

環境DNAを用いた山口県内2級河川におけるオオカナダモの分布状況と生息適地の把握

MONITORING OF *Egeria densa* USING ENVIRONMENTAL DNA AND ESTIMATION OF THE POTENTIAL HABITAT IN YAMAGUCHI PREFECTURE

乾 隆帝¹・赤松 良久²・後藤 益滋³・小室 隆⁴・河野 誉仁⁵・山原 康嗣⁶・
浜田 大輔⁷・谷本 茂⁸

Ryutei INUI, Yoshihisa AKAMATSU, Masuji GOTO, Takashi KOMURO, Takanori KONO,
Yasushi YAMAHARA, Daisuke HAMADA and Shigeru TANIMOTO

¹正会員 農博 山口大学大学院特命助教 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

²正会員 工博 山口大学大学院准教授 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

³正会員 工博 山口大学大学院学術研究員 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

⁴正会員 理博 山口大学大学院特命助教 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

⁵学生会員 工修 山口大学大学院生 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

⁶正会員 工修 中電技術コンサルタント株式会社 (〒734-8510 広島市南区出汐二丁目3番30号)

⁷非会員 中電技術コンサルタント株式会社 (〒734-8510 広島市南区出汐二丁目3番30号)

⁸非会員 学博 中電技術コンサルタント株式会社 (〒734-8510 広島市南区出汐二丁目3番30号)

In recent years, the alien aquatic weed *Egeria densa* found in the river mainstream, has been reported in many other rivers. Intrusion prevention and control of this species is desired for both ecological conservation and river management. In this study, we determined the distribution of this species by using environmental DNA analysis in the broad area of Yamaguchi prefecture and we estimated the potential habitat by using GIS and maximum entropy modeling (Maxent). These results showed that the distribution of *E. densa* has already widely expanded in the Yamaguchi prefecture and there is a risk of invasion and overgrowth in the wide area except for in the mountain stream.

Key Words : alien species, eDNA, GIS, mapping, Maxent, quantitative PCR, river management, SDM

1. はじめに

オオカナダモは、日本生態学会が選定した「日本の侵略的外来種ワースト100」に含まれている南米原産の外來沈水植物である^{1,2)}。本種は、従来は、湖沼や水路を中心に繁茂していたが^{3,4)}、近年は、河川の本流でも繁茂している事例が数多く報告されており、これらの河川では、実際に景観悪化や漁業被害が生じている⁵⁾。

これらの背景から、河川におけるオオカナダモの侵入や繁茂をモニタリングし、さらには、繁茂に影響を与える要因を解明し、繁茂抑制をおこなうことが必須である。これまでの河川におけるオオカナダモについての研究

は、水口ら⁶⁾、田中ら⁷⁾、後藤ら⁸⁾による広島県北部の江の川水系におけるフラッシュ放流にともなう流出特性や、乾ら⁹⁾による山口県の佐波川水系におけるUAV (Unmanned aerial vehicle : 無人航空機) を用いた被度の定量化と繁茂要因の検討、乾ら¹⁰⁾による山口県の佐波川水系におけるオオカナダモの流失と出水時の流れ場の関係性などがおこなわれている。これらの研究は、すべて単一河川におけるオオカナダモに焦点を当てた研究である。一方、これまでに、広域におけるオオカナダモの侵入・繁茂状況を明らかにした例はない。

河川におけるオオカナダモの効率的な侵入防止および防除策の確立には、単一河川における繁茂や流失特性を把握すると同時に、多水系にわたる広域における網羅的

な分布情報を集積する必要があるため、広域モニタリングに適用可能な簡易かつ有効的な技術の構築が必須である。そこで本研究では、目視調査を代表とする従来手法よりも簡便かつ高精度といわれる環境DNA分析^{11), 12), 13), 14)}を用いることにより、(1)山口県内広域の2級水系の河川におけるオオカナダモの分布状況を明らかにし、次に、(2)GISを用いて山口県内におけるオオカナダモの分布および生物量に影響を及ぼす地底的な環境要因を検討し、さらに(3)分布予測モデルを用いたオオカナダモの潜在的生息地の推定をおこなうことにより、山口県全域におけるオオカナダモの侵入および繁茂の可能性が高いエリアを明らかにすることを試みた。

