

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14313

研究課題名(和文)環境DNAを用いた高時空間解像度の河川内生物量推定法の開発

研究課題名(英文) Estimation with high spatio-temporal resolution on abundance of stream fish using environmental DNA analysis

研究代表者

赤松 良久 (Akamatsu, Yoshihisa)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：30448584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、室内実験による環境DNA濃度が魚類のバイオマスや密度を高精度に反映する指標であること明らかにした。また、流水環境にてアユを対象とした実験をおこない、環境DNAの影響範囲と減耗の傾向、DNAを含む物質であるフンと粘液の沈降速度が明らかになった。また、流動モデルを用いた環境DNAを含む物質の流下シミュレーションにより、流水環境中においては、DNAを含む物質は流下に伴って破碎され、微細な粒子となって漂流または沈降することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted three experiments using fish and simulation of dynamics of eDNA. They showed that (1) the amount of released eDNA were higher in slow velocity than fast velocity and eDNA concentration and biomass have a strong positive correlation in a running water, (2) the influence distance of eDNA in stream was between 1000m and 2000m, (3) excrement settles faster than mucus in static water and (4) the flow model showed that the distance of all particles containing eDNA settling was shorter than real stream.

研究分野：河川工学

キーワード：環境DNA アユ カワムツ バイオマス

### 1. 研究開始当初の背景

近年、共同研究者らは水域に生息する魚類の在・不在や生息量を採取した水サンプルに浮遊・存在する DNA の情報 (環境 DNA) を調べることで簡便に評価できる手法を開発した。しかし、河川などの流水中においては DNA 濃度と魚類や底生動物のバイオマスの関係が明確にされておらず、環境 DNA 技術を生物量のモニタリングに用いる際の大きな障壁となっている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は室内実験・現地調査に基づき流水中の環境 DNA 濃度と河川内の各種生物量の関係を明らかにし、流れ・熱・物質輸送シミュレーションと組み合わせることによって、河川の複数地点における環境 DNA-バイオマス曲線を構築する。これによって、採水のみによる高時空間解像度の河川内生物量推定法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 カワムツを用いた室内実験

水路実験では河川性遊泳魚の中で、採集および飼育が容易であるカワムツを対象とした。最新の河川水辺の国勢調査の結果、カワムツは西日本全ての一級河川において生息していることが明らかとなっており、西日本において代表的な純淡水遊泳魚であると言える。実験水路は上流端水槽、水路部、下流端水槽で構成されている (図-1)。上流端水槽と水路部は連結されており、水路部は長さ 600cm、幅 15cm、高さ 20cm のアクリル製の直線水路となっている。また、実験魚が上流端水槽、下流端水槽へ入り込まないように、水路部の上流端、上流端から 50cm 地点にアクリル製の多孔質の仕切り板を設置し、実験中のカワムツの遊泳区間とした。なお、本実験で使用した水はカワムツの DNA を含む分泌物や排泄物を含んでいるため、再利用が不可能である。そのため、下流端水槽に排水用の配管を取り付け、実験で使用した水は常時排水を行えるようにした。実験は下流の仕切り板から 15cm 下流の位置で流速が約 0.2(m/s)となる流れの条件で行った。この条件で、カワムツを流水中に投入してから 15 分後以降は、流水に流されたり逆らったりする遊泳行動はとらなくなりほぼ静止した遊泳行動をとることが確認された。したがって、カワムツが十分に水路に馴致した流水開始から 30 分後に、下流の仕切り板から 15cm 下流の位置で、環境 DNA の分析のための採水を行った。

#### 3.2 アユを用いた野外実験

野外実験は、環境 DNA を用いた予備調査によりアユが確認されなかった山口県の厚東水系甲山川で、2017 年 6 月および 9 月に 2 回実施した。まず、堰直下のプール部を網で仕切って養殖アユを 50 尾放流し、6 月は

