



環境DNAを活用した固着性水生生物モニタリング手法の成立性について

高山, 百合子
赤塚, 真依子
伊藤, 一教
源, 利文

(Citation)

土木学会論文集B2(海岸工学), 75(2):I_1087-I_1092

(Issue Date)

2019

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 2019 公益社団法人 土木学会

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90007011>



環境DNAを活用した固着性水生生物 モニタリング手法の成立性について

高山 百合子¹・赤塚 真依子²・伊藤 一教³・源 利文⁴

¹正会員 大成建設株式会社 技術センター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町344-1)

E-mail:yuriko.takayama@sakura.taisei.co.jp

²正会員 大成建設株式会社 技術センター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町344-1)

³フェロー会員 大成建設株式会社 技術センター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町344-1)

⁴神戸大学大学院准教授 人間発達環境学研究所 (〒675-8501 兵庫県神戸市灘区鶴甲3-11)

環境DNAを活用したアマモ場モニタリング手法は、定点で採水し環境DNA量を取得したとき、特定の個所を出発した環境DNAが出発点の異なる環境DNAと同時に混在しない場合に成立する手法である。本研究では、単純な湾形状と実海域モデルを用いた粒子追跡計算によりこの成立性について検討した。全国のアマモ場海域形状を単純モデル化した10タイプについて、特定エリア出発の粒子が、流れとの組み合わせによっては独占的に出現するケースを確認した。次に実海域モデルを用いて同様の傾向が得られる可能性を示したことから、アマモ場分布と流れの組合せによってはこの手法が成立する場合があることが確認できた。

Key Words : *environmental DNA, seagrass, Zosteraceae, particle calculation, water sampling*

1. はじめに

水生生物の調査手法として着目されている環境DNAは、採水サンプルに含まれるDNAの分析により生物種情報が得られることから^{1,2)}、従来の潜水目視等によるモニタリングに付随する労力を解消し、より詳細なモニタリングを実現できる可能性がある。環境DNAを用いた水生生物のモニタリングについては、数値計算と組み合わせで海草場をモニタリングする手法が提案されている^{3,4)}。この手法は、海草やサンゴなど水域で移動しない固着性生物を対象にして、数値計算により対象生物の生息場から発生した環境DNAの経路を予測し、経路上における採水により対象生物の変化を捉えようとするものである。この手法は、定点で採水し環境DNA量の時間変化を取得したとき、特定の個所を出発した環境DNAがある時刻を独占する、すなわち出発点の異なる環境DNAが同時に混在しない場合が手法成立の理想となる。海草場を対象とした既往の研究において成立性に言及するものはあるが、数値解析の必須条件（海草分布、その分布量など）が不確実な検討のため、その結果は定性的かつ概念的にとどまり、手法の成立性が確認されていないのが現状である³⁾。本研究ではこのモニタリング手法の成立性について検討することを目的として、単純

化した海域モデルを用いての環境DNAを模擬した粒子追跡計算を行い、採水点および採水時刻とDNA発生位置の一義的關係を調べ、手法の成立性を検討した。次に実海域モデルにより同様の検討を行った。

2. 実施内容

(1) 単純化した湾モデルによる検討

海草場の環境DNAを追跡の対象として、全国のアマモ場海域を整理し海域形状を単純化したモデルを作成した。アマモ場海域は、自然環境保全基礎調査（藻場調査）報告書⁵⁾を用いてアマモ場が確認された55海域のうち、外海からの流入口を持つ湾形状（流入部を有する湖、沼を含む）である46海域を選定し、湾形状を10タイプに分類した（表-1）。本研究ではこれらの海域を便宜上「湾」と呼ぶこととし、表-1は、単純化した湾形状と代表的な海域名称、選定した海域数を示した。またこれらの地形を用いて行った潮汐を外力とした流動解析により得られた流況パターンのうち、上げ潮時の流況を図示した。湾形状のタイプ1は、湾口が広く湾内には循環が発生しない往復流タイプである。タイプ2~4は、湾口部が2カ所、中央1カ所、片側1カ所の形状である。タイプ5~7は、湾口から湾奥までの奥行方向距離が相対的に長く、湾口水

