

DNA 情報を利用したミズワタクチビルケイソウ生息の診断法の精度の検討

要 旨

ミズワタクチビルケイソウ (*Cymbella janischii*) の在・不在河川が混在すると推測される嘉瀬川水系について本種の生息と環境 DNA (付着珪藻および河川水) による調査を実施し、環境 DNA の検出精度の検証を行った。しかし、嘉瀬川上流部は台風によって大量の土砂が流入したためか、調査時の本種の生息は極めて少なく、精度を検討する上で十分な情報を得ることができなかったため、研究室で定期観測をしている筑後川について追加の解析を行った。その結果、付着珪藻 DNA は高感度であり、サンプルに 1 細胞でも含まれていれば検出が可能であるが、死骸や過去の堆積物由来の DNA を検出している可能性も考えられた。付着珪藻 DNA での検出は、生体量が少ない場合の在不在の判定のみならず、過去の侵入履歴 (リスク) の確認にも活用できる可能性がある。一方、河川水 DNA は、今回解析したサンプルからは検出ができず、現場および上流の生物量が少ない場合は検出が困難であることが示された。河川水 DNA からの検出精度とその感度の向上については、今後さらに検討する必要がある。

特異的検出系の精度については、付着珪藻 DNA では偽陽性がなかったが、河川水 DNA では、検出限界以下 (検量線外) ではあったが 1 サンプルで内部配列の異なる増幅産物が生じた (種は不明、増幅過程のキメラ配列の可能性有)。定量 PCR で単純明確な結果を得るには、プローブの追加も有効と考えられた。

1. はじめに

本機関では、近年河川現場で問題になっているミズワタクチビルケイソウ (*Cymbella janischii*) の遺伝子による特異的検出系を開発している。先行研究により、付着珪藻からの環境 DNA は、顕微鏡観察よりも検出感度に優れ、生物量と正に相関することが確認されているが、河川水からの環境 DNA は、付着珪藻の場合よりも感度は劣り、採水場所の生物量と相関しなかった (2022 年春季水産学会、2022 年環境 DNA 学会ワークショップ発表)。河川水は流れてくる上流の様子を反映している可能性があり、上流のモニタリングに有効である可能性がある。河川水からの DNA を利用できれば、魚類の調査用に取得したサンプルを共有でき、同じ環境下での総合的な生物・環境評価が可能になるものと期待される。しかしながら、先行研究では、主要河川で主に 1 地点のみの調査であったことから、環境 DNA によって水系内の本種の状況をどこまで把握できるのかは不明であった。

そこで本事業では、水系内の複数地点で詳細な調査・解析を実施することで、環境 DNA からの検出精度の検証を更に進め、河川管理に適用可能なモニタリング方法 (調査場所、区間設定の目安など) を確立するための基礎資料とすることを目的とした。河川内の異なる状況下での検出精度を検証するには、全域に侵入している河川よりも、在・不在が混在する河川の方が望ましいと考えられ、調査河川は、先行研究で在・不在の混在が確認できている嘉瀬川水系の上流部を対象とした。さらに、嘉瀬川水系で不足するデータ者を補うために、担当者らが定期調査をしている筑後川水系についても追加の解析を行なった。

2. 方法

(1) 調査水域

嘉瀬川水系は延長 57 km、流域面積 368 km²の佐賀県の 1 級河川である。水系内に北山ダム（1956 年竣工）、嘉瀬川ダム（2012 年竣工）を持ち、漁業権は嘉瀬川ダム下流までとなっている。

調査は、先行研究で以前より侵入が確認されている嘉瀬川ダム上の神水川の図中 M1 を起点とする上流部を主に調査した。区間設定はおよそ 1 Km 前後とし、支流の分岐点は合流前後の地点を設け、分岐・合流による変化を取得でき

るよう計 11 地点を調査した（図 1）。各地点の位置情報を付録 1 に示す。

また、調査結果を補足するために、本調査の前後、および担当研究室が定期調査している筑後川水系（St.3 から上流部）についても追加の調査・解析を行った（付録 1 および 付録 2）。筑後川水系は熊本・大分・福岡・佐賀の 4 県を流れて有明海に注ぐ、幹川流路延長 143km、流域面積 2860km²の九州最大規模の 1 級河川であり、本種の国内侵入について初めて報告された河川である[1]。本機関清野の調査により、筑後川は 2011 年時点で St.3 より上流域は地点 B2（付録 2）を除く全地点で本種の侵入が確認されている（未発表）。

