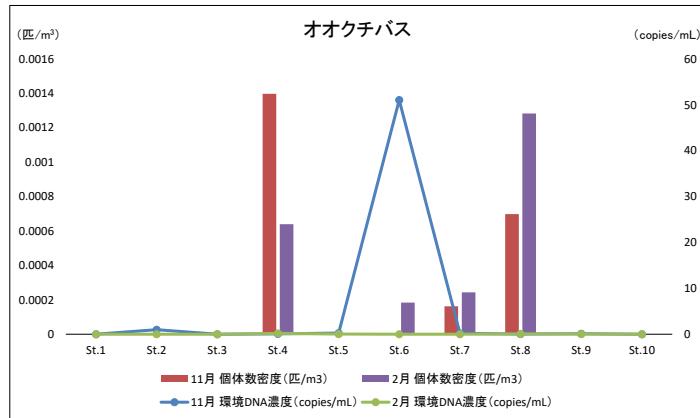


図 6-1-4 (1) 環境DNA濃度と個体数密度の比較結果（オオクチバス）

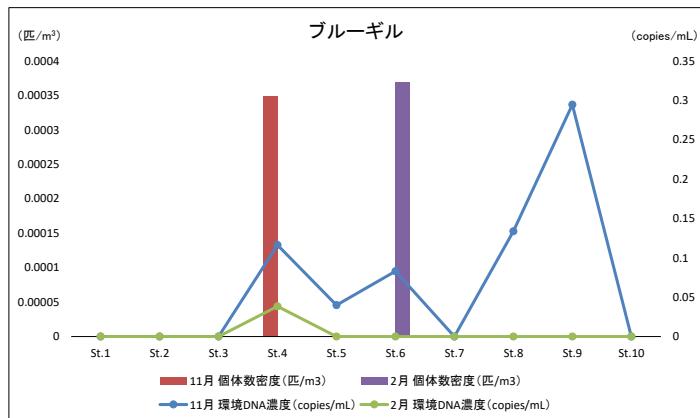


図 6-1-4 (2) 環境DNA濃度と個体数密度の比較結果（ブルーギル）

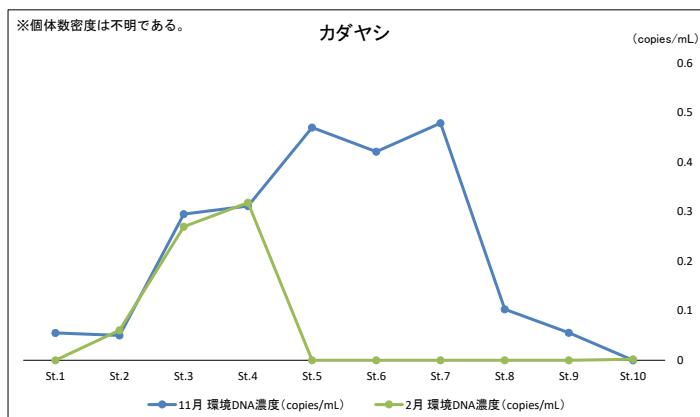


図 6-1-4 (3) 環境DNA濃度と個体数密度の比較結果（カダヤシ）

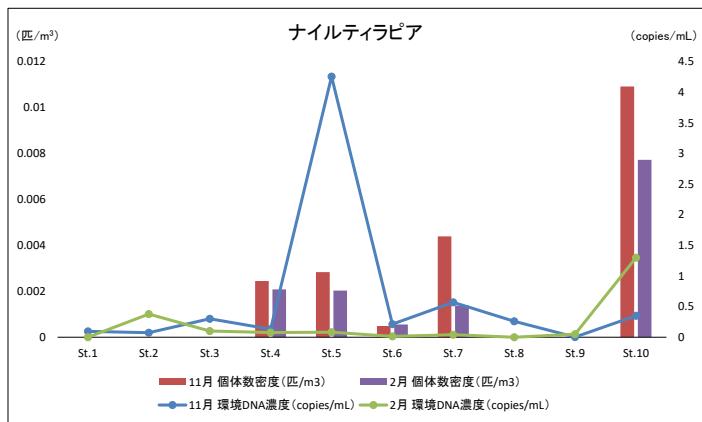


図 6-1-4 (4) 環境 DNA 濃度と個体数密度の比較結果（ナイルティラピア）

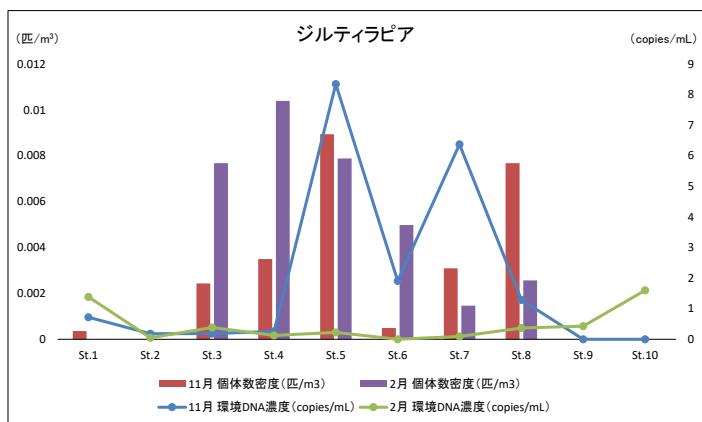


図 6-1-4 (5) 環境 DNA 濃度と個体数密度の比較結果（ジルティラピア）

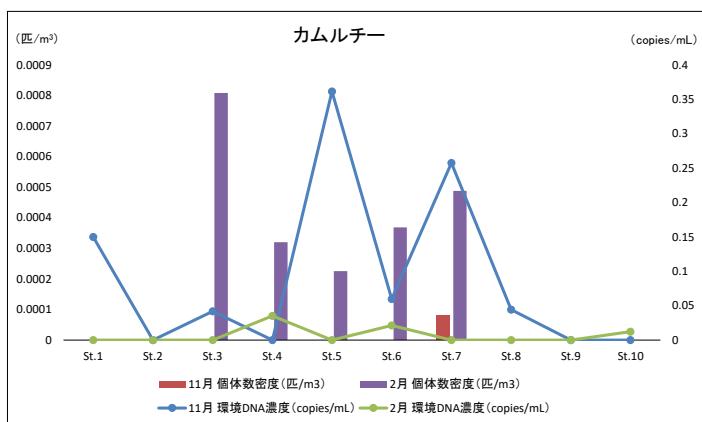


図 6-1-4 (6) 環境 DNA 濃度と個体数密度の比較結果（カムルチー）

2) 組み合わせパターンB

組み合わせパターンAとの比較から相関関係は見られなかったことから、各調査地点の環境DNAはパターンAの捕獲調査範囲から影響していない事が分かった。そのため、江津湖内の流れを再度検討し、組み合わせパターンを変更し(パターンB)、各調査地点の環境DNA濃度と比較した。