表-1 海草場が生育する海域形状の分類

タイプ1	タイプ2
10/55海域 崎山湾、常滑等	1/55海域 サロマ湖
タイプ3	タイプ4
1/55海域 風蓮湖	2/55海域 トウフツ湖、湧洞沼
タイプ5	タイプ6
4/55海域 能取湖、浜名湖等	4/55海域 火散布沼、万石浦等
タイプ7	タイプ8
1/55海域 山田湾	9/55海域 東京湾、伊勢湾、英虞湾等
タイプ9	タイプ10
7/55海域 久里浜湾、油谷湾等	7/55海域 七尾湾、鹿児島湾等

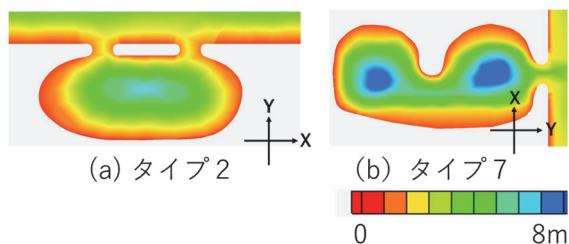
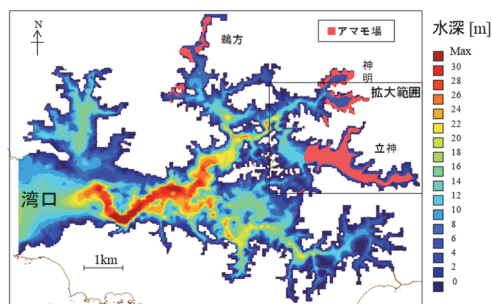
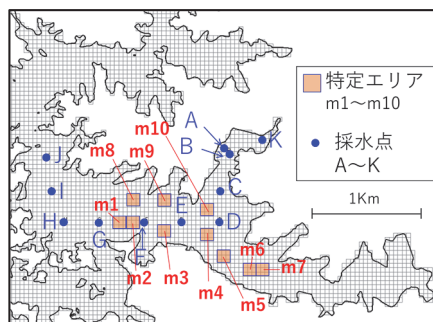


図-1 海底地形の一例

路部が短いタイプ5、長いタイプ6、湾内に岬のように張り出た地形を持つタイプ7である。タイプ8～10は、湾口が相対的に広い形状であり、タイプ8は、湾口から湾奥までの距離が長く、本研究において実海域モデルの対象とした三重県英虞湾はこのタイプに分類された。タイプ



(a) 海底地形と推定アマモ場



(b) 海草場の特定エリア

図-2 対象海域（英虞湾）

9, 10は、湾形状の縦横比が均等な形状であり、タイプ10は湾口部に島を有する。これら10タイプを用いた潮流解析を実施した結果、タイプ2～9は表-1に示した循環流が発生するタイプであったが下げ潮時には循環流が解消されて一方向流となった。なお今回整理したアマモ場海域は、表-1の湾形状タイプ以外に、海峡のような水路形状、外洋に面したタイプ、島周辺タイプがあった。本研究では、上記10タイプの湾形状を用いて、以下の手順により粒子追跡計算を行った。

上記10タイプの海底地形は概ね同様に作成し、湾央が最も深く6～8mとなるすり鉢状であり、湾口は約3m程度とした。一例としてタイプ2と7の海底地形を図-1に示す。計算手順は、まず潮汐を外力とした流動解析を実施し、次に湾内に設定した3カ所の海草場に環境DNAに見立てた粒子を海草場の最下層（5層）に投入し、流動解析結果に基づいて時々刻々の粒子位置を追跡した。海草場の位置は表-1の湾形状に緑のハッチで図示した（表-1の海草場A～C）。海草場は、一般にアマモの生育条件が水深に大きく依存していることから同水深帯に設定することが現実的であるが、ここでは結果を分かりやすく理解するために離れた3カ所とした。粒子はこれらの海草場位置に5mの等間隔で1083個を配置し、10分毎に投入した。採水点は表-1に示すst1～st3の位置であり、2m×2m×全水深のセル内の通過粒子数（以下、粒子数）を確認した。この採水点の範囲は、実際の採水に対し過大であるが、計算では採水範囲の大きさに通過粒子数が比例する傾向を確認しており現状のモデルで通過粒子数の時間変化傾向が把握でき、極力狭い範囲として設定した。

