

# 河川基金助成事業 研究レポート

「種特異的環境DNA手法を利用した万尾川水系に  
おけるタイリクバラタナゴ(外来種)の生息状況調査」

助成番号：2022 - 5411 - 001

学校法人大阪学園 大阪高等学校  
科学探究部

学校名：学校法人大阪学園 大阪高等学校  
校 長：岩本 信久  
顧 問：谷脇 鉄平  
部 長：野田 拓夢

2022 年度

## 1. 研究の目的

本研究では、万尾川水系で生息確認されている希少なタナゴ類(イタセンバラ、ヤリタナゴ)を守るために、タイリクバラタナゴ(外来種)の生息状況の把握から環境教育に繋げ、希少在来種の保全に貢献することを目的とする。

## 2. 研究の動機

本校科学探究部では、富山大学学術研究部理学系の山崎裕治准教授<sup>1)</sup>との共同研究(高大接続活動)で、2020年3月～10月に環境DNAを利用した仏生寺川・万尾川水系の生物相(魚種)の網羅的調査<sup>2)</sup>を行った。

結果は、万尾川から遺伝子配列一致率100%のタイリクバラタナゴ<sup>3)</sup>やゲンゴロウブナ、本来いないはずのニッポンバラタナゴ<sup>4)</sup>のDNAが検出された。ニッポンバラタナゴの分布は、濃尾平野、琵琶湖・淀川水系、京都盆地、山陽地方、四国北西部、九州北部で確認されている。地元大阪府内でも以前は淀川に生息していたようだが、ほぼ絶滅したと言われており、現在は八尾市<sup>5)</sup>のため池に生息している。

そこで、なぜ富山県氷見市内の万尾川で、ニッポンバラタナゴのDNAが検出されたのか、次の①～③の仮説を立てた。

### 仮説①『二枚貝類の移動によるニッポンバラタナゴの移動説』

ニッポンバラタナゴが産卵する際、ドブガイ類等の淡水産の二枚貝に産卵する。その二枚貝類が田んぼを作るための泥の中に混入して田んぼの中に移入し、田んぼと繋がっている用水路から河川に流れたという可能性がある。

### 仮説②『ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの交雑説』

ニッポンバラタナゴは、タイリクバラタナゴと容易に交雑されると言われている。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、子のミトコンドリアDNAは母系由来のDNAを引き継ぐ。そのため、ミトコンドリアDNAの12SrRNA領域を用いる環境DNA分析<sup>6)</sup>では、交雑した場合、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)がある。

事実、西尾ら(2020)<sup>7)</sup>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。また、誤同定<sup>8)</sup>に関しては、

環境DNA分析で用いるMiFishプライマーが、種によっては判定に注意をする必要があると注意喚起されている。

### 仮説③『釣りを目的とした放流による交雑個体群の移動説』

石川県小松市<sup>9)</sup>によると、本研究と同様に、小松市木場潟で本来いないはずのニッポンバラタナゴが環境DNA分析で見つかったと報告している。その報告書では、「釣りを目的としたゲンゴロウブナ(ヘラブナ)が放流されていたが、ゲンゴロウブナは琵琶湖・淀川水系に固有の種であるため、ゲンゴロウブナとともにニッポンバラタナゴが放流された可能性は否定できず、そのため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生息している可能性がある。」と述べられている。

氷見の淡水魚類リスト<sup>10)</sup>では、ゲンゴロウブナは外来種とされている中、本校科学探究部の2020年に実施した先行研究<sup>2)</sup>では、ゲンゴロウブナのDNAを検出することができた。ゲンゴロウブナを個人で放流した可能性もあれば、富山県南砺市の赤祖父ため池<sup>11)</sup>ではヘラブナが釣り目的で放流されているため、富山県氷見市内の河川でもゲンゴロウブナ(ヘラブナ)を放流した場合、石川県小松市と同様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放流された可能性だけでなく、何らかの形で万尾川に移入された可能性も考えられる。そこで、仮説①～③の検証を行うことにした。