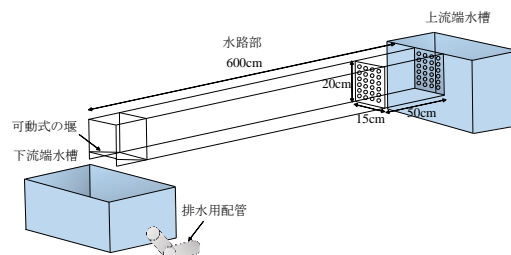


図-1 室内実験に用いた水路

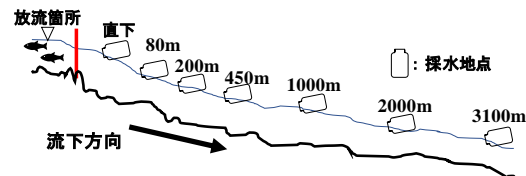


図-2 野外実験の模式図

放流箇所直下地点と放流箇所から 80m, 200m, 450m, 1000m, の合計 5 地点で、9 月は前述の 5 地点に 2000m, 3100m を追加した合計 7 地点 (図-2) にて、4 時間の馴致の後に、30 分間隔で 3 回採水 (1L) をおこなった。各採水地点の流量や流速の測定は、馴致時間中にポータブル電磁流速計 FH950 (日本ハイコン株式会社) を用いておこなった。

#### 3.3 環境 DNA 分析

環境 DNA 分析は以下のような手順で行った。サンプル水は、10%次亜塩素酸ナトリウムで洗浄して DNA を含まない脱イオン水で洗浄したボトルを用いて採水し、冷却して持ち帰った後、サンプル水を粒子保持径 0.7 $\mu$ m(GF/F)のガラスフィルターで濾過し、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。抽出した DNA のサンプルは、quantitative PCR (qPCR) を用いて、Piko Real 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(2016)に準拠したものを使用した。また、標準試料としてアユの DNA30000, 3000, 300, 30 コピーについて測定し、検量線からサンプルの定量をおこなった。定量 PCR の測定結果には、サンプルごとに 4 ウェルの平均値を用いた。

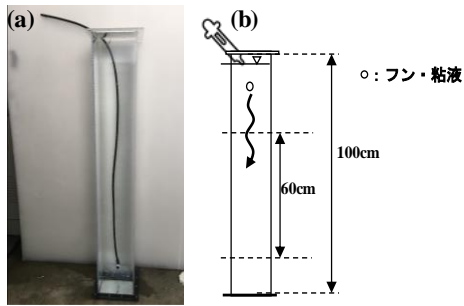


図-3 沈降実験の実験装置  
(a)実際の装置(b)模式図

### 3. 4 アユを用いたフン・粘液の沈降実験

2017年10月28日に佐波川で捕獲したアユを用いて実験をおこなった。フンは生時に排出されたものを採取した。粘液は、氷冷により即殺した個体の体表をアルシアンブルー溶液(pH2.5)で染色した後、採取した。フン・粘液ともに、スポイトで吸い取り、アクリル製の実験装置(図-3、内寸14cm×14cm、高さ100cm)に水を満たして、静水状態にしてから落下させ、60cm落下する時間を計測した。フンは50回、粘液は20回の繰り返し実験をおこない、95%信頼区間と区間内データの平均を算出した。

また、実験前に撮影した粒子の画像を、画像処理ソフトウェア ImageJ(URL: <https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて、フンおよび粘液の平均体積と代表粒径を算出した。平均体積の算出では、フンは円柱状、粘液は厚さが0.01mmの円盤状を仮定した。代表粒径は、算出した平均体積と体積が同じ球形粒子を仮定し、その直径とした。算出した代表粒径と平均体積、測定した平均沈降速度をもとに、ストークス式(1)を変形した(2)式より粒子密度を決定した。

$$v_s = \frac{D_p^2(\rho_p - \rho_f)g}{18\eta} \dots(1)$$

$$\rho_p = \frac{18\eta}{D_p^2 g} \cdot v_s + \rho_f \dots(2)$$

ここに、 $v_s$ : 終端速度(沈降速度)(cm/s)、 $D_p$ : 粒子径(cm)、 $\rho_p$ : 粒子の密度( $g/cm^3$ )、 $\rho_f$ : 流体の密度( $g/cm^3$ )、 $g$ : 重力加速度( $\approx 980.7$ )( $cm/s^2$ )、 $\eta$ : 流体の粘度( $\approx 0.01$ )( $g/cm \cdot s$ )である。