表-2 主な計算条件

項目	モデルタイプ	湾形状モデル	英虞湾モデル
計算領域		東西 3km×南北 3km	東西 10km×南北 8km
平面座標系	座標系	直交直線座標系	
	格子幅	15m	40m
鉛直座標系	分割数	5層 (σ座標系)	10層 (σ座標系)
水平渦動粘性・拡散係数		10m ² /s	
計算期間		5日間(助走1日間)	2018/1/1~1/16(助走10日間)
タイムステップ		3秒	
境界条件 (外洋)	潮汐	M2潮	気象庁潮位予測値 (尾鷲)
	水温・塩分	-	気象庁 (津, 名古屋)
粒子の投入	初期位置	表-1	図-2 (b)
	投入数	1083個 (均等)	972個 (均等)
	時間間隔	10分	

(2) 実海域モデルによる検討

三重県英虞湾を対象として、海草の環境DNAを粒子に見立てた粒子追跡計算を実施した。対象海域および海草場、採水点 (K~Jの11地点) を図-2に示す。粒子の初期位置となる海草場は120m四方の特定エリアを10カ所 (m1~m10) 設定した (図-2 (b))。特定エリアとは、モニタリング対象エリア、すなわち、採水点において、各特定エリアから出発した環境DNAが、他の特定エリアから出発した環境DNAと区別できるか否かを確認するエリアである。採水点はK~J (2m×2m×水深0.5m~1.5mの1m) である。英虞湾は、表-1のタイプ8のように湾口側から湾奥にかけて中央付近は往復流であるが、その両岸には岬や入江が多くあるので複雑な流れが発生すると考えられる。そこでモニタリング対象とする特定エリアは湾奥からやや岸側に寄った10エリア (m1~m10) とした。これらのエリアから出発した粒子が、図2(b)に示したその他のエリアから出発した粒子とは区別して採取できる可能性について検討を行った。

3. 計算方法

環境DNA分析は採取した海水をろ過し、ろ紙上に残った物質を対象になされるため、環境DNAを水溶性ではなく極微細な物体と考え粒子追跡計算を採用している。表-1および図-2(a)に示す範囲を計算領域として、まず潮汐を外力とした流動解析を行い⁹⁾、次に各計算格子の流速成分を10分間隔で取出し時間的に線形補間した流速を用いて、海草のDNAを粒子に見立て3秒間隔で粒子の追跡を行った。主な計算条件を表-2に示す。アマモの環境DNAは、海草場から時々刻々と放出される極微細な草体片と想定し流れに完全受動な粒子と設定した。

粒子の投入位置は、表-1に示した海草場A~C、および、図-2(b)に示した特定エリア (m1~10) である。これら範囲の底層 (湾形状は5層、英虞湾は10層) に表-1に示した粒子個数で均等配置した。粒子の投入時間は10分ごとである。計算結果は、採水点について時々刻々の通過粒子数を整理した。

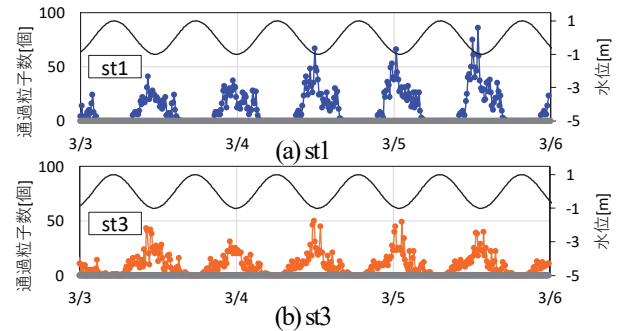


図-3 各海草場を出発した粒子の数 (タイプ1)