## 3. 研究の方法

富山県氷見市内の万尾川に生息するタナゴ類等の魚類の多くは、春頃(3月～5月)から産卵・孵化し始めるので、その時期に併せてタナゴ類が生息する河川水の採水やタナゴ類等の捕獲を行った。

また、環境DNA分析にかかる河川水のろ過やDNA抽出については、一般社団法人環境DNA学会が公開する標準版「環境DNA調査・実験マニュアル(ver. 2.2)」<sup>12)</sup>に基づいて行われた。

### 3.1. 環境DNA分析

#### 3.1.1 環境DNA

お風呂に入るとその浴槽のお湯の中には目に見えない皮膚片や髪の毛等が残り、これに含まれる細胞には生物の設計図であるDNAが含まれている。自然環境(海・河川・土壌等)中でも同様なことが起き、そこに生息

する魚や鳥等を始めとする生物のDNAが目には見えないかたちで自然環境中に含まれていることがある。このように、自然環境中に存在するDNAを「環境DNA」という。環境DNAを利用した分析手法は、実際に生物を直接捕獲する調査方法とは異なり、生物が生息する河川水等に含まれるDNAを分析・解析する調査方法である。

環境DNA分析を利用すれば、生息する生物種の同定や、生物種の分布や生息数を推定でき、生物保全の観点から希少種の生息状況調査に利用できる新技術として近年注目されている。

環境DNA分析を利用した魚類の生物種の検出手法<sup>13)</sup>には、「網羅的解析法(MiFish法等)」と「種特異的検出法」がある。

### <網羅的調査(網羅的解析法(MiFish法))>

魚類を分析するMiFishプライマー[対象領域12SrRNA]<sup>6)</sup>を利用して、「水中に漂うDNAに対して網羅的に種を検出する手法」で、調査範囲内で生息の可能性がある生物種がわかる。

### <種特異的調査(種特異的検出法)>

対象種の識別プライマーを利用して、「水中に漂う対象種(単一種)のDNAのみを検出する手法」である。

## 3.2.1 調査地及び採水

科学探究部の先行研究で行った調査域<sup>2)14)</sup>(図1)と同様の場所で、富山大学山崎准教授に採水(各河川ごとに河川水を2 L採水、2022年5月、6月及び7月)をお願いした。

なお、図2-1～図2-2のとおり、各河川を万尾川①、万尾川②とする。

各河川ごとに河川水を2 L採水し、その河川水を冷蔵便で本校に発送していただいた。このとき、DNAの劣化を予防するため<sup>15)</sup>、採水後、速やかに塩化ベンザルコニウム10w/v%水溶液(オスバン)を河川水1 Lに対して、1 mL添加した。



図1 採水地点



図 2-1 万尾川①の様子



図 2-2 万尾川②の様子

### 3.2.2 河川水のろ過及び河川水からのDNA抽出

本校化学実験室で、グラスファイバーフィルター(Whatman GF/F 平均孔径0.7  $\mu\text{m}$ )を用いて、各河川水を1 L吸引ろ過し、グラスファイバーフィルターにDNA採取を行った(図3)。

その後、DNA採取したグラスファイバーフィルターから、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いて、DNA抽出を行なった(図4)。

抽出したDNAサンプルの1 L分は種特異的調査用、もう1 L分は網羅的調査用として外部委託で得られた実験結果を比較検証材料とするために株式会社生物技研に委託した。

