

## 環境DNAを用いた河川内のアユ現存量推定法の開発

Development of estimation method for sweetfish biomass in rivers using environmental DNA

山口大学大学院創成科学研究科 准教授 赤松 良久

### (研究計画ないし研究手法の概略)

河川における生態系管理において、希少生物種だけでなくアユをはじめとした代表的な普通種の生息量の保全・再生が必要不可欠となっている。しかし、水域の生物量の把握は陸域と比べて困難であり、特に魚類に関しては網などを用いても正確な現存量を把握できていないという課題がある。これに対して、近年、湖沼や河川で採水した水サンプルに浮遊・存在する DNA の情報を調べることで、水棲生物の生息状況（在・不在、現存量、個体数密度など）を評価する生物モニタリング手法の開発が急速に進んでいる。この手法は、環境 DNA 分析と呼ばれており、環境 DNA とは水中などの環境中に存在する生物由来の DNA を示す。現在、様々な種の水棲生物にこの環境 DNA 分析が適用されている<sup>1)4)</sup>。

この環境 DNA 分析は対象とする水棲生物の在・不在の判別に関しては実用段階にある一方で、環境 DNA 分析を用いた水棲生物の現存量や個体数密度に関しては、十分な検討が行われていない状況である。それに対して、Doi et al.<sup>5)</sup>はアユを対象として目視調査による個体数・生物量と環境 DNA 濃度の間に高い正の相関関係があり、環境 DNA が相対的なアユの個体数・生物量を推定できることを明らかにしている。しかし、河川内では環境 DNA が河川内のどの程度の範囲のアユの個体数・生物量を反映しているかは明らかにされておらず、河川内のアユの現存量・資源量を推定するには至っていない。

そこで、本研究では環境DNAを用いたアユ現存量推定の可能性について、一般化線形モデルによるアユの空間分布予測やアユの分泌する環境DNA濃度に関する現地実験を援用して検討を行った。

### (実験調査によって得られた新しい知見)

#### 1. 研究方法

##### (1) 現地調査

##### a) 佐波川におけるアユの現存量調査

研究対象とした佐波川は山口県のほぼ中央に位置し、その源を山口県と島根県境の三ツヶ峰に発し、山間峡谷部から野谷川、三谷川、島地川等の支流を合わせ、防府市の市街地北部を流れ、周防灘に注ぐ幹川流路延長 56km、流域面積 460km<sup>2</sup> の一級河川である（図-1）。また、佐波川本流の国管理区間（河口 0km～26.2km）内には 15 基もの堰が存在していることが特徴の一つである。このように堰の連続する河川ではあるものの、佐波川は中国地方では比較的良好なアユの生産場であり、アユの放流が行われるとともに、数多くの天然遡上アユが再生産している。

