

旭酒造記念財団研究助成

生物多様性ネットゲインのための
流域網羅的な魚類・昆虫多様性評価

山口大学大学院創成科学研究科
教授 赤松 良久

2024 年度

1. はじめに

2022 年 12 月に生物多様性条約 COP15 において、「昆明・モントリオール生物多様性枠組み」が採択され、ネイチャーポジティブ（自然再興）の実現が掲げられた。ネイチャーポジティブは、2030 年までに生物多様性の損失を止め、回復軌道に乗せることを目標とした短期目標である。日本国内の動向としては、2023 年 3 月に「生物多様性国家戦略 2023-2030」が閣議決定された。この戦略では、普通種を含めた生物群集全体の保全の観点から、2030 年までに陸と海の 30 %以上を保全する「30by30 目標」の達成を指標としている。また、目標達成のための基本戦略のひとつとして、野生生物やその生息域の保全や再生、および負荷軽減と質の向上による「生態系の健全性の回復」が掲げられている。生態系の健全性を評価するうえで、野生生物の生息・分布情報は、生息域における生物多様性の基盤となる情報であり、その収集・蓄積は生態系の変化や回復過程を把握するうえで重要となる。現在にかけて、河川水辺の国勢調査や自然環境保全基礎調査などが実施され、国土レベルでの基礎情報の収集が行われている。ただし、従来の生物調査には、高い専門性や多大な調査労力が必要であり、国管理の調査地域の偏りや人的・時間的制約によって、生物の分布情報の蓄積量が十分確保できない可能性がある。また、短期間に広範囲の環境情報を収集することが困難である。

以上のような課題に対し、省力的かつ効率的に生物の生息状況を把握できる環境 DNA 分析¹⁾の有効性が示されている。環境 DNA 分析は、水などの環境サンプルから DNA を抽出・解析することで生息する生物種の検出する技術であり、広域の生物分布情報を収集するうえで非常に有効なツールとなる。さらに、環境 DNA データを活用して生物の生息可能性を予測する生息ポテンシャルマップの開発²⁾を行った研究が進められている。このように、環境 DNA データを用いることで網羅的な生物分布情報を収集・予測し、生態系および生息域の保全に資する情報を提供できる可能性が示されている。

そこで、本研究では、山口県内における淡水魚類及び水生昆虫の多様性に関する基礎情報を網羅的に収集・解明することを目的として、県内に存在する主要な 12 水系を対象に環境 DNA 分析を用いた魚類調査を実施した。また、得られた魚類の分布情報を基に、多様性解析及び生息ポテンシャルマップの作成を行い、山口県内における淡水魚類と水生昆虫の多様性の傾向や周辺環境との関係について検討した。なお、生息ポテンシャルマップの作成には、従来広く用いられている統計解析を用いた手法のほかに、近年、予測精度が高いことで注目されているニューラルネットワークを用いた手法で作成することを試みた。

キーワード：環境 DNA, 淡水魚類, 水生昆虫, 多様性, 分布予測

2. 環境 DNA を用いた山口県広域における魚類及び水生昆虫の多様性ポテンシャルの検討方法

2.1 調査地の概要と野外調査

本研究では、2024 年 8 月 7 日、27 日、9 月 14 日、27 日、28 日、29 日、30 日、10 月 1 日に、山口県内の 12 水系（1 級水系：1 水系；2 級水系：11 水系）の河川を対象に 83 地点で 1 L の河川水を採水した（図 2.1）。採水に用いるボトルは、事前に 10 %次亜塩素酸ナトリウム漂白剤、および DNA を含まない脱イオン水で洗浄し、容器内の DNA を除去しているものを用いた。採水後に DNA の分解を遅らせる DNA 分解阻害剤（10 %塩化ベンザルコニウム水溶液）を 1 mL 添加し、冷蔵状態で実験室に持ち帰った。さらに、調査時から分析時までにかけてのコンタミネーションを確認するために、採水ボトルに DNA の含まれていないイオン交換水を入れたクーラーブランクをクーラーボックスに同梱した。採水地点では、多項目水質計（U-52, HORIBA）にて、水温（℃）、pH、溶存酸素（mg/L）、濁度（NTU）、電気伝導度（S/m）、総溶解固形分（ppm）を計測した。

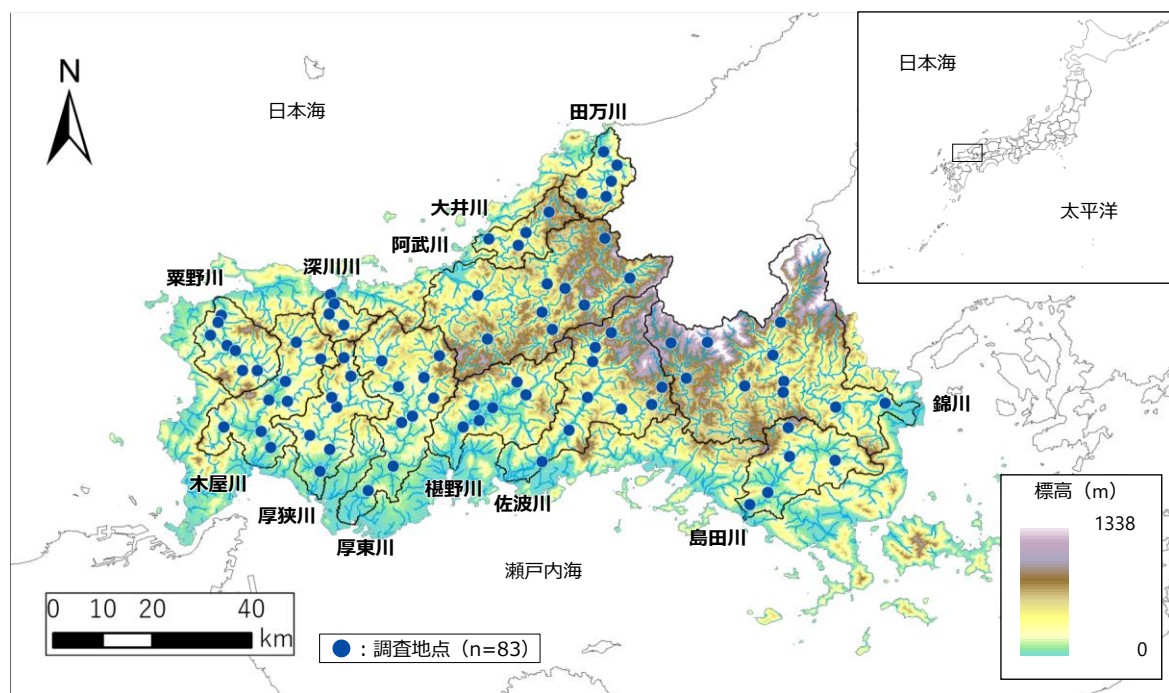


図 2.1 本研究の調査地.