2. 方法

(1) 野外調査および環境DNA分析方法

2017年8月11日、12日、13日、14日、17日、18日、19日に、山口県内の20水系の2級水系の河川を対象とし、87地点で1Lの表層水を採取した後、一部地点については、採水地点付近の河道をUAV (MavicおよびSpark, DJI) で撮影した。調査地点は図-1に示している。採水に用いるボトルは、次亜塩素酸ナトリウム漂白剤 (市販製品を10倍希釈したもの) で洗浄し、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、DNAの分解を阻害することを目的に、市販 (w/v%で10%の濃度) の塩化ベンザルコニウム溶液¹⁵⁾を1 Lあたり1mL添加した後、冷却して持ち帰った。輸送時のDNA 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た。サンプル水は、1LをGF/F ガラスフィルター (pore size c. 0.7 μ m; GE Healthcare) で濾過し、アルミホイルで包んで

20°Cで凍結保存した。クーラーブランクおよび濾過時のDNA混入の有無を確認するためのブランクは、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、Doi et al.¹¹⁾と同様に、サリベットチューブ (Sarsted) およびDNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) を用い、最終の溶出量は100 μ Lに調整した。抽出したDNA のサンプルは、quantitative PCR (qPCR) を用い、テンプレートDNAあるいはネガティブコントロールを2 μ L、プライマー・プローブのセットを8 μ L用い、PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) によって定量PCRをおこなった。オオカナダモの種特異的なプライマーおよび蛍光プローブは、Fujiwara et al.¹⁶⁾によって開発されたものを用いた。定量化のための検量線は、各PCR ごとに標的配列の人工合成DNAを15000, 1500, 150, 15copies/反応に調整した希釈系列を分析して作成した。定量PCRの測定結果は、4ウェル中1ウェル以上で検出された場合を在として扱い、非検出のウェルについてはゼロとして、4ウェルの平均値を算出した。なお、DNA抽出およびPCRの試薬調整と、PCRの実験は別の実験室でおこなった。また、環境DNA濃度がオオカナダモの実際の生物量を反映しているかを検討するために、UAVで撮影した画像から確認できるオオカナダモの繁茂状況と、環境DNA濃度の関係性を調べた。

(2) 地形的環境条件の算出と検討

まず、オオカナダモの定着可能な環境の地形的環境条件を明らかにすることを試みた。地形的環境条件は、赤松ら¹⁷⁾に従い、50mメッシュの数値標高モデル (DEM) を用いて小流域を作成し、小流域ごとに、平均標高 (m)、平均傾斜角 ($^{\circ}$)、平均SPI (Stream Power Index)、平均TWI (Topographical Wetness Index) を算出し、オオカナダモのDNAが検出された小流域と、検出

