

2023年5月9日

一般社団法人 全国浄化槽団体連合会

会長 上田勝朗 殿

水環境保全助成事業実施報告書（総括表）

団体名称	学校法人大阪学園 大阪高等学校 科学探究部
代表者	科学探究部顧問 谷脇 鉄平 
所在地	〒533-0007 大阪市東淀川区相川2-18-51
	電話番号 06-6340-3031 F A X 06-6349-3719
事業内容 (概要、成果等)	事業内容は別紙のとおり。
事業実施期間（日時）	令和5年3月29日～令和5年3月31日の期間で2泊3日
事業実施場所	ひみラボ(富山大学理学部・氷見市連携研究室)
参加人数	大阪高校：教員2名、科学探究部部員6名、 富山大学：山崎裕治准教授、山崎研究室の学生3名(TA) 氷見市教育委員会：西尾正輝 NPO法人Bioクラブ：川上僚介
経過	富山県氷見市を舞台に、2020年3月から富山大学学術研究部理学系山崎裕治准教授との共同研究(高大接続活動)で、網羅的環境DNA手法による仏生寺川・万尾川水系の魚類相調査から、本来生息しないはずのニッポンバラタナゴやタイリクバラタナゴのDNAが検出された。 その後、なぜニッポンバラタナゴのDNAが検出されたのか、タイリクバラタナゴにも着目しながら種特異的環境DNA手法及び現地での目視調査(研究合宿)を行った結果、ニッポンバラタナゴの生息の可能性が得られたため、引き続き検証していきたい。

説明資料、参考資料、成果物を添付してください。

○ 事業概要

本校科学探究部は、2017年から環境DNA¹⁾を利用した研究活動をしており、2020年3月から「環境DNAを利用した仏生寺川・万尾川水系(仏生寺川及び万尾川：2020年3月、5月、6月、9月及び10月)の魚類相の網羅的調査²⁾」を富山大学学術研究部理学系山崎裕治准教授と共同研究(高大接続活動)を行ってきた。富山県氷見市内における環境DNA分析を利用した魚類相の調査は当時行われておらず、環境DNA分析で検出されたDNAの解析結果から、各河川に多様な魚種が生息していることが判明した。特に万尾川では、タナゴ類(ニッポンバラタナゴ³⁾、タイリクバラタナゴ⁴⁾等)やゲンゴロウブナのDNAを検出できた。ところが、ニッポンバラタナゴは富山県氷見市内では、これまで生息確認がされておらず、この理由については環境DNA分析だけでは確かな説明ができない。

そこで2021年は、万尾川の環境DNA分析で検出されたニッポンバラタナゴ(環境省絶滅危惧ⅠA類³⁾)及びタイリクバラタナゴ(外来種⁴⁾)をはじめとするタナゴ類とゲンゴロウブナ(外来種⁵⁾)に着目し、万尾川の河川水から得られた環境DNA、各個体から直接採取したDNA及び各個体の識別プライマー⁶⁾等を用いて、種特異的環境DNA手法(PCR法及び電気泳動法)によりニッポンバラタナゴの生息有無の判定を、新型コロナの影響で現地に出向くことはできなかつたが遠隔で行ってきた。

そのような中、新型コロナの感染状況の収束の兆しが見えた2022年3月16日～18日の期間で、富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)を拠点に仏生寺川及び万尾川に生息するタナゴ類等の捕獲による魚類相調査、並びに調査域の河川水から種特異的環境DNA手法を利用したニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの生息有無の判定を目的とした研究合宿を実施できた。科学探究部として初合宿は、ようやくできたフィールドワーク活動の充実感を味わうだけでなく、富山県地方新聞3社に大きく取り上げていただき、予想外の成果が得られた。

ところが、本合宿を通じて種特異的環境DNA手法の難しさが露呈された。この合宿に向けて、合宿前の約1カ月練習したものの、種特異的環境DNA手法の実験環境が合宿の2ヵ月前に整備されたばかりだった事情があり、また、本合宿後も種特異的環境DNA手法の実験を繰り返していたが、練習量が少なく成功していない。特に、コンタミネーションについては、例えば、器具や試薬等、一つ一つの取り扱いを当時は統一化しておらず、個々の実験に対する姿勢や意識の差が課題として浮彫化された。