なお、抽出したDNAサンプルの保管方法は、冷凍( $-20^{\circ}\text{C}$ 以下)状態で行った。

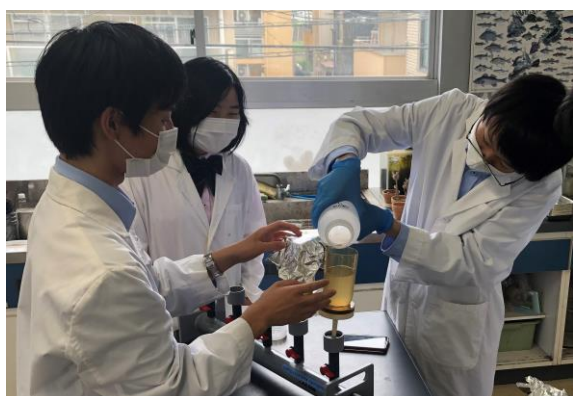


図 3 河川水のろ過の様子

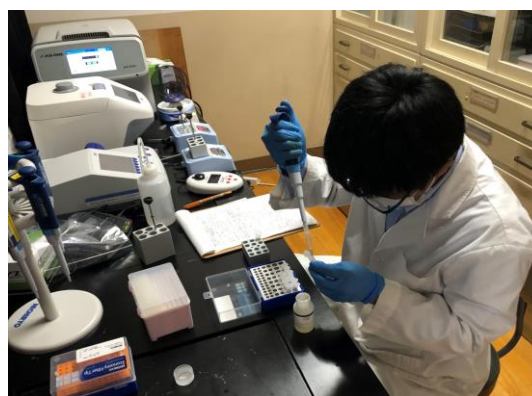


図 4 DNA抽出の様子

### 3.3.1 網羅的調査(網羅的解析法(MiFish法))

抽出したDNAサンプル(網羅的調査用)を株式会社生物技研<sup>16)</sup>に冷蔵便で発送し、環境DNA網羅的解析を委託した。その後、約1か月程度でDNA解析結果が届いた。DNA解析結果には、魚種ごとのDNA塩基配列だけでなく、検出遺伝子のリード数(塩基配列の単位)や魚種の塩基配列一致率、魚種の同定結果等も含まれている。

しかし、私たちはその結果を見ずに、DNA解析結果が「100%正しいとは限らない」というクリティカルシンキングを持ちながら、魚種ごとのDNA塩基配列をNCBI<sup>17)</sup>、MitoFish<sup>18)</sup>等の公共DNAデータベースで魚種の同定及び生息数の割合(検出遺伝子数は、DNA分析で得られたその魚種の塩基配列のリード数を各河川ごとに割合換算)を解析した。

その後、同定した魚種が各河川に生息しているかどうかを氷見の淡水魚類リスト<sup>10)</sup>、富山県レッドリスト(2012)<sup>19)</sup>等と照合した。

### 3.4.1 種特異的調査(種特異的検出法)

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個体(図5)、富山大学山崎准教授から万尾川で捕獲したタイリクバラタナゴ個体を提供いただいた。本校化学実験室で、各個体の体表、鰭及び提供いただいたニッポンバラタナゴを水槽で飼育しその飼育水から、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いて、DNA抽出を行った。

次に、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フォワード(以下、Fと表記する)及びリバース(以下、Rと表記する)に必要な種特異的なDNA配列情報は、Umemura *et al.* (2020)<sup>20)</sup>を参考にし、DNA合成(合成スケール: OLIGO KIDS、精製方法: 簡易カラム精製)を北海道システム・サイエンス株式会社<sup>21)</sup>に委託した(図6)。

