

8. 最新技術を用いた調査・研究活動

定量研では、設立当初から会の名称のとおり自然環境の定量評価技術の開発を目指し、その時々最新の技術を取り入れながら調査・研究活動を進めてきた。

既に設立から25年が経過し、その初期に開発したラジコンヘリ(農薬散布用)によるカニ穴計数は、今や小型で低額のドローンの使用が可能となり、人力で行っていた巣穴の写真判定や航空写真による底質の解析はAI(Artificial Intelligence)、いわゆる人工知能の利用により、より迅速かつ高精度にできる時代となった。

また、定量研では、研究開発と実用化が近年一気に進んだ環境DNAを利用して、カブトガニをはじめとする

干潟生物の定量・定性調査の開発を目指し、2017年ごろから研究を進めてきた。

これら最新技術を用いた調査・研究の成果の一部は、**図 8.1** に示すように学会等での口頭発表や論文発表、河川整備基金助成事業報告書等で公表してきた。

本章では、これまでの定量研での研究成果のうち、航空写真による底質の性状把握手法、巣穴を用いたカニの個体数推定方法と同推定によるラジコンヘリの活用、環境DNAによるカブトガニをはじめとする干潟生物の定量・定性評価手法について紹介する。

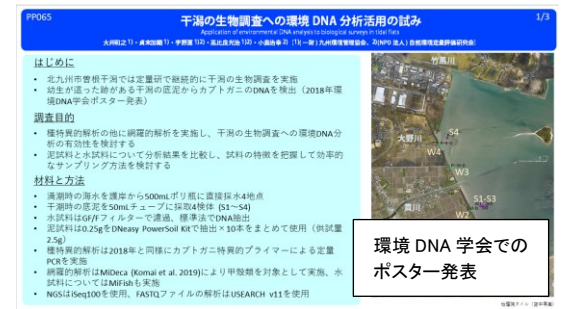
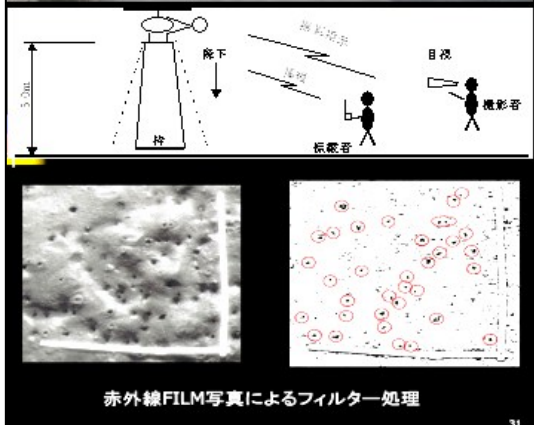
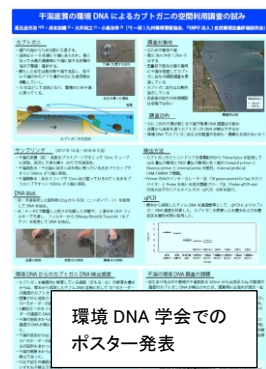
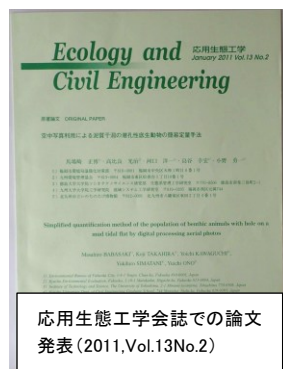
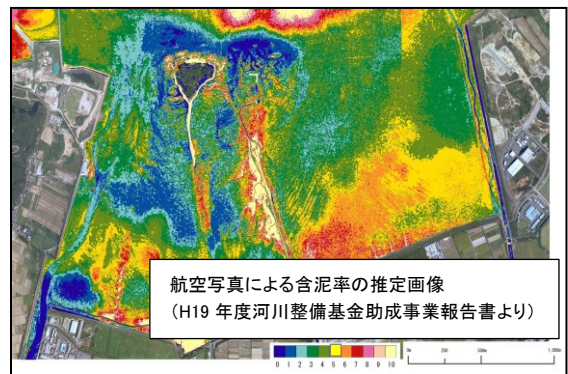


図 8.1 定量研での最新技術を用いた調査研究活動の学会等での発表(一例)

8.1 航空写真による干潟底質性状の面的把握

定量研では、航空写真に写る干潟表面の色から含泥率の分布を推定する方法を開発し、2003年に発表した¹⁾。2007年には、この方法を改良して曾根干潟における含泥率の分布の2000年からの変化を解析した²⁾。以下にその概要を紹介する。

8.1.1 航空写真の撮影諸元および撮影写真

撮影日:2000年9月27日

2007年7月31日

写真種別:垂直・カラー写真, 縮尺 1/10,000

撮影数量:2コース, 10枚

(干潟撮影範囲約3km×1.5km, 図8.1.1)

撮影条件:カメラ RC-20, F=153, オーバーラップ° 60%,
サイドラップ° 30%

撮影写真:写真8.1.1 (デジタルモザイク処理)

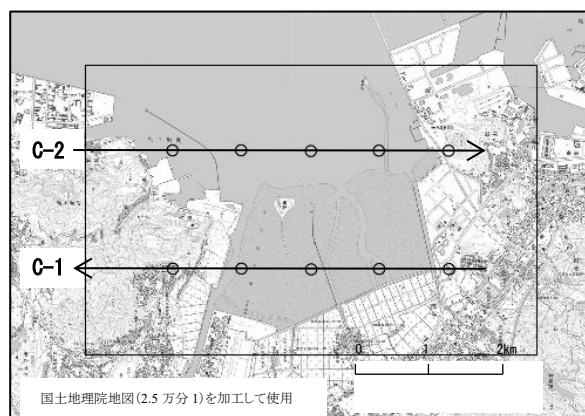


図8.1.1 曾根干潟航空写真飛行コース(→) および撮影ポイント(o)



写真8.1.1 曾根干潟の航空写真(上段:2000年, 下段:2007年)

8.1.2 画像解析手法

航空写真カラーポジフィルムをスキャナーで読みとった3バンドRGB(Red, Green, Blue)のデジタル画像(1画素の読みとりサイズは地上サイズで1m×1m相当とした)を用いて、航空写真と撮影年が一致する2000年および2007年の同一地点の含泥率の実測値との重回帰分析を行った。具体的には、表8.1.1(1)、表8.1.1(2)に示す各年度の調査で採取・分析した曽根干潟23地点の底泥の含泥率の分析結果を次式の目的変数Yとし、各年の航空写真から各地点のRGB値を画像編集ソフト

Adobe Photoshop で読みとった値をそれぞれ次式の説明変数 X_1, X_2, X_3 として重回帰分析を行い、式への当てはまりが最も良い a, b, c, d の係数(定数)を求めた。

$$Y = aX_1 + bX_2 + cX_3 + d$$

ここで、

Y: 現地の含泥率(%) 実測値

X_1 : 航空写真画像 RGB 値の Red の値

X_2 : 航空写真画像 RGB 値の Green の値

X_3 : 航空写真画像 RGB 値の Blue の値

表 8.1.1(1) 曽根干潟における含泥率の航空写真画像 RGB 値による重回帰分析結果(2000年)