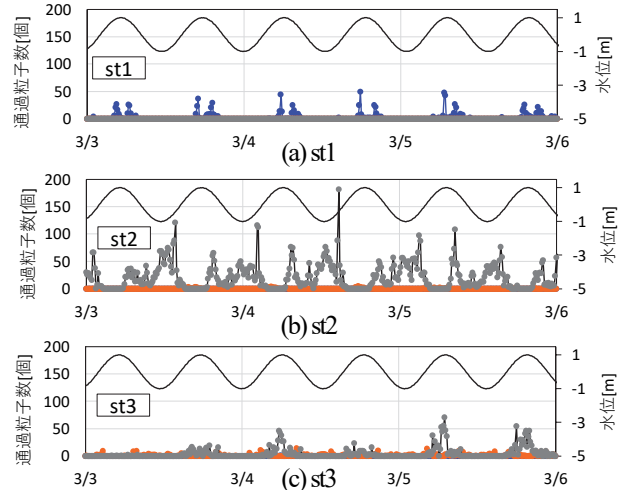


図-4 各海草場を出発した粒子の数 (タイプ2)



4. 検討結果

(1) 湾形状モデルによる検討

図-3~図-10は、3カ所の海草場からそれぞれ発生した粒子について、採水点における粒子数の時間変化を抜粋して示した。特定位置から出発した粒子を他の海草場から出発した粒子と区別するためには、採水地点および時刻において他の海草場から出発した粒子と混在していないか、混在するが位相や粒子数が異なることで区別する方法が考えられる。

タイプ1 (図-3) は、海草場A, Bから出発した粒子のみが間欠的に表れており、潮汐周期と同程度の時間間隔で増減が見られた。タイプ1はst1~st3においてこの傾向が見られていた。採水点で粒子が混在しなかった理由として、タイプ1は湾口から湾奥にかけて一様な往復流であるためと考えられた。

タイプ2 (図-4) は、st1では海草場Aから出発した粒子のみが間欠的に表れたが、st3では海草場BとCから出発した粒子が混在して出現した。st3における海草場C出発の粒子は、海草場B出発に対して卓越していることが確認できた。この理由として、表-1より、タイプ2はst3を通る循環流が形成されていることからこの流れにより海草場Cの粒子がst3に運ばれたことが挙げられる。st2で

は海草場B, Cから出発した粒子が出現し, 特に海草場C出発の粒子が卓越した. またst2は, st1およびst3を通る循環流の間に位置するがst1に出現した海草場A出発の粒子は出現しなかった. これは, st1を通る循環流が小さいためにst2まで到達しなかったと考えられた.

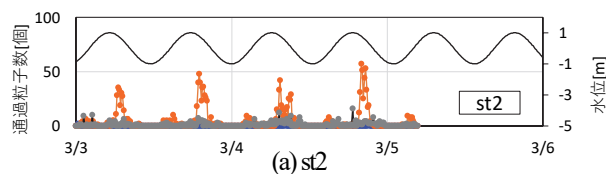
タイプ3 (図-5) は, st2とst3において海草場A~Cから出発した粒子が混在して出現し, 海草場B出発の粒子が, 海草場AとC出発に対して卓越する時間帯が間欠的に発生した. st2はst3に比べて, 海草場B出発粒子の卓越が顕著であり, 海草場Bを出発した粒子が独占的に発生している時間帯が確認できる. 表-1よりタイプ3はst2とst3を通る循環流が形成されていたことから, 海草Bと海草Cから出発した粒子がst2とst3に到達する際に粒子数や時刻に差異が生じたものと考えられた.

タイプ4 (図-6) は, 3カ所の海草場から出発した粒子が混在したが, st3では海草場Bから出発した粒子が優占して卓越する時刻が確認できる. タイプ4は, 3カ所の海草場を通過する大きな循環流が形成されていることから, 海草場A~Cを出発した粒子が採水点において時間差を持って出現したと考えられた.

