

新技術を活用した魚類の動態調査技術の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 30～令 2

担当チーム：河川生態チーム

研究担当者：中村圭吾、村岡敬子

【要旨】

本研究課題では、環境 DNA や AI を用いた新しい魚道の評価方法の提案を試みた。このうち、環境 DNA では、定量 PCR 法を用いて、河道内における魚類の動態を捉えることを試みた。分析方法の検討の結果、河川で採水を SYBR Green 法を使って定量し、解離解析を行うことにより、増幅時のエラーを確実に排除可能であった。また、魚道の改善が検討されている兵庫県竹野川において、回遊性魚類であるアユカケの採捕調査と環境 DNA 調査を 2019 年、2020 年に実施した。環境 DNA の qPCR 分析の結果、採捕調査と環境 DNA の分析結果は矛盾しない結果を示すとともに、これまで採捕確認されていない領域においても、濃度は低いながらもアユカケが検出され、環境 DNA による魚類動態調査が、アユカケのように個体数が少ない種においても有効であることが示された。

キーワード：環境 DNA、魚類動態、SYBR Green 法、魚道、評価

1. はじめに

国土交通省では、“河川環境の保全・復元”を目的に各種事業を実施している。そのうち、魚類については、治水と環境を両立させた生息環境の保全を行うとともに、これらの環境を利用できるよう、移動環境の確保に努めている。こうした取り組みと、河川環境の保全、水質の改善等の事業との相乗効果により、例えば多摩川では多くの稚アユが、再び河川に遡上するようになった。さらに、このような状況は、地域住民が河川環境に興味をもち、河川管理者らとの良好な関係を築くきっかけともなっている。

一方、魚の移動環境に関する地域住民からの要望は多様である。河川管理者らは、長年にわたり、遡上数調査、河川水辺の国勢調査などを実施しているものの、河川管理者らが調査の現場で“魚の移動環境”を客観的に把握するための手法が乏しく、対応に苦慮している実情がある。たとえば、国際な問題となっているウナギの保全のためには“移動の確保”が課題とされているものの、ウナギ自体の数が減少しているうえ、河川に養殖ウナギが放流されているなど、分布域だけでは評価が困難な実情があり、河川管理者らが、客観的に魚類の移動環境を評価し、事業に反映できる技術が求められている。

魚の移動環境を確保するための施設である魚道が機能しているのかを確認するために、河川管理者らは魚道を遡上してきた個体を目視で計数、あるいは直接採捕して種ごとの遡上数をとらえる調査を行っているが、経済的な負担は大きい。欧米では、主たる魚道の

対象魚種であるサケ科魚類を対象に自動計数システムが導入されているが、日本は種数が多く、遡上期のサイズが小さいものが多いため適用できない実情がある。さらに、本来遡上すべき個体の総数がわからないため、移動阻害を受けているのか否かを客観的に評価することが難しい現状もある。

アユやマス類などの回遊性魚類では、魚道を利用できず、堰堤の下流に長く留まる“滞留”が、地域住民からも大きな問題として取り上げられることが多い。この滞留の状況をとらえるため、テレメトリー調査、標識放流や潜水調査が行われているが、精度良いデータをを得るためには大規模な調査を要するなど、経済的な負担が大きい実情がある。

本研究では、国土交通省の河川事務所が実施している各種調査を念頭に、近年急速に技術開発が進む AI および環境 DNA を活用し、“魚類の移動状況”を科学的データに基づき客観的・効率的に評価するための調査手法を提案することを目的に、以下の達成目標を設定した。