測点 No	含泥率 (%) 【実測値】	航空写真画像データ によるRGP値			重回帰分析結果 【モデル式 $Y = aX_1 + bX_2 + cX_3 + d$ (y切片)】			含泥率 (%) 【重回帰式による推定値】	
		Red	Green	Blue	推定値	誤差			
P1	86.3	113	125	113	重回帰式 $Y = -1.9 * \text{Red} - 0.77 * \text{Green} + 3.2 * \text{Blue} + 15$ 標準誤差 13.34 自由度 19 R2乗 0.756 自由度調整済みR2乗 0.718 自由度調整済み重相関係数R 0.847 標本数 23 P値 ***0.000005 偏回帰係数 推定値 標準誤差 P値 a= -1.920 0.686 *0.012 b= -0.768 0.755 0.322 c= 3.207 0.423 ***0.0000004 定数d= 14.74 31.09 0.641 * 有意水準 5%未満 ** 有意水準 1%未満 *** 有意水準 0.1%未満	65.7	20.7		
P2	73.2	120	130	122		77.3	-4.1		
P3	52.0	106	114	101		49.0	3.0		
P4	31.5	125	129	112		36.6	-5.1		
P5	83.5	131	137	128		70.2	13.3		
P6	41.0	144	148	135		59.4	-18.4		
P7	41.5	109	117	94		18.6	22.9		
P8	19.7	123	126	107		26.7	-7.0		
P9	15.0	119	123	106		33.4	-18.4		
P10	30.8	110	113	96		26.2	4.6		
P11	27.6	111	119	99		29.3	-1.7		
P12	15.1	120	123	101		15.5	-0.4		
P13	38.0	138	136	116		19.3	18.7		
P14	92.8	108	116	118		98.1	-5.3		
P15	32.1	96	103	88		34.9	-2.8		
P16	17.9	106	113	97		37.0	-19.1		
P17	3.8	118	123	102		22.5	-18.7		
P18	52.8	102	109	101		60.5	-7.7		
P19	40.0	106	113	97		37.0	3.0		
P20	29.5	107	115	100		43.2	-13.7		
P21	71.0	99	104	98		60.4	10.6		
P22	33.8	99	107	92		38.9	-5.1		
P23	13.4	112	133	99		16.6	-3.2		

表 8.1.1(2) 曽根干潟における含泥率の航空写真画像 RGB 値による重回帰分析結果(2007年)

測点 No	含泥率 (%) 【実測値】	航空写真画像データ によるRGP値			重回帰分析結果 【モデル式 $Y = aX_1 + bX_2 + cX_3 + d$ (y切片)】			含泥率 (%) 【重回帰式による推定値】	
		Red	Green	Blue	推定値	誤差			
P1	89.0	136	138	127	重回帰式 $Y = 0.74 * \text{Red} - 1.4 * \text{Green} + 3.5 * \text{Blue} - 260$ 標準誤差 15.52 自由度 19 R2乗 0.61 自由度調整済みR2乗 0.549 自由度調整済み重相関係数R 0.741 標本数 23 P値 ***0.00038 偏回帰係数 推定値 標準誤差 P値 a= 0.741 0.326 *0.035 b= -1.443 0.492 **0.009 c= 3.460 0.692 ***0.00008 定数d= -261.34 66.24 ***0.0009 * 有意水準 5%未満 ** 有意水準 1%未満 *** 有意水準 0.1%未満	91.9	-2.9		
P2	73.7	129	135	123		77.0	-3.3		
P3	57.7	125	134	115		47.4	10.3		
P4	9.6	132	134	113		45.6	-36.0		
P5	62.9	136	144	123		69.5	-6.6		
P6	46.6	100	160	136		66.0	-19.4		
P7	40.6	124	125	109		38.3	2.3		
P8	25.4	118	126	116		56.9	-31.5		
P9	33.5	127	141	119		53.1	-19.6		
P10	50.3	113	124	112		42.0	8.3		
P11	22.3	111	117	113		53.8	-31.5		
P12	33.5	125	134	117		54.4	-20.9		
P13	21.7	125	133	112		38.3	-16.6		
P14	75.0	129	132	121		74.2	0.8		
P15	33.3	128	128	113		51.0	-17.7		
P16	28.3	115	128	118		58.9	-30.6		
P17	8.8	122	143	112		22.1	-13.3		
P18	85.5	125	129	128		99.9	-14.4		
P19	46.2	102	122	111		33.2	13.0		
P20	25.5	109	122	112		41.9	-16.4		
P21	66.0	112	128	118		56.7	9.3		
P22	26.9	106	121	114		48.0	-21.1		
P23	32.7	107	123	113		42.5	-9.8		

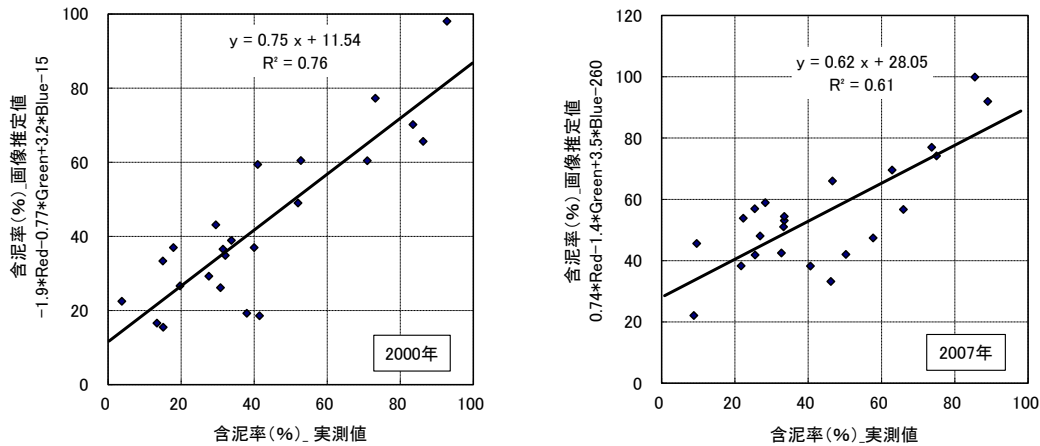


図 8.1.2 曾根干潟における含泥率の実測値と重回帰式による推定値の相関関係 (左図:2000年, 右図:2007年)

重回帰分析で得られた各年の重回帰式(次式①, ②)を用いて航空写真の画像から推定した含泥率と、実際に干潟で採取・分析した含泥率の実測値との間には図 8.1.2 に示すように有意な相関が認められた($R^2=0.76$, 0.61 , 有意水準(P 値) $<0.1\%$)。

① 2000年画像から得られた含泥率の重回帰式

$$\text{含泥率} = -1.9\text{Red} - 0.77\text{Green} + 3.2\text{Blue} - 15$$

$$(R^2=0.76)$$

② 2007年画像から得られた含泥率の重回帰式

$$\text{含泥率} = 0.74\text{Red} - 1.4\text{Green} + 3.5\text{Blue} - 260$$

$$(R^2=0.61)$$

そこで、この重回帰式を用いて、曾根干潟全面の含泥率の分布を航空写真の画像から推定した。推定結果は、以下のとおりである。

8.1.3 航空写真画像から推定した含泥率の分布

2000年および2007年の曾根干潟航空写真画像から推定した干潟全面の含泥率の分布を図 8.1.4 に示した。また、これらの画像から含泥率の割合別の干潟面積を算出し、その変化を図 8.1.3 に示した。

本推定画像をみると、現地踏査で確認した泥質の分布と概ね一致しており、干潟の底質分布や経年変化の概要を把握する上で有効な方法と考えられた。一方、

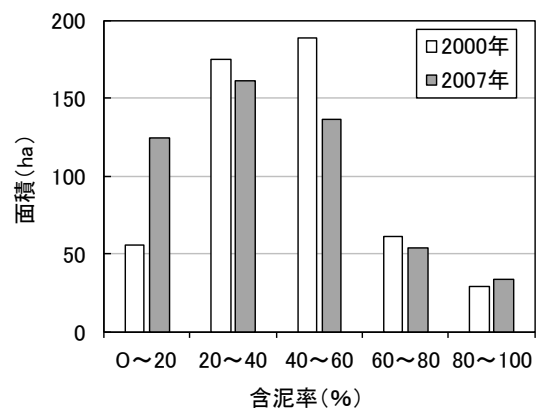


図 8.1.3 含泥率別の面積の変化 (面積合計 509ha)