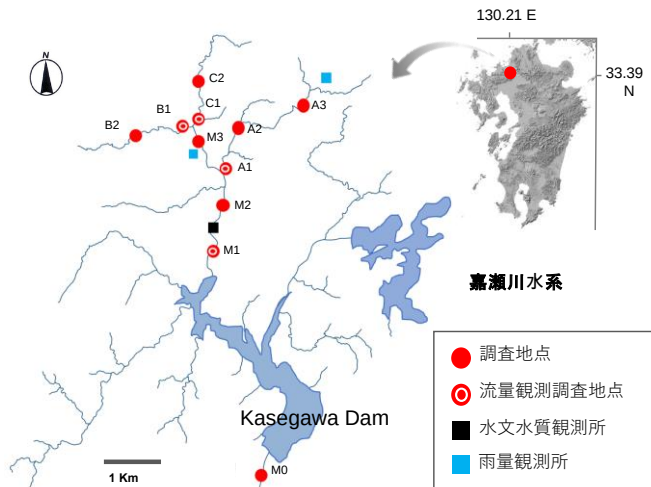


図1. 調査地点

(2) 調査およびサンプリング方法

嘉瀬川の事前調査を 2022 年 9 月 13 日、本調査を 2022 年 10 月 28 日、事後の確認調査を 2023 年 2 月 16 日に実施し、事前調査の 9 月は地点 M0 および M1 のみを、本調査は M0 を除く全地点、事後の確認調査は全地点を実施した。各地点では、付着珪藻、河川水を採取する他、水温の測定を行った。また、調査流域の流量との考察ができるように、起点 M1 と支流分岐点の A1, B1, C1 については流量の測定も行なった（図 1 中二重丸）。筑後川は、研究室で定期調査をしている 2022 年 8 月および 2023 年 1 月のサンプルを利用した。

各調査は、作業に伴う DNA 汚染を避けるため、下流から上流に向かって行ない、各地点の調査後は使用したウェーダを 2%ハイターに浸漬することで外来珪藻の拡散防止対策を行なった。実施した調査項目の詳細を以下に記す。

水質および流量測定

水温は pH 計 AS600（アズワン）で、流速はプロペラ式流速計 VR-301（KENEK）を用いて測定し、平均流速と断面積の積により流量を算出した。補足資料となる筑後川については流量の測定は行っていない。流量を付録 3 に記載する。

付着珪藻の採取

流心から少し外れた流れの中から石を 2~3 個採取してプラスチック皿の上に置き、石に付着した珪藻をナイロン歯ブラシでこすり落として採集した。群体が観察された場所は、群体の一部と群体を形成していない石の付着珪藻の両方を採取した。付着珪藻の採取面積は、石に 5 cm² の枠を当てながら複数箇所採取することで把握した。補足資料に用いた 8 月の筑後川の採取面積は取得していなかったため、厳密な生息密度を出すことはできなかったが、およその面積として暫定的に数値を出した。こすり落とした付着物は現場の河川水 50 ml でプラスチック皿の上に洗い落とし、435 μm のナイロンメッシュで大きなゴミを濾して除いたものを 50 ml チューブに回収した。なお、回収に使用する道具類はすべて使い捨てのものを利用し、無菌の 50 ml チューブ以外は使用前に現場の河川水で濯いでから使用した。また、環境水への汚染を避けるため、採取作業は環境水の採取場所よりも少し下流で行った。

回収した付着珪藻は、保冷剤で冷やしながら研究室に持ち帰った後、遠心 (2000×g, 2 分間) で 5 ml に濃縮したものを 1.5 ml チューブ (DNA, DNase Free のグレードを使用) に 4 等分した。再度遠心 (3500×g, 2 分間) して各チューブの上清を捨て、2 本は DNA 抽出用として 10 倍量以上の RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) に再懸濁して -20℃ に、残りの 2 本は顕微鏡観察用として 50%以上のエタノールに再懸濁して 4℃に保存した。

河川水の採取

河川水 1L をステリベクス (孔径 0.45μm SVHV010RS; ミリポア) でろ過し、内部の液を排出させた後 RNeasy Lysis Buffer 1.8 ml を注入し、ゴム栓 (点眼キャップ 3 φ, コクゴ) とテルフュージョン三方活栓キャップ (ミリポア) で封入した。予備を含め、各地点 2L (ステリベクス 2 本) を採取した。ブランクコントロールは、調査の最終地点で精製水 500 ml を濾過し、以降同様に処理した。濾過したステリベクスは保冷剤で冷やしながら研究室に持ち帰った後、-20℃で保管した。

(2) 遺伝子解析

DNA の抽出

付着珪藻の DNA は Keller ら[2]の方法を参照して DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN) または NucleoSpin® Soil Kit (Takara) により抽出した。抽出は kit の "Wet Soil Sample" のマニュアルに準じて行い、抽出 buffer (DNeasy PowerSoil Kit では solution C1 (60 μl)) に proteinase K (20 mg/μL) 20 μL を加え、Micro Smash MS-100R (TOMY) にて 5 分間 2500 rpm/min で攪拌した後、55 °C で 55 分間インキュベートした。インキュベート中は 10 分毎に vortex した。DNA はそれぞれの Kit の Elution buffer 100 μL で溶出し、使用時まで -20 °C で保存した。抽出時にコンタミネーションがなかったことを確認するために、空のカートリッジを用いて同様の作業を行い、ブランクコントロールとした。