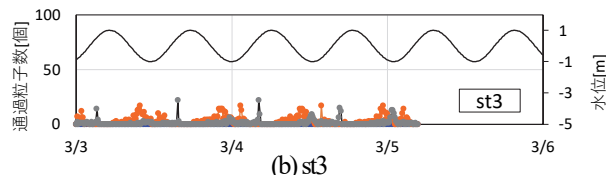
タイプ5から8は, タイプ2から4に対して湾の奥行方向に距離がある形状で, 循環流の形成範囲は湾奥まで広がっていない. タイプ5は粒子の出現傾向がタイプ6と類似しており, st2は海草場Cの粒子のみが出現したが, st3では海草場AおよびB出発の粒子が混在した. st3において出現するタイミングは海草場A出発とB出発において明確な差異が見られ, 海草場A出発の粒子に対してB出発の粒子が多い傾向であった. これら特徴の理由は循環流に起因すると考えられた.

タイプ7は, st1において海草場A出発の粒子が高い頻度で出現していた. これは, st1がタイプ7の岬背後に位置しているために海草場Aから出発した粒子が留まりやすくなったためと考えられ, 特定海草場から出発した粒子が採水点において高い頻度で出現するならば, このことも他の海草場から出発した粒子と区別できる要因になり得る. st3では海草場B出発の粒子が卓越して間欠的に発生した. これはst3通過する流れは往復流となっていることから海草場B出発の粒子が多く運ばれたと考えらる.

タイプ8は, タイプ5および6と類似していたが, st1は海草場Aを, st3において海草場Bをそれぞれ出発した粒子の出現頻度が高い. これは, タイプ8がタイプ5および6に対して湾口が広いために, 湾口付近に形成される海草場Aとst1, および, 海草場Bとst3を通過する循環流が小さくなったことでそれぞれの採水点に運ばれる粒子の頻度が高まった可能性が考えられた. またst3は, 海草場AとBをそれぞれ出発点とした粒子の出現タイミングに差異が生じていることから, 採水においてこれらを区

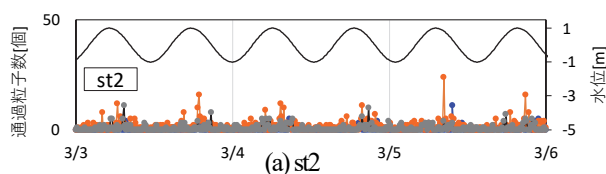


(a) st2

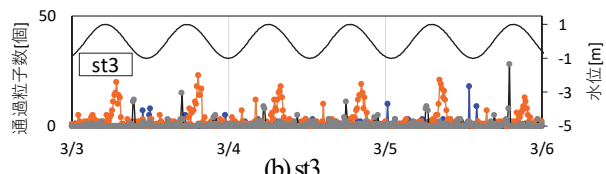


(b) st3

図-5 各海草場を出発した粒子の数 (タイプ3)

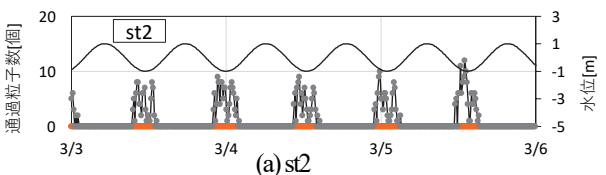


(a) st2

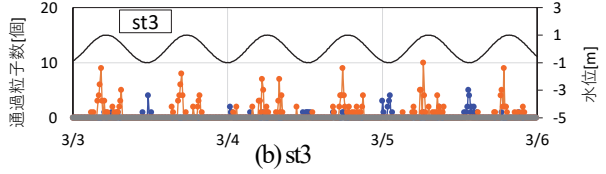


(b) st3

図-6 各海草場を出発した粒子の数 (タイプ4)