北干潟の図 8.1.4(上段)の破線で囲んだ海床路の根元付近、および竹馬川流入部付近、特に両区域の西側堤防沿い(図の下側)は2000年当時から含泥率の高い区域であることを調査時に現地確認しているものの、本推定結果では含泥率は低いと評価されており、実態を上手く再現できていない。この要因として、水面反射や泥の湿り具合などの影響が考えられ、推定手法の改善が望まれる。したがって、本推定結果には一定の誤差が含まれていることを加味する必要はあるが、図 8.1.3 に示す含泥率の割合別面積変化をみると、干潟全体では含泥率の少ない0~20%の区域が2倍ほど増加しており、南干潟の含泥率の減少を概ね表しているものと推察される。また、含泥率60%以上の砂泥から泥質域での変化が小さいことが読み取れる。

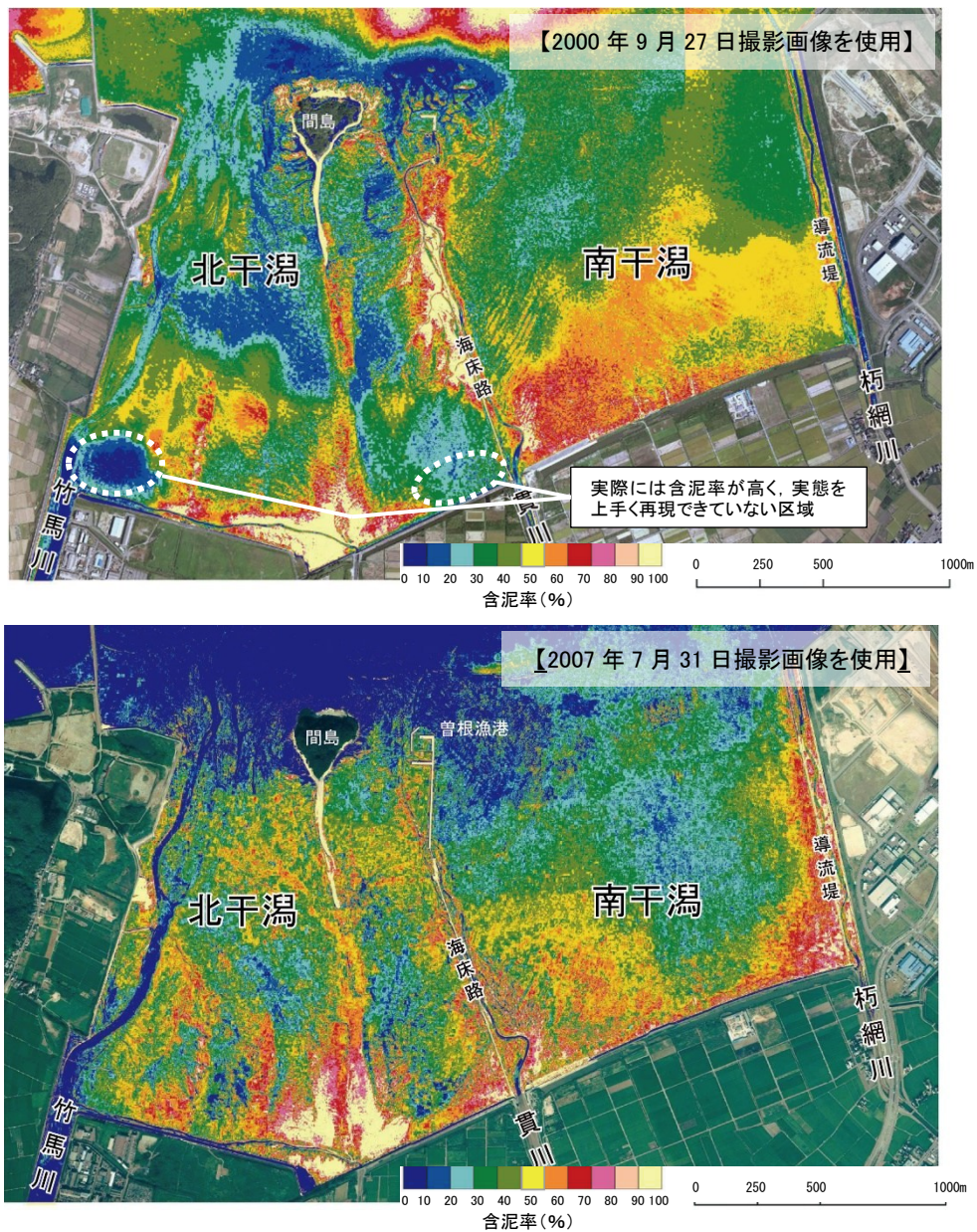


図 8.1.4 曾根干潟における含泥率分布の推定画像(上段:2000年, 下段:2007年)

8.1.4 まとめ

曾根干潟の航空写真から底質調査地点の RGB 値を読み取り、底質含泥率の実測値を目的変数、航空写真の RGB 値を説明変数とする重回帰式を用いて、含泥率の平面分布を推定する手法を開発した。

本手法は、水面反射等の影響により実態を上手く再現できない場所が一部みられ、今後の改善が望まれるものの、干潟の底質分布の経年変化を把握する上で有効であると考えられた。

謝辞:本研究は(財)河川環境管理財団の河川整備基

金助成事業として実施しました。心よりお礼申し上げます。
(山内)

参考文献

- 1) 小野勇一:河川整備基金助成事業「河口干潟生態系における環境評価手法の研究」報告書(助成番号 14-1-II-2-5), 40 pp., 河川環境管理財団, 2003.
- 2) 小野勇一:河川整備基金助成事業「河口干潟生態系の評価・モニタリングに有効な指標生物抽出技術および群集比較法等の開発」報告書(助成番号 19-1215-024), 45pp., 河川環境管理財団, 2008.

8.2 ヤマトオサガニ等大型底生生物の定量評価

8.2.1 底生生物の実態把握

曾根干潟におけるヤマトオサガニの現存量は大きいものと考えられるが、本種の生息地は歩行困難な軟泥質であり、定量的採集には時間と労力を要するほか危険も伴うため、十分な調査が行われることは少なかった。また、干潟上で活動するカニ類の数は、気温や潮時、外敵の分布等で異なるため、調査時期や時間、観察距離等の制限を受ける。

一方、干潟に棲むカニ類の多くは巣穴を作り、生活の拠点としている。ヤマトオサガニの場合も同様に成体では直径 2~5cm の大型の巣穴を形成する。この巣穴は、干潟表面から斜めに掘られる特徴をもつことから、ある程度の経験により他のカニ類との判別が可能である。したがって、ヤマトオサガニの個体数と巣穴の数との相関が明らかとなれば、巣穴の数によって、このカニの生息数が推定可能である。

そこで、これらの関係を求めるため、定量研では曾根干潟でヤマトオサガニと巣穴の個(体)数密度を調査した¹⁾。また、併せてその他の底生生物を調査し、ヤマトオサガニや巣穴および底質との関係から、間接的に底生生物現存量の把握ができないかを検討した¹⁾。

(1) 調査方法

底質調査は、**図 8.2.1** に示す調査範囲(黒破線内)のうち調査時に水没していた D-6, M-2 を除く 70 地点で、巣穴調査はさらに B-6 を除く 69 地点で 2001 年 6 月 11 日および 9 月 29 日(D-1, E-1, H-0, F-0 を補完)に実施した。