しかし、組み合わせパターンBにおいても、環境DNA濃度との間に相関関係は見られなかった。熊本市指定外来魚5種毎のグラフを図6-1-5(1)～(5)に示す。

なお、カダヤシについては、パターンAのグラフと同一のため、省略する。

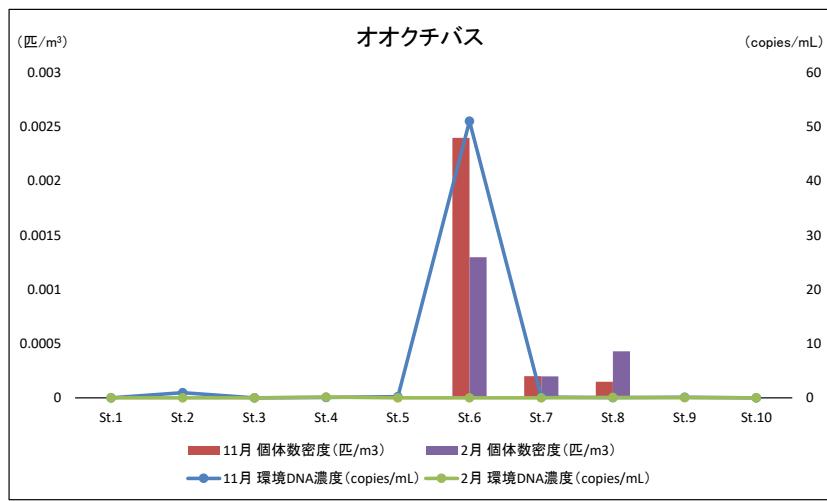


図 6-1-5 (1) 環境DNA濃度と個体数密度の比較結果（オオクチバス）

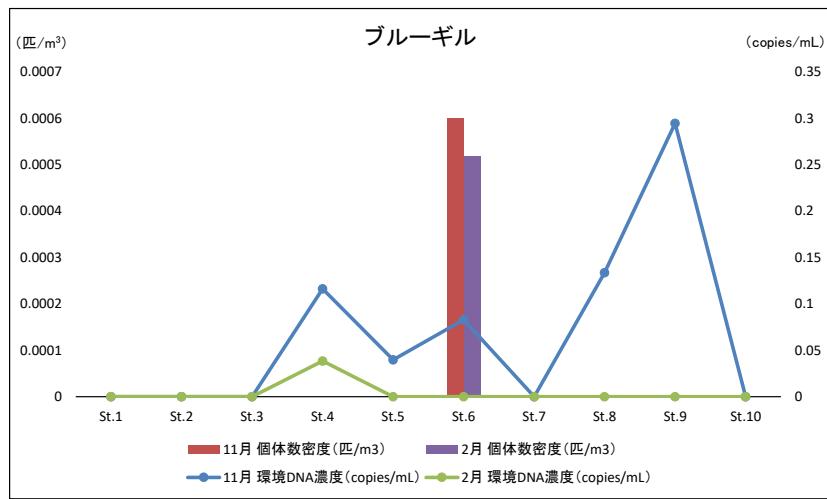


図 6-1-5 (2) 環境DNA濃度と個体数密度の比較結果（ブルーギル）

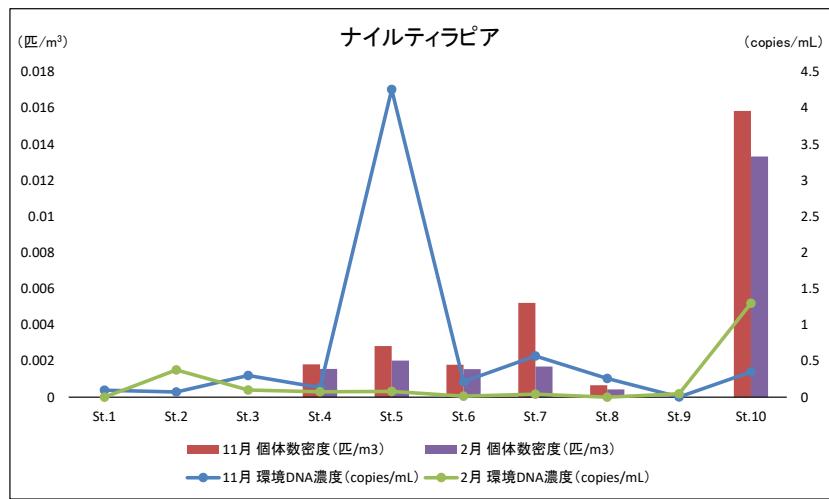


図 6-1-5 (3) 環境 DNA 濃度と個体数密度の比較結果（ナイルティラピア）

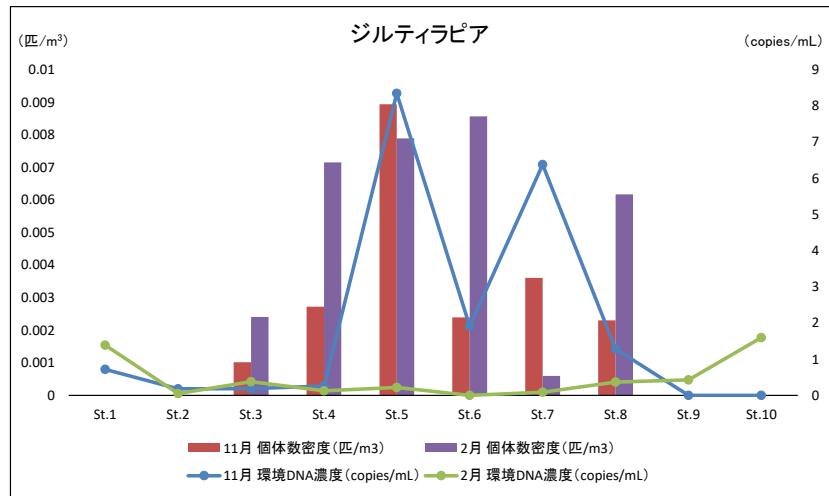


図 6-1-5 (4) 環境 DNA 濃度と個体数密度の比較結果（ジルティラピア）

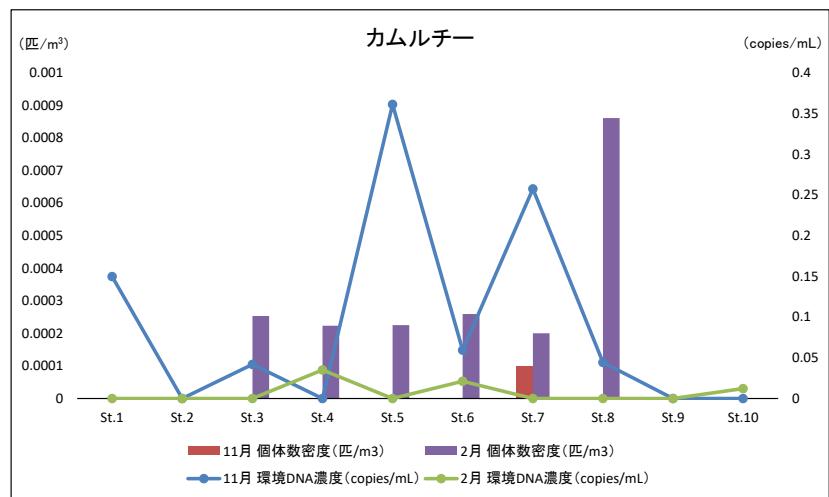


図 6-1-5 (5) 環境 DNA 濃度と個体数密度の比較結果（カムルチー）

6-2 各ブロックにおける推定生息個体数と環境 DNA 密度の比較

(1) 解析手法

上記 2 通りの捕獲調査範囲の組み合わせパターンによる確認個体数密度と環境 DNA 濃度との比較では相関関係は見られなかったことから、確認個体数での比較は困難であると考え、各調査地点の環境 DNA 濃度 (copies/mL) と今年度の捕獲調査（計 4 回分）の結果から推定される個体数（以下、推定生息個体数）の生息密度（以下、推定生息個体数密度）を比較した。また、推定生息個体数は、捕獲個体数と目視個体数を合計した確認個体数からプログラム・キャプチャ法を使用した。

また、環境 DNA 濃度および捕獲調査実施体積は、2 回分（11 月と 2 月）を平均した。

捕獲調査範囲の組み合わせは、確認個体数密度の比較で 2 パターン共に相関がみられなかつたが、B パターンにおいてオオクチバスの確認個体数密度と環境 DNA 濃度にやや類似した傾向がみられたため、パターン B を使用した。

今年度の捕獲調査 4 回分の確認個体数・推定生息個体数・捕獲調査実施体積を表 6-2-1(1)～(5) に示す。

表 6-2-1 (1) 確認個体数および推定生息個体数、捕獲調査範囲体積（オオクチバス）

地点名	6月確認 個体数 (匹)	8月確認 個体数 (匹)	11月確認 個体数 (匹)	2月確認 個体数 (匹)	推定生息 個体数 (匹)	捕獲調査 実施体積 (m ³)