- ① AI を活用した魚種判別技術の開発
- ② 魚道内における魚類移動状況調査手法の提案
- ③ 河道内横断工作物周辺における移動環境調査手法の提案

2. 魚道評価への AI 活用の取り組み

AI と画像解析を組み合わせた技術は、サケ・ヤマメウナギを用いた米国での先行研究があるものの、日本は河川に生息する種数が多く、体長が小さいため、画

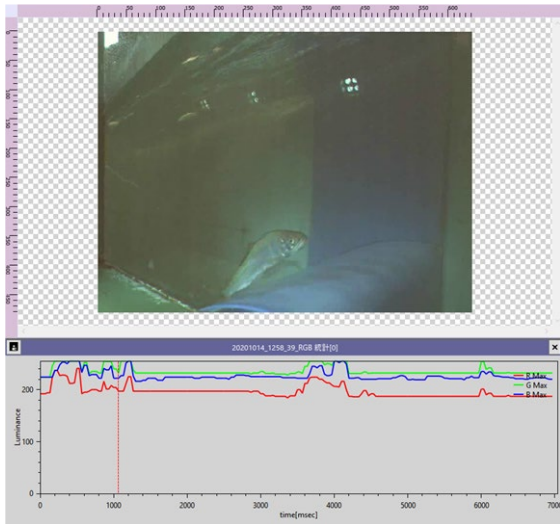


図-1 アユの遊泳行動の数値化

解析対象とした画像には2尾の魚の通過が表現されている

像から得られる情報の精度を高める工夫が必要である。

一方、土木研究所がこれまで魚道の研究で行ってきた、高速ビデオカメラを用いた魚類遊泳行動に関する実験では、流れが速い領域の遊泳行動が、魚種や大きさによって規定される魚類の遊泳能力と関係づけられることが示唆されていた。そこで、本研究では、我が国において最も設置事例数の多い階段式魚道の隔壁部頂部の遊泳行動を教師画像として種判別を試みることにした。

本研究の開始時（平成30年）は、AIは静止画を一枚ずつ判断して処理をしており、魚道内の魚類の動画をAI処理により種判別させようとすると、画像処理に計算時間がかかり、同時並行処理を行うことが困難と考えられた。そこで、魚道内を通過する魚類の遊泳行動を動画解析ソフトにより数値化し、それをAIにより判断させる方向で研究を進めた。

フルカラーで撮影した魚道内の魚の遊泳行動を用い、Ditect社製DIPP-Motion Proを用いによる数値化を検討した。複数の魚種を対象とする場合、魚が通過する断面を特定できないことから、魚が通過するエリアを定め、そのエリア全体の情報を用いて魚の通過を検出できる条件を探索した。検討の結果、画像の色調変化を用いることで、魚の遊泳行動の数値化が可能と考えられた(図-1)。

しかしながら、AI技術の開発の進捗が早く、この数値化を検討している間に、AIが動画を評価できるようになり、数値化を行う必要がなくなった。さらに、他機関においてAIを使った魚道評価手法が実用化され

たことから、本研究におけるAIに関する部分の開発は残研究期間が1年あったが、研究を終了した。

3. 魚道評価への環境DNA活用の取り組み

3.1 環境DNAの定量方法に関する検討

魚道の機能においては、魚道内を通過できるだけでなく、河川を遡上してきた魚が魚道の入り口を見つけることができることも重要である。魚道の入り口がわかりにくい、あるいはアクセスが難しい場合には、堰堤の下流側に魚が滞留する状況となる。ここでは、滞留がある場合に、環境DNAの濃度が高くなるのではないかと、という部分に着目した。具体には、対象とする魚類の種特異解析のうち定量PCR法(Quantitative polymerase chain reaction, 以下qPCR)を用いて、環境DNAの濃度の相対比により、魚道の滞留状況の評価を試みた。

qPCR法はすでに様々な研究分野で活用されている技術であるものの、様々な生物のDNAや物質が混在している環境DNAの定量を行う上で、以下の事項が懸念された。

- ① 対象生物のみを定量できているのか
- ② 低濃度のサンプルを増やせるか
- ③ PCR阻害物質の影響を受けていないか

qPCRでは、目的外の配列が増幅されないように、より特異性の高いTaqManプローブが用いられていることが多い。しかしながら、qPCR後に、実際増えたものが目的としている配列なのか否かの判断材料がない。そこで、本研究ではSYBR Greenアッセイの活用を試みた。SYBR Greenアッセイは、qPCR後にPCR産物を加熱する解離解析により、qPCRで対象領域と異なるものが増えていないかを確認することができる。この解離解析は、分析後のPCR産物をそのまま用いるため追加の作業は発生しない。

環境DNAのqPCR検討対象としたのは、北海道函館湾の3河川におけるカジカ属(カンキョウカジカとハナカジカ)、九頭竜川および兵庫県北川におけるアユカケおよび淀川汽水域におけるアユである。これらのサンプルは、ステリベクスもしくは現地ですぐ直後にドライアイスで凍結し、そのまま実験室に持ち帰り、DNAの抽出まで-80℃で保管した。DNAの抽出は、QIAGEN社製DNeasy Blood & Tissue Kitを用いた。また、qPCR装置としてThermo Fisher Scientific社のStep One plusを用いた。

アユカケ、カジカ属については、qPCRでは、Thermo Fisher Scientific PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

を用いることで、良好な増幅を得るとともに、解離解析により特異的でない増幅をしたサンプルを除外することができ、例えばアユカケにおいては、概ね 96well プレート 1 枚あたり 1～2well が非特異的な増幅があるとして除外された。また、カンキョウカジカ、ハナカジカ双方を増幅可能なプライマーを設計したカジカ属の qPCR では、定量時には双方の環境 DNA を合算した結果を得るとともに、解離解析により非特異的な増幅を排除するだけでなく、種もしくは片方の 1 種がいる状態も追認することができた。