### 3. 5 流動モデルを用いた環境 DNA の動態

## の検討

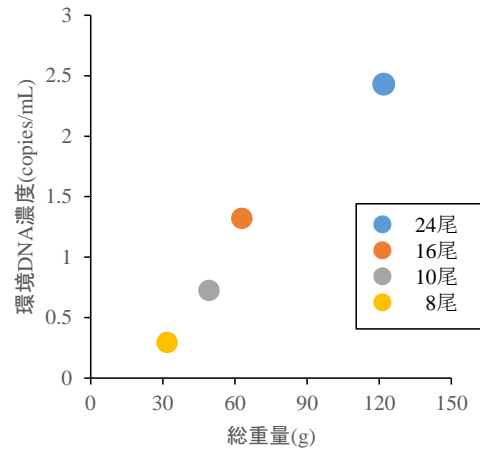


図-4 カワムツの環境 DNA 濃度と総重量の関係

フンと粘液の平均および最低沈降速度を流動モデルに組み込み、(1)環境 DNA を含む物質の流水環境下での移動距離の検討と、(2)実際の結果との比較検討のために実際の環境 DNA の減耗程度を参照したフンと粘液の流下中の沈降速度と流下距離の算出をおこなった。流れ場の検討には一次元河川水物質輸送モデルを使用した。上流からの流量には、採水前のアユ馴致時間中に計測した80m地点の流量を設定し、計算対象期間は、アユを上流のプール部に放流してから採水までの6時間とした。計算区間は、アユを放流したエリアから、下流方向へ1000m地点までについて検証した。地形データは2018年2月8日に Phantom 4 Professional (DJI Science and Technology 社)により撮影した空撮写真から、Photoscan (Agisoft 社)を用いて三次元データを計算し、作成したオルソ画像から流心の河床高と川幅を算出して、矩形断面を設定した。計算のための格子は5m間隔とした。

## 4. 研究成果

### 4. 1 カワムツを用いた室内実験

実験はカワムツの尾数を8, 10, 16, 24と変化させて4ケース行った。環境 DNA 分析から得られたサンプルの環境 DNA 濃度と各ケースで用いたカワムツの総重量の関係を図-4に示す。これらの結果から、環境 DNA 濃度とカワムツの総重量には高い正の相関があることがわかる。この結果は流水中でも環境 DNA 濃度が魚類のバイオマスや密度を高精度に反映する指標であることを示唆している。

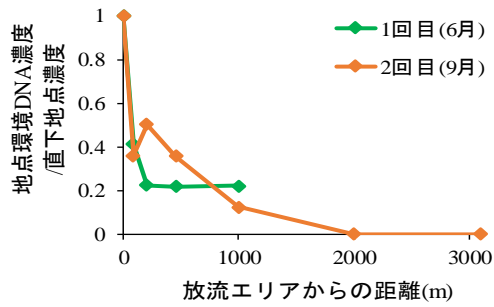


図-5 直下地点の平均環境 DNA 濃度を基準とした時の地点ごとの濃度比の推移

#### 4. 2 アユを用いた野外実験

図-5 に直下地点の平均環境 DNA 濃度を基準とした時の地点ごとの濃度比の推移を示す。環境 DNA 濃度は、放流箇所直下が最も高く、下流に向かうほど減少傾向を示し、80m で直下の半分未満となったものの、1000m においても検出された。しかし、2000m 以上流下すると、アユの DNA は検出されなかった。これらの結果から、今回の条件下における環境 DNA の影響範囲は放流箇所直下から 1000-2000m 間にあり、検出限界よりも上流で環境 DNA の大半が減耗することが示唆された。

また、水温が高い (28.7°C) 6 月は環境 DNA 濃度が低く (直下地点で 12.13copies/mL)、逆に水温が低い (22.9°C) 9 月は環境 DNA 濃度が高い (直下地点で 196.42copies/mL) という傾向がみられた。

#### 4. 3 アユを用いたフン・粘液の沈降実験

沈降実験の結果、フンの沈降速度は  $1.00 \pm 0.04 \text{ cm/s}$  ( $n=17$ )、粘液の沈降速度は  $0.56 \pm 0.03 \text{ cm/s}$  ( $n=5$ ) となり (95%信頼区間内データの平均±標準偏差)、粘液に比べてフンの沈降速度が速いことが明らかになった。