なお、抽出した各DNAサンプルの保管方法は、冷凍(-20℃以下)状態で行った。

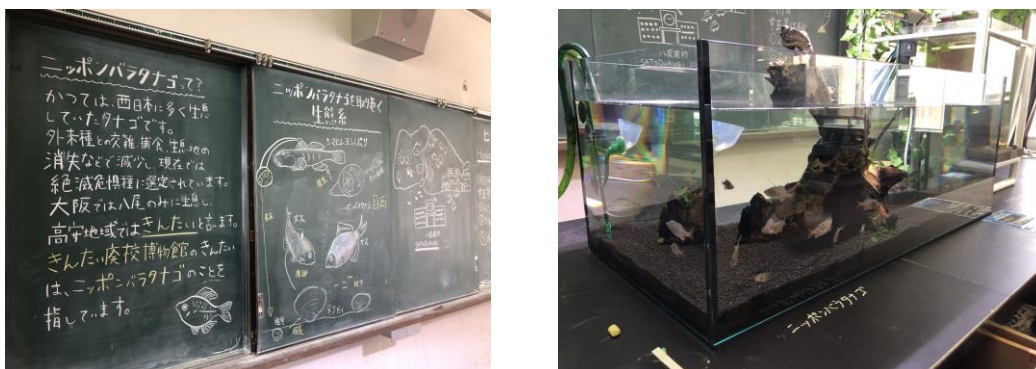


図5 八尾市のきんたい廃校博物館で飼育されるニッポンバラタナゴ

ニッポンバラタナゴの識別プライマー	
塩基対	348 bp
プライマー-F	: 5'-ACC CTA TAT AGG AGA CAC CC-3'
プライマー-R	: 5'-CTT AAT GTG TGG CGG GGT A-3'
タイリクバラタナゴの識別プライマー	
塩基対	193 bp
プライマー-F	: 5'-GGT TTA TTT CTG GCT ATG CAC-3'
プライマー-R	: 5'-GTT TCC TTA TAT AAA TAG GAC CCA-3'

図6 各対象種識別プライマー(対象領域 Cytb)

### 3.4.1.1 PCR法及び電気泳動法(その1)

滅菌水、GoTaq Master Mixes(Promega)、アガロースゲル、Atlas ClearSight Gold DNA Stain(funakoshi)、TAE buffer、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、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴ個体から抽出したDNAサンプル、ニッポンバラタナゴを飼育する飼育水から抽出したサンプルを用いて、PCR法及び電気泳動法(図7)を行い、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が正常に機能するか確認を行った。

なお、PCR法のアニーリング温度やサイクル数等の設定条件は、株式会社ニッポン・ジーンのPCRプロトコル<sup>22)</sup>を参考にした。

< 試薬分量(1本当たり) >	
滅菌水	7.0 $\mu$ L
Go taq	10.0 $\mu$ L
プライマーF	1.0 $\mu$ L
プライマーR	1.0 $\mu$ L
抽出 DNA	1.0 $\mu$ L
総量	20.0 $\mu$ L

< PCR 法 設定条件 I >	
ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの体表及び鱗	
I. 初期加熱	98°C 30 秒
II. DNA 分離	98°C 10 秒
III. プライマー結合	55°C 15 秒
IV. DNA 伸長	72°C 15 秒
V. 最終伸長	72°C 2 分

30回(II~IVを繰り返す)

< PCR 法 設定条件 II >	
ニッポンバラタナゴを飼育する飼育水及びネガティブコントロール(滅菌水)	
I. 初期加熱	98°C 30 秒
II. DNA 分離	98°C 10 秒
III. プライマー結合	55°C 15 秒
IV. DNA 伸長	72°C 15 秒
V. 最終伸長	72°C 2 分

35回(II~IVを繰り返す)

< ゲル分量 >	
アガロースゲル	0.8 g
Atlas ClearSight Gold DNA Stain	5.0 $\mu$ l
TAE buffer(50 倍希釈)	40 ml

< 電気泳動法 設定条件 >	
50 V で 10 分間泳動した後、100 V に切替えて 20~30 分間泳動	

図 7 PCR 法及び電気泳動法の実験条件(その 1)

### 3.4.1.2 PCR法及び電気泳動法(その2)

滅菌水、KOD ONE PCR Master Mix-Blue-(TOYOBO)、アガロースゲル、Atlas ClearSight Gold DNA Stain(funakoshi)、TAE buffer、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、万尾川(2022年5月～7月)から抽出したDNAサンプルを用いて、PCR法及び電気泳動法(図8)を行い、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が正常に機能するか確認を行った。

なお、PCR法のアニーリング温度やサイクル数等の設定条件は、Umemura *et al.* (2020)<sup>20)</sup>をを参考にした。

<試薬分量(1本当たり)>	
滅菌水	21.0 $\mu$ L
KOD ONE PCR Master Mix-Blue-	25.0 $\mu$ L
プライマーF	1.5 $\mu$ L
プライマーR	1.5 $\mu$ L
抽出 DNA	1.0 $\mu$ L
総量	50.0 $\mu$ L

<PCR法 設定条件Ⅲ>	
万尾川(ニッポンバラタナゴの識別プライマー)	
I. 初期加熱	98°C 30 秒
II. DNA 分離	98°C 10 秒
III. プライマー結合	55°C 15 秒
IV. DNA 伸長	72°C 15 秒
V. 最終伸長	72°C 2 分