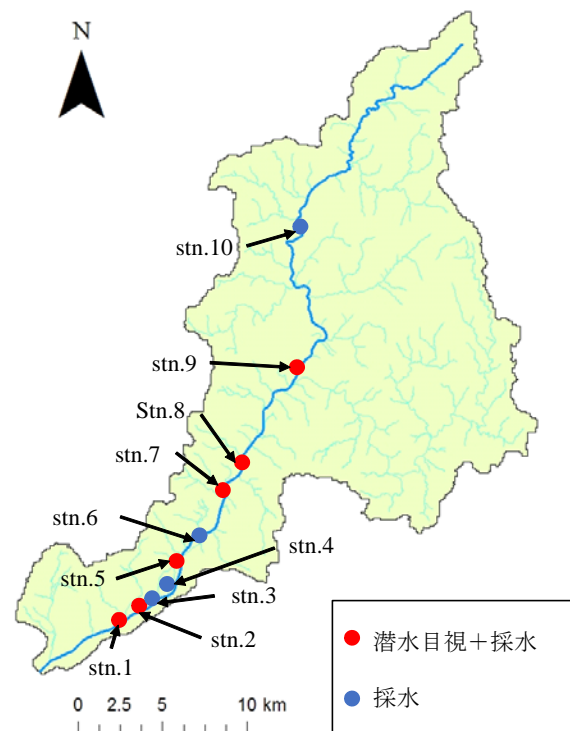


図-1 調査対象域および調査地点

2015年の5月28日、7月30日および10月7日に、佐波川本流のSt. 1, 2, 5, 7, 8, 9の6地点を対象に、アユの潜水目視調査を行った。各地点、河川の縦断（上下流）方向に80m前後の調査範囲を設定し、それぞれの範囲内において、約15m間隔で河川の横断方向に6つのラインを設置し、横断方向にスノーケリングによる潜水目視調査を行い、ラインの前後0.5m、合計1m内に出現したすべてのアユについて、「未成魚サイズ」であるか、「成魚サイズ」であるかを区別し、ラインごとの平均密度( $n/m^2$ )を算出した。さらに、乾ら<sup>6)</sup>で得られた「未成魚サイズ」および「成魚サイズ」の1個体あたりの重量を掛け合わせることで、ラインごとの平均湿重量( $g/m^2$ )を算出した。

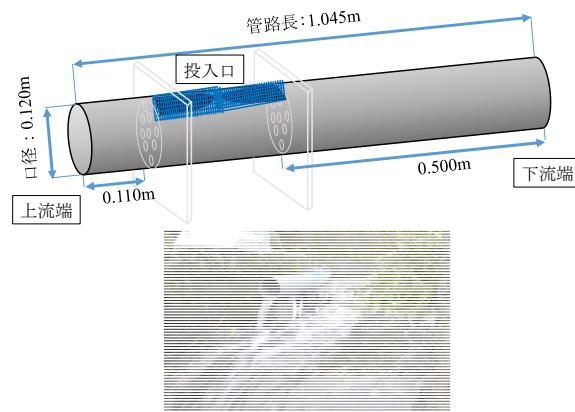


図-2 実験装置の外形図と設置の様子

また、現地調査では目視調査を行う前に、調査範囲に含まれる瀬の下流において、環境DNA分析のための採水を行った。別途、St. 3, 4, 6, 10の4地点では、潜水目視調査はおこなわずに、環境DNA分析のための採水をおこなった。

## b) アユの分泌する環境DNA濃度に関する現地実験

山口県の一の坂川の榎野川との合流部から約4kmの地点において、アユの単位重量当たりから放出されるDNA濃度の計測を行った。この地点では事前に環境DNA分析を用いて、アユが存在しないことを確認する。図-2に示すような円筒状のパイプ内にアユを入れ、下流側で環境DNA分析のための採水を行った。また、図-2に現地実験の様子も示す。実験はアユが1尾、2尾の場合に対して、それぞれ3回、2回実施した。パイプ内の流量はパイプ入口にて電磁流速計を用いて計測した。

## (2) 環境DNA分析

環境DNA分析は、基本的にDoi et al.<sup>5)</sup>で用いた手法と同様に抽出し、定量PCRをおこなった。以下に手順の概要を示す。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で漂白し、DNAを含まない脱イオン水によって洗浄した。サンプル水は、冷却して持ち帰った後、GF/Fガラスフィルター（pore size c. 0.7  $\mu m$ ; GE Healthcare, Little Chalfont）で濾過し、アルミホイルで包んで $-20^{\circ}C$ で凍結保存した。輸送時の混入を確認するために、輸送時のクーラーボックスの中に、採水ボトルに脱イオン水を入れたクーラーブランクを入れ、濾過時の混入を確認するためのブランクとともに、ネガティブコントロールとして用いた。フィルターからの抽出は、Uchii et al.<sup>7)</sup>に従って、サリベットチューブ(Sarstedt, Nümbrecht, Germany)およびDNA抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)を用いてDNA溶液を抽出した。抽出したDNAのサンプルは、TaqMan quantitative PCR (qPCR)を用い、PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham)によって定量PCRをおこなった。定量PCRをおこなう際、アユに特異的なプライマーおよび蛍光プローブについては、Yamanaka & Minamoto<sup>4)</sup>と同様のものを使用した。定量PCRの結果は、PikoReal software ver. 2.2.248.601 (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。

