

# 環境DNAを活用した海域調査における 流れの影響について

赤塚 真依子\*<sup>1</sup>・高山 百合子\*<sup>2</sup>・織田 幸伸\*<sup>2</sup>・高畑 陽\*<sup>1</sup>・源 利文\*<sup>3</sup>

Keywords : environmental DNA, seagrass, particle tracking, biological survey, environmental preservation

環境 DNA, 海草, 粒子追跡計算, 生物調査, 環境保全

## 1. はじめに

環境 DNA 分析は、環境中の生物組織片（排泄物、植物片等）由来の DNA を分析する手法であり、新しい生物情報の入手方法として、魚類の網羅的解析を中心に実施事例が増えている<sup>1)</sup>。著者らは、これまでに魚道における回遊魚の遡上確認<sup>2)</sup>や造成工事における希少両生類の保全地における生息状況の把握<sup>3)</sup>など、建設工事期間中における生物モニタリングに環境 DNA の活用を検討し、建設工事で保全対象となる生物の生息状況を把握する手法としての有用性を報告してきた。

環境 DNA を活用した生物調査では、そこに生息する水域生物の環境 DNA を精度良く採取できる採水地点を適切に選定する必要がある、水域における流れと環境 DNA の関係を整理することが重要である。海域における環境 DNA の空間分布調査は、河川<sup>4)</sup>に比べて少なく、調査頻度も限られた検討が多い<sup>1,5-7)</sup>。その要因の一つとして、海域では流れの変化が大きく、採水地点における環境 DNA が常に変化していることが挙げられる。環境 DNA に関する研究事例が多い魚類は水域を移動することから、固着生物の環境 DNA を対象とすることが、海域における環境 DNA モニタリングへの流れの影響特性把握に有効と考えられる<sup>8)</sup>。

近年、ブルーカーボン創出で注目されている藻場では、ブルーカーボンをクレジット化する際に創出効果の提示が求められている。そのため、定期的に藻場の存在状況をデータとして取得することが必要となる<sup>9)</sup>。衛星写真等の活用により、藻場の生息範囲推定が検

討されているが、海草、海藻の種類や多様性の把握は従来のダイバーによる目視観察に頼るところが大きい。海中において藻場の状況を適切に評価できる環境 DNA の採取地点を把握することができれば、従来手法より容易に藻場の生育状況を評価できる可能性がある。

本研究では、群集で存在するアマモを対象とし、環境 DNA を採取する地点の流れの影響を把握することを目的に、アマモの藻場周辺海域における流動解析および粒子追跡計算から、流れの影響によるアマモの環境 DNA の分布について評価を試みた。

## 2. 現地調査

### 2.1 藻場調査

三重県松阪市松名瀬海岸沖のアマモが生育している藻場を調査地とした。櫛田川河口から笹川河口の藻場を対象とした藻場調査と環境 DNA 分析のための採水を 2021 年 8 月と 2022 年 1 月に実施した（表-1）。

調査では、ソナー探査で藻場範囲を確認し、その範囲の東西端部と間に 5 本の調査測線を岸沖方向に設けた。調査測線上で、アマモが生育する境目を起点として岸沖方向に約 100 m 間隔の各調査地点において、コドラート法（50 cm 四方）により株数、草丈、被度を計測した。また、測線間およびこの藻場に隣接するアマモ場の確認として、ソナーによる探査を行った。2021 年 8 月の藻場調査結果を図-1 に示す。図-1 は、藻場調査により確認した藻場の生育範囲を包括するように色付けをした。図-1 に示すように、1990 年代の藻場範囲

\* 1 技術センター 都市基盤技術研究部 環境研究室

\* 2 技術センター 社会基盤技術研究部 水理研究室

\* 3 神戸大学

<sup>10)</sup>と2021年8月に被度が高い範囲では大きな変化が見られなかった。2021年8月調査では、海岸線に沿った水深5~6mより浅い範囲においてアマモの生育を確認し、2022年1月の調査では、発芽体が多く確認されたが、季節による生育分布域に大きな差はなかった(写真-1)。