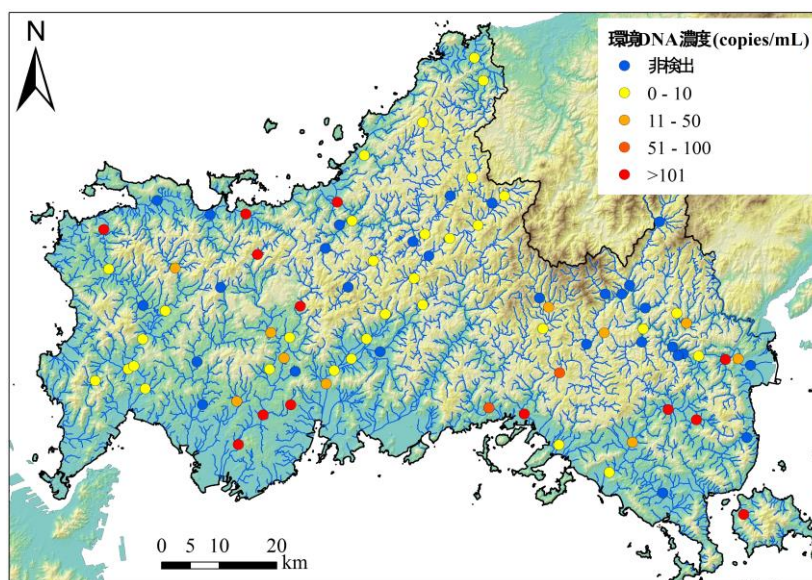


図-1 山口県の2級水系におけるオオカナダモの環境DNA濃度の分布

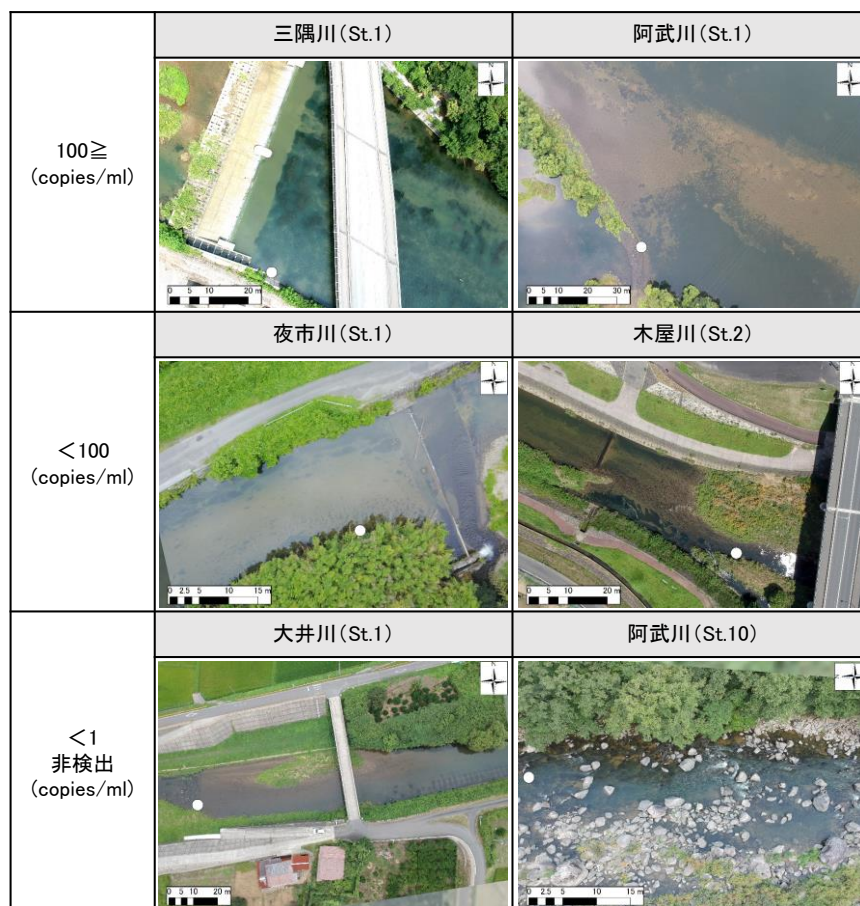


図-2 オオカナダモの繁茂状況と環境DNA濃度との関係性。図中の白点は採水地点を示す

されなかった小流域における地形的環境条件をMann-WhitneyのU検定を用いて比較した。なお、SPIは土砂の侵食の起こりやすさを示し、TWIは土砂の溜まりやすさを示す変数であり、ともに集水域面積と傾斜角から算出される。さらに、オオカナダモが検出された小流域において、生物量と地形的環境条件の関係性を把握するために、環境DNA濃度(copies/mL)と、前述した方法により算出した小流域ごとの平均標高(m)、平均傾斜角(°)、平均SPI (Stream Power Index)、平均TWI (Topographical Wetness Index) との関係性を調べた。

(3) 潜在的生息地の地図化

本研究では、分布予測モデルには、Maximum entropy modelling (Maxent)¹⁸⁾を用いた。Maxentは、生物の分布(在)データと、環境データを用いることにより、生物の分布予測ができるモデルである¹⁹⁾。モデルの評価にはAUCが用いられ、また、環境変数との関係性は、寄与率と応答曲線によって示される¹⁹⁾。本研究では、Maxent ver 3.3.3Kを用い、分布データには、環境DNA分析によって、4ウェル中1ウェル以上で検出された地点のXY座標を用いた。環境データには、前述の小流域で集計した平均標高、平均傾斜角、平均SPI、平均TWIを用いた。さらに、Maximum training sensitivity plus specificityで示さ