## (3) アユの空間分布予測

モデルには一般化線形モデル (GLM) を用い、各ラインにおけるアユの平均湿重量( $g/m^2$ )を目的変数

とし、各ラインの流速および河口からの距離、および各変数の 2 乗項を説明変数とした。モデルは 5 月、7 月、10 月それぞれで構築し、各月ともに、AIC が最も低いモデルをベストモデルとして採用した。さらに、ベストモデルで算出した予測値と実測値を単回帰分析することにより予測精度の検証をおこなった。なお、解析には統計ソフト R3.2.1 (R Development Core Team) を用いた。

さらに、乾ら<sup>6)</sup>と同様に、調査期間における平水時の平均的な流れ場を算出し、その結果に生物量予測モデルを外挿することにより、佐波川本川の国管理区間全域におけるアユの重量を見積もった。流れ場の計算には、河川の流れ場の計算ソフトウェアである iRIC (International River Interface Cooperative) ソフトウェアを用いた。計算に用いたソルバーについては、一般座標系を用いて河川の非定常平面二次元流れの計算を行うことが可能な Nay2D-Flood ソルバーを用いた。計算に用いた断面データは、2009 年 8 月に行われた測量結果を元に作成したメッシュデータを用いた。計算区間は、漆尾観測所を上流端とし、佐野堰直下を下流端とした。境界条件としては、上流端流量に漆尾観測所の平水流量 (7 月 :  $13.37\text{m}^3/\text{s}$ , 10 月 :  $12.49\text{m}^3/\text{s}$ ) を与え、下流端はどちらも等流水深とした。また、取水や支流による影響を考慮するため、8 分割して計算を行った (図-3)。支流などの横流入に関しては、まず、上流端の漆尾観測所の平水流量 (7 月 :  $13.37\text{m}^3/\text{s}$ , 10 月 :  $12.49\text{m}^3/\text{s}$ ) と、全区間の平水取水流量 (7 月 :  $13.14\text{m}^3/\text{s}$ , 10 月 :  $5.06\text{m}^3/\text{s}$ ) を足した新橋観測所の平水流量 (7 月 :  $21.82\text{m}^3/\text{s}$ , 10 月 :  $15.83\text{m}^3/\text{s}$ ) の流量差から、計算区間内の全横流入量を算出し、各支流の持つ集水面積割合で割り振ることにより算出した。なお、可視化には ArcGIS 10.2 (ESRI) を用いた。

#### (4) 環境 DNA が反映する空間スケールの検討

アユの現存量の空間分布予測結果を用いて、各調査地点の採水ポイントから上流に 100m, 200m, 400m, 800m, 1600m, 3200m, 6400m 区間におけるアユの総重量を算出し、各調査地点の環境 DNA フラックスとの関係を単回帰分析により検討した。また、アユの分泌する環境 DNA 濃度に関する現地実験結果を用いて、各調査地点の採水から得られる環境 DNA 濃度が反映するアユの総重量を見積もった。