## 2.2 環境DNA調査

環境DNA分析試料として海水を採水した地点と時刻を表-1、図-1に示す。採水地点は、藻場直上と、直下に藻場が無い地点を含むように、藻場の中央C1~C4、西端W1~W4、東端E1~E4の12地点を設定した。藻場中央は、C4、C3が藻場直上、C2は藻場の沖側境界、C1は藻場境界から300m沖の地点である。西端と東端は、W4とE4が藻場直上であり、それ以外は藻場外とした。8月は藻場中央C1~C3の3地点、1月26日は西端W1~W4、中央C1、C3の6地点、1月27日は12地点において、8月は干潮に近い下げ潮時、1月は下げ潮時と上げ潮時に採水した。

そこで、8月はC1、C2(海底上3m、水面下約7m、3m)、1月はC1において2日間の流速を電磁流向流速計(INFINITY-EM, JFEアドバンテック(株)製)を用いて測定した。約20Lの海水を水面下1mの位置からポンプを用いて汲み上げた。採水試料は、直射日光を避けて運搬し、採水当日にガラス繊維ろ紙(φ90mm)でろ過し、ろ紙を冷凍保管した。

環境DNA分析は、環境DNA学会標準マニュアルに準拠し、ろ紙からDNAを抽出し、定量PCR法でアマモのmatK領域を対象とし環境DNA量を定量した<sup>11,12)</sup>。DNA抽出液は、PCRでのDNA増幅阻害の対策として、磁性ビーズAgencourt AM Pure XP(BECKMAN COULTER)で精製した。

## 3. 流動解析と粒子追跡計算

アマモの環境DNA量に対する流れの影響を検討するため、伊勢湾全域を対象とした流動解析により松名瀬海岸沖の流れ場を再現し、この流れ場に基づいて環境DNAを粒子に見立てた粒子追跡計算を実施した。流動解析モデルは、静水圧近似とブシネスク近似を仮定したナビエ・ストークスの運動方程式と質量保存則の連続式を基礎式とする3次元流動解析モデル<sup>13)</sup>を用いた。鉛直方向はσ座標系であり、水平拡散項はσ平面に沿った方向で定義される。流動解析の計算領域と松名瀬海岸沖の海底地形を図-2に示す。主な計算条件は表-2である。計算格子は、外洋側から岸に向けて細かくし、

表-1 現地調査概要

Table 1 Overview of field survey

	8月調査	1月調査	
藻場調査	潜水目視(草丈・株数・被度)およびソナー探査		
採水日時	2021年8月4日 8:00~8:30 (干潮9:13)	2022年1月26日 13:30~14:00 (満潮11:18)	2022年1月27日 7:50~8:50 (干潮6:23)
採水地点	3地点 中央	6地点 西端・中央	12地点 西端・中央・東端

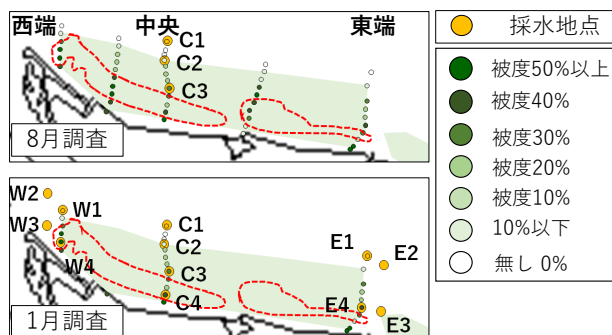
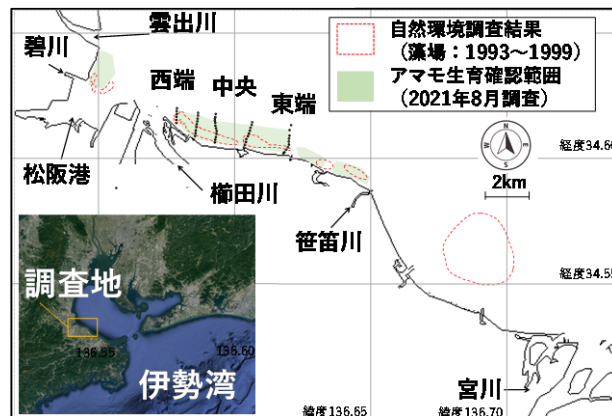
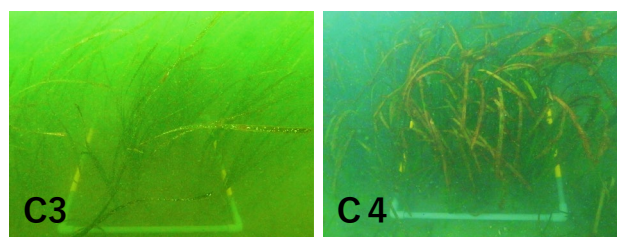
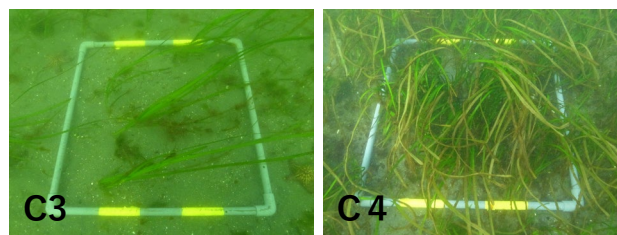