底生生物調査は、2000 年 9 月 26 日に**図 8.2.1** に示す範囲内の B から N の岸側 0~2 の地点で、2001 年 9 月 29 日に同範囲の B から L の沖側 3~5 の合計 72 地点で実施した。

底質調査は、各調査地点 1 か所で干潟表面 10cm 程度の泥を約 500mL 採取し、粒度組成および強熱減量の分析を行った。

巣穴調査は、各調査地点周辺の 5 か所に**写真 8.2.1** に示す 50cm×50cm の枠と 5, 10, 15, 20mm 大の円を描いた白色塩ビ板を置き、真上から干潟表面を写真撮



図 8.2.1 底生生物・底質調査範囲および調査地点
(航空写真は 2000 年 9 月 27 日に定量研が撮影)

影した。後日、写真から大きさ別巣穴数を計数した。

底生生物の採集は、各調査地点 1 か所に**写真 8.2.2** に示す鉄板 4 枚を、**写真 8.2.3** に示すように枠状(50×50cm コドラート)に差し込み、この中に閉じこめたカニ類を泥とともにスコップで深さ約 30cm 掘上げ、これらを 4mm 目の篩で選別する方法で行った。なお、一般の底生生物調査では 1mm 目の篩が用いられるが、今回のような採泥量の多い調査では砂が網目を抜けず、1 か所で持ち帰る試料は数十 kg を超えることになる。そこで、事前に底質の異なる 3 地点の泥を 1mm, 2mm, 4mm 目の篩を重ねてふるって比較した結果、4mm 目では砂が抜け、小型のヨコエビ類やゴカイ類を除き、オサガニ類、エビ類、二枚貝類、巻貝類等の干潟に生息する底生生物の中では大型のほとんどの種類(以下、「大型底生生物」という)を捕捉でき、**図 8.2.2** に示すように底生生物全体の湿重量もほとんど変わらないことを確認した。なお、採泥の深さ 30cm は、**写真 8.2.4** に示す事前調査によってカニ穴の形状を調査し、決定した。

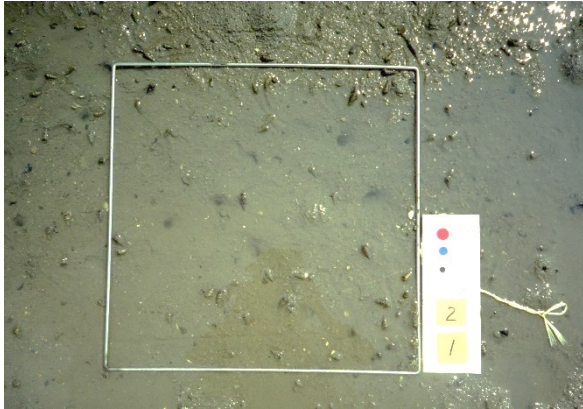


写真 8.2.1 干潟表面の写真撮影例
(50×50cm 方形枠, 右側の白色塩ビ板内の円の直径は
赤 20mm, 青 15mm, 黒 10mm, 緑 5mm)

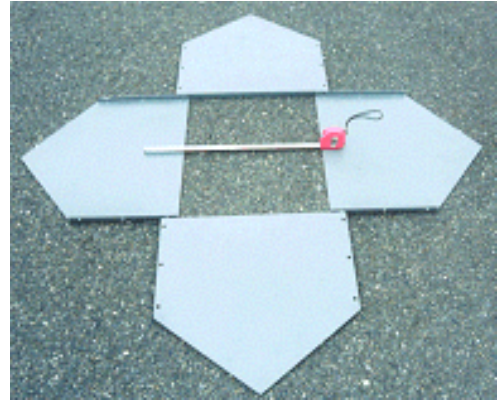


写真 8.2.2 底生物採取用コドラート枠
(50×50cm, 深さ 30cm 鉄製)



写真 8.2.3 コドラート枠の設置



写真 8.2.4 カニの巣穴の形状
(建設用発泡剤による巣穴の型取り)

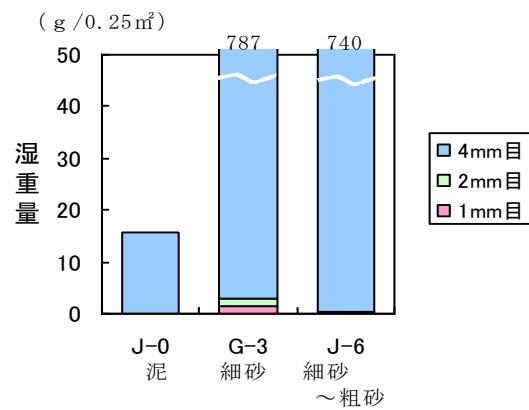
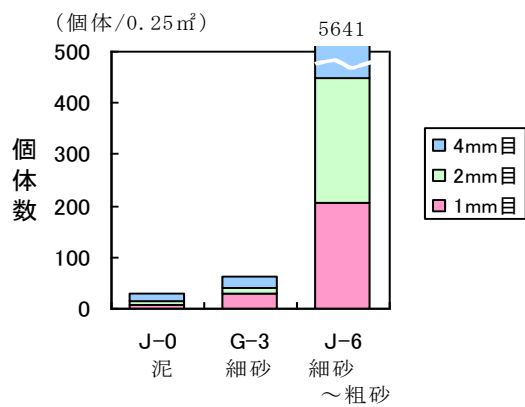


図 8.2.2 底生物の篩の網目サイズ別採集量

(2) 調査結果

1) 大型底生生物および巣穴の分布

地盤高、干潟表面泥の粒度組成、強熱減量、穴の大きさ別個数、ヤマトオサガニ等大型底生生物の個体数の分布を図 8.2.3 に示す。各分布の特徴は次のとおりである。

なお、地盤高の分布は、北九州市が 2000 年 10 月に調査したものによる。

a) 底質

粘土およびシルトは岸側に多く、沖側に少ない。これは、波浪や潮流によって舞い上がった干潟上または沖合の底泥が流速の低下する岸沿いで沈降するためと考えられる。細砂は干潟南側の沖側に多い。粗砂は大野川および貫川の河口、竹馬川下流の間島北側に多い。この分布状況から、粗砂は出水時に河川から供給される陸域由来のものと考えられる。間島周辺は岩礁帯となっており、調査では間島西側に礫が僅かに混在している。有機物の指標となる強熱減量は、大野川および貫川河口、竹馬川下流から間島にかけての滞付近で多くなっている。

b) 巣穴

直径 10mm 以下の「穴小」は、南側干潟中央部に多い。直径 10~15mm の「穴中」、15~20mm の「穴大」は大野川河口および貫川河口の滞周辺に多い。

c) 底生生物

ヤマトオサガニは、含泥率(粘土+シルト)の高い西側沿岸に多い。直径 10mm 以上の穴の分布と概ね一致する。

オサガニは、ヤマトオサガニの生息域より沖側、特に南側の細砂域に多い。

環形動物は、間島の北側の砂泥域に多い。ここは強熱減量の高い区域である。

砂や泥の中に潜る二枚貝では、アサリ・シオフキガイが砂泥質で強熱減量の高い間島周辺に、ハナグモリガイが大野川河口付近に多い。

表在性二枚貝のホトギスは間島南側の砂質域、表在性巻貝のヘナタリ・アラムシロ等は干潟北側の砂泥域に多い。

以上の底生生物の分布から、曾根干潟は次の 4 つの

区域に大きく分けることができる。

A: ヤマトオサガニ主分布域

B: オサガニ主分布域(南側ヤマトオサガニ分布域の沖)