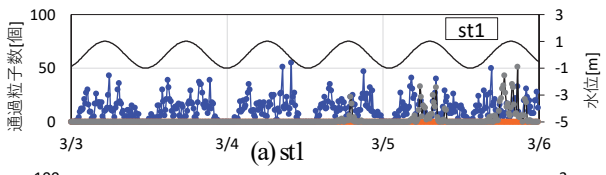


(a) st2

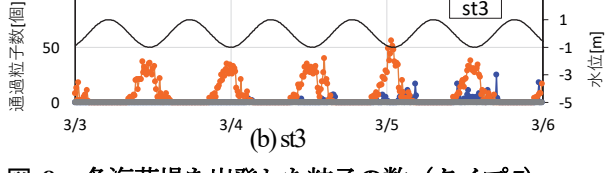


(b) st3

図-7 各海草場を出発した粒子の数 (タイプ5)



(a) st1



(b) st3

図-8 各海草場を出発した粒子の数 (タイプ7)



別できる可能性がある.

タイプ10は湾口に円状の島があることで循環流が形成されおらず, 粒子の時間変化はタイプ1に類似し, 他の海草場を出発点として粒子との混在は少ない.

表-3に, 上記10タイプについて粒子の時系列変化を用いて検討した結果を整理した. 整理の方法は, 各湾タイ

プにおいて採水点ごとに海草場A～Cから出発した粒子が区別できそうな度合いを4段階（度合いが高い方から◎, ○⁺, ○, △）で評価した。◎は、特定の海草場から出発した粒子のみが出現したケースであり往復流タイプや循環流のない領域が採水点であるケースが多かった。○⁺は、特定海草場出発の粒子が卓越する場合や、卓越するタイミングに明確な差異がある場合である。○, △は、○⁺に比べると卓越量や発生タイミングの差異が不明瞭であるケース順である。表-3より、粒子が区別しやすいケースは、タイプ1や10の往復流パターンと、タイプ5, 6のように循環流が形成される範囲に複数の海草場が位置していないパターンであった。粒子は循環流に乗って採水点に運ばれてくると考えられるが、この経路上の海草場から出発した粒子が、高頻度で出現したり、経路上にない海草場からの出発粒子に対して卓越する可能性が考えられる。

以上より、単純な形状モデルではあるが、流況や循環流パターンに起因して環境DNAの量やタイミングに差異が生じ、特定位置から出発した環境DNAを区別できる可能性を示すことができた。また10タイプ全てにおいて、特定位置から出発した粒子を区別できる可能性があると考えられた。

(2) 英虞湾モデルによる検討

特定エリア（m1～m10）から出発した粒子数の時間変化を採水点ごとに示す（図-11）。表示時間は24時間分とした。

ここでの採水点は、実際の採水状況をできるだけ模擬するために2m×2m×水深0.5m～1.5mの1m層の範囲について確認したため、粒子数は少ない結果となったが、粒子が間欠的に出現する傾向や時間経過とともに増減する傾向が見られた。

C点は、1/15（6:00）前後にm10、1/15（15:00）前後にm1～m3をそれぞれ出発した粒子が出現した。このうちm10を出発点とする粒子が現れる頻度が高く、1/15（6:00）前後では数時間程度の出現が続いた。潮汐とのタイミングを見ると、1/15（6:00）前後は満潮を挟んだ時間帯であることから、m10を出発した粒子は、上げ潮時にC点より湾奥に到達し、下げ潮時に再度C点を通過したと考えられた。

D点は、今回検討した採水点の中では多くの粒子が出現していた。最も高い頻度で出現した粒子はm3とm10を出発点とする粒子であり、1/15（12:00）前後では3時間程度、m10が独占的となる出現となった。E点においては1/16（0:00）にm10を出発点とする粒子が多く出現していた。m10を出発した粒子は、D点とE点において干潮時に出現していたことから、D点、E点では、m10を出発点とする粒子が上げ潮に湾奥に運ばれ、干潮時にD点、