38回(II～IVを繰り返す)

<PCR法 設定条件Ⅳ>	
万尾川(タイリクバラタナゴの識別プライマー)	
I. 初期加熱	98°C 30 秒
II. DNA 分離	98°C 10 秒
III. プライマー結合	55°C 15 秒
IV. DNA 伸長	72°C 15 秒
V. 最終伸長	72°C 2 分

38回(II～IVを繰り返す)

<ゲル分量>	
アガロースゲル	0.8 g
Atlas ClearSight Gold DNA Stain	5.0 $\mu$ l
TAE buffer(50 倍希釈)	40 ml

<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 30～40 分間泳動	

図 8 PCR 法及び電気泳動法の実験条件(その 2)



### 3.5.1. 富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)でのタイリクバラタナゴの生息状況調査

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。

そこで、実際に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9)をフィールドワークしながらタイリクバラタナゴの生息状況調査を行った。



図9 フィールドワークマップ

< 1日目：タイリクバラタナゴの生息状況調査 >

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10～図11)。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12～図15)。

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10 大浦池(手前)での採水の様子



図11 大浦池(奥の橋)でのろ過の様子



図 12 万尾川②(上流)でのろ過の様子



図 13 万尾川②(下流)での採水の様子



図 14 万尾川②(下流)での定置網による捕獲の様子



図 15 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16～図17)。



図 16 DNA 抽出の様子



図 17 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18～図19)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。



図 18 PCR 法の様子

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

＜PCR法 設定条件V＞	
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を繰り返す)

＜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 19 合宿時の PCR 法及び電気泳動法の実験条件

#### 4. 結果

##### 4.1. 網羅的調査(網羅的解析法(MiFish法))

DNA解析の結果(図20)、種の同定でDNA塩基配列一致率100%の魚種は、以下のとおりになった。

タイリクバラタナゴは万尾川①(2022年6月)及び万尾川②(2022年7月)、ゲンゴロウブナは万尾川②(2022年5月及び7月)から検出された。

今回の結果は、2020年に実施した先行研究<sup>2)</sup>で判明した万尾川にタイリクバラタナゴが生息する可能性について偶然ではないことが分かった。

万尾川①	ウキゴリ属の一種	オイカワ	カワムツ	メダカ属の一種	ギンブナ	クロヨシノボリ
	コイ	タイリクバラタナゴ	タモロコ	モツゴ		
万尾川②	イタセンバラ	ウキゴリ	ウキゴリ属の一種	オイカワ	カワムツ	メダカ属の一種
	ギンブナ	クロヨシノボリ	ゲンゴロウブナ	コイ	ジュズカケハゼ	タイリクバラタナゴ
	タモロコ	ドジョウ	ナマズ	ニゴロブナ	ミナミメダカ	モツゴ

図 20 環境 DNA 分析により氷見市河川で検出された魚種(2022年5月,6月及び7月)

##### 4.2. 種特異的調査(種特異的検出法)

各条件で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、ネガティブコントロール(滅菌水)をネガコンと表記する。

- ・万尾川での河川水を用いた種特異的調査の行う前に、Umemura *et al.* (2020)<sup>20)</sup>による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が正常に機能するか否か種特異的調査を行った結果(図21)、各個体の体表及び鰭に対して種特異的増幅産物は確認されたため、各識別プライマーが正常に機能していることが分かった。
- ・図21から各識別プライマーが正常に機能していることが分かったため、次に環境水に対して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が正常に機能するか否か種特異的調査を行った結果(図22)、ニッポンバラタナゴ飼育水で種特異的増幅産物は確認されたため、ニッポンバラタナゴの識別プライマーが正常に機能していることが分かり、環境水中からDNAを検出することができた。