計測した各沈降物の粒径とストークス式より算出した粒子密度 ( $\text{g/cm}^3$ ) および平均重量 (g) を表-1 に示す。

#### 4. 4 流動モデルを用いた環境 DNA の動態の検討

表-2 に現地実験の結果から設定したパラメータを示す。図-6 に、測定した沈降速度から算出した環境 DNA 含有物質の流下に伴う濃度の推移 (各地点濃度/直下濃度) を示す。5m 地点において、6 月の場合は、7.7% (フン平均沈降速度)、10.4% (フン最低沈降速度)、12.8% (粘液平均沈降速度)、18.9% (粘液最低沈降速度)、9 月の場合は 5.4% (フン平均沈降速度)、7.3% (フン最低沈降速度)、9.3% (粘液平均沈降速度)、13.9% (粘液最低沈降速度) の量の沈降物が堆積し、全ての沈降物が流下してから 25m までの間に堆積してい

表-1 各沈降物のパラメータ

	フン	粘液
平均粒径 (cm) (mean ± SD, n=50)	長さ: $0.298 \pm 0.081$ 幅: $0.036 \pm 0.009$	$0.128 \pm 0.050$
平均体積 ( $\text{cm}^3$ )	$3.03 \times 10^{-4}$	$1.29 \times 10^{-4}$
球体と仮定した時の半径 (cm)	0.083	0.063
沈降速度 (±95%CI) (cm/s)	$1.00 \pm 0.04$	$0.56 \pm 0.03$
粒子密度 ( $\text{g/cm}^3$ )	4.454	4.426
平均重量 (g)	$1.35 \times 10^{-4}$	$1.33 \times 10^{-4}$

表-2 実験結果から設定したパラメータ

実際の河川と環境DNAに関する条件		
	6月	9月
80m地点の流量 ( $\text{m}^3/\text{s}$ )	0.018	0.012
直下地点の平均環境DNA濃度 (copies/mL)	12.13	196.43
80m地点の平均環境DNA濃度 (copies/mL)	5.01	70.78
直下地点の濃度に対する80m地点の濃度 (%)	41.3	36.0
DNAを含む物質に関する条件		
	フン	粘液
平均沈降速度 (cm/s)	1.00	0.56
最低沈降速度 (cm/s)	0.72	0.35

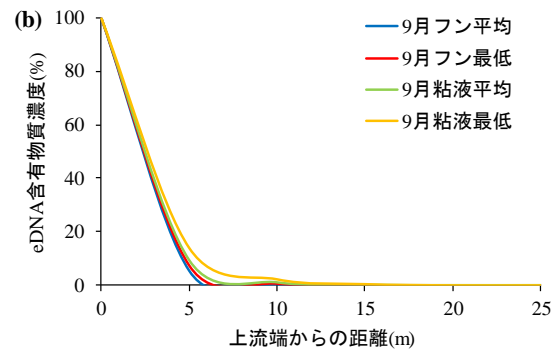
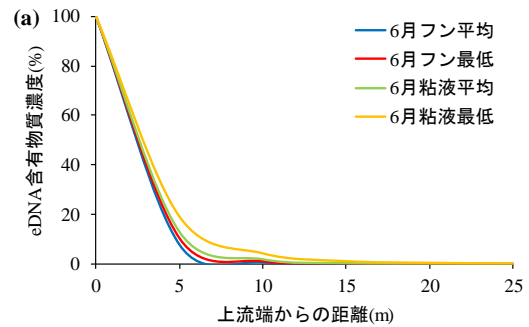