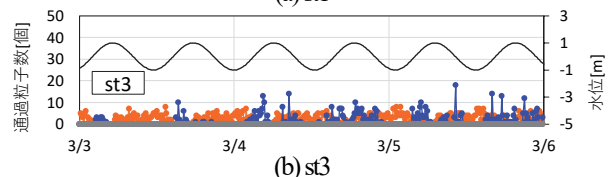
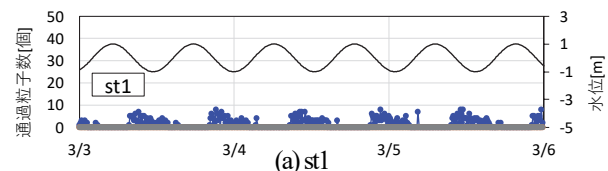


図-9 各海草場を出発した粒子の数（タイプ8）

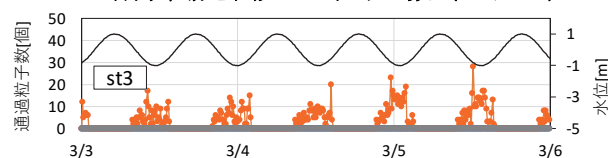


図-10 各海草場を出発した粒子の数（タイプ10）



表-3 特定エリアから出発した粒子の区別しやすさ評価

	st1	st2	st3		st1	st2	st3
タイプ1	◎	◎	◎	タイプ6	◎	◎	○ ⁺
タイプ2	◎	◎	○	タイプ7	○	◎	○ ⁺
タイプ3	◎	○ ⁺	○	タイプ8	◎	◎	△
タイプ4	△	△	○	タイプ9	◎	◎	△
タイプ5	◎	◎	○ ⁺	タイプ10	◎	◎	◎

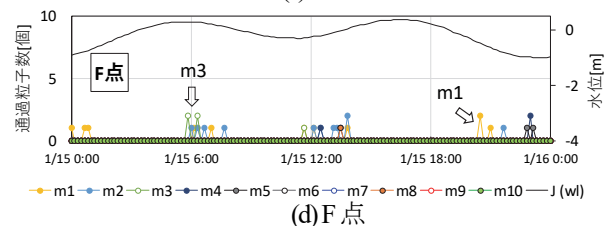
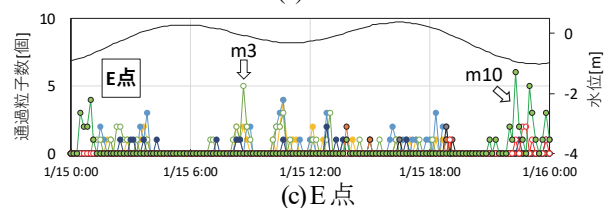
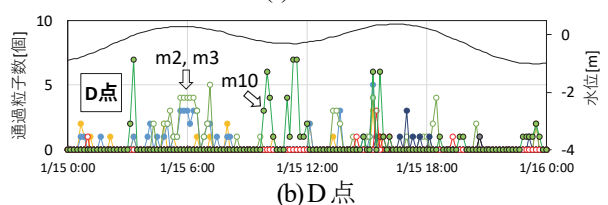
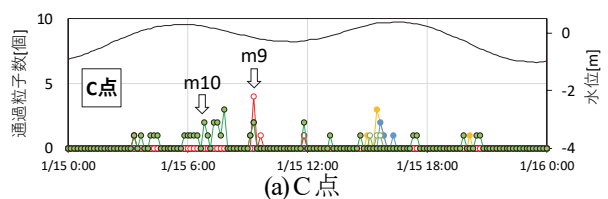


図-11 実海域モデルによる粒子数の時間変化

E点に到達したことが推測できる。

図にF点を示したが、F点より湾口に近い採水点G点～

J点は、湾奥の採水点に比べて粒子の出現頻度が低下していたが、出現パターンは間欠的であった。粒子の出現頻度低下は、海草場（m1～10）と採水点の位置および流れの組合せに関連すると考えられる。