A-1	0	0	0	0	0	2821.60
A-2	0	0	0	0	0	873.12
A-3	0	0	0	0	0	1829.73
B-1	0	0	0	0	0	1813.36
B-2	0	0	0	0	0	2586.01
C-1	0	0	0	0	0	594.72
C-2	0	0	0	0	0	835.32
C-3	0	0	0	0	0	1041.03
D-1	0	0	0	0	0	1713.37
D-2	0	0	0	0	0	2723.57
I	0	0	8	2	16±4.90	1550.17
F-1	0	0	0	0	0	1944.00
F-2	0	0	0	0	0	1266.43
F-3	0	0	0	0	0	1300.71
G-1	3	4	0	0	7	2692.19
G-2	2	0	0	0	2	1349.90
G-3	2	0	0	0	2	2317.94
E-1	8	0	0	0	8	1289.73
E-2	6	0	0	0	6	935.60
E-3	7	0	0	0	7	1294.78
H	16	1	2	1	23±3.46	5934.19
J-1	0	0	1	1	5±3.46	1495.09
J-2	2	0	0	0	2	1739.15
J-3	0	0	0	0	0	2042.96

表 6-2-1 (2) 確認個体数および推定生息個体数、捕獲調査範囲体積（ブルーギル）

地点名	6月確認 個体数(匹)	8月確認 個体数(匹)	11月確認 個体数(匹)	2月確認 個体数(匹)	推定生息 個体数(匹)	捕獲調査 実施体積(m ³)
A-1	0	0	0	0	0	2821.60
A-2	0	0	0	0	0	873.12
A-3	0	0	0	0	0	1829.73
B-1	0	0	0	0	0	1813.36
B-2	0	0	0	0	0	2586.01
C-1	0	0	0	0	0	594.72
C-2	0	0	0	0	0	835.32
C-3	0	0	0	0	0	1041.03
D-1	0	0	0	0	0	1713.37
D-2	0	0	0	0	0	2723.57
I	0	0	2	0	2	1550.17
F-1	0	0	0	0	0	1944.00
F-2	0	0	0	0	0	1266.43
F-3	0	0	0	0	0	1300.71
G-1	0	0	0	0	0	2692.19
G-2	0	0	0	0	0	1349.90
G-3	0	0	0	0	0	2317.94
E-1	0	0	0	0	0	1289.73
E-2	0	0	0	0	0	935.60
E-3	0	0	0	1	4±3.46	1294.78
H	2	0	0	0	2	5934.19
J-1	0	0	0	0	0	1495.09
J-2	0	0	0	0	0	1739.15
J-3	0	0	0	0	0	2042.96