ステリベクスで濾過した河川水の DNA は、DNeasy Blood and Tissue Kit を利用して Miya ら[3]の方法で抽出し、kit の Elution Buffer 100 μL で溶出し、使用時まで -20 °C で保存した。なお、付着珪藻 DNA、河川水 DNA とともに、実験で使用するチューブとピペットチップは滅菌された DNA low binding / DNase、RNase Free のものを使用した。

DNA 濃度は微量分光光度計 Nabi UV/Vis Nano Spectrophotometer (MicroDigital) また

は Qubit™ dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) によって測定した。

コントロール DNA の準備

PCR 時の偽陽性、偽陰性を確認するため、先行研究で作成した以下に記述するポジティブコントロール、ネガティブコントロールを使用した (未発表)。ポジティブコントロールは *C. janischii* の nuclear-encoded large-subunit rRNA (28S; GenBank accession number LC568542 [4]) の部分配列から成る人工遺伝子を挿入したプラスミド DNA、ネガティブコントロールは、登録遺伝子の中で *C. janischii* に最も近縁な *C. mexicana* の 28S (GenBank accession number KJ011568) の部分配列から成る人工遺伝子を挿入したプラスミド DNA に由来する。それぞれのプラスミドを M13 primers (M13-F: 5'-CCAGGGTTTCCCAGTCACGAC, M13-R: 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG) と Phusion DNA polymerase (New England BioLabs) を用いて内部配列を増幅し、PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) で精製した後、Easy Dilution (TAKARA) によって調整した希釈系列を定量 PCR に使用した (以下それぞれ Control-CJ、Control-CM と記述する)。なお、内部配列増幅の反応組成は、20 µL 中 0.2 ng template DNA, 1× Phusion HF buffer (New England BioLabs), 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 0.2 µL Phusion DNA polymerase とし、PCR 条件は 98°C 30 秒を 1 サイクル、98°C 10 秒、60°C 20 秒、72°C 5 秒を 40 サイクル、最後に 72°C 10 秒を 1 サイクルで行った。

定量 PCR

C. janischii の定量 PCR は、本種の特異的なプライマー (P1-F: 5'-GCGAAGGAAACCAGTGTAT, P1-R: 5'-GAAACTATGTAATCACTAGCAGTAAAA) およびプライマーの相補鎖の 3'末端配列が完全に一致する配列を特異的に増幅する HiDi DNA polymerase (myPOLS) を用いて行った。添加するサンプルは、付着珪藻 DNA は原液を、河川水 DNA の場合は先行研究において顕著な PCR 阻害はなかったものの 5 倍に希釈したものの方が結果のバラツキが少なく安定していたため、Easy Dilution で 5 倍希釈したものを使用した。反応液は、各 Primer 0.1 µM, each dNTPs 200 µM, 0.1×ROX Dye, 1×HiDi buffer (myPOLS), 1×GreenDye (myPOLS) または 1×EvaGreen (Biotium), 0.75 U HiDi DNA Polymerase, template DNA 1 µL (no template control は代わりに滅菌水を使用) を含み、滅菌水で 15 µL とした。PCR は Aria MX (Agilent) により、95°C 2 分 30 秒を 1 サイクル、95°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 25 秒を 50 サイクル、最後に 95°C 1 分、60°C 30 秒、95°C 30 秒を 1 サイクルの条件で行った。検量線は既知量の Control-CJ ($1.146 \sim 5.731 \times 10^6$ copies) を用い、特異的な増幅と実験中のコンタミネーションの有無を確認するためにネガティブコントロール Control-CM (5.731×10^5 copies) およびブランクコントロールも毎実験毎に設けた。実験は 3 回繰り返し、平均 DNA コピー数と標準誤差を求めた。増幅された PCR 産物は、リアルタイム PCR での解離曲線、アガロースゲル電気泳動によるバンドサイズ、P1-F primer を使用したダイレクトシーケンス (受託シーケンス (Genewiz およびユーロフィン)) による内部配列の確認を行った。

(3) 顕微鏡観察

嘉瀬川水系の事前調査 (2022 年 9 月) および本調査 (2022 年 10 月) のサンプルは、

河川生物研究所の受託解析により、本種の生細胞数および全珪藻量の測定を行った。

嘉瀬川水系の事後調査（2023 年 2 月）および筑後川のサンプルは本機関で解析した。顕微鏡は ECLIPSE Ts2-FL (ニコン)を使用し、懸濁液の一部を取って希釈し、その一定量の全視野を 3 回以上観察した。希釈率と観察に使用した液量から、元の採取面積 1 cm² 当の細胞数を推定した。群体から採取したサンプルは、群体の主構成種と *C. janischii* の有無の確認のみ行なった。