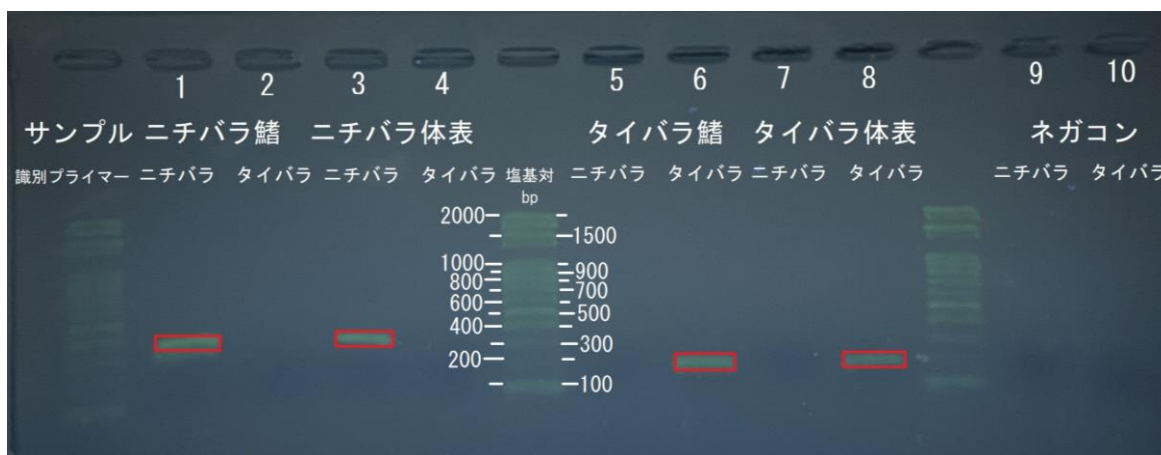


図 21 ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの体表及び鰭の電気泳動結果

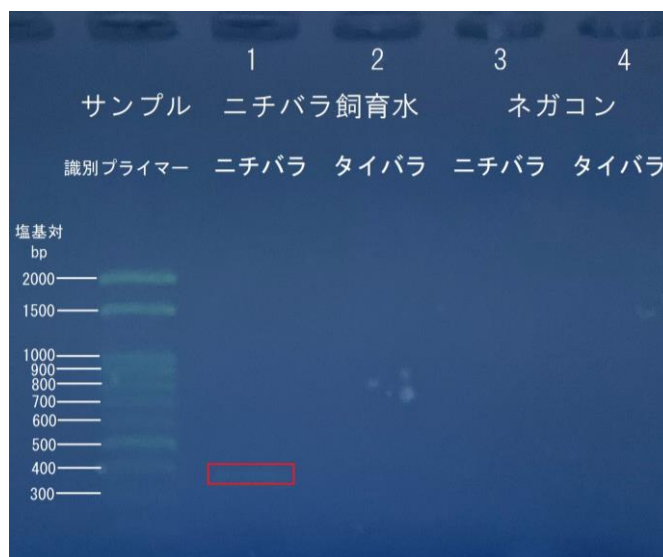


図 22 ニッポンバラタナゴの飼育水の電気泳動結果

- ・図20及び図21の結果をもとに、万尾川②に対して種特異的調査を行った結果(図23)、ニッポンバラタナゴ飼育水で種特異的増幅産物は確認されたが、万尾川②で種特異的増幅産物は確認されなかった。