2.2 河川水からの DNA 抽出方法の検討

環境 DNA 分析では、採水サンプルから DNA 溶液を抽出し、その DNA 溶液に含まれる DNA を解析することで生物の生息状況を評価した（図 2.2）。はじめに、研究室へ持ち帰った水サンプルは、GF/F フィルター（粒子保持能 0.7μm）1 枚でろ過し、DNA 抽出までろ紙を -4℃ で保管した。DNA 抽出において、河川水に関しては（一社）環境 DNA 学会発行の環境 DNA 調査・分析マニュアル ver. 2.2 (<https://ednasociety.org/manual/>) を参照し、ザルスタット社のサリベットおよ

び QIAGEN 社の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いた方法でろ紙から DNA を精製した。

2.3 環境 DNA 分析

魚類の環境 DNA 分析には、魚類の環境 DNA 濃度を網羅的かつ定量的に評価可能な定量メタバーコーディング法 (qMiSeq 法)³⁾を用いた。本研究では、魚類の網羅的検出系である MiFish プライマー (Miya et al. 2015)⁴⁾、キュウリウオ目およびヤツメウナギ目についてはそれぞれ別のプライマー (MiFish-OF/OR, MiFish-LF/LR) を用いた。2 度の PCR によって魚類の DNA、および各サンプルに異なる濃度 (std. 1 = 5, std. 2 = 25, std. 3 = 50 copies/PCR reaction) で添加された 3 種類の内部標準 DNA を同時に増幅した。魚類の DNA を網羅的に増幅する 1st PCR から超並列シーケンサー (iSeq 100, Illumina) による DNA 配列の決定までの分析プロトコル、および MiFish パイプラインを用いたシーケンスデータの解析は、Miya et al. (2020)³⁾に従って実施した。解析によって得られた魚類データのうち、種を同定できない配列については属レベルでの同定にとどめた。また、過去に佐波川水系で確認されていない種や明らかに人為的なコンタミと判断された種 (淡水域における海産魚等) については、魚類相リストから除外した。各種に割り当てられたリード数をコピー数に変換するため、サンプルごとに得られた内部標準 DNA のリード数と既知のコピー数の関係から検量線を作成した。そして、検出された魚類のリード数をサンプル固有の検量線の傾きで割ることにより DNA コピー数 (以下、環境 DNA 濃度 ; copies/L) に変換した。

水生昆虫の環境 DNA 分析には、水生昆虫の種を網羅的に検出可能なメタバーコーディング法を用いた。本研究では、水生昆虫の汎用性遺伝子マーカーである MtInsects-16s (PCR プライマー) を用いた PCR を実施した。PCR から種の同定までの手順は、魚類と同一の方法とした。

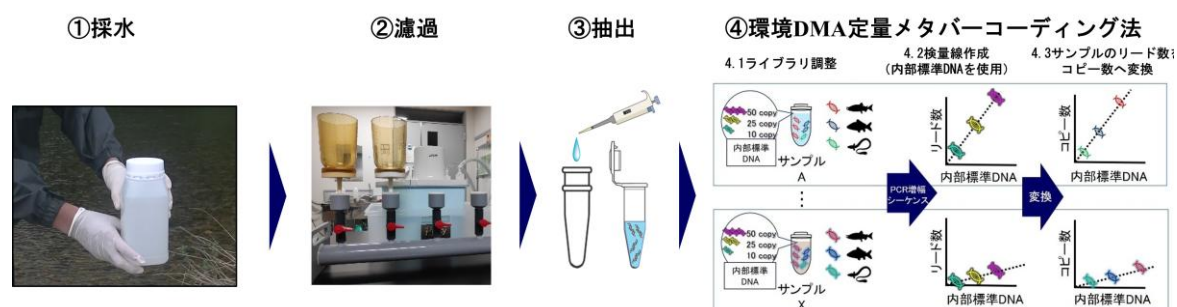


図 2.2 環境 DNA 分析のフロー図

2.4 環境要因の算出

地理的環境要因を算出するために、国土数値情報が公開している数値標高モデル (Digital Elevation Model ; DEM) を用いて小流域を作成した。基本、DEM は 5 m メッシュのものをを用い、欠損部分は 10 m メッシュを用いた。続いて、各小流域を代表する地理的環境要因として、標高、河床勾配、土地利用割合、地質割合を算定した。標高は、小流域内に位置する河川の

中間地点を代表値とした。河床勾配は、各小流域に位置する河川の上流端と下流端の標高差に対し、対応する河川距離で割ることで算出した。土地利用割合は、土地利用細分メッシュデータ注5) (100m メッシュ) を用い、小流域ごとに各利用分類の面積を収集し、小流域面積に対する割合を算出した。地質は、20 万分の 1 シームレス地質図を用いて、小流域ごとに各岩相の面積を収集し、小流域面積に対する割合を算出した。河川水温や水質の環境要因は、採水地点の計測値を基に逆距離荷重法の処理を行うことで、山口県内全体での補間を行った。その後、小流域内の平均値を算出した。

2.5 山口県広域における淡水魚類及び水生昆虫の生息ポテンシャルの検討

山口県内の魚類多様性を把握するために以下の多様性解析を行った。まず、各水系の環境 DNA 分析で検出された種数と、在来種・外来種・絶滅危惧種に基づくカテゴリー割合を算出した。在来種・(国内外) 外来種・絶滅危惧種の判別には、山口県外来種リストおよびレッドリストを参考にした。次に、各水系の在来魚の種数と環境要因(流路延長、流域面積、ダムの数)との間に関係についてスピアマンの順位相関係数から推定した。さらに、各地点の検出種数および各魚類の環境 DNA 濃度を基に算出した Simpson 多様度指数を用いて、Kruskal-Wallis 検定を行った。また、Kruskal-Wallis 検定で有意差が見られた場合、Steel-Dwass 検定による多重比較を行うことで、どの水系間に違いが見られるのかを明らかにした。

山口県内の水生昆虫の多様性を把握するために、環境 DNA 分析による検出種数を集計した。また、水質汚濁に弱いカゲロウ目・カワゲラ目・トビケラ目の種数を合計した EPT 指数を各地点で算出した。なお、EPT 指数は値が高いほど水質の良好さや環境の多様性があることを示す指標である。

魚類及び水生昆虫の種数を対象としたポテンシャルマップの作成するために、一般化線形混合モデル (Generalized liner mixed model ; GLMM) を用いた統計解析により、魚類と水生昆虫の種数予測モデルを構築した。応答変数は各調査地点の検出種数とし、説明変数は標高と河床勾配、土地利用割合、地質割合、水温、水質とした。確率分布は二項分布を用いた。ランダム項は魚類では採水日とし、水生昆虫では地点とした。また、説明変数のうち多重共線性が疑われたものについては変数から除外した。魚類では、山口県に本来生息する魚種の多様性を予測することを目的としたことから、外来種数については解析から除外した。GLMM は総当たりで行い、モデル選択によって赤池情報量基準 (AIC) が最小値となるモデルをベストモデルとして採用した。構築したモデルによる予測種数と実際の検出種数とで、ピアソンの積率相関 (r) を算定し、モデルの再現性を確認した。最後に、ベストモデルに対し、2.4 で算出した環境条件を外挿することにより、山口県広域の在来魚種と水生昆虫の生息ポテンシャルマップを作成した。ニューラルネットワークを用いた種数予測モデルでは、応答変数に種数を、入力変数に AIC 最小のモデルの説明変数を用いて構築した。モデル構築以降の処理は、GLMM と同一である。