○ 事業内容

本事業では、2021年度の研究合宿から見えた課題を元に、網羅的及び種特異的環境DNA手法を繰り返し実験することで生徒たちの「学びの実体験」の定着を図りながら、2022年度も研究合宿(2泊3日)を実施し、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの生息状況の把握から環境教育に繋げ、生物保全の研究に貢献することを併せて目的とする。

○ 実施研究内容

1. 網羅的及び種特異的環境DNA手法

研究合宿に向けて、網羅的環境DNA手法で得られたデータと比較するために、種特異的環境DNA手法(PCR試薬はKOD FX Neoを使用)を繰り返し実験することで、実験精度の向上を図った。

2. 富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)でのタナゴ類の生息状況調査

事前の図書やインターネットによる調べ学習で、万尾川にタイリクバラタナゴが移入された経路を調べたら、氷見市内の大浦池でヘラブナが放流されているネット記事を見つけた。

当初は、2022年8月に研究合宿を実施する予定だったが、新型コロナ第7波の影響で延期し、新型コロナが収束した2023年3月29日～31日の期間に氷見市へ出向き、大浦池及び万尾川②(図1⁷⁾)をフィールドワークしながらタナゴ類の生息状況調査を行った。

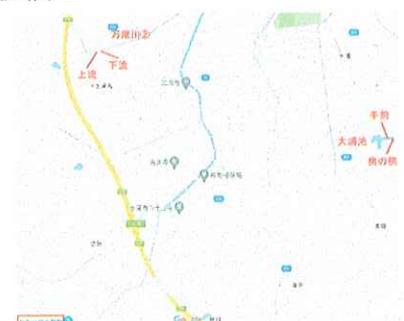


図1 フィールドワークマップ

< 1日目：タナゴ類の生息状況調査 >

ひみラボに昼到着し、今回の合宿にかかる講習会の実施後、大浦池(手前、奥の橋)に移動し、目視調査及び池水を約0.5 L採水し、ステリベクスを用いてろ過をした(図2～図3)。

この際、大浦池の近くにヘラブナを放流した証拠の看板(2か所)や大浦池から繋がる用水路沿いにタナゴ類の産卵床である二枚貝類を発見した。

その後、万尾川②(上流、下流)に移動し、タナゴ類等の捕獲(定置網、たも網)による魚類の網羅的調査及び河川水を採水しステリベクスを用いてろ過をした(図4～図7)。

また、このフィールドワークを通じて、生息地周辺の環境を知るための探索も行った。



図2 大浦池(手前)での採水の様子



図3 大浦池(奥の橋)でのろ過の様子



図4 万尾川②(上流)でのろ過の様子



図5 万尾川②(下流)での採水の様子



図6 万尾川②(下流)での定置網による捕獲の様子



図7 万尾川②(下流)でのたも網による捕獲の様子

< 2日目：種特異的調査(種特異的検出法) >

(1)大浦池及び万尾川②からのDNA抽出

DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)及び滅菌水を用いて、ステリベクス内のフィルターからDNA抽出を行った(図8～図9)。



図8 DNA抽出の様子



図9 DNA抽出の様子

(2)PCR法及び電気泳動法

滅菌水、PCRバッファー、ポリメラーゼ(GXL)、dNTP、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの識別プライマーF及びR、(1)のDNAサンプル、ひみラボのタイリクバラタナゴを飼育する飼育水を

用いて、PCR法及び電気泳動法(図10)を行い、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの生息有無の判定を行った。

<試薬分量(1本当たり)>	
滅菌水	6.0 μ L
PCR バッファー	3.0 μ L
dNTP	1.5 μ L
ポリメラーゼ (GXL)	0.5 μ L
プライマーF	1.0 μ L
プライマーR	1.0 μ L
抽出 DNA	2.0 μ L
総量	15.0 μ L

<PCR法 設定条件>	
I.初期加熱	98℃ 5分
II.DNA分離	98℃ 10秒
III.プライマー結合	55℃ 15秒
IV.DNA伸長	68℃ 10秒
V.最終伸長	68℃ 7分

} 35回(II~IVを繰返す)