図-1 アマモの生育範囲と被度および採水地点  
Fig.1 Seagrass area, coverage and sampling point



(a) 2021年8月



(b) 2022年1月

写真-1 アマモの生育状況  
Photo.1 *Zostera marina*

松名瀬海岸沖で45 mとした。境界条件は、湾口部に鳥羽観測所における実測潮位を与えた(図-2赤線)。粒子追跡計算では、アマモの環境DNAを藻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して追跡した<sup>8)</sup>。粒子の初期位置は、図-3に示したアマモの生育範囲の全面とし、鉛直層の最下層(5層目)に均等配置した。粒子は、45 m格子に対し81個の粒子を10分間隔で投入した。

#### 4. 現地調査および環境 DNA 分析結果

##### 4.1 採水時の流況

現地において計測した流速および調査日の伊勢湾における毎時の潮流推算情報(潮流メッシュ推算データ、伊勢湾全域、日本水路協会)を参考として用い、松名瀬エリアにおける採水時刻の流況を整理した。図-3に、現地における計測流速値と推算潮位を示す。ここで流向は、北向きを0°とした時計回りの角度であり、推算潮位は、気象庁の鳥羽観測所の値である。図-3にはアメダスによる風向・風速(津気象台)を併記した。

8月の採水時刻は干潮の約1時間前の下げ潮時であり、現地の風は弱く海況は穏やかであった。伊勢湾の潮流推算図によると、松名瀬海岸沖では、湾中央から湾口に向かう下げ潮の流れと対になる形で時計回りの流れが形成されており、松名瀬海岸沖の岸近くには西に向かう流れ、沖側では北に向かう流れが見られる。図-3(a)に示す流速計測値は、C1、C2ともに、流速は数cm/sと非常に弱く、概ね北西~北向きの流れであった。

1月26日の採水時刻は、下げ潮時(満潮の2時間後)であり、伊勢湾の潮流推算図では、沖から松名瀬沿岸に向かう流れが示されている。流速計測値は、C1で10cm/s程度の東~東南東向きの流れであった。1月27日は上げ潮時(干潮の1時間後)であるが、潮流推算図では、湾中央から湾口に向かう下げ潮流が残っており、松名瀬海岸沖では湾口側に向かう南東流が、その東側では北西流と合流するような複雑な流況が示されていた。流速計測値は、C1で数cm/sと前日に比べて弱く、流向は1月26日とほぼ同じであるが、やや南寄りであった。1月26日および27日の採水時刻における現地の風は弱く、比較的穏やかであった(図-3(b))。

以上より、計測した流速と伊勢湾の潮流推算情報から、湾中央から湾口に向かい南下する大きな流れがあるタイミングに、松名瀬海岸沖ではこの流れを補償するように時計回りの還流が形成され、下げ潮時においても湾奥(西側)へ向かう流れが発生する場合があるこ

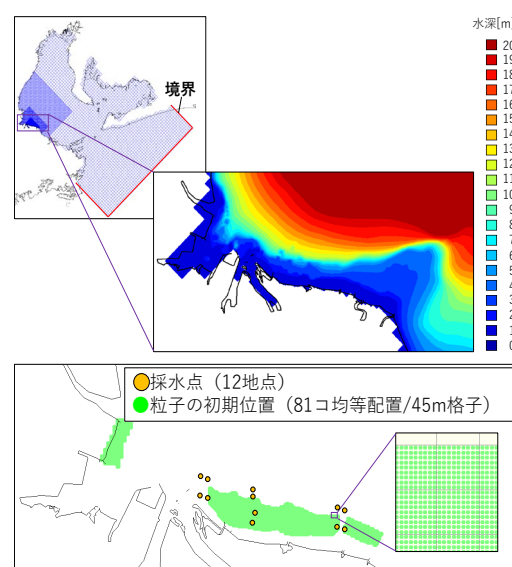


図-2 計算格子、海底地形と粒子の初期位置  
Fig.2 Computational grid, water depth and initial position of particle