表 6-2-1 (3) 確認個体数および推定生息個体数、捕獲調査範囲体積（ナイルティラピア）

地点名	6月確認 個体数(匹)	8月確認 個体数(匹)	11月確認 個体数(匹)	2月確認 個体数(匹)	推定生息 個体数(匹)	捕獲調査 実施体積(m ³)
A-1	0	0	0	0	0	2821.60
A-2	0	0	0	0	0	873.12
A-3	0	0	0	0	0	1829.73
B-1	0	0	0	0	0	1813.36
B-2	0	0	0	0	0	2586.01
C-1	0	0	0	0	0	594.72
C-2	0	0	0	0	0	835.32
C-3	0	0	0	0	0	1041.03
D-1	3	0	8	4	27±6.93	1713.37
D-2	0	0	0	0	0	2723.57
I	0	0	6	2	14±4.90	1550.17
F-1	0	0	0	1	4±3.46	1944.00
F-2	0	0	2	1	6±3.46	1266.43
F-3	0	0	11	2	19±4.90	1300.71
G-1	18	2	52	7	100±9.17	2692.19
G-2	2	0	0	0	2	1349.90
G-3	0	0	2	0	2	2317.94
E-1	0	0	2.5	0	2.5	1289.73
E-2	0	0	0	1	4±3.46	935.60
E-3	0	0	0	0	0	1294.78
H	0	1	0	0	1	5934.19
J-1	0	0	0	0	0	1495.09
J-2	0	0	0	0	0	1739.15
J-3	0	0	22	6	46±8.49	2042.96

表 6-2-1 (4) 確認個体数および推定生息個体数、捕獲調査範囲体積（ジルティラピア）

地点名	6月確認 個体数(匹)	8月確認 個体数(匹)	11月確認 個体数(匹)	2月確認 個体数(匹)	推定生息 個体数(匹)	捕獲調査 実施体積(m ³)
A-1	0	0	2	0	2	2821.60
A-2	0	0	0	0	0	873.12
A-3	0	0	0	0	0	1829.73
B-1	0	0	0	0	0	1813.36
B-2	0	0	0	0	0	2586.01
C-1	0	0	4	0	4	594.72
C-2	0	0	2	1	6±3.46	835.32
C-3	0	0	0	5	5	1041.03
D-1	3	0	3	7	34±9.17	1713.37
D-2	0	4	9	2	21±4.90	2723.57
I	0	0	8	11	52±11.49	1550.17
F-1	0	0	18	8	50±9.80	1944.00
F-2	4	0	2	2	14±4.90	1266.43
F-3	7	1	21	4	45±6.93	1300.71
G-1	42	2	19	0	63	2692.19
G-2	0	0	13	1	17±3.46	1349.90
G-3	4	0	2	3	18±6	2317.94
E-1	2	0	2.5	7	32±9.17	1289.73
E-2	0	0	0	4	16±6.93	935.60
E-3	6	0	0	0	6	1294.78
H	0	0	4	1	8±3.46	5934.19
J-1	0	0	11	2	19±4.90	1495.09
J-2	0	0	0	0	0	1739.15
J-3	0	0	0	0	0	2042.96

表 6-2-1 (5) 確認個体数および推定生息個体数、捕獲調査範囲体積（カムルチー）

地点名	6月確認 個体数(匹)	8月確認 個体数(匹)	11月確認 個体数(匹)	2月確認 個体数(匹)	推定生息 個体数(匹)	捕獲調査 実施体積(m ³)
A-1	0	0	0	0	0	2821.60
A-2	0	0	0	0	0	873.12
A-3	0	0	0	0	0	1829.73
B-1	0	0	0	0	0	1813.36
B-2	0	0	0	0	0	2586.01
C-1	0	0	0	1	1	594.72
C-2	0	0	0	0	0	835.32
C-3	0	0	0	0	0	1041.03
D-1	0	0	0	0	0	1713.37
D-2	0	0	0	0	0	2723.57
I	0	0	0	0	0	1550.17
F-1	0	0	0	0	0	1944.00
F-2	0	0	0	0	0	1266.43
F-3	0	0	0	1	4±3.46	1300.71
G-1	2	0	1	0	3	2692.19
G-2	0	0	0	0	0	1349.90
G-3	0	0	0	1	4±3.46	2317.94
E-1	2	1	0	0	3	1289.73
E-2	2	0	0	1	6±3.46	935.60
E-3	2	0	0	0	2	1294.78
H	0	0	0	1	4±3.46	5934.19
J-1	1	0	0	0	1	1495.09
J-2	0	0	0	0	0	1739.15
J-3	0	0	0	0	0	2042.96