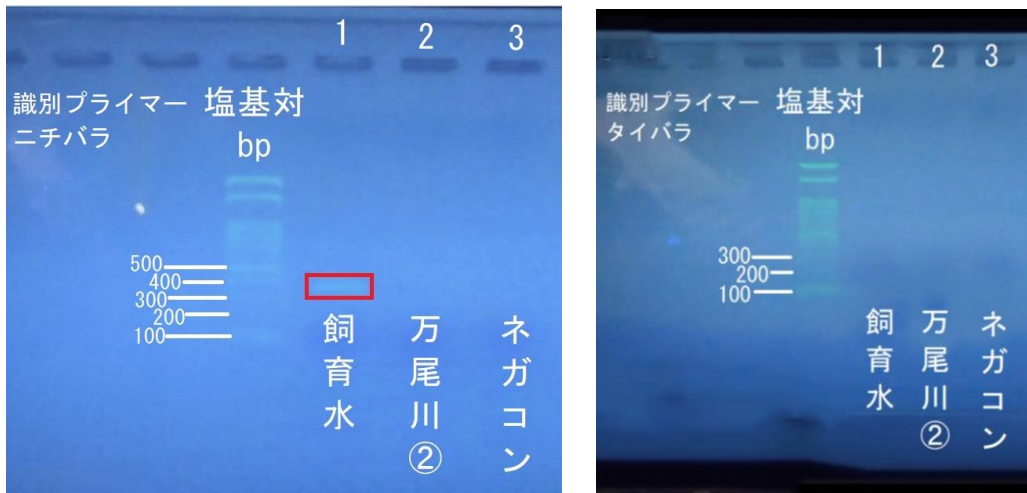


図 23 万尾川②の電気泳動結果

#### 4.3. 富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)でのタイリクバラタナゴ生息状況調査

< 1日目：タイリクバラタナゴの生息状況調査 >

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24)、タイリクバラタナゴ等を捕獲することができた。



図 24 万尾川②で捕獲した魚類

< 2日目：種特異的調査(種特異的検出法) >

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25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25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。

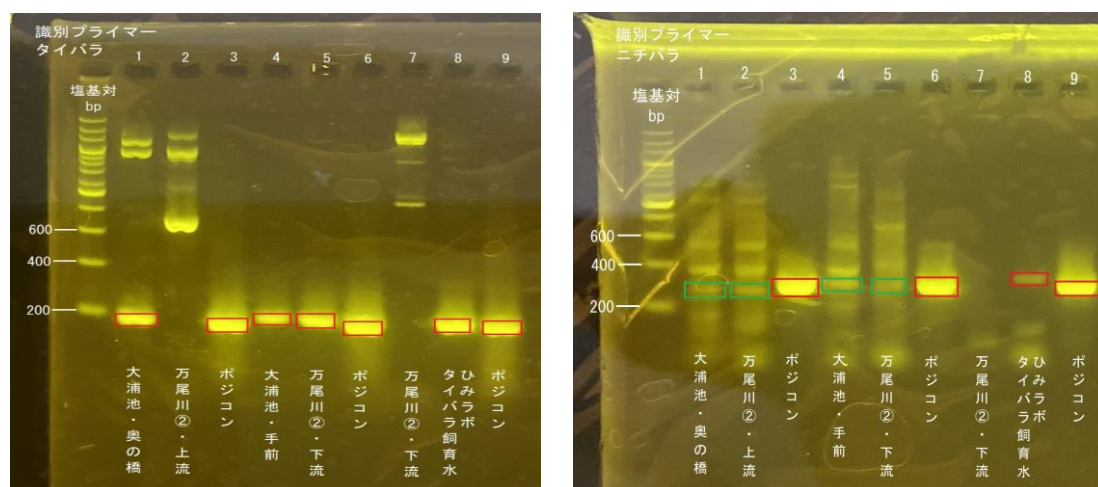


図 25 大浦池(手前、奥の橋)、万尾川②(上流、下流)及び  
 ひみラボタイリクバラタナゴ飼育水の電気泳動の結果

## 5. 考察

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(図20)、2020年の先行研究<sup>2)</sup>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)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。

そこで、Umemura *et al.* (2020)<sup>20)</sup>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、予備実験(図21及び図22)で識別プライマーの有効性を確認できたため、実際に、2023年に万尾川②で種特異的調査を行った結果(図25)、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26<sup>23)</sup>)、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25)、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、本研究にあたる予備実験で、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(図22)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<sup>9)</sup>と同様の事象が起きて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、本校化学実験室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、これについて本校化学実験室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 26 大浦池から万尾川へ移入される可能性のあるルート

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご支援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、NPO法人Bioクラブの川上僚介氏、八尾市きんたい廃校博物館、研究助成をいただいた公益財団法人河川基金、並びに関係の方々に深く敬意と感謝の意を表する