表-2 主な計算条件

Table 2 Calculation conditions

	2021年8月調査	2022年1月調査
計算領域	伊勢湾全域	
平面座標系	座標系 直交直線座標系	
	格子幅 1215m, 405m, 135m, 45m	
鉛直座標系	分割数 5層(σ座標系)	
タイムステップ	0.5秒	
水深	内閣府南海トラフの巨大地震モデル検討会地形データより作成	
計算期間	2021/7/1~2021/8/7	2022/1/1~2022/2/1
境界条件	潮汐 気象庁潮位実測値(鳥羽)	
水温・塩分	伊勢湾環境データベース	
粒子数×投入間隔	161,514個(81個均等配置/45m格子)×10分間隔	

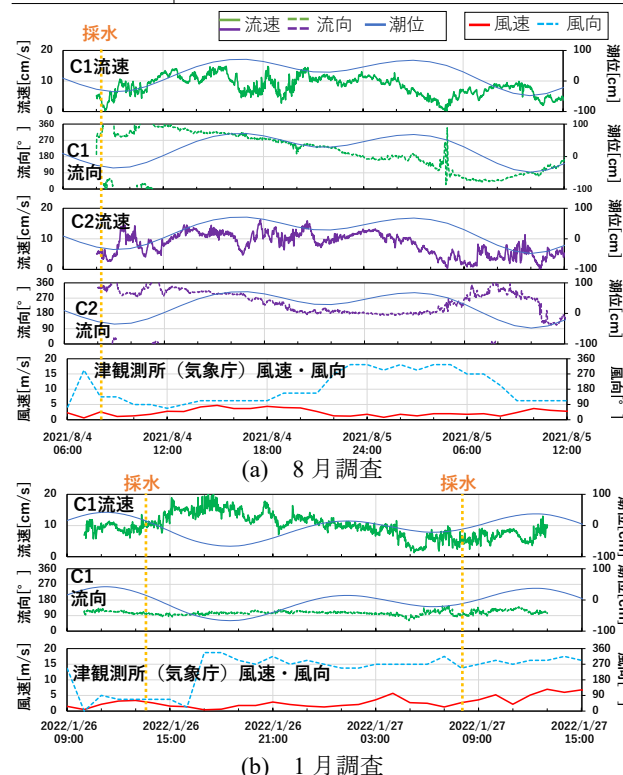


図-3 計測流速値および気象データ  
Fig.3 Flow velocity value and meteorological data

とを確認し、採水時刻の流況特性を概ね把握した。

### 4.2 環境 DNA 分析結果

分析条件の検討結果を表-3 に示す。ろ紙 1 枚当たりの DNA 量を求め、ろ過した海水 1 L 当たりの量に換算した copies/L として比較した。1 L をろ過した条件 1, 2 ではアマモの環境 DNA が検出されず、5 L, 15 L をろ過した条件 3~5 でアマモの環境 DNA の増幅を確認できた。また、抽出した DNA の精製なしとした条件 3 および精製したろ過量 15 L の条件 5 では分析阻害を確認した。このことは、ろ過量を増量したことにより海水に含まれる分析を阻害する腐植物質なども環境 DNA と一緒に多ろ紙に回収したためと考えられる。分析阻害がないことを確認できた条件 4 を採用した。

藻場中央、西端、東端における環境 DNA の分析結果を図-4 に示す。8 月調査では、藻場中央において、アマモが生育する藻場直上 (C3)、藻場の沖側境界 (C2)、藻場沖 (C1) の 3 地点から採水しており、環境 DNA 量は、C3, C2, C1 の順序で低くなり、岸側が最も高くなった (図-4(a))。1 月の調査 (図-4(b)) では、藻場中央で 1 月 27 日は岸側の C4 が高くなったが、1 月 26 日には沖側の C1 が高かった。藻場西端の 4 地点では、1 月 26 日と 27 日の両日で藻場直上および岸寄りの W3, W4 における環境 DNA 量が W1, W2 に比べて高くなった。藻場東端は、E2 が高い結果となったが、E1~E4 における環境 DNA 量は他地点に比べると低く、E1~E4