(2) 解析結果

推定生息個体数密度との比較においても、相関関係は見られなかった。

熊本市指定外来魚 6 種毎のグラフを図 6-2-1 (1) ~ (6) に示す。

なお、カダヤシについて、確認個体数のデータが得られなかつたため、環境 DNA 濃度 (copies/mL) のみ示す。

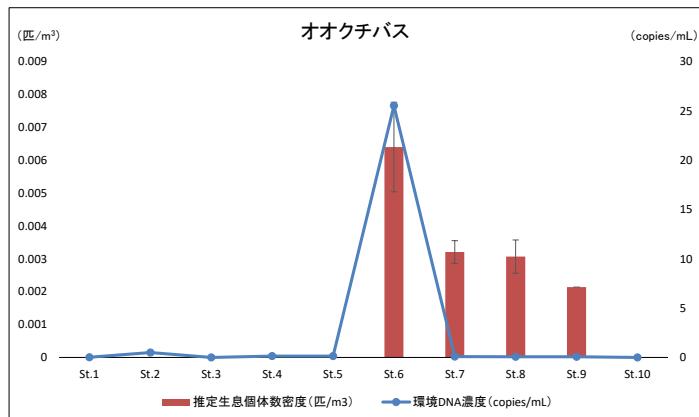


図 6-2-1 (1) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（オオクチバス）

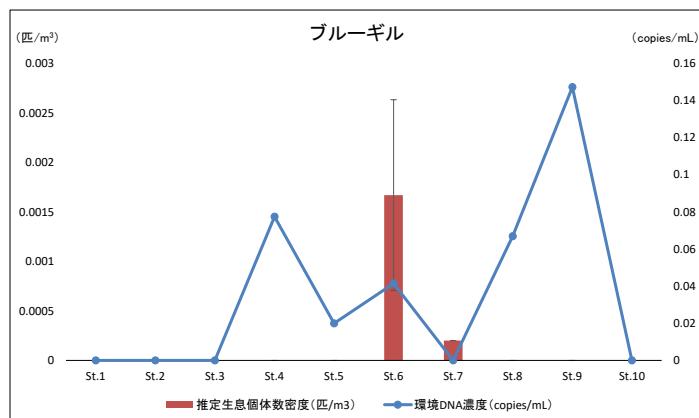


図 6-2-1 (2) 環境 DNA 濃度と推定生息個体数密度の比較（ブルーギル）

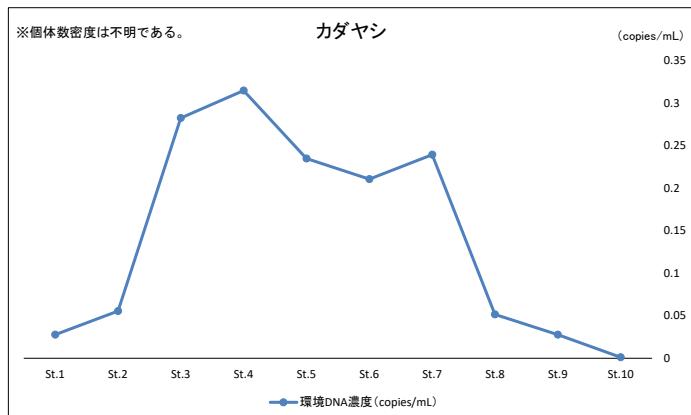


図 6-2-1 (3) 環境 DNA 濃度と推定生息個体数密度の比較（カダヤシ）

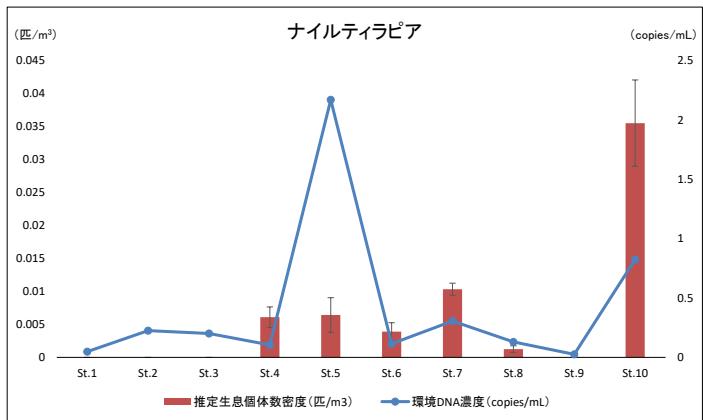


図 6-2-1 (4) 環境 DNA 濃度と推定生息個体数密度の比較（ナイルティラピア）

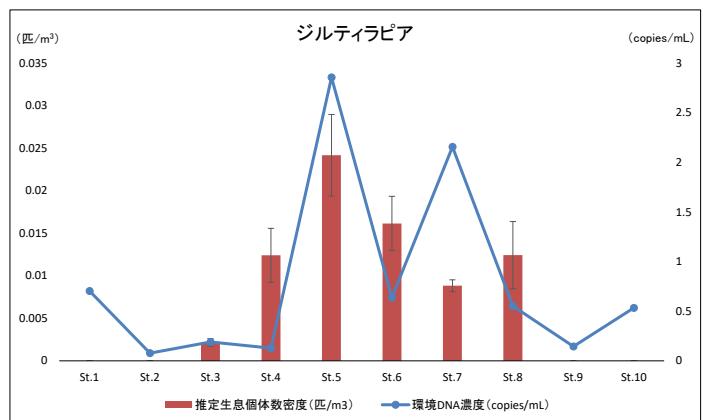


図 6-2-1 (5) 環境 DNA 濃度と推定生息個体数密度の比較（ジルティラピア）

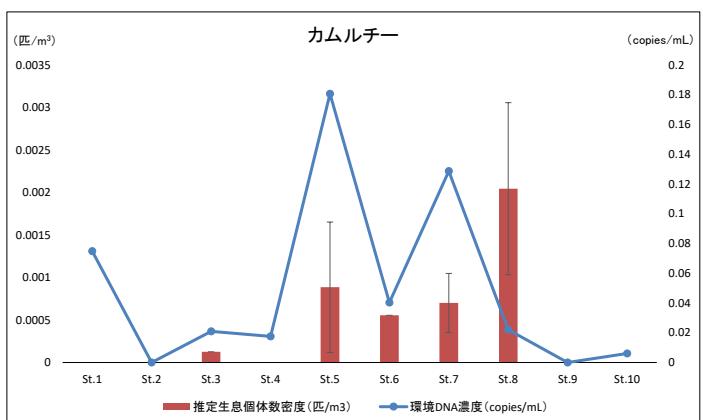


図 6-2-1 (6) 環境 DNA 濃度と推定生息個体数密度の比較（カムルチー）

6-3 全域における定量解析

(1) 解析手法

先述のいずれの結果からも相関関係が見られなかつたことから、本業務の調査地点（採水地点）に対応すると考えられる捕獲調査範囲の組み合わせでは相関関係は見出せないと考えた。

そこで、江津湖を4つのエリアに区画分けし（上江津、中江津、下江津、加勢川）、それぞれに対応する環境DNAの2回分（11月と2月）の分析結果の平均値と推定生息個体数密度を比較した。推定生息個体数は、今年度の4回分の捕獲調査の捕獲個体数と目視個体数を合計した確認個体数からプログラム・キャプチャー法を使用した。

4つのエリア（上江津、中江津、下江津、加勢川）に分類される調査地点・捕獲調査実施体積・エリア毎の全体の水域体積を表6-3-1に、江津湖4エリアに分類される調査地点および捕獲調査範囲を図6-3-1に、江津湖4エリアの確認個体数・推定生息個体数・推定生息個体数密度を表6-3-2（1）～（6）に示す。