れたCut-off値を基準に、山口県内におけるオオカナダモの潜在的生息地を地図化した。

3. 結果と考察

(1) 山口県内のオオカナダモの分布状況

全調査地点における環境DNAの分析結果について図-1に示している。本研究で調査をおこなった全20水系のうち、15水系55地点のサンプルからオオカナダモのDNAが検出された。これらの結果から、山口県においては、既に県内の広域にオオカナダモの分布が拡大していることが見てとれる。水系ごとの環境DNAの平均濃度は、厚東川水系が最も高く(1100copies/mL)、富田川(539copies/mL)、島田川(161copies/mL)と続き、瀬戸内海流入河川においてオオカナダモが比較的高密度で繁茂している可能性が高いことが明らかになった。

図-2に、オオカナダモの環境DNA濃度が高かった地点、中程度だった地点、低かった地点および検出されなかった地点のUAVによる空撮画像を示している。河床が目視で確認できた12地点の画像から算出したオオカナダモの被度と、環境DNAの関係性を図-3に示している。全体的な傾向としてはおおむね正の関係性が見られたも

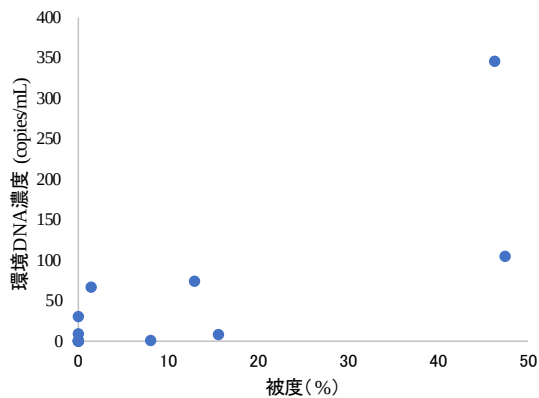


図-3 オオカナダモ被度と環境DNA濃度の関係性

の、採水地点直上の被度が高いにもかかわらず、環境DNA濃度の低い地点や、被度が高いにもかかわらず、環境DNA濃度が低い地点も見られた。これらの結果から、環境DNA濃度は、オオカナダモの生物量のある程度反映している可能性は高いものの、採水地点直上だけの被度だけを反映するわけではないことが示唆されたため、これらについての詳細な検討は今後の課題であるといえる。

図-4に、オオカナダモの環境DNAが検出された小流域と検出されなかった小流域間で、平均標高(m)、平均傾斜角(°)、平均SPI (Stream Power Index)、平均TWI (Topographical Wetness Index) を比較した結果を示している。Mann-WhitneyのU検定の結果、傾斜角のみ有意差が見られ、オオカナダモの環境DNAが検出された小流域は検出されなかった小流域に比べ傾斜角が小さいこと

が示された。また、他の環境条件については有意差こそないものの、中央値のみで比較した場合は、オオカナダモの環境DNAが検出された小流域は検出されなかった小流域に比べ、標高が小さく、SPIが小さく、TWIが大きい傾向がみられることから、オオカナダモは、比較的下流的な環境に侵入・定着しやすい可能性が示唆された。

次に、環境DNA濃度(copies/L)と、小流域ごとの平均標高(m)、平均傾斜角(°)、平均SPI (Stream Power Index)、平均TWI (Topographical Wetness Index) との関係性を図-5に示している。これらの図からは、どの変数ともに、環境DNA濃度との明確な関係性はみられなかった。つまり、人や鳥など様々な進入経路が考えられるオオカナダモが侵入・定着しやすいかどうかは地形的な要因が影響することに対して、そこで繁茂するのか、大規模な群落を形成するのかといったような生物量については、地形的な要因には左右されない可能性が高いことが考えられる。乾ら⁹⁾では、山口県の佐波川において、堰の上流側でオオカナダモの被度が高くなることを示しているが、このような局所的な要因が、オオカナダモの生物量に影響を与えている可能性が高い。