## 7. 引用・参考文献

- 1) 山崎裕治・西尾正輝 (2019) 簡易的な環境 DNA 分析方法を用いた絶滅危惧種イタセンパラの検出、日本魚類学会魚類学雑誌、66 巻 2 号、p. 171-179  
Doi : <https://doi.org/10.11369/jji.19-005>
- 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 (2015) 生態系被害防止外来種リスト  
<https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/iaslist.html>
- 4) 環境省 (2020) レッドリスト  
<http://www.env.go.jp/press/107905.html>
- 5) NPO 法人ニッポンバラタナゴ高安研究会  
<http://n-baratanago.com/>
- 6) 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  
Doi : [https://doi.org/10.20714/jsia.18.2\\_20](https://doi.org/10.20714/jsia.18.2_20)
- 7) 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
- 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](http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html)
- 9) 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](https://www.city.komatsu.lg.jp/material/files/group/17/kibagata_2020investigation.pdf)

10) ひみラボ水族館(2016)氷見の淡水魚類リスト

<https://sites.google.com/site/himilab/>

11) 富山県南砺市(2003)富山県南砺市赤祖父ため池、富山県農林水産部農村振興課

<https://www.pref.toyama.jp/1605/sangyou/nourinsuisan/noukan/kamo/shisetsu11.html>

12) 環境 DNA 調査・実験マニュアル(ver.2.2)

<https://ednasociety.org/>

13) 環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き(二次的自然環境においてはじめて環境 DNA 分析を利用するみなさまへ第2版)

[https://www.biodic.go.jp/edna/edna\\_top.html](https://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html)

14) 採水地点(Yahoo 地図)

<https://map.yahoo.co.jp/>

15) Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., Kondo, A. A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*(2017)., 18:233-241.

16) 株式会社生物技研

<https://gikenbio.com/>

17) NCBI(National Center for Biotechnology Information、国立生物工学情報センター)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

18) MitoFish(Mitochondrial Genome Database of Fish)

<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>

19) 富山県レッドリスト(2012)

[http://www.pref.toyama.jp/cms\\_sec/1709/kj00013513.html](http://www.pref.toyama.jp/cms_sec/1709/kj00013513.html)

20) 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.

21) 北海道システム・サイエンス株式会社

<https://hssnet.co.jp/>

22) 株式会社ニッポン・ジーン (PCR プロトコル)

[https://www.nippongene.com/siyaku/product/pcr/cat\\_pcr.pdf](https://www.nippongene.com/siyaku/product/pcr/cat_pcr.pdf)

23) 国土地理院地図

<https://maps.gsi.go.jp/>

・ 助成事業者紹介

学校法人大阪学園 大阪高等学校 科学探究部

京都産業大学との環境 DNA 分析を利用した共同研究(高大接続活動)をきっかけに、2017年10月に前身の科学同好会から「部」に昇格。

【共同研究(高大接続活動)の経歴】

● 京都産業大学生命科学部先端生命科学科 高橋純一准教授

○ 環境 DNA を利用した淀川水系の魚類相調査及び生物保全の実践活動

○ ムギツク(淀川、大阪)mtDNA 配列の全容解明

Taniwaki *et al.*, 2020.

Complete mitochondrial DNA sequence of the East Asian minnow, *Pungtungia herzi* (Actinopterygii: Cypriniformes).

Mitochondrial DNA Part B. 5(3): 3127-3129.

Doi: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23802359.2020.1800423>

登録配列のアクセッション番号: LC519883

NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1832560670>

○ 環境 DNA を利用した淀川水系に生息するムギツクの生息状況調査及び生物保全の実践活動

● 富山大学学術研究部理学系 山崎裕治准教授

○ 環境 DNA を利用した仏生寺川・万尾川水系の魚類相調査及び生物保全の実践活動

○ 環境 DNA を利用した仏生寺川・万尾川水系に生息するタナゴ類の生息状況調査及び生物保全の実践活動

○ 環境 DNA を利用した富山県氷見市内に生息するサンショウウオ類の生息状況調査及び生物保全の実践活動

● 大阪大谷大学薬学部薬学科 内井喜美子准教授

○ 環境 DNA 濃度の保存方法に関する研究

・ 共同研究者

山崎 裕治

現職: 富山大学学術研究部理学系 准教授(水産学博士)