図-3 計算区間の分割と流入する支流

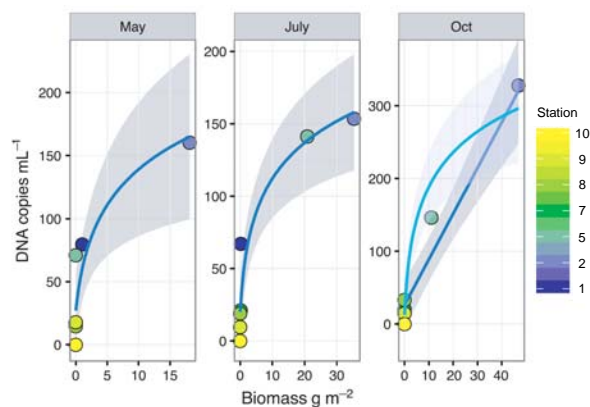


図-4 環境DNA濃度とアユの現存量の関係<sup>5)</sup>

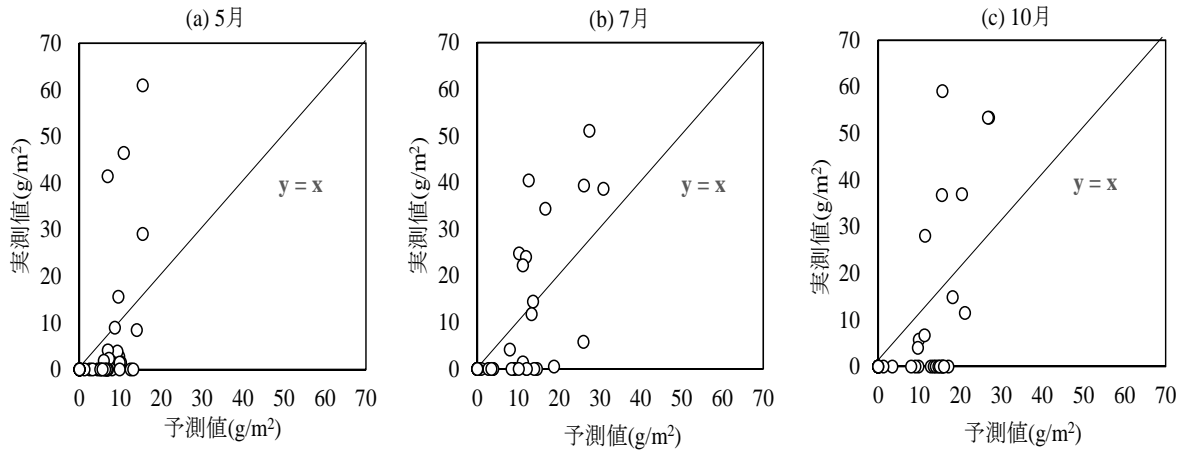


図-5 GLMによる生物量の予測値と実測値との比較

## 2. 結果および考察

### (1) 環境 DNA とアユの現存量の関係

図-4 に Stn.1, 2, 5, 7, 8, 9, 10 におけるアユの環境 DNA 濃度と各地点の採水地点直上の 3 ラインの平均湿潤重量の関係を示す<sup>5)</sup>。なお, Stn.10 は潜水調査対象地点ではないが, アユのはみ跡も確認されなかったため, アユの現存量はゼロとしている。この地点では環境 DNA 濃度もゼロであった。

図中の青い線は最適な回帰線をグレーで囲んだ部分は 95%信頼区間を示している。10 月の結果に関しては, 最適な回帰線に加えて, 対数回帰曲線を水色の線で示しており, その 95%信頼区間は薄紫で囲んだ部分である。最適な回帰線の  $R^2$  値は 5 月では 0.915, 7 月では 0.824, 10 月では 0.961 となり, すべての月で高い値を示した。このことから環境 DNA 濃度とアユの現存量には高い相関があることが明らかとなっている, また, 潜水目視調査でアユが発見できなかったものの, 捕食痕が存在した地点 (Stn.4, 5, 6) でも環境 DNA が検出されたことから, 採集や発見が困難な場合でも, 環境 DNA 分析による手法では生物の生息 (在/不在) を把握することが可能であると考えられる。本結果の詳細は Doi et al.<sup>5)</sup>を参照頂きたい。

### (2) アユの環境 DNA 供給量

表-1 に 1 尾, 2 尾のアユから分泌される環境 DNA 濃度に関する現地実験から得られた, パイプ内の流量, アユの重量, 環境 DNA 濃度, 単位時間・重量当たりのアユの環境 DNA フラックスを示す。環境 DNA 濃度としては 2 尾の場合が 4 倍程度高い値となっており, 単位重量・時間当たりのアユの環境 DNA フラックスで比較すると, アユが 2 尾の場合に 2 倍程度高い値となっている。これは, 2 尾の体表が接触することによって環境 DNA のもととなるアユの粘液の流水への混入量が増えるためと考えられる。