表-3 分析条件の検討結果  
Table 3 Results of analysis of analysis

条件	海水ろ過量	精製	環境DNA量 [copies/L]	分析阻害
1	1L	なし	検出なし	なし
2	1L	あり	検出なし	なし
3	5L	なし	28	あり
4	5L	あり	200	なし
5	15L	あり	10	なし

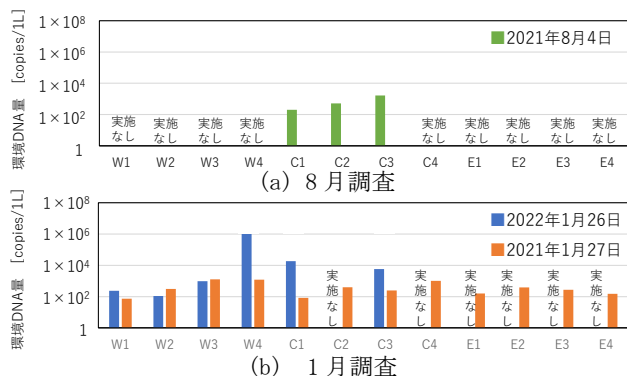


図-4 環境 DNA 分析結果  
Fig.4 Result of eDNA analysis

の 4 地点間の差異は小さかった。この結果から、アマモの環境 DNA 量は、藻場から数 100 m 程度離れた位置でも定量下限を超える値が得られることが分かった。

## 5. 環境 DNA に対する流れの影響について

### 5.1 流動解析結果

図-5, 図-6 に、流動解析結果として採水時刻における流速ベクトルを示す。図-5 の 8 月の採水時刻は下げ潮時であるが、4 章 1 節において確認した流況と同様に、松名瀬海岸沖において岸沿いに湾奥に向かう流れが形成されている。これは、湾央を南下する流れと対になるように形成された流れである。図-6 の 1 月 26 日は下げ潮時であり、全体に湾口側に向かう南下する流れが形成され、松名瀬海岸沖の流向は東~東南東向きである。この結果は、現地計測結果と整合している。一方、1 月 27 日は上げ潮時で、松名瀬海岸沖においては流速は小さいものの、沖側から岸に向かう南向の流れが形成されており、4 章 1 節において確認した現地流況との差異が見られた。東端では西向きと比較的大きな流れが生じており、非常に複雑な流況になっていると考えられるため、解析の再現精度には課題がある。

### 5.2 粒子追跡計算結果と環境 DNA 分析結果の比較

環境 DNA の分析結果について、確認した流況パターン、および、粒子追跡計算結果と比較することにより、環境 DNA の分布に対する流れの影響を検討する。環境 DNA 分析結果と粒子追跡計算結果を図-7, 図-8 に示す。計算結果は、採水と同時に時刻 (1 分間隔) に、採水地点 (2 m×2 m×全水深) に存在していた粒子数である。8 月の計算結果 (図-7, 青) を見ると、粒子数は、藻場直上の C3 が最も多くなった。図-5 より、藻場付近では、湾奥側の北西に向かう流れがあることから藻場から出発した粒子は C2, C1 の沖側へと徐々に運ばれるものの、C3 付近の流速が小さいために藻場に近い C3 の粒子が

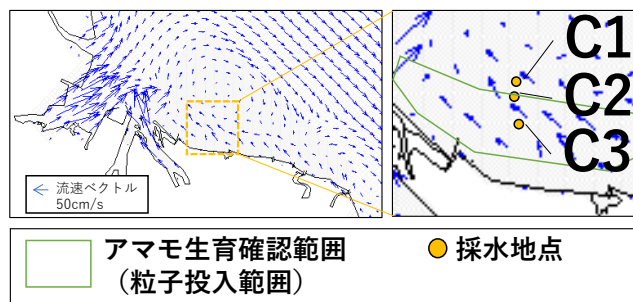


図-5 流動解析結果 (2021 年 8 月 4 日)  
Fig.5 Flow velocity vectory (August 2021)