3. 結果と考察

3.1 山口県内における検出魚種数

環境 DNA 分析の結果、本研究において山口県で検出された魚類の総種数は 52 種であった(表 3.1)。図 3.1 に、本研究において検出された魚種数の分布図を示す。山口県内の各地点で検出された種数は、最少で 7 種、最多で 24 種であった。全体的な傾向として、各水系において、上流域ほど種数が少なく、中下流域において最も多くなることが確認された。また、日本海側に比べて瀬戸内海側で種の総数が多くなり、瀬戸内側の河川水系のほうが魚類の多様性が高いことが示唆された。図 3.2 に、各水系のカテゴリー（絶滅危惧種・普通種・外来種）別の構成割合を示す。日本海側の河川では、阿武川水系を除いて、外来種の検出種数が少なく、10%未満であった。一

表 3.1 環境 DNA 分析で得られた各水系の魚類相

科	和名	分類	粟野川 n = 7	深川川 n = 4	阿武川 n = 9	大井川 n = 4	田万川 n = 5	木屋川 n = 8	厚狭川 n = 7	厚東川 n = 9	樺野川 n = 6	佐波川 n = 9	島田川 n = 5	錦川 n = 10
ヤツメウナギ科	カワヤツメ属sp.	絶滅危惧種												
ウナギ科	ウナギ属sp.	絶滅危惧種	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
コイ科	コイ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	フナ属sp.	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	アブラボテ	絶滅危惧種	■	■				■	■	■				
	イチモンジタナゴ	外来種 (国内)												▲
	カネヒラ	外来種 (国内)												▲
	オイカワ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ハス	外来種 (国内)			▲		▲		●		▲	▲	▲	▲
	カワムツ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヌマムツ	絶滅危惧種								■				
	ウグイ	普通種			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	アブラハヤ	外来種 (国内)											▲	
	タカハヤ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ワタカ	外来種 (国内)			▲									
	ソウギョ	外来種 (国外)							▲					
	ムギツク	普通種	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヒガイ属sp.	普通種			●							●	●	●
	タモロコ属sp.	普通種			●			●		●	●	●	●	●
	ニゴイ属sp.	普通種								●			●	●
	ズナガニゴイ	絶滅危惧種						■	■	■	■	■		
	スゴモロコ属sp.	普通種						●	●	●	●	●	●	●
	イトモロコ	絶滅危惧種	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	カマツカ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ナガレカマツカ	普通種												●
ドジョウ科	ドジョウ属sp.	絶滅危惧種	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	オオシマドジョウ	絶滅危惧種				■	■							■
	ヤマトシマドジョウ	絶滅危惧種	■	■				■	■	■	■	■		
	シマドジョウ属sp.	絶滅危惧種											■	
	インドジョウ	絶滅危惧種	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ギギ科	ギギ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
アカザ科	アカザ	絶滅危惧種	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ナマズ科	ナマズ	絶滅危惧種	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
キュウリウオ科	ワカサギ	外来種 (国内)			▲		▲		▲	▲				▲
	アユ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
サケ科	サケ属subsp.	絶滅危惧種		■		■	■		■	■	■	■	■	■
	ニジマス	外来種 (国外)			▲	▲			●			▲		▲
	イワナ属subsp.	外来種 (国内)					▲					▲		▲
メダカ科	ミナミメダカ	絶滅危惧種			■		■		■	■	■	■	■	■
カジャ科	カジャ属sp.	絶滅危惧種	■				■	■	■	■				■
	アユカケ	絶滅危惧種	■		■	■		■	■	■				■
ケツギョ科	オヤニラミ	絶滅危惧種	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
サンフィッシュ科	ブルーギル	外来種 (国外)	▲		▲		▲		▲	▲	▲			▲
	オオクチバス	外来種 (国外)	▲	▲	▲		▲		▲	▲	▲			▲
ドンコ科	ドンコ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	イシドンコ	絶滅危惧種			■	■								■
ハゼ科	ウキゴリ属sp.	普通種	●	●	●	●	●							■
	ビリンゴ	普通種			●	●	●	●	●	●			●	●
	ゴクラクハゼ	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●
	ヨシノボリ属sp.	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	チチブ属sp.	普通種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
タイワンドジョウ科	カムルチー	外来種 (国外)									▲		●	
	検出種数		27	20	33	24	24	31	30	33	28	29	28	35
	普通種		14	11	17	15	13	15	15	16	13	16	16	19
	絶滅危惧種		11	8	10	8	10	12	12	14	12	10	9	10
	外来種 (国内外)		2	1	6	1	1	4	3	3	3	3	3	6

方で、瀬戸内海側の河川では3種以上が確認され、総種数に占める割合は約10%以上であった。絶滅危惧種は、各水系で10種程度が検出され、構成比の占める割合は30～40%であり比較的高いことが確認された。図3.3に、各調査地点の検出種のカテゴリー（絶滅危惧種・普通種・外来種）別構成割合を示す。山口県広域において、すべての水系で外来種が確認され、特に西部の下流域が主な生息箇所となっていることが確認された。また、外来種は水系内で広く検出されておらず、特定の地点に集中する傾向がみられたことから、水系内で外来種の侵入・定着している水域に偏りがみられることが示唆された。