<電気泳動法 設定条件>	
50 V で 10 分間泳動した後、100 V に切替て 20 分間泳動	

図 10 合宿時の PCR 法及び電気泳動法の実験条件

○ 事業結果

<1日目>

大浦池の目視調査では、ブルーギルと思われる魚影が確認できた。
万尾川②での捕獲調査の結果(図11)、タイリクバラタナゴ等を捕獲できた。



図 11 万尾川②で捕獲した魚類

<2日目>

大浦池、万尾川②及びひみラボのタイリクバラタナゴ飼育水を用いて種特異的調査を行った結果、以下のとおりになった。

なお、図上では、ニッポンバラタナゴをニチバラ、タイリクバラタナゴをタイバラ、ポジティブコントロール(対象種の肉片)をポジコンと表記する。

- ・タイリクバラタナゴの識別プライマーを用いて種特異的調査を行った結果(図12左)、大浦池(手前、奥の橋)、万尾川②(下流)、ひみラボのタイリクバラタナゴ飼育水、ポジティブコントロールでタイリクバラタナゴの種特異的増幅産物が確認された。
- ・ニッポンバラタナゴの識別プライマーを用いて種特異的調査を行った結果(図12右)、ひみラボのタイ

リクバラタナゴ飼育水、ポジティブコントロールでニッポンバラタナゴの種特異的増幅産物が確認された。また、薄っすらではあるが、大浦池(手前、奥の橋)、万尾川②(上流、下流)でニッポンバラタナゴの種特異的増幅産物が確認された。

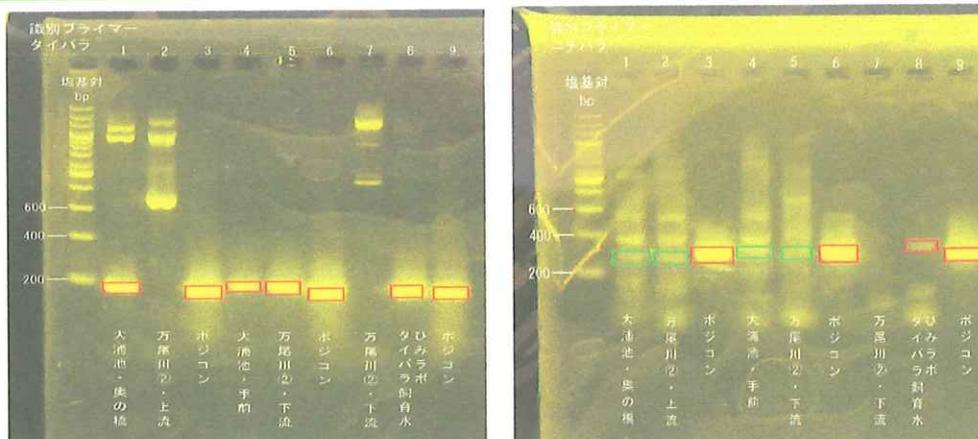


図12 大浦池(手前、奥の橋)、万尾川②(上流、下流)及びひみラボタイリクバラタナゴ飼育水の電気泳動の結果

○ 事業結果

本研究で大浦池及び万尾川②を調査した結果、以下のようなことが起きていると考察した。

1. 2022年の万尾川での網羅的調査の結果、2020年の先行研究⁹⁾と同様に、遺伝子配列一致率100%のタイリクバラタナゴのDNAが検出された。
2. 母がニッポンバラタナゴで父がタイリクバラタナゴの場合、母系由来の12SrRNA領域を子が引き継ぐため、外見がタイリクバラタナゴでもニッポンバラタナゴのDNAだと検出される可能性(誤同定⁸⁾)があり、網羅的調査で用いるMiFishプライマー(12SrRNA領域)では、ニッポンバラタナゴかタイリクバラタナゴの判定が難しいとされる。

事実、西尾ら(2020)⁹⁾によると、タイリクバラタナゴとヤリタナゴの交雑個体群が発見されたことを報告している。

そこで、Umemura *et al.*(2020)⁹⁾を参考に、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの種特異的な識別プライマーを用いて、本校での予備実験で識別プライマーの有効性を確認できたため、実際に、2023年3月29日～31日の研究合宿で万尾川②の種特異的調査を行った結果(図12)、タイリクバラタナゴを捕獲した万尾川②(下流)で、タイリクバラタナゴの種特異的増幅産物が確認できただけでなく、ニッポンバラタナゴの種特異的増幅産物も薄っすら確認できた。

3. なぜ万尾川②にタイリクバラタナゴが移入されたのか目視調査した結果(図13¹⁰⁾)、大浦池でヘラブナが放流されていることが確認された。

そこで、大浦池で種特異的調査を行った結果(図12)、タイリクバラタナゴの種特異的増幅産物が確認できただけでなく、ニッポンバラタナゴの種特異的増幅産物も薄っすら確認できた。