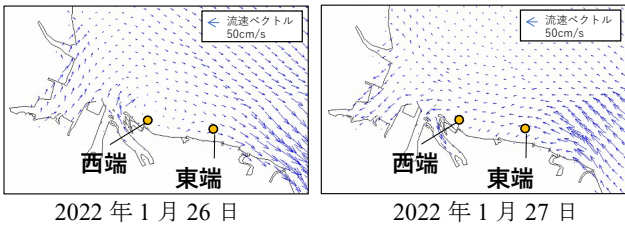


図-6 流況比較 (2022年1月)  
Fig.6 Fow velocity vectoy (January 2022)

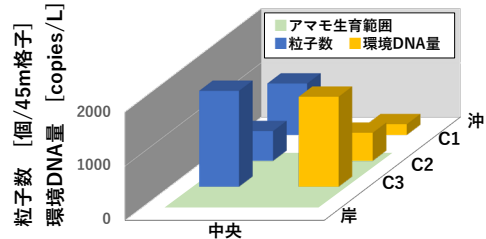


図-7 環境 DNA 分析結果と粒子追跡計算結果の比較 (2021年8月)  
Fig.7 Comparison of eDNA analysis and particle number (August 2021)

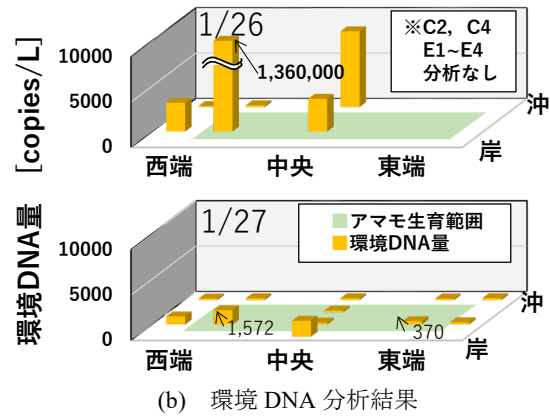
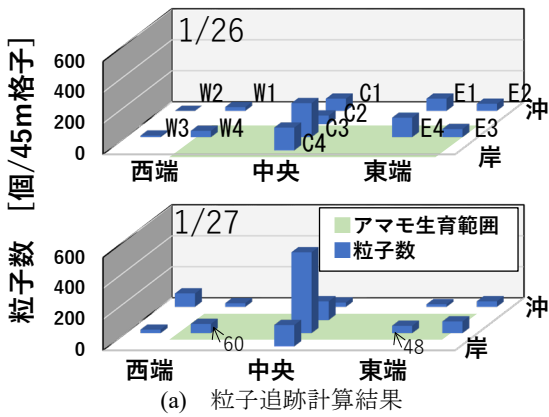


図-8 環境 DNA 分析結果と粒子追跡計算結果の比較 (2022年1月)  
Fig.8 Comparison of eDNA analysis and particle number (January 2022)

最も多くなったと考えられる。

図-8(a)の1月26日の粒子数を見ると、東西に比べて中央でやや多く、また東端と西端の粒子数を比較すると、東端がやや多い結果となった。図-6より、西端の粒子は東向きの流れにより少なくなり、また東端の粒子は、中央よりも東端の方が東向き流速が大きい傾向にあるため、中央よりも少なくなったと考えられる。1月27日は、C3の粒子数が卓越している。この時の流れが非常に小さいため、藻場中央に位置するC3では粒子が移流せずに蓄積され、一方周囲の粒子は流速は小さいものの外側に移流していると推察される。

次に、環境DNA量の平面分布について、現地の流況特性および計算結果を踏まえて考察する。

8月の流況は、北西に向かう沿岸沿いの弱い流れであることから、図-6(黄)の藻場中央の3地点における環境DNA量は、その供給源である藻場との距離に応じた差異になったと考えられる。計算結果の粒子数と整合した結果となった。

一方、図-8(b)の1月の環境DNA量については、計算結果の粒子数と整合した結果となっていない。1月26日は、計算結果と同様に藻場中央で環境DNA量が高くなっているものの、西端でも非常に高い環境DNA量が検出されている。図-6を見ると、計算では西端近傍では沖向き(北東向)の流れが生じていることが要因と考えられる。また、1月27日は、計算では、対象エリ

アの流況が非常に複雑になっているため、局所的な滞留域が生じている可能性が考えられる。ただし、図-3の流速計測の結果では、流速は小さいことから、岸側で高いDNA量となり、全体としては比較的均等な環境DNA量になったと考えられる。