一方、アユでは、増幅効率が悪く、定量が困難であったことから、SYBR Green 法だけでなく、増幅効率が良いとされる TaqPath qPCR Master Mixes を用いた Taqman プローブ法と SYBR Green 法の双方を併用し、繰り返し実験を行いながら在・不在の判断を行った。その過程において、PCR の初期サイクルのアニーリング時間を長くすることで、検出率を高めることができた。また、在不在の結果の大部分は採捕の結果と相反する結果とはならなかった。

さらに、デジタル PCR 装置を用いて絶対定量を試みたところ、検出率が低い原因として PCR 阻害物質の影響が大きいこと、阻害物質の除去操作によりサンプルの濃度が検出限界以下となった可能性が示された。

以上、環境 DNA の定量を行う際には、PCR 条件の最適化と PCR 阻害物質の影響低減双方のアプローチ

が重要であることが示された。また、極めて低濃度のサンプルについては、デジタル PCR を用いても定量が困難であったが、在・不在の評価であれば qPCR を繰り返すことである程度の評価は可能と考えられる。

3. 2 環境 DNA による魚類の移動環境評価

環境 DNA を用いて、実河川におけるアユカケの移動環境の評価を試みるために、福井県立大学の田原大輔と連携し竹ノ川と九頭竜川での調査を実施した。竹野川の調査対象範囲には堰堤が 4 基あるとともに、魚道改善の必要性等が検討されている (図-2)。これら堰堤の上下流において、アユカケの在不在を潜水目視により確認するとともに、環境 DNA 分析用のサンプリングを行った。調査は、2019 年 11 月、2020 年 6 月、8 月、11 月の計 4 回実施した。

潜水目視では 2019 年、2020 年共に、下流側から 2 番目の堰下流までアユカケが確認されていた。一方、環境 DNA では、2 番目の堰まで、高い濃度の環境 DNA が確認されるとともに、調査範囲全体で低いながらもアユカケの環境 DNA が検出された (図-3)。このことは、環境 DNA の動態が目視と同様の結果を示しながらも、目視では確認できないような、個体数の少ない区間においても検出が可能と考えられた。

また、竹野川よりも河川規模の大きい九頭竜川においても同様の調査を試みたところ、竹野川同様に、目視確認域よりも上流でアユカケを検出することができ

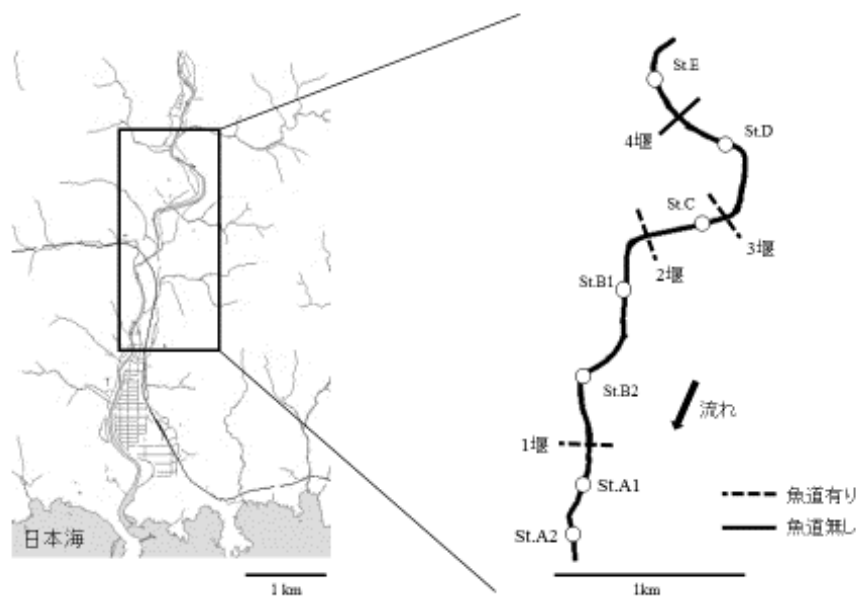


図-2 調査対象とした竹野川調査区間と堰堤

た。

以上、環境 DNA の定量を行うことで、個体数が少ない魚種の分布域が既往の調査方法よりも効率的に把握できるだけでなく、量的な評価を行うことで十分な移動ができていない堰堤の抽出を客観的かつ簡便行うことが可能であることが示された。