表 6-3-1 江津湖4エリアに対応する調査地点および捕獲調査範囲

区画	調査地点	捕獲調査 実施体積 (m ³)	水域体積 (m ³)
上江津	St. 1, 2	9253.14	105152.83
中江津	St. 3	2730.63	22274.18
下江津	St. 4, 5, 6, 7	28329.61	434734.16
加勢川	St. 8, 9, 10	3588.06	22082.73

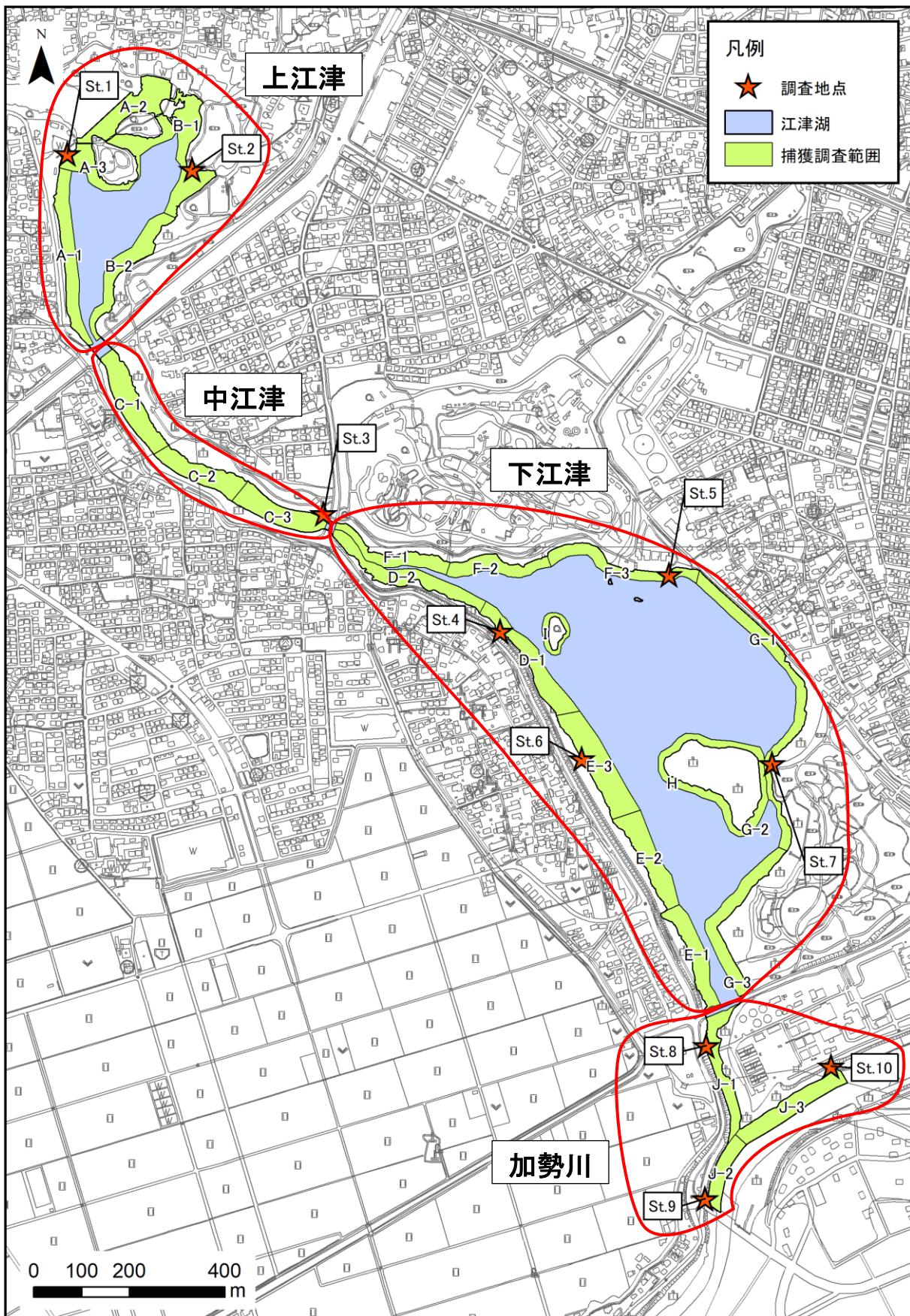


図 6-3-1 江津湖4エリアに対応する調査地点および捕獲調査範囲

表 6-3-2 (1) 江津湖4エリアの総確認個体数、推定生息個体数、推定生息個体数密度
 (捕獲調査範囲内のオオクチバス)

地点名	確認個体数 (匹)	推定個体数 (匹)	密度 (匹/m ³)
上江津	0	0	0
中江津	0	0	0
下江津	62	71±8.4	2.51*10 ⁻³ ±2.95*10 ⁻⁴
加勢川	4	7±3.5	1.95*10 ⁻³ ±9.65*10 ⁻⁴

表 6-3-2 (2) 江津湖4エリアの総確認個体数、推定生息個体数、推定生息個体数密度
 (捕獲調査範囲内のブルーギル)

地点名	確認個体数 (匹)	推定個体数 (匹)	密度 (匹/m ³)
上江津	0	0	0
中江津	0	0	0
下江津	5	8±3.5	2.82*10 ⁻⁴ ±1.22*10 ⁻⁴
加勢川	0	0	0

表 6-3-2 (3) 江津湖4エリアの総確認個体数、推定生息個体数、推定生息個体数密度
 (捕獲調査範囲内のナイルティラピア)

地点名	確認個体数 (匹)	推定個体数 (匹)	密度 (匹/m ³)
上江津	0	0	0
中江津	0	0	0
下江津	127.5	181.5±36.3	6.41*10 ⁻³ ±1.28*10 ⁻³
加勢川	28	46±8.5	1.28*10 ⁻² ±2.36*10 ⁻³

表 6-3-2 (4) 江津湖4エリアの総確認個体数、推定生息個体数、推定生息個体数密度
 (捕獲調査範囲内のジルティラピア)