3. 結果

調査時の河川の様子

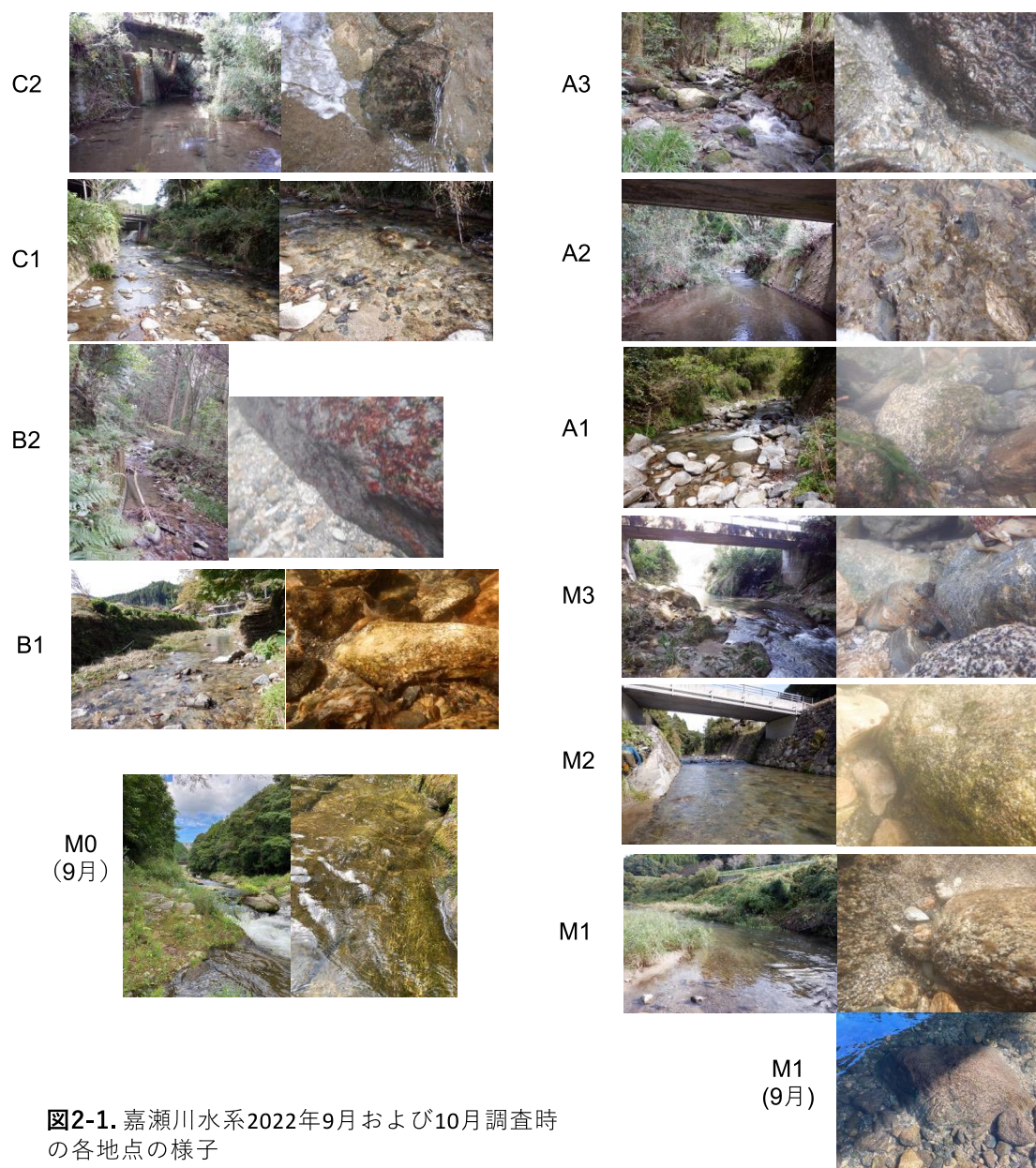


図2-1. 嘉瀬川水系2022年9月および10月調査時の各地点の様子

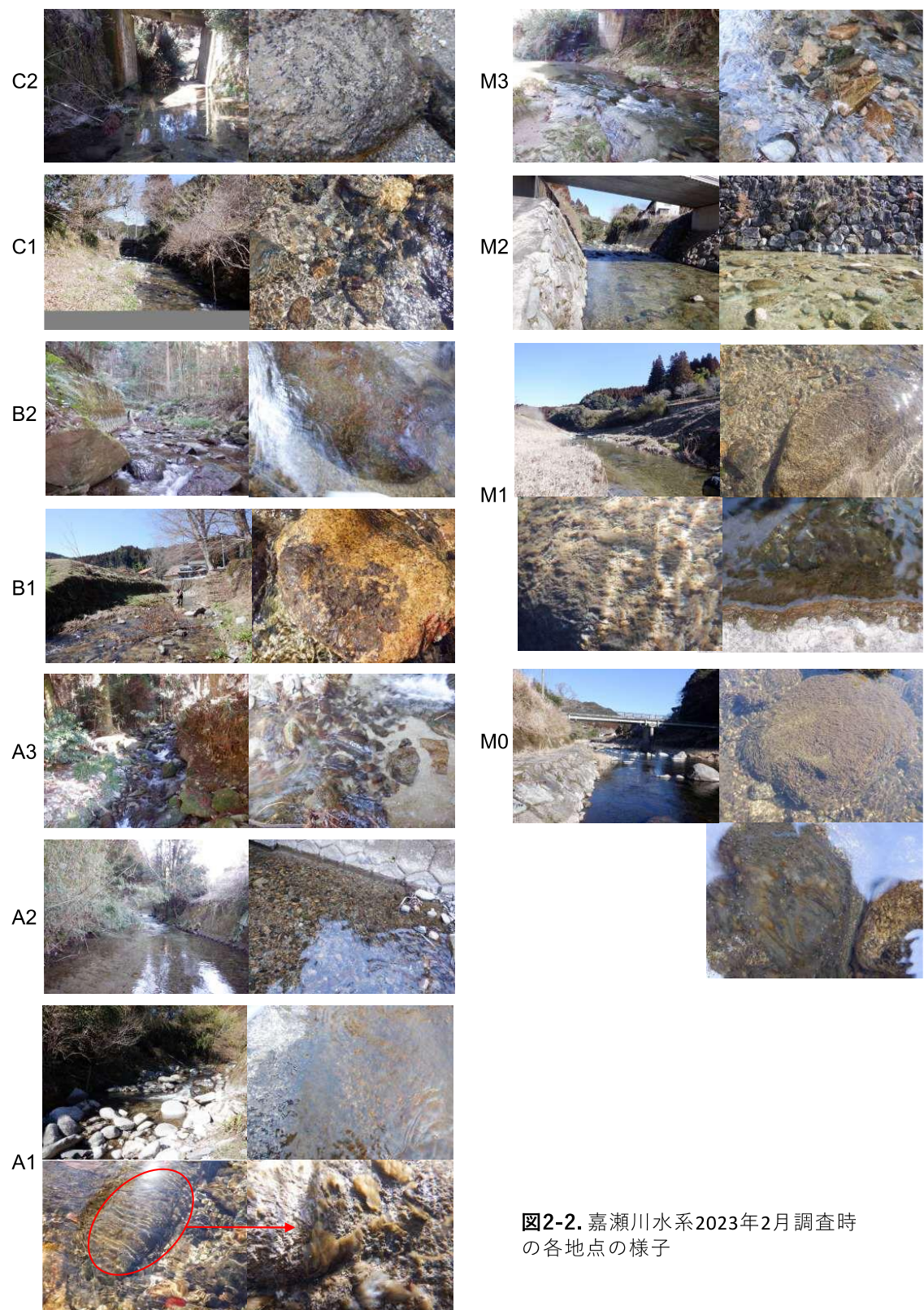


図2-2. 嘉瀬川水系2023年2月調査時の各地点の様子

嘉瀬川の調査時の各地点から上流の様子と河床または石の様子を図 2-1（2022 年 9 月および 10 月調査時）および図 2-2（2023 年 2 月調査時）に示す。2022 年 9 月および 10 月調査時は、いずれの地点も *C. janischii* と思われる群体（ワタ）は見受けられなかった。ダム下の地点 M0 は岩盤で小石も少なく、アーマーコート化が進んでいた。M1 の石に茶色い塊があったが、それは砂であった。M1 は 9 月の調査までは水深がこれよりも深く、砂の堆積も少なかった。調査地点に至る福岡からの峠道が 9 月 18 日の台風 14 号で崩落していたことから、M1 の少し上流にある水文水質観測所のデーターを確認したところ、9 月 18 日の台風 14 号でかなりの出水が起きていたことがわかった（付録 4）。

2023 年 2 月の調査では、M0, M1, A1 の地点の石や護岸に群体が確認された（図 2-2）。顕微鏡で確認すると M0, M1 では *C. janischii* が確認されたが、群体そのものは別の藻類であった。A1 の群体は、流れの急な場所で局所的に発生しており、顕微鏡観察の結果 *Gomphoneis minuta* の単群体であった。