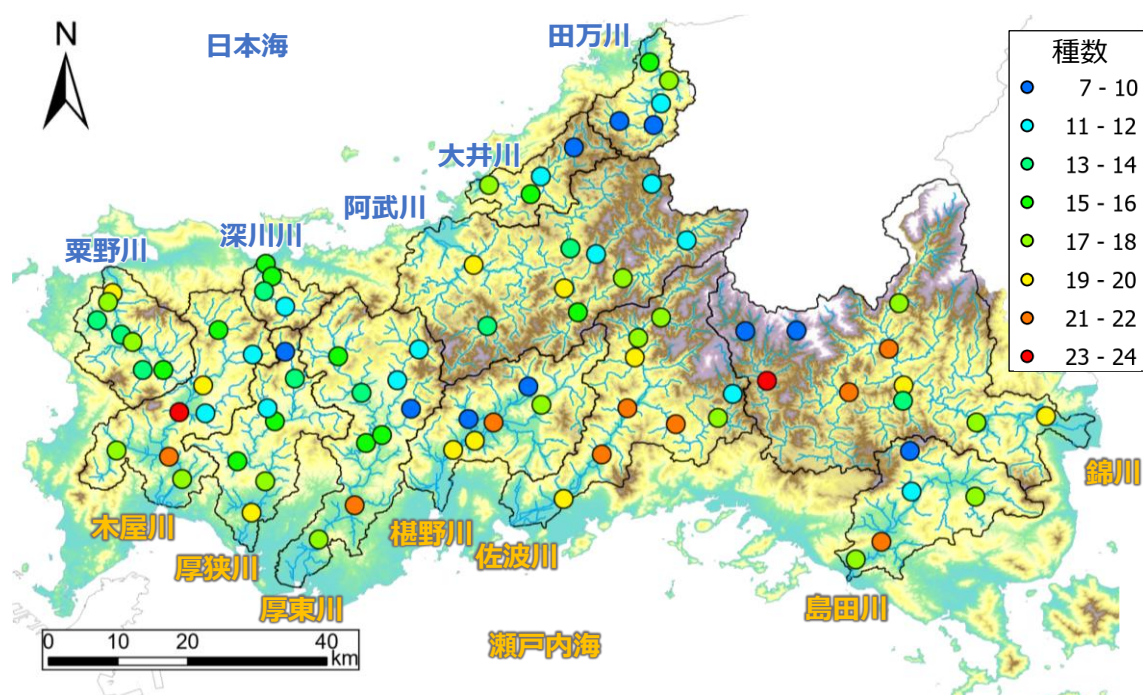


図 3.1 各調査地点の検出魚種数.

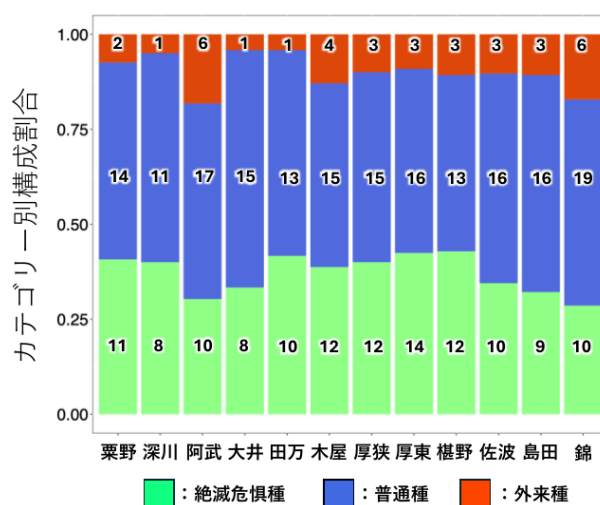


図 3.2 各水系のカテゴリー（絶滅危惧種・普通種・外来種）別構成割合。数字は種数を示す。

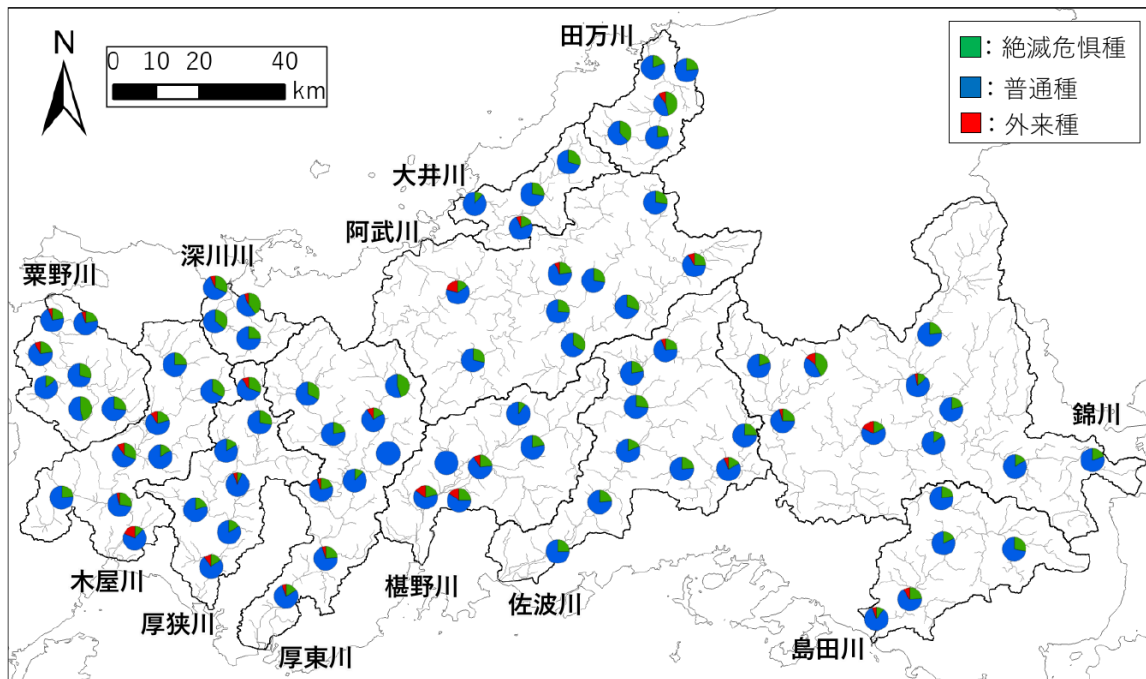


図 3.3 各調査地点のカテゴリー（絶滅危惧種・普通種・外来種）別構成割合.

3.2 各水系の魚類多様性

図 3.4 に、各水系の在来種の検出種数と流路延長の関係を示す。在来魚の種数は、流路延長が長くなるほど増加する傾向が確認され ($\rho = 0.893$, $p < 0.01$), 流域面積やダムの数でも同様であった。この関係から阿武川水系を除く日本海側河川において、数が相対的に少なかった要因として、河川域が短いために、魚類の生息範囲が小さいことが考えられた。検出総種数が日本海側、瀬戸内海側で最も多かった阿武川水系と錦川水系ではともに、流入河川数が 70 以上かつ総河川距離が 300 km 以上の山口県内最大級の水系であることから、多様な魚類の生息環境が存在していることが考えられた。環境 DNA 濃度を基にした種数および Simpson の多様度指数の比較では、どちらも Kruskal-Wallis 検定で有意な違いは確認されなかった (種数: $p = 0.1762$, Simpson: $p = 0.4018$)。このことから、魚種数および魚類の多様度指数においては水系間でほと

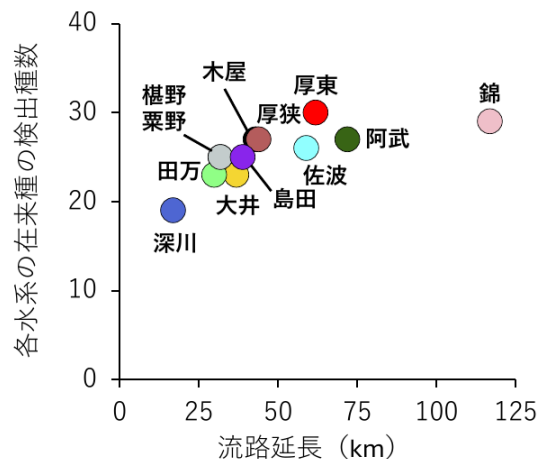


図 3.4 検出種数と流路延長の関係.