### (3) GLM によるアユの空間分布

AIC (赤池情報量基準) に基づくアユの現存量予測のベストモデルを以下に示す。

表-1 アユの分泌する環境DNA濃度に関する現地実験結果

	湿潤重量 (g)	環境DNA濃度 (coypies/mL)	流量 (m <sup>3</sup> /s)	環境DNAフラックス (coypies/s/g)
1尾	62	1.04	0.00136	22.8
2尾	129	3.73	0.00167	48.2

表-2 Stn. 2~5の環境DNA濃度, 流量, 環境DNAフラックスおよび上流区間 (100m, 200m, 400m, 800m, 1600m, 3200m, 6400m) のアユの総重量

	地点	環境DNA濃度 (copies/mL)	流量 (m <sup>3</sup> /s)	環境DNAフラックス ×10 <sup>8</sup> (copies/s)	アユの総重量(kg)						
					100m	200m	400m	800m	1600m	3200m	6400m
7月	Stn.2	153.5	9.92	15.23	67	119	255	439	985	1709	3589
	Stn.3	146.5	9.92	14.53	52	121	237	422	1058	1651	3725
	Stn.4	119.4	9.92	11.84	68	125	183	363	661	1565	3588
	Stn.5	141.2	13.49	19.05	75	144	310	492	1089	2050	3622
10月	Stn.2	327.9	11.26	36.92	70	128	281	505	991	1857	3355
	Stn.3	252.9	11.26	28.48	46	140	276	481	1091	1749	3316
	Stn.4	174.1	11.26	19.61	69	127	191	374	708	1387	2999
	Stn.5	146.4	13.18	19.30	48	97	220	359	780	1560	2802

アユの現存量 (5月) =  $11.68 \times V - 6.800 \times 10^4 \times D + 7.080$

アユの現存量 (7月) =  $22.66 \times V - 8.800 \times 10^4 \times D + 6.735$

アユの現存量 (10月) =  $20.22 \times V - 9.500 \times 10^4 \times D + 8.763$

ここで,  $V$  は流速(m/s),  $L$  は河口からの距離(m)である. 各月の現存量予測モデルから算出される予測値と実測値を単回帰分析し,  $R^2$  値を算出した結果, 7月の精度が 0.450 と最も高く, 次いで 10月で 0.356, また, 5月が最も低く, 0.210 であった (図-5).

比較的高精度なモデルが得られた 7月, 10月について, 平面 2次元河川流動モデルを用いて算出した流れ場の結果に外挿することにより, 佐波川の国管理区間内におけるアユの現存量を算出した. 図-6 にアユの現存量の空間分布を示す. 10月は7月に比べて下流域にアユが降下している様子がわかる.

### (3) 環境 DNA が反映する空間スケールの検討

表-2 に Stn.2~5 の環境 DNA 用のサンプル採取地点から 100m, 200m, 400m, 800m, 1600m, 3200m, 6400m 区間におけるアユの総重量を算出した結果を示す. また, 各地点の環境 DNA 濃度, 流量, 環境 DNA フラックスも同時に示す. この結果を用いて, 7月および 10月について, 環境 DNA フラックスと 100~6400m 区間の総重