水質と珪藻の観察結果

嘉瀬川での水温、全珪藻量、本種生体量をグラフ化したものを図 3 に、筑後川の本種生体量を視覚化したものを付録 2 に示す。嘉瀬川の水温は、9 月は調査流域下流部の M1 で 20℃以上であったが、10 月末には本種の生育可能温度[5]に近い 12℃～15℃に低下していた。台風前の 9 月の全珪藻量は、M1 で約 12 万 cells / cm²であったが台風後の 10 月調査時は 10 倍以下の約 1 万 cells/cm²に減少していた。他の地点に比べて全珪藻量の多い A2, C2 は平で緩やかな流れであった（図 2 参照）。本種は、9 月、10 月は、死細胞含めて M1 のみで検出され、その生体量（死細胞を除く）は、全珪藻量が大幅に減少しているにもかかわらず 10 月は若干増加していた。2 月の観察では、M1 の他に M0 でも本種が確認され、生体量は M0 の方が多かった。M1 から上流の地点ではいずれも検出されなかった。

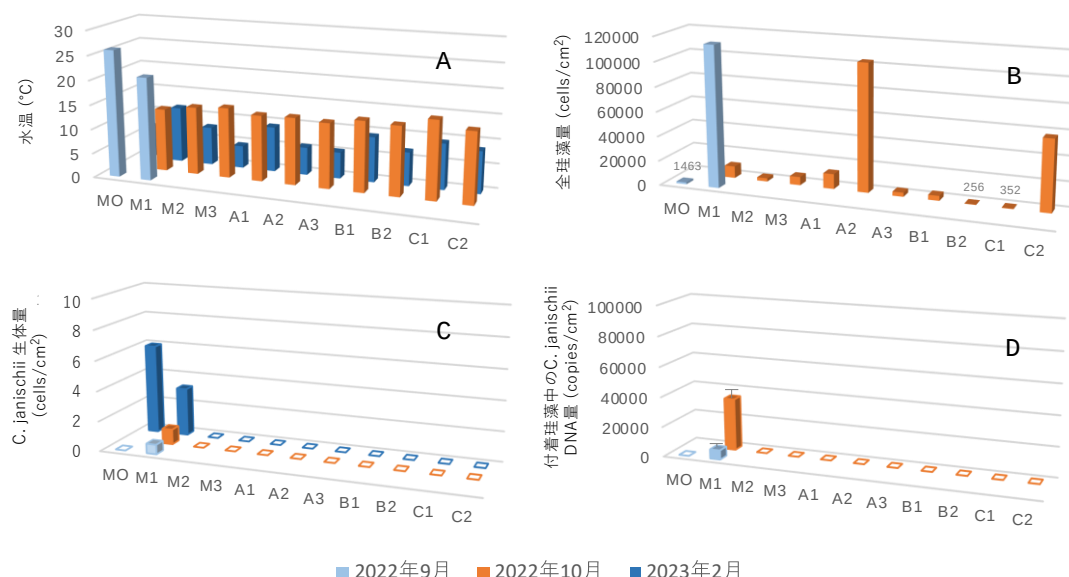


図3. 嘉瀬川の調査・解析結果

A) 水温、B) 付着珪藻1 cm²当たりの全珪藻量、C) 付着珪藻1 cm²当たりの *C. janischii* の生体量 (cells / cm²)、D) 付着珪藻1 cm²当たりの *C. janischii* のDNA量 (copies / cm²). 白抜きの棒グラフは数値が0（非検出）を示す。

筑後川では、8月には壊れた殻や細胞質のない殻が St.3, St.9 で確認されたが、本種の生体は観察されなかった（付録 2）。しかし、4ヶ月後の翌年 1 月は、B1, B2 以外で本種の群体が目視で観察され、群体を避けて採取した付着珪藻からは A3 で 9,800 cells/cm²、他の地点は 1 万 cells/cm² を超えるほどに増加していた。B1 は、定期観測地点の付着珪藻からは 8 月、1 月ともに検出されなかったが、ダムで冠水する不安定な地点であったことから、上流部の別地点を確認したところ、目立った群体はないものの本種の生息は確認された。B2 は、8 月、1 月ともに検出されなかった。温泉街からの排水口が近いために、その影響を受けている可能性があるが、上流部の他の地点の確認はまだできていない。

環境 DNA の結果

嘉瀬川の 9 月、10 月、筑後川の 8 月のサンプルについて解析し、嘉瀬川の環境 DNA の結果を図 3 に、筑後川の結果を付録 2 に示す。嘉瀬川は、M1 の付着珪藻 DNA のみで検出され、顕微鏡観察による生体の結果と一致した。検出された 1 cm² 当りの DNA 量は、9 月は 6,170±191 コピー、10 月は 34,611±5,220 コピーであった。河川水 DNA はいずれの地点でも検出されなかった。

筑後川の生体は、8 月では観察されていないが、付着珪藻の環境 DNA から B1, B2 を除いて 182±30～5,715±368 コピーの DNA が検出された。死んだ殻や欠片が確認された St.3 と St.9 はその中でも高い数値を示した。一方、河川水 DNA から、筑後川でもすべて検出されなかった。