んど違いがみられないことが示された。これは、絶滅危惧種を含めた在来種が山口県内の河川水系に広く分布しており、結果として水系間の魚類相の差が出にくかったためであると考えられる(表-1)。絶滅危惧種のなかにはドジョウ属やオヤニラミのように山口県内に広く分布している種から、アブラボテやイシドロンコのような特定の水系にしか生息していない種が混在していることから、魚類多様性の保全を考える際には、分布水系の偏りや特異性を考慮する必要がある。一方で、前述のとおり外来種の分布域は各水系で偏りがみられたことから、特定の水域での外来種駆除が非常に効果的であることが示唆された。

3.3 山口県広域の魚類生息ポテンシャルマップ

表 3.2 に、在来魚の魚種数を対象とした GLMM によるモデル選択の結果を示す。モデル選択の結果、本研究のベストモデルの説明変数には、標高、水田割合、水温、溶存酸素が選択された。また、これらの環境要因のうち、標高、水温、溶存酸素は上位 5 つのモデルのほとんどに含まれたことから、山口県内の河川水系における魚類多様性を説明するうえで重要な環境要因であることが示唆された。一般的に、魚類の種多様性は上流域にいくほど低くなるとされており⁷⁾、標高による負の影響は、この影響を反映していると考えられる。これは、上流域ほど溪流のような限られた河川環境しかないのに対して、下流域の低地部になるにつれてワンドのような緩流域が形成されていること、川幅の広い水域に早瀬や平瀬、淵などの多様な河川環境が広がっているためであると考えられる。また、水田割合による正の影響は、二次的自然である水田が河川の周辺にあることで、河川への栄養塩の流入や、河川と連続した水田のある地域では魚類の水田の利用等が促進されるためであると考えられる⁸⁾。水温による正の影響は、標高の関係と同様であると考えられ、水温の低い上流域よりもある程度水温の高い中下流域で魚類の多様性が高くなるためであると考えられる。特に、本研究では水温の高い夏から初秋にかけて調査を実施していたことから、この影響が強く出たものと考えられる。溶存酸素による正の影響は、溶存酸素量が魚類の活性や生息密度に影響することから、これを反映していると考えられた。統計的手法を用いて構築したモデルによる予測値と実際の検出種数には、ある程度の相関が確認された ($r = 0.500$, $p < 0.01$)。図 3.5 に、統計手法を用いた山口県広域の在来種を対象とした生息ポテンシャルマップの結果を示す。環境 DNA 調査結果(図 3.1)と比較して、予測は過大評価している傾向が確認された。これは、説明変数に、比較的下流域で大きくなる変数が選ばれたためだと考えられる。

表 3.2 GLMM の上位 5 モデルの選択された説明変数の一覧

	切片	標高	水田割合	水温	(水温) ²	溶存酸素	pH	AIC	ΔAIC
Model 1	-0.97649	-0.00181	0.00349	0.05039	-	0.03152	-	102.029	0.000
Model 2	-0.95297	-0.00152	-	0.05185	-	-	-0.12119	102.080	0.052
Model 3	-4.08001	-0.00173	-	0.04930	-	0.02988	-	102.184	0.155
Model 4	-1.04636	-0.00159	-	0.45410	-0.00751	0.02884	-	102.316	0.288
Model 5	-1.25122	-0.00184	0.00355	-	0.00089	0.03140	-	102.433	0.404

ニューラルネットワークを用いて構築したモデルによる予測値と実際の検出種数には、統計的手法と比較して高い相関が確認された ($r = 0.661$, $p < 0.01$)。これは、ニューラルネットワークを用いることで、魚類と環境要因との複雑な関係を表現できる可能性を示している。図 3.6 に、ニューラルネットワークを用いた山口県広域の在来種を対象とした生息ポテンシャルマップの結果を示す。環境 DNA 調査結果 (図 3.1) と比較して、広域的に一致していることが確認された。ただし、局所的に多い箇所を予測できていない。これは、本検討では、流域スケールの環境要因を用いてモデルを構築しているためだと考えられる。今後の課題として、瀬淵の数や河岸植生割合などのハビタットスケールの環境要因を用いて精度向上をはかることがあげられる。

ポテンシャルマップでは、両手法ともに中下流において在来種の生息ポテンシャルが高く、山間部は低くなる傾向が示された。特に佐波川水系と榎野川水系、田万川水系の下流域で高いと予測された。この範囲には、水田の土地利用割合が高いことが影響していると考えられる。佐波川水系と田万川水系では、外来種の検出箇所が少ないことが本研究において明らかとなっている (図 3.3)。環境 DNA 調査結果とポテンシャルによる予測結果を踏まえ、山口県内において、佐波川水系と田万川水系は保全の優先度が高い水域が多くなることが考えられた。一方で、榎野川水系中下流には外来種が侵入・定着している可能性が高く (図 3.3)、在来種の生息ポテンシャルを保つために対策の優先度が比較的高いことが示唆された。