地点名	確認個体数 (匹)	推定個体数 (匹)	密度 (匹/m ³)
上江津	2	2	2.16*10 ⁻⁴
中江津	12	15±3.5	5.49*10 ⁻³ ±1.27*10 ⁻³
下江津	226.5	376±76.2	1.33*10 ⁻² ±2.69*10 ⁻³
加勢川	13	19±4.9	5.30*10 ⁻³ ±1.36*10 ⁻³

表 6-3-2 (5) 江津湖4エリアの総確認個体数、推定生息個体数、推定生息個体数密度
 (捕獲調査範囲内のカムルチー)

地点名	確認個体数 (匹)	推定個体数 (匹)	密度 (匹/m ³)
上江津	0	0	0
中江津	1	1	3.66*10 ⁻⁴
下江津	14	26±13.9	9.18*10 ⁻⁴ ±4.89*10 ⁻⁴
加勢川	1	1	2.79*10 ⁻⁴

(2) 解析結果

江津湖4エリアに対応する環境DNA濃度の平均値と推定生息個体数密度の比較においても、相関関係は見られなかった。

熊本市指定外来魚6種毎のグラフを図6-3-2(1)～(6)に示す。

なお、カダヤシについて、確認個体数のデータが得られなかつたため、環境DNA濃度(copies/mL)のみ示す。

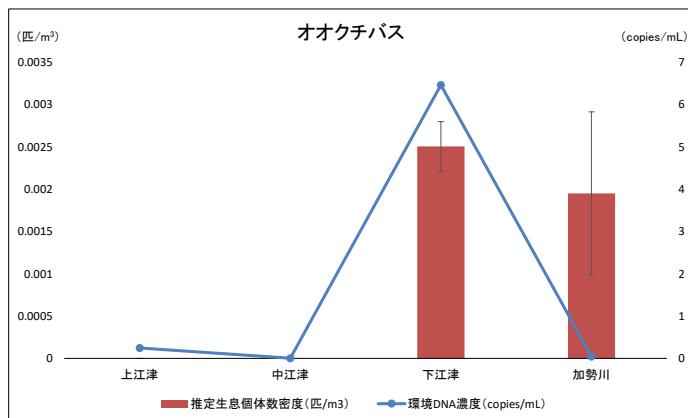


図 6-3-2 (1) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（オオクチバス）

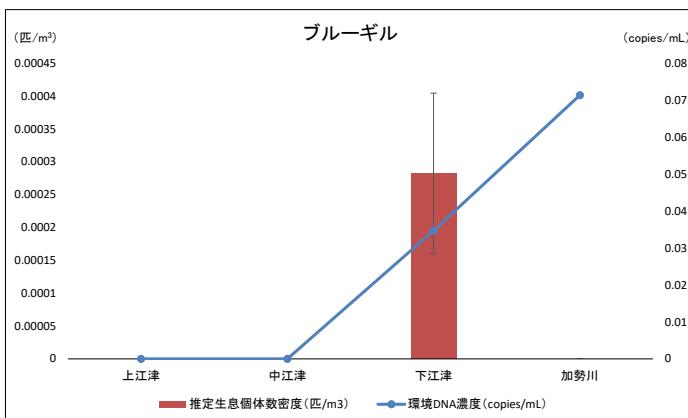


図 6-3-2 (2) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（ブルーギル）

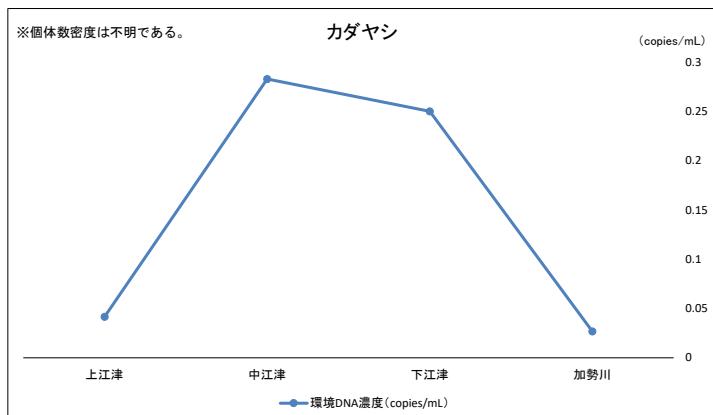


図 6-3-2 (3) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（カダヤシ）

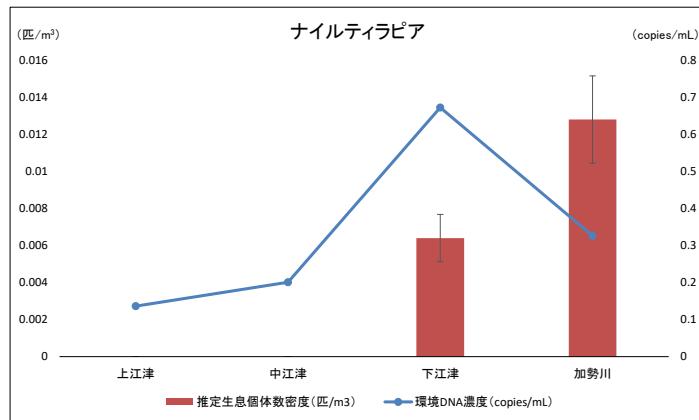


図 6-3-2 (4) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（ナイルティラピア）

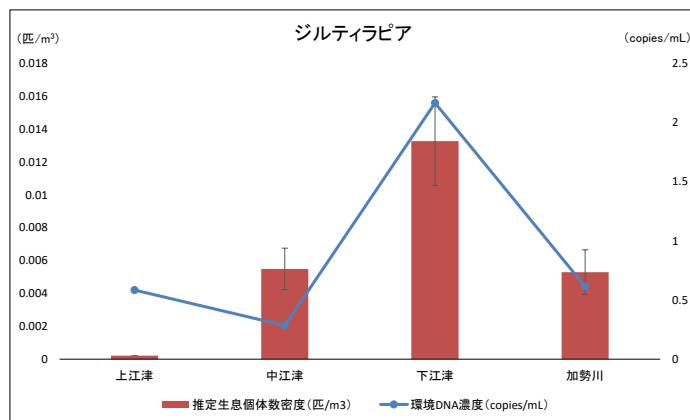


図 6-3-2 (5) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（ジルティラピア）

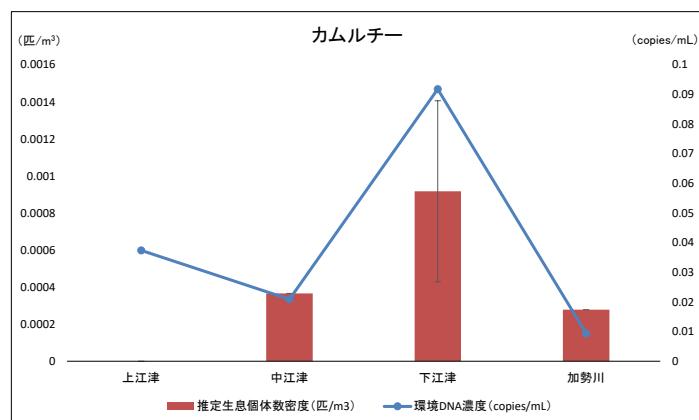


図 6-3-2 (6) 環境DNA濃度と推定生息個体数密度の比較（カムルチー）

7. まとめ

江津湖内の全 10 地点において、現地調査（採水）を行い試水サンプルを得た。それらから抽出した環境 DNA を基に網羅的解析および種特異的検出法による定量分析および定量解析を行った。定量解析においては、魚類生息状況調査から得られた熊本市指定外来魚 5 種（オオクチバス、ブルーギル、ナイルティラピア、ジルティラピア、カムルチー）の確認個体数（捕獲個体数と目視個体数の合計）と環境 DNA 濃度との間に相関関係が見られるか、検討および解析を行った。

網羅的解析では、全 10 地点合計で 9 目 19 科 45 種の魚種が検出された。

コノシロやフクドジョウ、グッピーなど、今までの捕獲調査では確認されていない魚類 4 種の DNA が確認されたが、一方でスナヤツメ南方種やカネヒラ、カゼトゲタナゴなど、今までの捕獲調査で確認されているが、網羅的解析では検出されなかった種も 7 種確認された。

種特異的検出法による定量分析では、熊本市指定外来魚 6 種の環境 DNA 濃度を測定した。一部の結果において、大変高い環境 DNA 濃度が検出された。実際、多くの個体数が生息している可能性が考えられるが、一方で採水を行う直前に採水地点の付近に偶然生息していた可能性も否定できない。

定量解析では、「確認個体数密度と環境 DNA 濃度」と「推定生息個体数密度と環境 DNA 濃度」に相関があるかについて、捕獲調査範囲の組み合わせ方や江津湖を 4 つのエリアに区画分けをするなど、複数の手法を用いて解析を行ったが、いずれの手法においても環境 DNA 濃度との間に相関関係は見出せなかった。

また、カダヤシについては、魚類生息状況調査において確認されていないため、定量解析を行っていない。しかし、複数地点から環境 DNA が検出されているため、生息していると考えられる。