偽陽性などについて

使用したプライマーセット P1 は、今回の嘉瀬川 2022 年 9 月-10 月の 12 件体、筑後川 2022 年 8 月の 7 件体の他に先行研究での九州～東北までの 13 河川 13 件体の計 32 サンプルの解析実績をもつが、付着珪藻では偽陽性は検出されていない。一方、河川水では、検出限界以下ではあるが、嘉瀬川 2022 年 9 月の地点 M0 で *C. janischii* とは異なる増幅産物が出現した。内部配列を確認したところ、*C. janischii* の配列とはまったく異なり、Blast 検索をすると部分的に *Fusobacterium hwasookii* (Sequence ID: CP013334) との相溶性が高かった（90%）ことから、増幅過程で生じたキメラ配列の可能性も疑われた。

4. 考察

嘉瀬川の付着珪藻 DNA では、実際の生体の存在場所と対応する結果が得られた。一方、筑後川では、8 月に生体を確認できない地点でも陽性を示すところが多くあり、付着珪藻 DNA で陽性となった地点は翌年 1 月に目視で確認できる群体が出現していた。検出対象遺伝子である 28S の 1 細胞当りのコピー数は種によって異なるが、他種では数万コピーという報告がある[6]。本種の当該コピー数は、現在確認の準備を進めているが、仮に数万コピーと考えると、採取したサンプル中（今回の嘉瀬川の付着珪藻 DNA サンプルは 25～50 cm² 分）に 1 個体でも本種が含まれていれば PCR 解析に使用する 1 µl 中には DNA の溶出 volume が 100 µl であることから、100 分の 1 の数百コピー存在することになり、PCR で十分検出できる濃度である。顕微鏡で同じ面積を確認するのは非現実的であることから、付着珪藻 DNA が高感度に検出できる理由が

理解できる。しかし、DNA は必ずしも生体由来とは限らず、Kuwaie ら[7]や Ogata ら[8]の報告にあるように、死骸や過去の堆積物に由来する可能性もある。今回の筑後川の DNA がどちらに由来するのかは不明であるが、筑後川や他の侵入河川の状態を見ると、一度侵入し、定着した河川からの根絶は困難と思われることから、リスクを持つ河川であるのかを知ることも重要と思われる。付着珪藻 DNA の検出は、生体量が少ない場合の在不在の判定のみならず、過去の侵入履歴（リスク）の確認にも利用できる可能性がある。

なお、珪藻の採取場所については、筑後川の地点 B1 のように、場所によっては本種を検出できず、他の地点では確認されることがあるため、サンプリングは珪藻の採取に適した複数の場所を確認して実施することが重要だと思われる。

今回使用した河川水 DNA からは、嘉瀬川、筑後川ともに検出されず、現場および上流の生物量が少ない場合、検出は困難であることが示された。検出可能な生物量については、筑後川の 1 月のサンプルを解析することで何かしらの目安が得られるかもしれない。なお、河川水からの検出感度上げるために、1) PCR 阻害がない限りサンプルを希釈せずに用いる、2) 抽出方法を改良する[9]、3) 採水量を増加するなどの検討も必要かもしれない。

検出系については、今回河川水の 1 サンプルのみで偽陽性があったが、検出限界以下での反応であり、増幅過程でのキメラ産物である可能性が考えられた。定量 PCR で単純明快な結果を得るには、内部配列の特異性を検出するプローブの追加も有効と考えられる。ただし、プローブの種類によっては、偽陽性が万が一出た場合にリアルタイム PCR での解離曲線での精査ができなくなることに留意が必要である。