なお、本校での予備実験で、八尾市のきんたい廃校博物館から純系ニッポンバラタナゴを提供いただき、その飼育水で種特異的増幅産物が確認されていることが、大浦池や万尾川②でも種特異的増幅産物が確認されていることの裏付けにもなると考えた。

4. 従って、本研究の実験結果から、大浦池でヘラブナを放流した際に、ニッポンバラタナゴ、又はニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの交雑個体群が混在したものが仏生寺川に移入し、その後、万尾川②に移入された、という石川県小松市¹¹⁾と同様の事象が起きているのではないだろうかと考えた。
5. しかしながら、4. の仏生寺川から万尾川への移入ルートは本研究では調査できなかったため、引き続き検証していきたい。
6. また、ひみラボでの種特異的調査ではニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの種特異的増幅産物は確認できたものの、本校での種特異的調査ではタイリクバラタナゴの種特異的増幅産物は確認できなかったため、これについて本校での実験精度を上げるために引き続き検証していきたい。



図 13 大浦池から万尾川へ移入される可能性のあるルート

○ その他事業効果

本事業では、富山大学山崎准教授からのご支援ご指導だけでなく、山崎研究室の学生さんに TA としてご協力いただくことになり、大変有意義な内容になった。

特に、大学生と科学探究部の生徒たちとの交流は、コロナ禍でなかなかオープンキャンパスにも行けず大学生との交流会ができ状態が続いていたが、研究内容の意見・情報交換だけでなく、将来の進学に対して富山大学の魅力を学ぶ機会にもなり、科学探究部の生徒は大変充実した。

2020年3月から富山大学山崎准教授との共同研究(高大接続活動)を行い、事実、2021年度1名、2022年度1名はこの学びを通じて富山大学への進学に繋がっているのも、今後も研究だけでなく進学にも繋がるように支援していきたい。

○ 謝辞

本事業を遂行するにあたり、ご支援ご指導をいただいた富山大学学術研究部理学系の山崎裕治准教授、富山大学山崎研究室の学生さん、氷見市教育委員会の西尾正輝氏及び NPO 法人 Bio クラブの川上僚介氏、八尾市のきんたい廃校博物館、研究助成をいただいた一般社団法人全国浄化槽団体連合会、並びに関係の方々に深く敬意と感謝の意を表する

○ 参考文献

- 1) 宮正樹(2020)バケツ一杯の水で棲んでいる魚が丸ごとわかる技術 : MiFish プライマーを用いた環境 DNA メタバーコーディング法の最新情報、環境アセスメント学会誌、18 巻 2 号、p.20-24
https://doi.org/10.20714/jsia.18.2_20
- 2) 谷脇鉄平(2020)、環境 DNA を利用した仏生寺川・万尾川水系河川の生物相調査及び生物保全の実践活動、公益財団法人下中記念財団 2020 年報、p.28-37
<https://www.shimonaka.or.jp/wp/wp-content/uploads/2021/07/2019-environmental-dna2.pdf>
- 3) 環境省(2020)レッドリスト
<http://www.env.go.jp/press/107905.html>

- 4) 環境省(2015)生態系被害防止外来種リスト
<https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/iaslist.html>
- 5) ひみラボ水族館(2016)氷見の淡水魚類リスト
<https://sites.google.com/site/himilab/>
- 6) Umemura, K., Kurita, Y., Onikura, N. Novel genotyping system for distinguishing among native, non-native and admixed individuals of rosy bitterling *Rhodeus ocellatus* subspecies. *J. Fish. Biol.*(2020)., 96:1516–1522.
- 7) 採水地点(Yahoo 地図)
<https://map.yahoo.co.jp/>
- 8) 環境省自然環境局生物多様性センター(2020)MiFish 法に係る誤同定チェックシート
http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html
- 9) 西尾正輝・川上僚介・川本朋慶・倉澤央(2020)富山県で初確認されたタイリクバラタナゴとヤリタナゴの交雑個体、富山県生物学会誌富山の生物、59 巻、p.68-73
- 10) 国土地理院地図
<https://maps.gsi.go.jp/>
- 11) 石川県小松市(2020)木場潟周辺自然環境調査報告書、木場潟自然環境調査検討委員会
https://www.city.komatsu.lg.jp/material/files/group/17/kibagata_2020investigation.pdf