C: 巻貝類主分布域(北側ヤマトオサガニ分布域の沖)

D: 二枚貝・大型環形動物主分布域(間島周辺)

2) 大型底生生物と巣穴および底質との関係

ヤマトオサガニほか底生生物の類別個体数および表 8.2.1 に示す個体数上位 20 種と穴の数、底質との関係は表 8.2.2 に示すように低い。

この因子分析結果によると、表 8.2.3 に示すようにアサリと正の相関の高い因子 1、細砂と正、含泥率(泥分)と負の相関の高い因子 2 が抽出される。

図 8.2.4 はこの因子負荷量のプロット図である。因子 1 と相関の高いアサリ周辺にはアラムシロ、シロスジフジツボ、ケフサイソガニ、マメコブシガニ等表在性の底生生物が集まっている。

因子 2 と相関の高い細砂と含泥率の直線上には細砂に近い方にオサガニが、含泥率と地盤高に近い方にヤマトオサガニが位置し、その間に底質との関わりの深い埋在性のシオフキ、アナジャコ、イチョウシラトリ、オキシジミなどが細砂と相関の高いものから順に並び、環境勾配に伴う分布の変化を良く表している。

これらの個体数と含泥率および地盤高との関係を図 8.2.5 に示す。これによると、底生生物の種類ごとに含泥率と地盤高に適値があり、個体数はこの適値を中心とする山型分布をとるため、線形単純回帰による相関は低くなっている。このほか相関を低下させている原因としては、①含泥率が適地であっても、地盤高や塩分など他の環境要因が不適である場合や種の供給が元々少ない場合は個体数が少なくなること、②集中分布型(表 8.2.1)の種では各地点の個体数のバラツキが大きく、採用したデータの精度が低いことなどが考えられる。

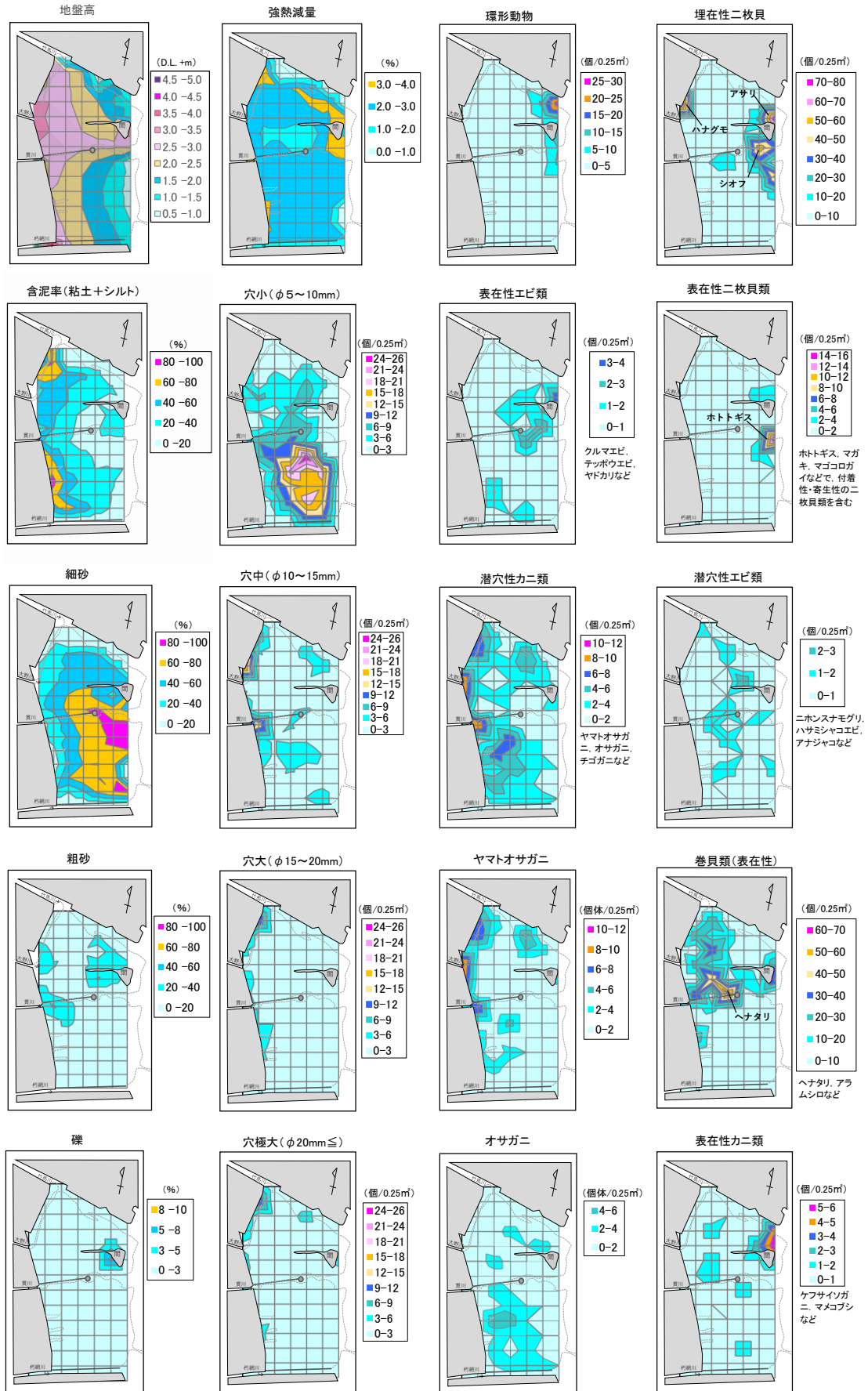


図 8.2.3 底質, 巣穴, 底生生物の分布

表 8.2.1 相関分析を行った個体数上位 20 種の全地点での出現状況および分布特性

順位	門	綱	目	科	種名	総個体数	I δ 指数	分布型
1	軟体動物門	二枚貝綱	偽イ目	偽イ科	ホトギス	777	71.1	集中分布
2	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタレガイ目	マルスタレガイ科	アサリ	675	48.0	〃
3	軟体動物門	腹足綱	中腹足目	ウミナ科	ヘナリ	382	5.4	〃
4	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタレガイ目	ハナグモリ科	ハナグモリ	199	69.9	〃
5	軟体動物門	腹足綱	新腹足目	オリヨフハイ科	アラムシロ	195	3.3	〃
6	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタレガイ目	ハカガイ科	シオフキ	135	13.9	〃
7	節足動物門	甲殻綱	十脚目	スガニ科	ヤマトサガニ	126	2.6	〃
8	節足動物門	甲殻綱	十脚目	スガニ科	オサガニ	84	1.4	〃
9	節足動物門	甲殻綱	完胸目	フジツボ科	ササフジツボ	81	27.1	〃
10	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタレガイ目	ニッコウガイ科	ユウシガイ	61	8.6	〃
11	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタレガイ目	ニッコウガイ科	イヨウシトリ	40	3.1	〃
12	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタレガイ目	マルスタレガイ科	オキシミ	35	1.6	ランダム分布
13	節足動物門	甲殻綱	完胸目	フジツボ科	シロスジフジツボ	35	21.8	集中分布
14	環形動物門	多毛綱	遊在目	チロ科	<i>Glycera subaenea</i>	34	2.8	〃
15	環形動物門	多毛綱	遊在目	キホシソメ科	<i>Lumbrineris sp.</i>	33	1.4	ランダム分布
16	節足動物門	甲殻綱	十脚目	アサギヤコ科	アサギヤコ	25	1.9	〃
17	軟体動物門	腹足綱	中腹足目	ウミナ科	ホウウミナ	24	16.2	集中分布
18	環形動物門	多毛綱	定在目	トコカイ科	<i>Heteromastus sp.</i>	23	11.4	〃
19	節足動物門	甲殻綱	十脚目	コマシガニ科	マコブシガニ	20	3.8	〃
20	節足動物門	甲殻綱	十脚目	イカニ科	ケフサイカニ	16	4.8	〃

$$I_{\delta} = n \frac{\sum_{i=1}^n x_i(x_i-1)}{N(N-1)} \quad n: \text{サンプル数}, N: \text{総個体数}(\sum x_i), x_i: i\text{番目のサンプルの個体数}$$