8. 引用文献

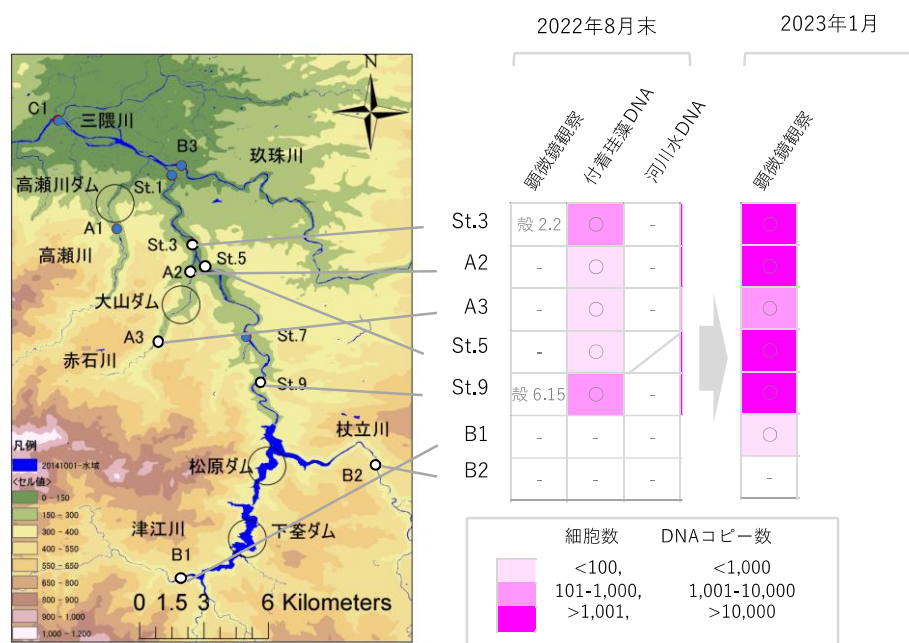
1. SUZAWA T, SEINO S, MAYAMA S. Blooms of *Cymbella janischii* (A. W. F. Schmidt) De Toni accompanied by *Gomphoneis minuta* (Stone) Kociolek & Stoermer from the upper stream of the Chikugo River, Kyushu, Japan : possibility of new alien diatom species. *Diatom*. 2011;27: 58–64. doi:10.11464/diatom.27.58
2. Keller SR, Hilderbrand RH, Shank MK, Potapova M. Environmental DNA genetic monitoring of the nuisance freshwater diatom, *Didymosphenia geminata*, in eastern North American streams. *Divers Distrib*. 2017;23: 381–393. doi:10.1111/ddi.12536
3. Miya M, Minamoto T, Yamanaka H, Oka SI, Sato K, Yamamoto S, et al. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *J Vis Exp*. 2016; e54741. doi:10.3791/54741
4. Kato-Unoki Y, Kurihara A, Kuge T, Shimasaki Y, Suzawa Y, Mayama S. Genetic evidence for the invasion of *Cymbella janischii* (A. Schmidt) De Toni, 1891 in Japan. *BioInvasions Rec*. 2022;11: 409–415. doi:10.3391/bir.2022.11.2.14
5. Bahls LL. *Cymbella janischii*—Giant Endemic Diatom of the Pacific Northwest: Morphology, Ecology and Distribution Compared to *Cymbella mexicana*. *Northwest Sci*. 2007;81: 284–292. doi:10.3955/0029-344x-81.4.284
6. Hariganeya N, Tanimoto Y, Yamaguchi H, Nishimura T, Tawong W, Sakanari H, et al. Quantitative PCR Method for Enumeration of Cells of Cryptic Species of the Toxic

- Marine Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. in Coastal Waters of Japan. PLoS One. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0057627
7. Kuwae M, Tamai H, Doi H, Sakata MK, Minamoto T, Suzuki Y. Sedimentary DNA tracks decadal-centennial changes in fish abundance. Commun Biol. 2020;3: 558. doi:10.1038/s42003-020-01282-9
 8. Ogata M, Masuda R, Harino H, Sakata MK, Hatakeyama M, Yokoyama K, et al. Environmental DNA preserved in marine sediment for detecting jellyfish blooms after a tsunami. Sci Rep. 2021;11: 16830. doi:10.1038/s41598-021-94286-2
 9. Wong MKS, Nakao M, Hyodo S. Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. Sci Rep. 2020;10: 21531. doi:10.1038/s41598-020-77304-7

鵜木（加藤）陽子、清野聡子（九州大学）

付録 1. サンプルング場所の地点情報

地点名		緯度経度
嘉瀬川	M0*	33.383707, 130.214539
	M1	33.431483, 130.203184
	M2	33.442830, 130.205672
	M3	33.454792, 130.199434
	A1	33.447998, 130.205828
	A2	33.457626, 130.209643
	A3	33.464744, 130.230938
	B1	33.457429, 130.197511
	B2	33.456132, 130.184975
	C1	33.457866, 130.198697
	C2	33.470315, 130.200357
筑後川	St3	33.265984, 130.960960
	A2	33.255509, 130.958947
	A3	33.224816, 130.940961
	St5	33.249609, 130.971924
	St9	33.207332, 130.985762
	B1	33.130079, 130.954332
	B2	33.181455, 131.035221
*2023年2月採取地点は 33.373106, 130.209434		



付録 2. 筑後川調査地点および結果. 地図中の白丸は調査地点を示す. 右図表中の“-”は非検出を、“殻”と数値は観察された死細胞の数を示す.

付録 3. 調査時の流量

地点名		2022年10月調査時流量 (cm ³ /s)	2023年2月調査時流量 (cm ³ /s)
嘉瀬川	M1	1.09	0.61
	A1	0.43	0.27
	B1	0.24	0.16
	C1	0.34	0.15



付録 4. 神水川水文観測所中原の 2022 年 9 月～10 月の水位情報. 国土交通省データー
より