4. まとめ

本研究では、環境 DNA や AI といった新しい技術を用いて魚類の移動環境を評価することを試みた。このうち、AI は、研究を進めている間に、AI の技術進歩

が著しく、目標としていた魚種判別をしながら遡上数を計測するシステムが民間会社によって開発された。

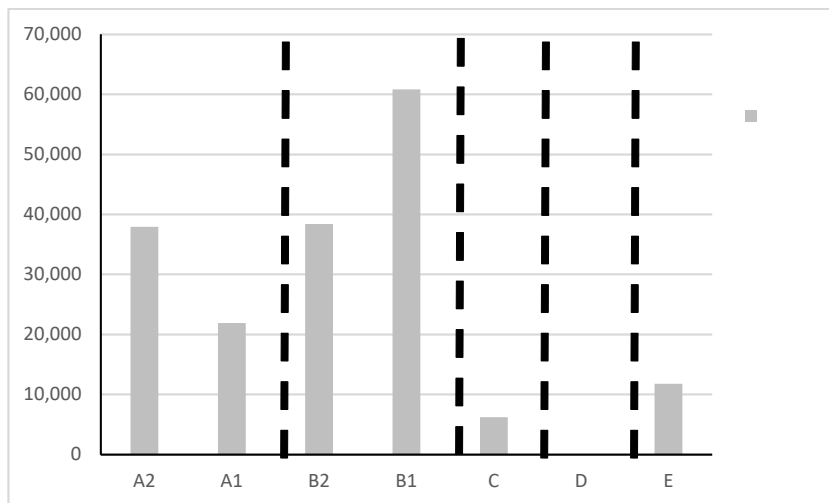
一方で、環境 DNA を使うことで、個体数の少ない魚種の移動環境を客観的に評価できることが示された。一方で、環境 DNA の量的な評価を行うためには、分析方法の最適化や、PCR 阻害物質の影響の低減など、技術的に開発しなければならない課題があることが分かった。さらに、この手法を実務に展開するためには、どのような実施体制下においても、データを継続比較できるように再現性を担保することが重要である。

例えば、分解しやすい環境 DNA を、実施者や実施

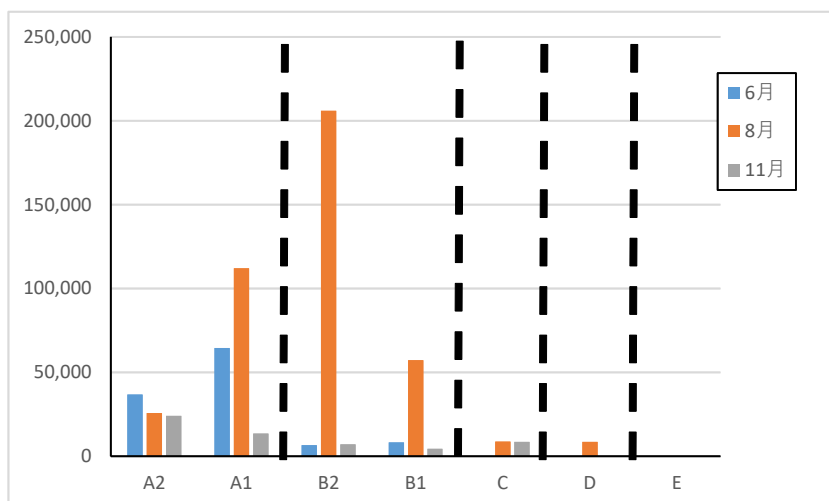
体制が異なっても一定の範囲にその影響を抑えることができるよう、調査の一連の流れに必要な要素技術の開発とルール作りが必要である。

参考文献

- 1) 鈴木宏幸, 村岡敬子, 中村圭吾: 環境 DNA の精製時に発生する誤差要因に関する基礎検討, 第 46 回関東支部技術研究発表会, 2019.3.



a) 2019 年 11 月の調査結果



b) 2020 年の調査結果

図-3 竹野川における環境 DNA の分析結果

FISH MIGRATION MONITORING TECHNOLOGY USING ENVIRONMENTAL DNA AND AI

Research Period : FY2018-2020

Research Team : Water Environment Research
Group(water environment
Research)

Author : NAKAMURA Keigo
MURAOKA Keiko

Abstract : A pilot study evaluating fish passage using new technology, environmental DNA (eDNA) and AI, was conducted in this study. For estimating eDNA of fish, the SYBR Green assay on quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was chosen, and qPCR melt curve analysis indicates a positive result. Visual diving observation and environmental DNA qPCR were used to track Ayukake (*Rheopresbe kazika*) migration via the Takeno River. Each report corresponded to the other, and eDNA detects Ayukake distribution effectively. Our study shows that eDNA is one of the valid tools for monitoring fish migration, including rare species on Rivers.

Key words : environmental DNA, fish migration, SYBR Green assay, fish passage, evaluation