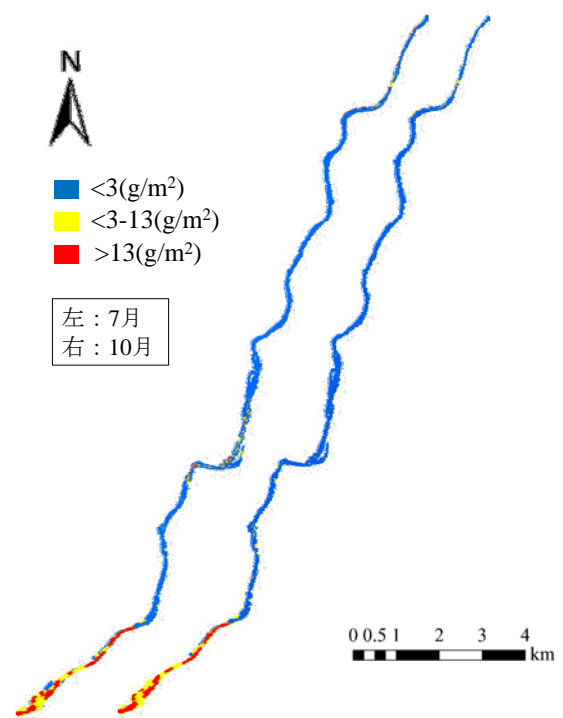


図-6 アユの現存量の空間分布

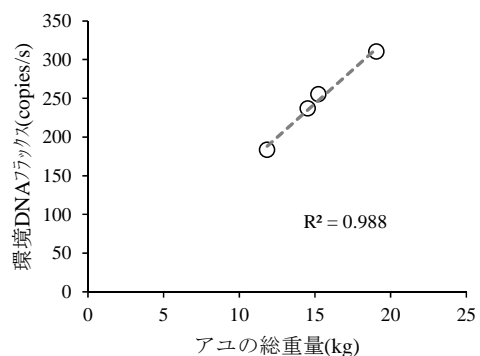


図-7 7月の400m区間のアユの総重量とアユの環境DNAフラックスの関係

量を単回帰分析し、 $R^2$  値を算出した。図-7 に一例として7月の400m区間の単回帰分析の結果を示す。400m区間のアユの総重量とアユの環境DNAフラックスは極めて高い相関があることが分かる。このように算出された $R^2$  値の100~6400m区間での変化を図-8 に示す。この結果から400~800m程度がもっと $R^2$  値が高いことが分かる。

また、実験から得られた単位重量・時間あたりのアユの環境DNAフラックスを用いて、表-2の環境DNAフラックスを割ることによって、その地点の環境DNAの供給源となっているアユの総重量を概算することができる。その概算結果を表-3 に示す。なお、この結果は環境DNAが含まれているアユの分泌物・糞が沈降しないと仮定した計算結果であり、過大評価になっていると考えられる。これは6400m区間のアユの総重量の結果(表-2)と比べても一桁大きい値である。したがって、この結果からは6400m以上のより長い区間のアユの総重量を反映していることが推察される。このように図-8の結果と大きく食い違う原因として、実験から得られた単位重量・時間あたりのアユの環境DNAフラックスが過小評価されていることが考えられる。表-1の結果からも分かるようにアユが群として存在する場合や河床で採餌行動をする場合には体表面を物理的にこすり付けることによって環境DNAを含む分泌物の流失が激増すると考えられる。また、実験で用いたアユは餌を与えられていない状態であるため、実際の自然河川内のように糞をしていないことも影響したと推察される。

Jane et al.<sup>9)</sup>は河川内で籠に入れたマスから流水中に放出された環境DNAの流下距離は240m程度であることを明らかにしている。このことから、図-8から予測される400-800m程度が環境DNA濃度が反映する範囲であるという結果が妥当であると考えられる。

### 3. まとめ

本研究では山口県の佐波川において、アユを対象として、河川水に含まれるDNA濃度による現存量推定の可能性について検討した。GLMによってアユの現存量の空間分布を予測し、その結果を用いて、環境DNA濃度とその地点からどの程度上流までのアユの総重量と一番相関が高いかを検討した結果、400~800m程度がもっとも $R^2$  値が高いことが明らかとなった。また、アユ一尾当たりから分泌する環境DNAフラックスを現地実験によって算出し、佐波川において計測された環境DNA濃度と比較することによって、環境DNA濃度が反映する上流の範囲を推定した。しかし、実験で得られたアユ一尾当たり