図-6 沈降速度 (実測値) から算出した流下に伴う環境 DNA 含有物質の濃度推移

(a)6 月の場合, (b)9 月の場合

るという結果となった。この結果から、静水条件下で測定した沈降速度から計算した場合、沈降物は、環境 DNA を実際に検出した地点まで移動しないことが示唆された。

図-7 に直下地点から 80m 地点までの環境 DNA 濃度の減耗割合と環境 DNA 含有物質の濃度が等しくなるように算出した推定沈降

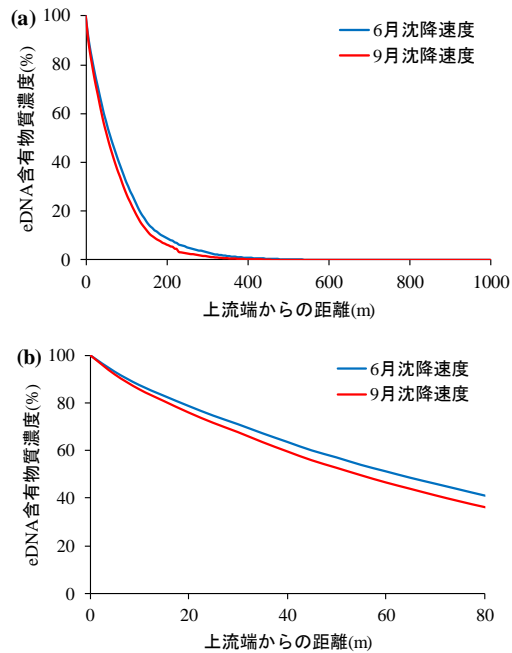


図-7 推定沈降速度における環境DNA含有物質の  
流下に伴う濃度推移  
(a)1000mまで, (b)80mまで

速度における環境DNAを含む物質の流下に伴う濃度の推移(各地点濃度/直下濃度)を示す。推定沈降速度は、6月では0.0058cm/s、9月では0.0045cm/sとなり、実際の沈降速度と比較すると、フンの沈降速度の約200分の1、粘液の沈降速度の約100分の1の沈降速度となった。

また、6月の場合は535mまで、9月の場合は455mまでの範囲で環境DNAを含む物質が沈降するという結果がみられた。沈降速度とストークス式から、環境DNAを含む物質の粒子径を算出すると、6月の場合は0.0063cm、9月の場合は0.0056cmと、3-2で算出した粒子径(フン:0.083cm、粘液:0.063cm)の10分の1程度にまで小さくなることが示された。この結果から、環境DNAを含む物質は、そのままの形で沈降・堆積するのではなく、流下中に微細な粒子に破碎され、流水中に漂流していることが考えられる。

#### 結論

本研究では、室内実験による環境DNA濃度が魚類のバイオマスや密度を高精度に反映する指標であることが明らかになった。また、流水環境にてアユを対象とした実験をおこない、環境DNAの影響範囲と減耗の傾向、DNAを含む物質であるフンと粘液の沈降速度が明らかになった。また、流動モデルを用いた環境DNAを含む物質の流下シミュレーションにより、流水環境中においては、DNAを含む物質は流下に伴って破碎され、微細な粒子となって漂流または沈降することが示

唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

- 1) 乾隆帝, 赤松良久, 高原輝彦, 後藤益滋, 一松晃弘: 流水中におけるカワムツの生物量と環境DNA量の関係性—水路実験と野外への適用—, 河川技術論文集, 第23巻, pp.651-656, 2017. (査読あり)
- 2) 乾隆帝, 後藤益滋, 河野誉仁, 赤松良久, 掛波優作, 一松晃弘: 江の川における環境DNA分析を用いたアユの定量化と生物量に影響を与える環境要因の検討, 土木学会論文集B1(水工学), Vol.73, No.4, I\_1105-I\_1110, 2017. (査読あり)
- 3) 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 (査読あり)

[学会発表] (計 3件)

- 1) 乾隆帝; 流水中におけるカワムツの生物量と環境DNA量の関係性—水路実験と野外への適用—, 河川技術シンポジウム, 2017.
- 2) 乾隆帝; 江の川における環境DNA分析を用いたアユの定量化と生物量に影響を与える環境要因の検討, 水工学講演会, 2017.
- 3) 赤松良久: 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, 水工学講演会, 2017

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 良久 (Akamatsu Yoshihisa)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号: 30448584

(2) 研究分担者

高原 輝彦 (Takahara Teruhiko)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号: 10536048

乾隆帝 (Inui Ryutei)

山口大学・大学院創成科学研究科・特命助教

研究者番号： 10536048