$I_{\delta} = 1$ はランダム分布(ポアソン分布), $I_{\delta} < 1$ は一様分布, $I_{\delta} > 1$ は集中分布を示す。1 からどれくらい離れたら有意かは次式を F 検定する。

$$F = \frac{s^2}{\bar{x}} = \frac{I_{\delta}(N-1)+n-N}{n-1} \quad s^2 = \frac{\sum(x_i-\bar{x})^2}{n} \quad s: \text{標準偏差}, \bar{x}: x_i \text{の平均値} \quad 2)$$

表 8.2.2 底生生物の個体数と穴の数, 底質との相関係数(r)

項目	穴数							強熱減量	粒度組成				地盤高
	小 φ 5 ~10mm	中 φ 10 ~15mm	大 φ 15 ~20mm	極大 φ 20mm ≤	穴計	穴中 以上	穴大 以上		泥 (粘土+シルト)	細砂	粗砂	礫	
ヤマトオサガニ		0.38	0.48	0.55		0.52	0.54		0.38	-0.52	0.28		0.4
オサガニ	0.41		-0.3	-0.38		-0.3	-0.36		-0.26	0.39	-0.24		-0.28
計(オサガニ類)		0.31	0.34	0.37	0.29	0.39	0.38		0.26	-0.34			0.27
分類別	環形動物 二枚数(埋在性)										0.27		
	エビ類(潜穴性)					0.3	0.41	0.38					0.28
	カニ数(潜穴性)		0.34	0.34	0.38				0.26	-0.35			-0.31
	二枚数(表在性)												
	エビ類(表在性)					-0.25							
	カニ数(表在性)					-0.27				-0.26		0.25	
主な出現種	ホトギス												-0.31
	アサリ							0.28					0.32
	ヘナリ												
	ハナグモリ		0.68		0.29	0.37	0.51				0.26		
	アラムシロ					-0.27			-0.24		0.34		0.34
	シオフキ								-0.29	0.34			-0.42
	ササフジツボ								-0.28				-0.24
	ユウシガイ												
	イヨウシトリ												
	オキシミ												
	シロスジフジツボ												
	<i>Glycera subaenea</i>					-0.28			0.31	-0.33	0.26		0.3
<i>Lumbrineris sp.</i>	-0.25		-0.27		-0.35								
アサギヤコ			-0.25				-0.25			0.26			
ホウウミナ													
<i>Heteromastus sp.</i>	-0.26										0.28		
マコブシガニ													
ケフサイカニ									-0.25				
底質	強熱減量	-0.33		0.33	0.46		0.27	0.41		0.39	-0.43		
	泥(シルト+粘土)	-0.29		0.62	0.59		0.47	0.65	0.39		-0.82		0.56
	細砂												
	粗砂	-0.28	0.3				0.26				-0.38		0.36
	礫											0.36	0.29
地盤高	-0.31		0.35	0.49		0.37	0.44		0.56	-0.69			

有意確率 $p < 0.05$ を表示

表 8.2.3 因子分析結果

因子負荷量 (回転無)

項目	因子1	因子2
強熱減量	0.15	-0.49
含泥率	-0.34	-0.77
細砂	0.25	0.96
粗砂	0.12	-0.41
礫	-0.04	-0.15
地盤高	-0.35	-0.64
塩分	0.13	0.06
ホトキス	0.04	0.17
アサリ	0.96	-0.25
ハナタリ	-0.08	-0.06
ハナクモリ	-0.05	-0.14
アラムシロ	0.77	-0.14
シオフキ	0.08	0.35
ヤマトオサガニ	-0.23	-0.49
オサガニ	0.09	0.39
サラサフジツボ	0.93	-0.15
ユウシカガイ	0.16	0.15
イヨウシタリ	-0.07	-0.03
オキシジミ	-0.13	-0.14
シロスジフジツボ	0.54	-0.06
<i>Glycera subaenea</i>	0.06	0.28
<i>Lumbrineris</i> sp.	0.18	0.11
アナジャコ	0.03	0.25
ホウミナ	0.07	0.06
<i>Heteromastus</i> sp.	0.00	0.09
マモコブシカニ	0.49	-0.21
ケブサイカニ	0.59	-0.03
説明済	3.77	3.26
寄与率	0.14	0.12