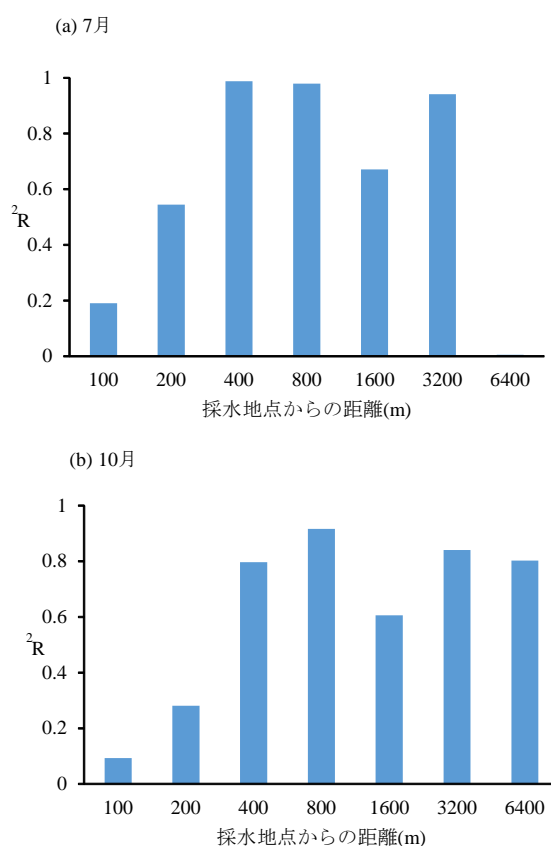


図-8  $R^2$  値の100m~6400m区間での変化

表-3 Stn. 2~5のアユの環境DNA濃度が反映するアユの総重量

	地点	反映するアユの総重量 (kg)
7月	Stn.2	66782
	Stn.3	63750
	Stn.4	51929
	Stn.5	83570
10月	Stn.2	161934
	Stn.3	124900
	Stn.4	86000
	Stn.5	84631

のからの環境 DNA フラックスは実河川に比べて、大幅に過小評価している可能性が高いことが示唆された。

河川中の魚の DNA 情報は排出する分泌物・糞に含まれているため、分泌物・糞の河川内での動態をシミュレーション等を用いて、より詳細に検討していく必要があると考えられる。それによって、採水して得られる環境 DNA 濃度が上流のどのぐらいの期間を反映しているかを河川流量等の水理条件と関連付けて正確に見積もることが可能になると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Doi H., Takahara T., Minamoto T., Matsushashi S., Uchii K. and Yamanaka H.: Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species, *Environmental Science & Technology*, Vol.49, pp.5601-5608.2015a.
- 2) Takahara T., Minamoto T. and Doi H.: Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLOS ONE*, 8, e56584, 2013.
- 3) Thompson W. L.: Hankin and Reeves' approach to estimating fish abundance in small streams: limitations and alternatives. *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol.132, pp.69-75, 2003.
- 4) Yamanaka H. & Minamoto T.: The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, Vol.62, pp.147-153, 2016.
- 5) Doi H, Inui R., Akamatsu Y., Kanno K., Yamanaka H., Takahara T. and Minamoto T.: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshwater Biology*, in press.
- 6) 乾隆帝, 一松晃弘, 赤松良久, 河野誉仁: 佐波川における魚類量予測モデルの構築, *土木学会論文集 B1(水工学)*, Vol.72, No.4, I\_987 -I\_1002, 2016.
- 7) Uchii K., Doi H. & Minamoto T.: A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources*, in press.
- 8) 赤松良久, 一松晃弘, 乾隆帝, 河野誉仁: 佐波川における底生動物量の空間分布予測モデルの構築, *土木学会論文集 B1 (水工学)*, 印刷中.
- 9) Jane S.F., Wilcox T.M., Mckelvey K.S., Young M.K., Schwartz M.K., Lowe W.H., et al.: Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams, *Molecular Ecology Resources*, Vol.15, pp.216-227, 2015.

#### ( 発表論文 )

- 1) 赤松良久, 乾隆帝, 一松晃弘, 河野誉仁, 土居秀幸: 環境DNAを用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討, *土木学会論文集B1(水工学)*, Vol.73, No.4, I\_1111-I\_1116, 2017
- 2) H. Doi\*, R. Inui\*, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara, T. Minamoto: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshwater Biology*, 62, pp.30-39, 2017. \*The both authors equally contributed.