また、環境 DNA 分析結果に基づくポテンシャルマップは、広域に展開可能であり、魚類の多様性を効率的に推定できることが示された。

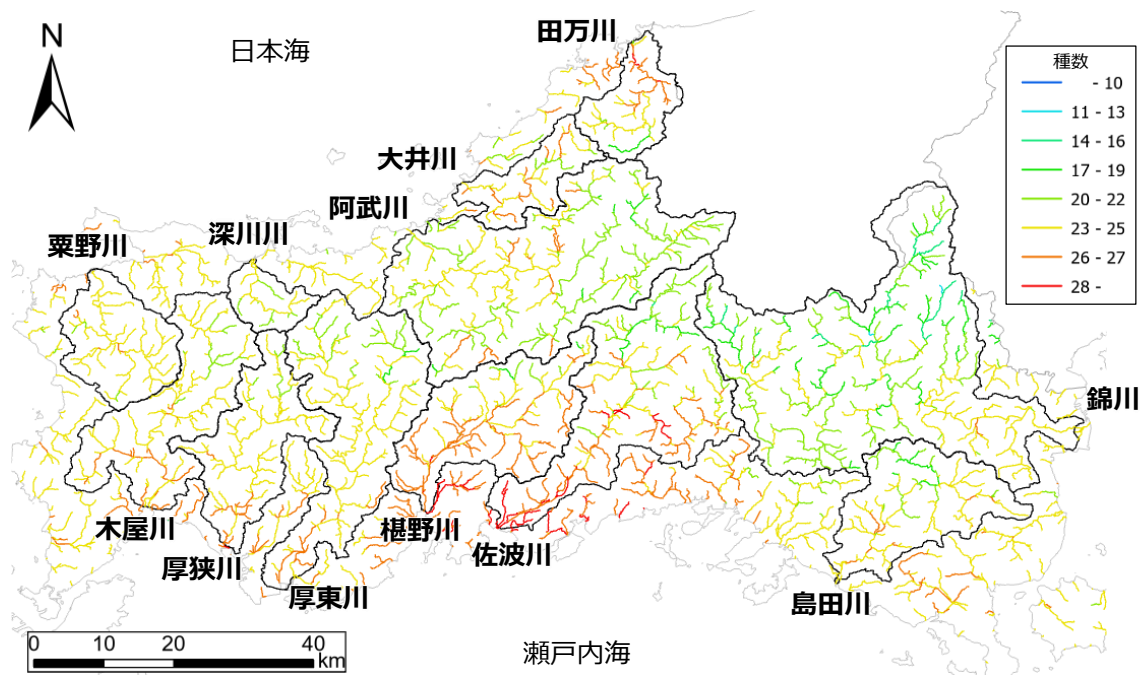


図 3.5 統計的手法を用いた山口県広域における在来魚の生息ポテンシャルマップ。プロットは環境 DNA 調査による検出種数を，河川網は予測値を示す。



図 3.6 ニューラルネットワークを用いた山口県広域における在来魚の生息ポテンシャルマップ。プロットは環境 DNA 調査による検出種数を，河川網は予測値を示す。

3.4 山口県内における水生昆虫の検出種数

環境 DNA 分析の結果，本研究において山口県で検出された水生昆虫の総種数は 127 種であった(表 3.3, 表 3.4)．図 3.7 に，本研究において検出された水生昆虫の種数の分布図を示す．山口県内の各地点で検出された種数は，最少で 6 種，最多で 67 種であった．全体的な傾向として，各水系において，中上流域ほど種数が多く，下流域ほど少なくなる傾向が確認された．このことより，山間部において水生昆虫の種数が多く多様性が高いことが確認された．

表 3.3 環境 DNA 分析で得られた各水系の水生昆虫 (1/2)

科	和名	粟野川	深川川	阿武川	大井川	田万川	木屋川	厚狭川	厚東川	樺野川	佐波川	島田川	錦川
		n=7	n=4	n=9	n=4	n=5	n=8	n=7	n=9	n=6	n=9	n=5	n=10
ガムシ科	コガムシ			●	●								
ダルマガムシ科	ミヤタケダルマガムシ							●					
ヒメドロムシ科	ナガアシドロムシ属sp.	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ゴトウミゾドロムシ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	イブシアシナガドロムシ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ツヤナガアシドロムシ						●						
	キスジミゾドロムシ	●											
	ツヤドロムシ属sp.	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヒメツヤドロムシ	●	●	●			●	●	●	●	●	●	
	ホンヒメツヤドロムシ				●	●	●						
	マルヒメツヤドロムシ	●	●	●	●	●						●	
	チビヒゲナガハナノミ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
ヒラタドロムシ科	ヒラタドロムシ	●	●	●	●	●		●		●	●	●	●
ホタル科	ゲンジボタル	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●
ヒメガガンボ科	ウスバガガンボ属の1種			●		●							●
	Atarba属の1種					●							
ヒメフタオカゲロウ科	オオヒメフタオカゲロウ											●	●
コカゲロウ科	ヒメフタオカゲロウ											●	
	ミツオミジカオフタバコカゲロウ						●	●			●	●	●
	ヨシノコカゲロウ			●									
	フタバコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	サホコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	コカゲロウ属の1種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	シロハラコカゲロウ	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヨシノコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●
	フタバカゲロウ			●	●	●					●		
	タマリフタバカゲロウ		●	●	●	●	●	●	●	●		●	
	ウスイロフトヒゲコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	フタモンコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	トビイロコカゲロウ属sp.			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヒロバネトビイロコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Dコカゲロウ	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ウデマギリコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	コバネヒゲトガリコカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Caenis属の1種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	オオクマダラカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
マダラカゲロウ科	クロマダラカゲロウ		●	●	●	●	●			●	●	●	●
	オオマダラカゲロウ	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●
	ヨシノマダラカゲロウ			●		●	●		●		●	●	●
	トゲマダラカゲロウ属の1種											●	●
	シリナガマダラカゲロウ	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●
	ホソバマダラカゲロウ												●
	イシワタマダラカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	イマニシヒメマダラカゲロウ			●							●	●	●
	クシゲマダラカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	アカマダラカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
モンカゲロウ科	エラブタマダラカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	モンカゲロウ属sp.	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	トウヨウモンカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
ヒラタカゲロウ科	ミヤマタニガワカゲロウ属の1種												●
	オビカゲロウ											●	●
	キブネタニガワカゲロウ			●							●		
	トラタニガワカゲロウ						●				●		
	クロタニガワカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●
	ミドリタニガワカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	シロタニガワカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	オニヒメタニガワカゲロウ	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●
	ウエノヒラタカゲロウ	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●
	ナミヒラタカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	マツムラヒラタカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	エルモンヒラタカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ユミモンヒラタカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	キョウトキハダヒラタカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	キハダヒラタカゲロウ								●				
	ヒメヒラタカゲロウ									●	●		●
	サツキヒメヒラタカゲロウ			●	●						●	●	●

表 3.4 環境 DNA 分析で得られた各水系の水生昆虫 (2/2)

科	和名	粟野川	深川川	阿武川	大井川	田万川	木屋川	厚狭川	厚東川	樫野川	佐波川	島田川	錦川
		n=7	n=4	n=9	n=4	n=5	n=8	n=7	n=9	n=6	n=9	n=5	n=10
チラカゲロウ科	ナバスチラカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	チラカゲロウ						●						
トビイロカゲロウ科	ヒメトビイロカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヒメトビイロカゲロウ属の1種		●				●	●	●	●		●	
	ナミトビイロカゲロウ		●	●	●	●	●			●	●	●	●
	ウェストントビイロカゲロウ			●		●		●			●	●	●
シロイロカゲロウ科	オオトゲエラカゲロウ	●	●			●	●				●		
	シロイロカゲロウ属sp.			●		●		●	●	●	●	●	●
	キイロカワカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
カワカゲロウ科	キイロカワカゲロウ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
チビミズムシ科	コチビミズムシ	●		●		●		●		●	●	●	●
アメンボ科	アメンボ科sp.			●		●	●		●	●	●		●
タイコウチ科	ミズカマキリ	●		●									
カタビロアメンボ科	ケンシカタビロアメンボ属sp.	●		●	●			●	●	●		●	
	ナガレカタビロアメンボ	●		●		●							
トンボ科	ハラビロトンボ					●							
	リスアカネ	●											
	マユタテアカネ					●							
カワトンボ科	アカネ属sp.												●
	ハグロトンボ	●	●	●		●			●			●	
	カワトンボ属sp.					●				●			
サナエトンボ科	クロサナエ			●									●
	ダビドサナエ					●							●
	コオニヤンマ	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●
	ヒメサナエ	●	●	●		●	●						●
ミドリカワゲラ科	オジロサナエ		●	●		●	●				●	●	
	セシジミドリカワゲラ												●
ホソカワゲラ科	モンホソカワゲラ												●
	イソベホソカワゲラ		●				●		●				
	ハルホソカワゲラ属の1種												●
オナシカワゲラ科	ナツホソカワゲラ	●											
	ジッポンオナシカワゲラ	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●
	ヨツカギオナシカワゲラ												●
	ナガハリオナシカワゲラ			●									●
	フサオナシカワゲラ属sp.	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	マルオナシカワゲラ	●	●				●			●			
	オナシカワゲラ属sp.	●		●	●	●	●			●	●		
	チノオナシカワゲラ											●	●
カワゲラ科	ウエノオナシカワゲラ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヨコトゲオナシカワゲラ					●							
	エダオカワゲラ												●
	キアシコナガカワゲラ												●
	オオメコナガカワゲラ								●				
	カミムカワゲラ	●	●	●		●							●
	ウエノカワゲラ	●		●			●						●
	クロナガカワゲラ	●	●			●				●	●	●	●
アミメカワゲラ科	フタツメカワゲラ属の1種	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	オオヤマカワゲラ	●	●			●	●	●		●	●		●
	ヒメオオヤマカワゲラ												●
	スズキクラカケカワゲラ										●		●
	オオクラカケカワゲラ											●	●
	トウゴウカワゲラ					●						●	●
	ヒロバナアミメカワゲラ												●
	ヒメカワゲラ属sp.								●				●
シマトビケラ科	コガタシマトビケラ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	キブネシマトビケラ	●	●			●	●		●		●	●	●
ヒゲナガトビケラ科	ナガトビケラ属の1種	●	●				●	●					
	センカイトビケラ属の1種				●					●			
ナガレトビケラ科	ヒロアタマナガレトビケラ	●	●	●			●		●				●
	カワムラナガレトビケラ	●				●	●					●	●
	ムナクロナガレトビケラ	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ヤマナカナガレトビケラ		●				●	●					
		71	65	78	54	79	74	63	63	62	72	72	89