抽出法: 最尤因子分析法

(因子2)
細砂
↑
泥
↓

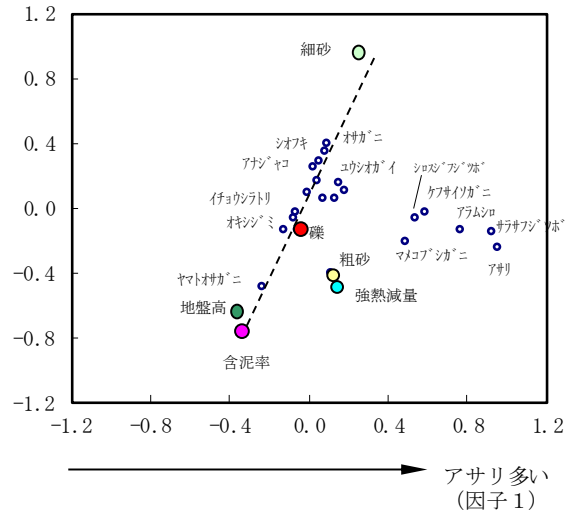


図 8.2.4 因子負荷量のプロット図

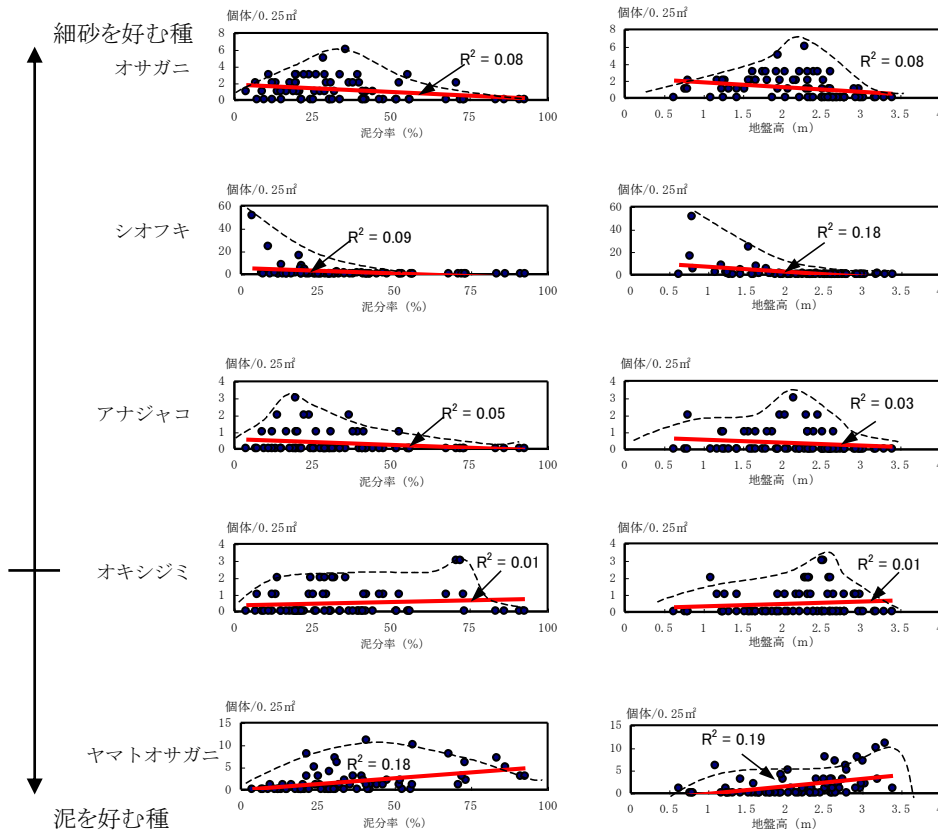


図 8.2.5 主な底生生物の個体数と含泥率, 地盤高との関係

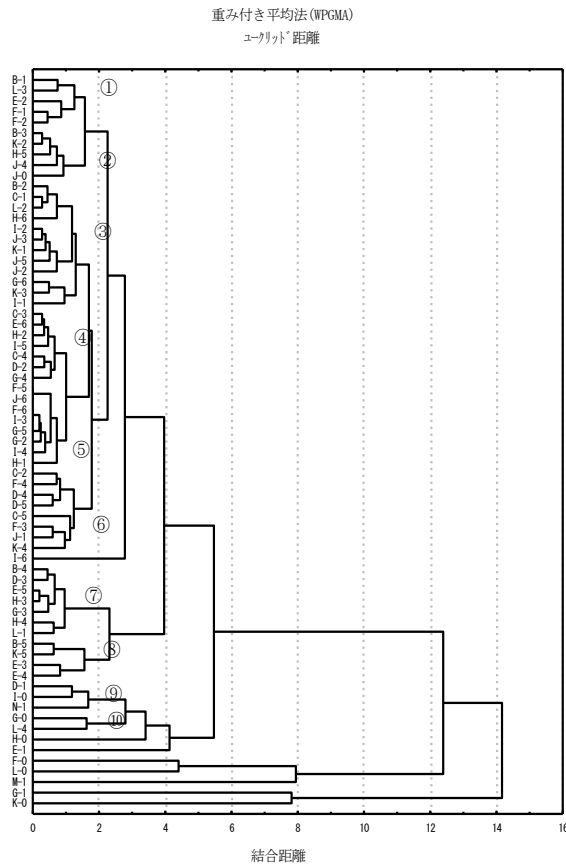


図 8.2.6 穴のサイズ別個数による
クラスター分析結果

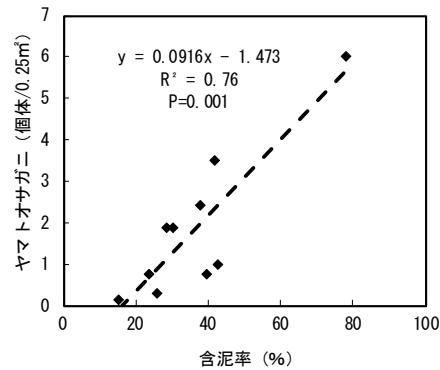
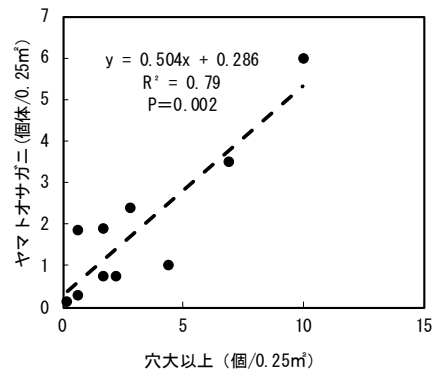


図 8.2.7 ヤマトオサガニ個体数と穴大以上
および含泥率との関係

表 8.2.4 主な底生生物の個体数と穴の数、底質との相関係数(r)

主な出現種	穴の数					底質					地盤高
	小 φ 5 ~10mm	中 φ 10 ~15mm	大 φ 15 ~20mm	極大 φ 20mm ≤	大以上 φ 15mm ≤	強熱 減量	泥 (粘土+ シルト)	細砂	粗砂	礫	
ヤマトオサガニ			0.85	0.88	0.85	0.69	0.87	-0.82			0.74
オサガニ	0.75			-0.74		-0.68		0.72			
<i>Lumbrineris</i> sp.		-0.65			-0.67						
アサギヤコ			-0.71								
<i>Heteromastus</i> sp.		0.72									
マモコサガニ		-0.75			-0.67						

有意確率 $p < 0.05$ を表示
N=10

そこで、各地点のバラツキによる誤差を小さくし相関の精度を高めるため、巣穴のサイズ別個数に着目して調査地点のクラスター解析を行い、巣穴の分布に類似性のみられた図 8.2.6 の①~⑩のグループの平均値間で相関をとったところ、表 8.2.4、図 8.2.7 に示すようにヤマトオサガニと穴大(直径 15mm)以上、含泥率との間に相関係数 $r=0.85$ 以上の高い相関が得られた。オサガ

ニと細砂にも $r=0.72$ と高い相関がみられ、オサガニ類の分布が底泥粒度の良い指標となること、穴の数や底質からヤマトオサガニの個体数の推定が可能となったことが明らかとなった。

なお、以上の相関分析および因子分析には、統計解析ソフト STATISTICA³⁾を使用した。

3) 大型底生生物・巣穴の個体(個)数を定量把握するための必要サンプル数

a) 底生生物

底生生物の72地点の調査結果をもとに、90%の信頼性、誤差±30%で曾根干潟の底生生物を定量的に把握する場合の必要サンプル数(50×50cm コドラート採集法)を次式により求めた。

なお必要サンプル数の算出は、全地点のデータを用いた場合と出現地点のみのデータを用いた場合の2種類で行った。計算結果は表 8.2.5 に示すとおりである。

必要サンプル数²⁾

$$N = (z/E)^2 \sigma^2 = (1.667/(\bar{x} \times 0.3))^2 \times \sigma^2$$

(信頼度 90%, 誤差±30%)

ここで、z: t 値(信頼度 90%, 自由度 71)=1.667

\bar{x} : 平均値 σ : 標準偏差

E: 許容誤差=平均値×30%(誤差)

これによると、ヤマトオサガニの必要サンプル数は 67、オサガニは 40 で、個体数上位 20 種の中ではオサガニが最も少ない。これはオサガニの I_δ 指数(森下)²⁾が 1.4 とランダム分布に近いことに起因している。底生生物のほとんどは集中分布型を示すため、干潟全体でのバラツキが大きく、図 8.2.8(左)に示すように必要サンプル数は平均個体数の増加に伴い増える傾向にある。特にホトギスやアサリ、シホフキなどの二枚貝類の必要サンプル数は 400~2,200 であり(表 8.2.5)、これらの採集による定量的把握は極めて困難といえる。一方、表在性のヘナタリ、アラムシロ、ホソウミニナ等の巻貝、オサガニ類の必要サンプル数は 40~550(表 8.2.5)と二枚貝に比