(2) オオカナダモの潜在的生息的地図の作成

Maxentの結果、AUCが0.825、感度が0.804のモデルが作成された。AUCは、モデルの精度の正確さの基準となる0.7を超えていたため¹⁹⁾、オオカナダモの潜在的生息地を説明可能な精度であるといえる。次に、オオカナダモの出現確率と環境条件の関係性をみると、TWIの寄与率が最も高く(71.3%)、SPI(11.4%)、傾斜角(10.6%)、標高(6.7%)と続いた。最も影響力の大き

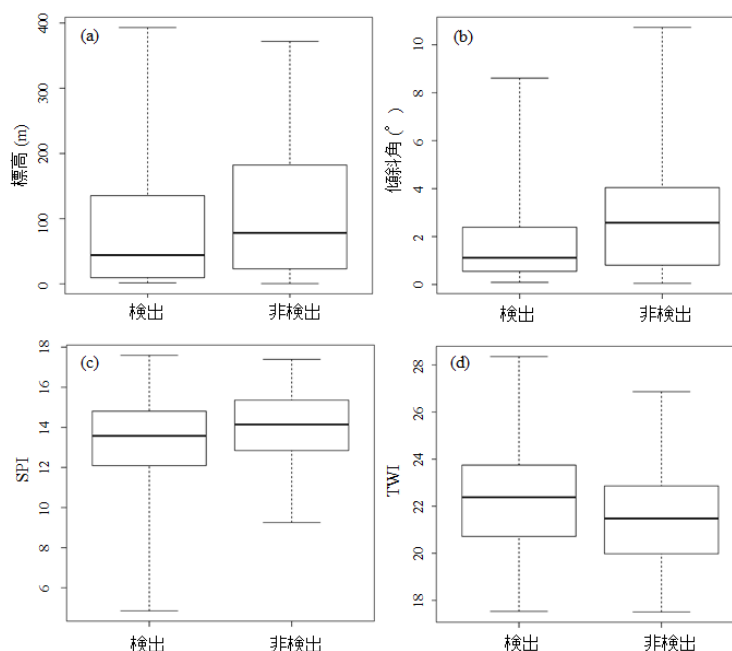


図-4 オオカナダモのDNAが検出された小流域と検出されなかった小流域間の地形的環境特性の比較。(a) 平均標高 (m)、(b) 集水域平均傾斜角 (°)、(c) 平均SPI、(d) 平均TWI