この結果から、相関を持たせるためには、調査手法の変更が必要と考えられた。

8. 課題

今年度の魚類生息状況調査の結果から推定された生息個体数の密度と環境 DNA 密度の間に相関関係は見出せなかった。また、環境 DNA 濃度についても、定量下限値を超えた値が少なかった。

特に、2月の試水サンプルの環境 DNA 濃度は全体的に低く、冬になり魚類の活性が下がることに起因すると考えられる。そのため、2月（冬季）の採水による生息魚類の環境 DNA の定量化は不適と考えられる。

これらのことから、以下の課題および改善方法が考えられる。

8-1 生息個体数と環境 DNA 濃度について

生息個体数と環境 DNA 濃度に相関関係を見出し、個体数推定を行う場合、以下の改善が必要になる。

(1) 魚類生息状況調査方法の改善

環境 DNA は調査範囲内に生息している全ての個体から放出された DNA が含まれる。

現在、電気ショッカ一船を使用し、調査範囲内の 1 ルートを調査しているが、1 ルートのみの調査では、調査範囲の適正な生息個体数推定ができない。

そのため、魚類生息状況調査の調査ルートを 1 ルートだけでなく調査範囲内を網羅できるような捕獲方法に改善する必要がある。

また、網による代表区画を設置し、その区画内の環境 DNA 濃度と調査対象種の密度を比較することで相関関係が見出せる可能性がある。

(2) 室内実験における相関データの利用

室内水槽における調査対象種の環境 DNA 濃度と個体データ（個体数や重量など）の相関データを得ることで、環境 DNA 濃度から、推定生息個体数を求めることは理論上可能である。

しかし、野外においては、阻害物質や流速、水温などの環境条件により、室内実験の結果と野外調査の結果は一致しない。

8-2 環境 DNA の活用手法

(1) 駆除の効率化

環境 DNA は、調査対象種が集中して生息している場所を探すことに利用することができる。

例えば、湖心を含めた複数地点で採水を行い、その分析結果から調査対象種が多く生息している場所を特定することで、より効果的な外来魚駆除が行う事ができる。

(2) 駆除の効果検証

環境 DNA の測定を継続的に実施することで、外来魚駆除の効果を検証できる可能性がある。

例えば、1年間（冬季を除く）を通して複数地点での採水を実施し、「上江津、中江津、下江津、加勢川」の各エリアの平均濃度を継続的に監視していくことで、調査対象種の生息変化を検証できると考えられる。

9. 参考文献

- 1) Yamanaka H, Motozawa H, Tsuji S, Miyazawa RC, Takahara T, Minamoto T (2016) On-site filtration of water sample for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. Ecological Research, 31(6) : 963–967
- 2) Takahara T, Minamoto T, Doi H (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. PLOS ONE, 8: e56584
- 3) Simmon M, Tucker A, Chaddeton WL, Jerde CL, Mahon AR (2016) Active and passive Environmental DNA surveillance of aquatic invasive species. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 73(1):76–83
- 4) Patrick S, Shaharior H, Atsuya K, Ebenezer K, Hidentoshi S, Koichiro K (2020) Population Genetics and taxonomic signatures of wild Tilapia in Japan based on mitochondrial DNA control region analysis. Springer Nature Switzerland AG
- 5) 清水稔：江津湖の魚類相～電気ショッカー船での確認を中心に～. (2017)