分析結果からは、アマモの環境DNA量は、藻場から数100m程度離れた位置においても定量下限を超えた値が得られ、環境DNAの移流によって藻場内の地点と同等の高い値が得られる場合があることが分かった。松名瀬海岸沖における環境DNA量の相対的な平面分布において、沿岸方向の流れによって運ばれる環境DNA量は、流れが弱いために藻場との距離が近いほど高くなる分布傾向を形成するが、局所的な滞留域などの複雑な流況の影響を受けて高い環境DNA量となる地点があることが示唆された。流動解析を環境DNAによる藻場モニタリングに活用するためには、流況再現性の向上とアマモの生育密度条件等を反映した解析が必要であり、岸近傍の浅海域の流況の再現精度が課題となる。

## 6. おわりに

本論では、藻場を対象とした環境DNA分析と採水時の流況確認および粒子追跡計算に基づき、環境DNA量の相対的な差異について検討した。環境DNAを活用した藻場のモニタリングを実施する際には、流速の小さ

い条件で採水することが有効と考えられるが、数値解析結果に基づいて流況を把握することで、環境DNAを多く採取したい、季節変動等の長期的な変化を見るために短時間の変動が少ない位置で採取したいなど、目的に合わせた採水地点を選定できると考えられる。

今後は、定点におけるアマモのDNA量の経時変化と流れの関係の把握や季節変動を含めた長期的なアマモのDNA量を評価するための調査地点の選定、試料の採取手法等を検討し、藻場の生育状況や多様性の評価への環境DNAの活用を目指していきます。

### 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) 赤塚真依子, 高山百合子, 伊藤一教: 河川における環境 DNA を活用した魚類遡上のモニタリングに関する検討, 土木学会関東支部第 47 回技術研究発表会, II, 42, pp.1-2, 2020.
- 3) 内池智広, 赤塚真依子, 渡邊千佳子, 高山百合子: ため池群における環境 DNA を用いた希少両生類の生息状況調査, 土木学会全国大会第 77 回年次学術講演会, VII, 18, pp.1-2, 2022.
- 4) Jo, T. and Yamanaka, H.: Meta-analyses of environmental DNA down stream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments, *Freshwater Biology*, pp.1-11, 2022.
- 5) Fukaya, K., Murakami, H., Yoon, S., Minami, K., Osada Y., Yamamoto, S., Masuda, R. Kasai, A., Miyashita, K., Minamoto, T. and Kondoh, M.: Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modeling, *Molecular Ecology*, vol.30, No.13, pp.3057-3067, 2021.
- 6) 平田真二, 白尾豪宏, 飯田岳, 赤松良久, 乾隆帝, 中村圭吾, 村岡敬子: 汽水域及び河川下流域における環境 DNA の空間分布把握とサンプリング法の検討, 河川技術論文集, vol.25, pp.417-422, 2019.
- 7) 上村了美, 上月康則, 大谷壮介, 平川倫, 岩見和樹, 竹山佳奈, 山中亮一: 環境DNA メタバーコーディングによる運河・港湾に生息する魚類の種多様性検出に関する研究, 土木学会論文集 B3 (海洋開発), vol.74, No.2, pp.1\_474-479, 2018.
- 8) 赤塚真依子, 高山百合子, ムチエブエ エドウィン, 織田幸伸, 源利文: 環境 DNA を活用した藻場モニタリングにおける流れの影響について, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), vol.78, No.2 (投稿中) .
- 9) Kuwae, T., and S. Crooks : Linking climate change mitigation and adaptation through coastal green-gray infrastructure: a perspective, *Coastal Engineering Journal*, vol.63, No.3, pp.188-199, 2021.
- 10) 環境庁自然保護局: 自然環境保全基礎調査第五回調査, 2001.
- 11) Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., Nakamura, K., Takahara, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Iwasaki, W., Kasai, A., Masuda, R. and Uchii, K. : An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, *Environmental DNA*, vol.3, pp.8-13, 2021.
- 12) 赤塚真依子, 高山百合子, ムチエブエ エドウィン, 伊藤一教, 源利文: 藻場モニタリングのための環境 DNA 分析プロトコル作成に向けた検討, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), vol.77, No.2, pp. I\_895-I\_900, 2021.
- 13) Deltares: Delft3D-FLOW User Manual, 2018.