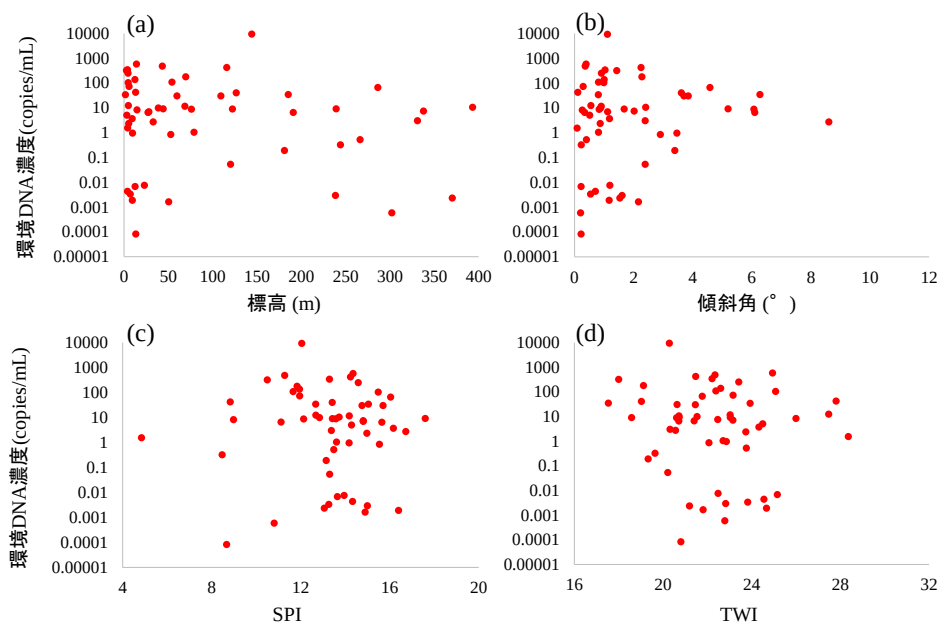


図-5 オオカナダモのDNA濃度と小流域の環境特性の比較. (a) 平均標高 (m), (b) 平均傾斜角 (°), (c) 平均SPI, (d) 平均TWI

いTWIの出現確率に対する応答曲線を見てみると、TWIが10を超えると出現確率が急増し、14前後でピークを迎えた。次に影響力の大きいSPIについては、7を超えると出現確率が急減した。傾斜角と標高については、負の関係を示した。これらの結果から、山口県内において、オオカナダモは、TWIがある程度大きく、SPIがある程度小さく、傾斜角が小さく、標高が小さい、つまり下流的な環境条件を持つエリアに侵入・定着する可能性が高いことを示している。図-6に、山口県内におけるオオカナダモの潜在的生息地（出現確率がCut-off値である

0.396以上のエリア）を示している。この結果から、潜在的な生息地は下流的な環境条件を持つエリアだけでなく、中上流域にも広がっていることが見てとれる。よってオオカナダモは、山口県内においては、山地渓流域を除く広いエリアに侵入・定着する可能性が示された。

4. 結論

本研究では、環境DNA分析を用いて山口県内における

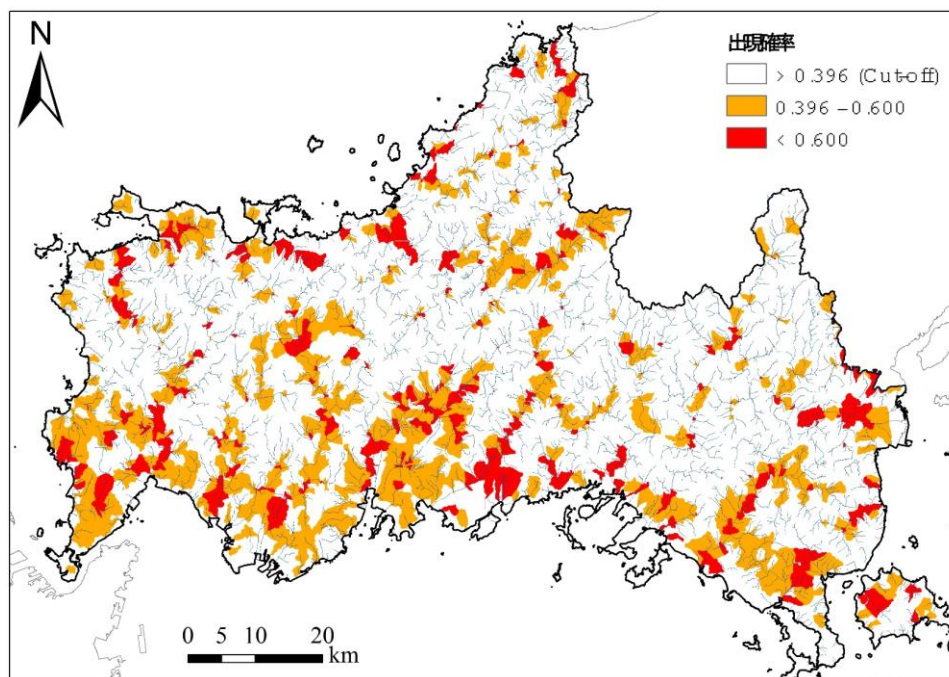


図-6 山口県内におけるオオカナダモの潜在的生息地の地図化

オオカナダモの分布状況を把握した。さらに、GISを用いてオオカナダモの環境DNAが検出された小流域の地形的特性を把握し、分布予測モデルを用いた潜在的生息地の把握をおこなった。その結果、山口県においては、既に県内の広域にオオカナダモの分布が拡大していること、瀬戸内海流入河川においてオオカナダモが比較的高密度で生息している可能性が高いこと、そして山地溪流を除く県内河川広範囲で侵入・定着のリスクあることが示された。つまり、山口県においては既に広域にオオカナダモの供給源がある状況であるため、侵入ルートを絶つよりは、侵入してきたあとに定着しない、あるいは繁殖しないような河川管理が必要になってくるであろう。