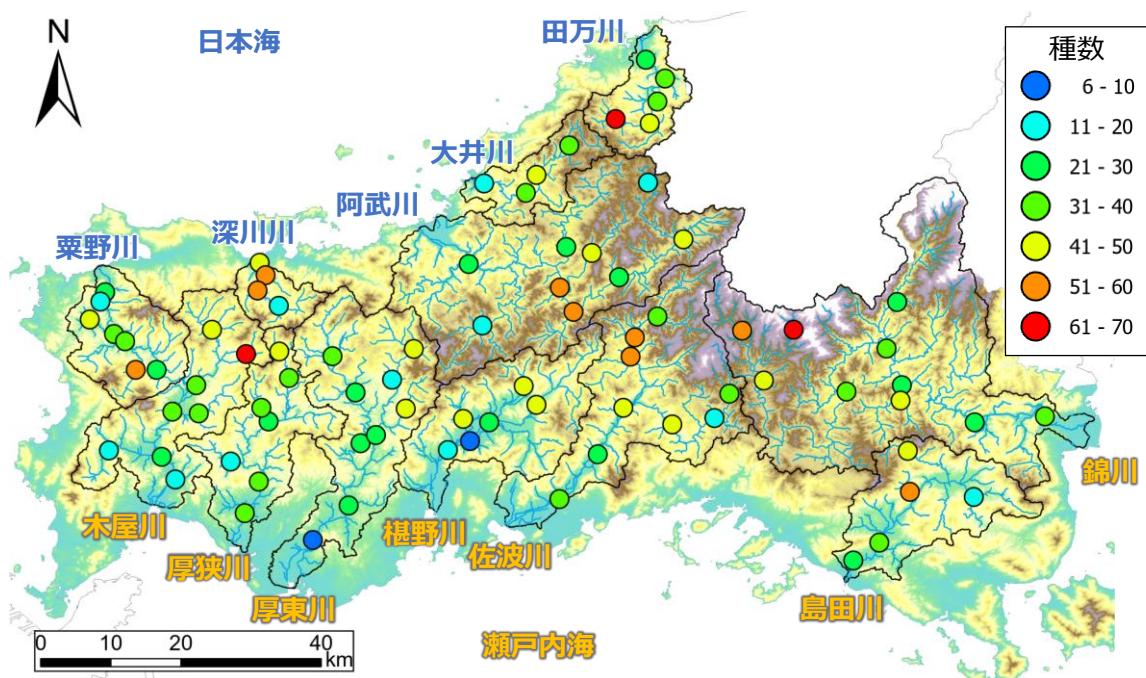


図 3.7 各調査地点の検出水生昆虫種数.

3.5 EPT 指数に基づく山口県内広域の環境評価

図 3.8 に、各調査地点の EPT 指数（カゲロウ目・カワゲラ目・トビケラ目の種数の合計値）を示す。EPT 指数は、下流域小さく中上流域において高くなる傾向であった。このことから、中上流域の水質は良好であり、環境の多様度が高い可能性が示唆された。

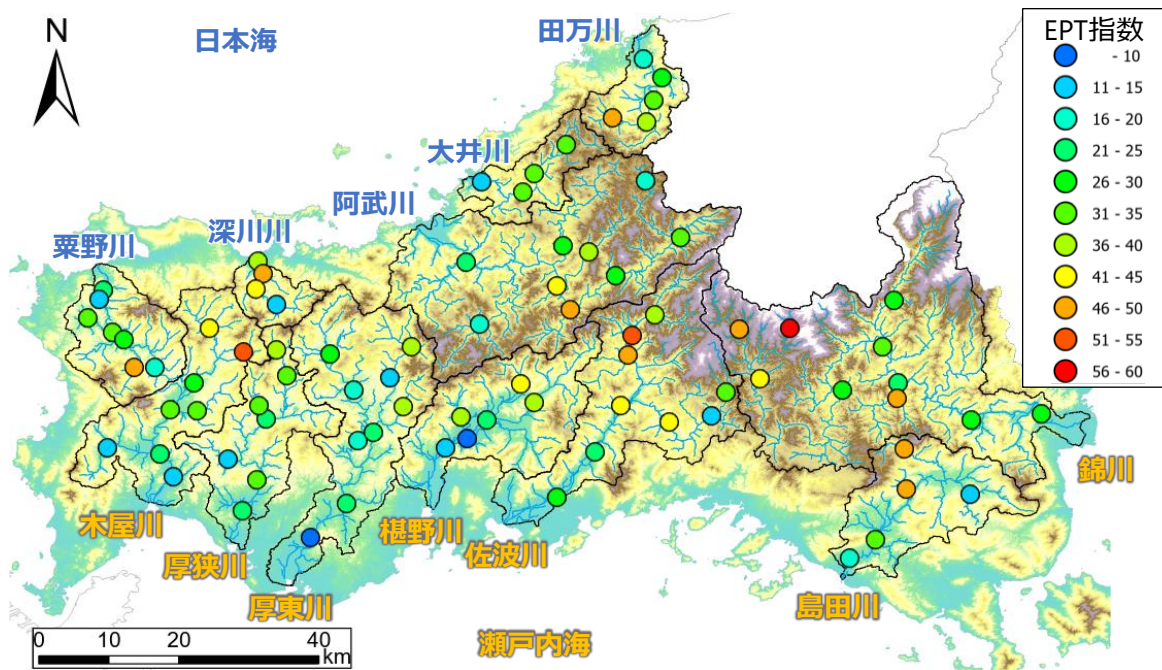


図 3.7 各調査地点の EPT 指数.