以上より、実海域の流れを用いた特定エリアを出発する粒子の出現状況は、単純な湾形状モデルの結果に比べると複雑となったが、粒子の出現が間欠であることや特定エリアの位置によっては卓越や卓越するタイミングの差異により独占的に出現する可能性が示唆された。これは複数の海草場から同時にDNAが発生しても、特定のエリアを起源とするDNAが独占的に通過する地点とタイミングがあり、これらの地点と時刻で採水することで他の出発点と区別されたDNAを採取できることを示唆した。すなわち環境DNA分布と流れの組合せによっては、この手法が成立する場合があることが確認できた。

今後は、計算における環境DNAモデル化や計算モデルの精度を向上させ、特定位置から出発した粒子が卓越して出現する要因について、流況と海草場位置の関係から検討する予定である。

6. まとめ

環境DNAを活用したアマモ場モニタリング手法は、定点で採水し環境DNA量の時間変化を取得したとき、特定の個所を出発した環境DNAがある時刻を独占する、すなわち出発点の異なる環境DNAが同時刻に混在しない場合に成立する手法である。本研究では、単純な湾形状やひとつの実海域モデルという限定的な条件ではあるが、モニタリング手法の成立性について検討した。主な結論を以下に示す。

1) 湾形状モデルにより、すべての形状タイプにおいて、採水点の位置によって特定エリア出発の粒子が卓越するケース、または、卓越のタイミングが異なるケースがある可能性を示した。流況と海草場の位置の組合せによって、他を出発した粒子と区別できる可能性がある。

2) 実海域モデルにより、特定エリアから出発した粒子が他のエリアから出発した粒子に対して独占的に出現する可能性を示した。これは複数の海草場から同時にDNAが発生しても、特定のエリアを起源とするDNAが独占的に通過する地点とタイミングがあり、これらの地点と時刻で採水することで他の出発点と区別されたDNAを採取できることを示唆した。すなわち環境DNA分布と流れの組合せによっては、この手法が成立する場合があることが確認できた。

今後は、環境DNAの分解等、特性をモデル化し計算モデルの精度を向上させたい。うえて、海草場と採水点の関係を詳細に整理し、モニタリング手法の成立性についてさらなる検討を進める予定である。

参考文献

- 1) 源利文, 山本哲史, 笠井亮秀, 近藤倫生: 環境 DNA を用いた沿岸域における魚類モニタリング, 沿岸海洋研究, Vol.53, No.2, pp.173-178, 2016.
- 2) 高原輝彦, 山中裕樹, 源 利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～, 日本生態学会誌, Vol.66, pp.583-599, 2016.
- 3) 高山百合子, 赤塚真依子, 伊藤一教, 源利文: アマモ場のモニタリング手法における環境 DNA の活用について, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), Vol.74, No.2, I_1231-I1236, 2018.
- 4) 赤塚真依子, 高山百合子, 伊藤一教, 森本哲平, 源利文: 海草場を対象とした環境 DNA 検出方法と三次元数値解析の適用性に関する検討, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), Vol.74, No.2, I_1225-I1230, 2018.
- 5) 環境庁自然保護局: 第4回自然環境保全基礎調査 海域生物環境調査報告書 (干潟, 藻場, サンゴ礁調査), 第2巻 藻場, 1994.
- 6) Deltares: Delft3D-FLOW User Manual, 672p, 2014.

(2019.3.13 受付)

A FEASIBILITY STUDY ON A MONITORING METHOD OF NON-MOVING ACUATIC ORGANISM USING ENVIRONMENTAL DNA

Yuriko TAKAYAMA, Maiko AKATSUKA, Kazunori ITO and Toshifumi MINAMOTO

The seagrass bed monitoring method using environmental DNA (eDNA) can be established in the following cases. When sampling water is collected at a fixed point and the time change of the amount of eDNA is acquired, eDNA starting from a specific location does not coexist as eDNA from other starting points at the same time. In this study, we examined this feasibility by particle tracking calculation using simple bay model and the Ago bay model as a real sea. Using 10 types of simple bay models and the Ago bay model, it was confirmed that particles starting from a specific area appeared exclusively at the water sampling point depending on the flow pattern, and it was confirmed that this method might be established depending on the combination of seagrass distribution and flow of the bay.