本研究で用いた環境DNAは、オオカナダモの分布状況を短期間で把握できるため、今後の分布拡大や生物量の増加の状況をモニタリングしていくための最適な手法であると言えるだろう。特に、本研究の分布予測モデルによって好適生息地と判断されたエリアにおいては、より高頻度のモニタリングをおこない、状況に応じた適切な防除策を考える必要があるだろう。

参考文献

- 1) Santos, M. J., Anderson, L. W. and Ustin, S. L.: Effects of invasive species on plant communities: an example using submersed aquatic plants at the regional scale, *Biol Invasions*, Vol.13, pp.443-457, 2011.
- 2) 国立環境研究所 侵入生物データベース : https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/detail/80670_ref.html
- 3) Haramoto, T., and Ikushima, I.: Life cycle of *Egeria densa* Planch., an aquatic plant naturalized in Japan, *Aquatic Botany*, Vol.30, pp.389-403, 1988.
- 4) 琵琶湖博物館 WEB図鑑「外来生物」 : <http://www.lbm.go.jp/emuseum/zukan/gairai/data/ookanadamo.htm>
- 5) 内田朝子, 白金晶子, 洲崎燈子, 裕 伸夫, 水野 修, 椿隆明 : 矢作川における要注意外来生物オオカナダモ (*Egeria densa*) の繁殖状況と駆除活動, 矢作川研究 No.18, pp.33-40, 2014.
- 6) 水口雄介, 椿涼太, 河原能久, 松原巧馬 : フラッシュ放流による沈水植物の流失特性, 土木学会論文集B1 (水工学) Vol. 69, No. 4, I_1351-I_1356, 2013.
- 7) 田中俊介, 椿涼太, 河原能久, 小手川勇太 : フラッシュ放流によるダム下流区間における外来沈水植物の流出動態, 土木学会論文集B1 (水工学) Vol. 72, No. 4, I_1117-I_1122, 2016.
- 8) 後藤益滋, 赤松良久, 乾 隆帝, 河野誉仁, 海老野秀典, 山口皓平 : 土師ダムにおけるフラッシュ放流に伴う江の川の河床環境改善効果の検証, 土木学会論文集B1 (水工学), Vol.74, No.4, I_589-I_594, 2018.
- 9) 乾 隆帝, 赤松良久, 掛波優作 : 佐波川におけるオオカナダモ被度の定量化と繁殖要因の検討, 土木学会論文集B1 (水工学) Vol. 72, No. 4, I_1123-I_1128, 2016.
- 10) 乾 隆帝, 掛波優作, 赤松良久 : 佐波川におけるオオカナダモの流失特性の検討, 河川技術論文集, Vol 22, pp.457-462, 2016.
- 11) 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*, Vol.62, pp.30-39, 2017.
- 12) 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, 水工学論文集, Vol.73, No.4, I_1105-I_1110, 2017.
- 13) 河野誉仁, 赤松良久, 後藤益滋, 乾隆帝 : 環境DNAを用いたアユの定量化と降下状況モニタリングの試み, 河川技術論文集, 第23巻, pp.669-674, 2017.
- 14) 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.
- 15) Yamanaka H., Minamoto T., Matsuura J., Sakurai S., Tsuji S., Motozawa H., Hongo M., Sogo Y., Kakimi N., Teramura I., Sugita M., Baba M. and Kondo A. : A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant, *Limnology*, Volume 18, Issue 2, pp.233-241, 2017.
- 16) Fujiwara A., Matsushashi S., Doi H., Yamamoto S., and Minamoto T.: Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds, *Freshwater Science* 35(2), pp. 748-754, 2016.
- 17) 赤松良久, 上鶴翔梧, 高村紀彰, 神谷大介, 清木隆博, 竹村紫苑, 乾隆帝, 鎌田磨人 : 中国地方における流域の流程区分図の作成とその活用法の検討, 河川技術論文集, 第20巻, pp.169-174, 2014.
- 18) Phillips, S.J., Anderson, R.P. and Schapire, R.E.: Maximum entropy modeling of species geographic distributions, *Ecological Modelling*, Vol.190, pp. 231-259, 2006.
- 19) Akobeng, A.K.: Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values, *Acta Paediatrica*, Vol.96, pp.338-341, 2007.

(2018. 4. 3受付)