3.6 山口県広域の水生昆虫生息ポテンシャルマップ

表 3.5 に、水生昆虫の種数を対象とした GLMM によるモデル選択の結果を示す。モデル選択の結果、本研究のベストモデルの説明変数には、河床勾配と水温が選択された。また、この 2 変数は上位 5 つのモデルの全てに含まれたことから、山口県内の河川水系における水生昆虫の多様性を説明するうえで重要な環境要因であることが示唆された。河床勾配が負の影響を及ぼす要因として、河床勾配が大きい箇所では出水時に水量や流砂量が比較的大きくなるため、生息環境の変化が起りやすく多様性が低下することが考えられる。水温が負の影響を及ぼす要因としては、水温が高いほど羽化によって個体数が減少し多様度が低下する⁹⁾ことが知られており、この影響を反映していたと考えられた。統計的手法を用いて構築したモデルによる予測値と実際の検出種数には、相関は確認できなかった ($r = 0.042$, $p = 0.705$)。統計的手法によってモデル構築できなかった要因として、河床勾配と水温との間に線形的な関係を見出せなかったことが考えられる。ニューラルネットワークを用いて構築したモデルによる予測値と実際の検出種数には、高い相関が確認された ($r = 0.549$, $p < 0.01$)。これは、ニューラルネットワークを用いることで、水生昆虫を対象にしても流域スケールの環境要因との複雑な関係を表現できる可能性を示している。**図 3.8** に、ニューラルネットワークを用いた山口県広域の在来種を対象とした生息ポテンシャルマップの結果を示す。環境 DNA 調査結果 (**図 3.7**) と比較して、広域的に一致していることが確認された。ただし、全体的な傾向をとらえられているものの所々、検出種数と予測種数に乖離がみられる。これは、底生動物が生息場所とする河床の情報が考慮されていないためだと考えられる。今後の課題として、河床材料の被度や TWI (Topographical Wetness Index) などの河床に関係する環境要因を用いて精度向上をはかることがあげられる。

ポテンシャルマップでは、中上流域において水生昆虫の生息ポテンシャルが高く、下流域は低くなる傾向が示された。特に佐波川水系と錦川水系、島田川水系、深川川水系、木屋川水系の上流域で高いと予測された。このことより、環境 DNA 分析結果に基づくポテンシャルマップを作成することで、水生昆虫に対しても多様性を効率的に推定できることが示された。

表 3.5 GLMM の上位 5 モデルの選択された説明変

	切片	河床勾配	水田	人工地	水温	(水温) ²	電気伝導度	(電気伝導度) ²	AIC	Δ AIC
Model1	25.46726	-23.78284	-	-	-1.92053	0.03474	-	-	260.332	0.000
Model2	24.87545	-20.82534	-	0.00615	-1.87691	0.03381	-	-	260.673	0.341
Model3	25.99694	-22.99147	-	-	-1.96683	0.03558	0.75863	-	261.900	1.567
Model4	26.03049	-24.05151	0.00234	-	-1.96437	0.03553	-	-	261.961	1.629
Model5	25.83426	-23.21227	-	-	-1.95073	0.03531	-	1.60716	262.033	1.701



図 3.8 ニューラルネットワークを用いた山口県広域における水生昆虫の生息ポテンシャルマップ。プロットは環境 DNA 調査による検出種数を，河川網は予測値を示す。

4. 結論

本研究では，山口県内における淡水魚類と水生昆虫の多様性に関する基礎情報を網羅的に収集・解明することを目的とし山口県内の主要な 12 水系 83 地点において環境 DNA を用いた調査を行った。そして，得られたデータを用いて多様性解析，在来種のポテンシャルマップを作成した。その結果を総括し，以下のような結論がえられた。

1. 環境 DNA 分析を用いた広域的な魚類調査の結果，52 種の魚類が検出された。魚種数は上流域よりも中下流域で多いことが確認され，各水系の中下流域に魚類多様性のホットスポットが含まれている可能性が示唆された。
2. 広域的に絶滅危惧種が生息しており，水系における種の構成割合のうち絶滅危惧種が占める割合は約 30～40%であることが明らかとなった。
3. 在来種を対象とした種数の予測モデルを構築し，山口県広域の在来種を対象としたポテンシャルマップを作成した結果，特に佐波川水系と榎野川水系，田万川水系の中下流において生息ポテンシャルが高い傾向が示され，環境 DNA 調査結果と併せることで優先的な保全水域と対策水域の推定が行えることが考えられた。
4. 環境 DNA 分析を用いた広域的な水生昆虫調査の結果，127 種の水生昆虫が検出された。種数は下流域よりも中上流域で多いことが確認され，山間部において多様性が高いことが確認された。

5. EPT 指数は、種数同様に上流域で値が高くなる傾向が確認され、上流域において水質が良好であり環境の多様性が高い可能性が示された。
6. 環境 DNA 調査結果に基づく生息ポテンシャルマップは水生昆虫にも適用できる可能性が示され、水生昆虫の多様性についても広域的に推定できることが示唆された。

上記のことから、以上のことから、山口県内における淡水魚類及び水生昆虫の多様性に関する基礎情報を網羅的に収集し、概ね解明することができた。本研究によって、環境 DNA 分析が淡水生物の広域分布情報の収集・蓄積に有用であり、河川管理における魚類・水生昆虫の多様性や生息地の保全に貢献できるツールであることが示された。

5. 引用文献

- 1) Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J. H., Nester, G., Campbell, M. A., van der Heyde, M., Heydenrych, M. J., Juskiewicz, D. J., Nevill, P., Dawkins, K. L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M., Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J. P., White, N. E., Richards, Z. T. and Allentoft, M. E.: Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Sci. Total Environ.*, 873, 162322, 2023.
- 2) 滝山路人, 赤松良久, 宮園誠二, 福丸大智, 中尾長平: 環境 DNA に基づく流域網羅的な魚類多様性ポテンシャルマップの開発, 土木学会論文集, Vol.80, No.16, 23-16103, 2024.
- 3) Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., Yamanaka, H., Minamoto, T., and Kondoh, M.: Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using highthroughput sequencing. *Metabarcod. Metagenom*, 2, 1–17, 2018.
- 4) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, JY., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2, 150088, 2015.
- 5) Miya et al.: MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science*, 86: 939~970, 2020.
- 6) Takenaka M., Yano K., Suzuki T., Tojo K.: Development of novel PCR primer sets for DNA barcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species. *Limnology*, 24(2), 121-136, 2023
- 7) 川那部浩哉, 水野信彦 (中村太士編): 河川生態学, pp 128-138, 講談社, 2013.
- 8) 斉藤憲治, 片野修, 小泉顕雄: 淡水魚の水田周辺における一時的水域への侵入と産卵, 日本生態会誌, 38, 35-47, 1998.
- 9) 新井涼充, 糠澤桂, 風間聡, 竹門康弘: 水温が源流域の水生昆虫に与える影響, 土木学会論文

集 B1 (水工学) , Vol.69, No.4, I_1279-I_1284, 2013.