表 8.2.5 主な底生生物の必要サンプル数

順位	門	綱	目	科	種名	総個体数	I_δ 指数	分布型	必要サンプル数	
									(全地点データ)	(出現地点データ)
1	軟体動物門	二枚貝綱	イガイ目	イガイ科	ホトギス	777	71.1	集中分布	2193	242
2	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタガガイ目	マルスタガガイ科	アサリ	675	48.0	"	1471	254
3	軟体動物門	腹足綱	腹足目	ウミナシ科	ヘナタリ	382	5.4	"	143	34
4	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタガガイ目	ハナガモリ科	ハナガモリ	199	69.9	"	2155	833
5	軟体動物門	腹足綱	新腹足目	オリヨコハシ科	アラムシロ	195	3.3	"	82	36
6	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタガガイ目	ハカガイ科	シオフキ	135	13.9	"	418	104
7	節足動物門	甲殻綱	十脚目	スガニ科	ヤマトオサガニ	126	2.6	"	67	23
8	節足動物門	甲殻綱	十脚目	スガニ科	オサガニ	84	1.4	"	40	9
9	節足動物門	甲殻綱	完胸目	フジツボ科	ササフジツボ	81	27.1	"	834	94
10	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタガガイ目	ニッコウガイ科	ユシオガイ	61	8.6	"	270	46
11	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタガガイ目	ニッコウガイ科	イチョウシトリ	40	3.1	"	121	19
12	軟体動物門	二枚貝綱	マルスタガガイ目	マルスタガガイ科	オキシジミ	35	1.6	ランダム分布	81	7
13	節足動物門	甲殻綱	完胸目	フジツボ科	シロスジフジツボ	35	21.8	集中分布	695	51
14	環形動物門	多毛綱	遊在目	チロ科	<i>Glycera subaenea</i>	34	2.8	"	121	12
15	環形動物門	多毛綱	遊在目	キボシツメ科	<i>Lumbrineris sp.</i>	33	1.4	ランダム分布	78	6
16	節足動物門	甲殻綱	十脚目	アナシヤコ科	アナシヤコ	25	1.9	"	117	6
17	軟体動物門	腹足綱	中腹足目	ウミナシ科	ホリミナ	24	16.2	集中分布	548	29
18	環形動物門	多毛綱	定在目	イトコガイ科	<i>Heteromastus sp.</i>	23	11.4	"	407	25
19	節足動物門	甲殻綱	十脚目	コブシガニ科	マメコブシガニ	20	3.8	"	194	11
20	節足動物門	甲殻綱	十脚目	イワガニ科	ケキイワガニ	16	4.8	"	250	10

$$I_\delta = n \frac{\sum_{i=1}^n x_i(x_i-1)}{N(N-1)}$$

n: サンプル数, N: 総個体数($\sum x_i$), x_i : i 番目のサンプルの個体数

$I_\delta = 1$ はランダム分布(ポアソン分布), $I_\delta < 1$ は一様分布, $I_\delta > 1$ は集中分布を示す。1 からどれくらい離れたら有意かは次式を F 検定する。

$$F = \frac{s^2}{\bar{x}} = \frac{I_\delta(N-1)+n-N}{n-1}$$

$$s^2 = \frac{\sum(x_i-\bar{x})^2}{n}$$

s: 標準偏差, \bar{x} : x_i の平均値²⁾

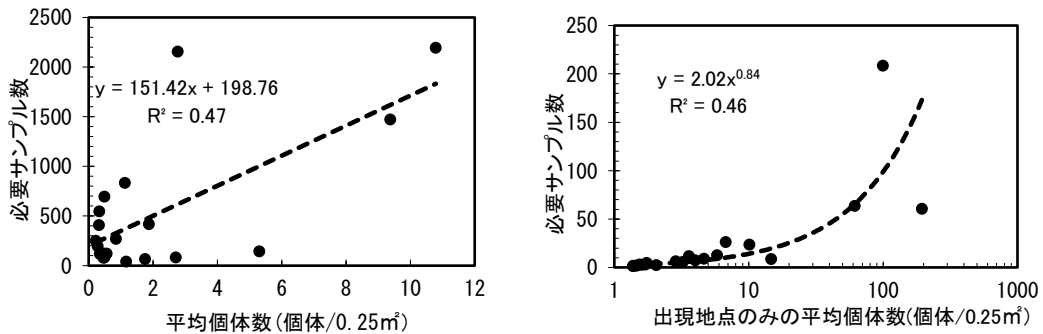


図 8.2.8 底生生物の平均個体数と必要サンプル数との関係(左: 全地点のデータ, 右: 出現地点のみのデータ)

べれば少ないものの、定量的把握には多数のサンプルが必要であり、後述のようにラジコンヘリの活用が有効である。また、生息域(出現場所)が特定できれば図 8.2.8(右)に示すようにサンプル数は無作為抽出の図 8.2.8(左)の概ね 10 分の 1 で良い。

b) 巣穴

底生生物と同様の方法でヤマトオサガニと関係の深い「穴大」および「穴極大」の必要サンプル数を算出すると、表 8.2.6 に示すようにそれぞれ 63, 54 で、オサガニ類の必要サンプル数の 40~70(表 8.2.5)と概ね一致した。

(高比良)

c) ラジコンヘリで写真撮影した巣穴

2000 年 9 月 26 日にヤマトオサガニの主生息域(図 8.2.1 の地点 G-0, G-1, H-0, H-1 で囲まれた範囲)内の 8 区域(表 8.2.7)で農薬散布用の大型ラジコンヘリ(以下、「RC ヘリ」という)による巣穴の写真撮影を試験的に行った(写真 8.2.5, 図 8.2.9, 写真 8.2.6)。

表 8.2.7 はこのとき撮影した 8 区域(1 区域は写真 1 枚の撮影範囲で約 4.6×5.5m)の写真から 1×1m 枠内のオサガニ類の巣穴を目視で判定・計数し、信頼度 90%, 誤差±30%の必要サンプル数を求めたものである。これによると、各区域の必要サンプル数は 2~8 で、(50×50cm 枠に換算すると約 8~28)となった。RC ヘリでは写真 1 枚あたり 14~16 サンプルを採取できるため、1 区域 1 枚程度の撮影で十分な精度を確保できる。また、写真ではカニの活動個体、巻貝類も確認でき(写真 8.2.7), RC ヘリがホバーリングしながら上空からゆっくり近づくと 2m 程度までカニが逃避せずにその場に留まっていることも明らかとなった。なお、必要サンプル数が前項「b) 巣穴」の穴の 63, 54 に比べて 18(50×50cm 枠換算)と少ないのは、RC ヘリではヤマトオサガニの主分布域のみを対象にしたためと考えられる。

(奥田)

4) 曾根干潟におけるヤマトオサガニ生息数

干潟全体 72 地点におけるヤマトオサガニの採集調査結果から干潟面積 500 ヘクタールの本種の生息数を推定すると、表 8.2.8 に示すように約 3,500±1,200 万個体(信頼度 95%)となった。

表 8.2.6 巣穴の必要サンプル数

項目	穴大	穴極大
標本数(n数)	68	68
平均	1.73	1.53
不偏分散 σ^2	6.0	4.1
標準誤差 $\sqrt{(\sigma^2/n)}$	0.30	0.25
90%信頼範囲(平均±個体)	0.50	0.41
誤差(±%)	29%	27%
必要サンプル数 (90%の信頼度, ±30%の誤差)	63	54



写真 8.2.5 RCヘリによる干潟写真の撮影状況

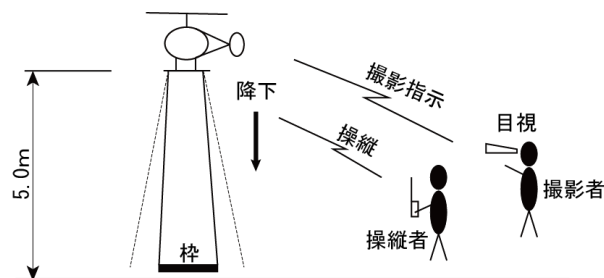


図 8.2.9 RCヘリによる干潟写真の撮影方法

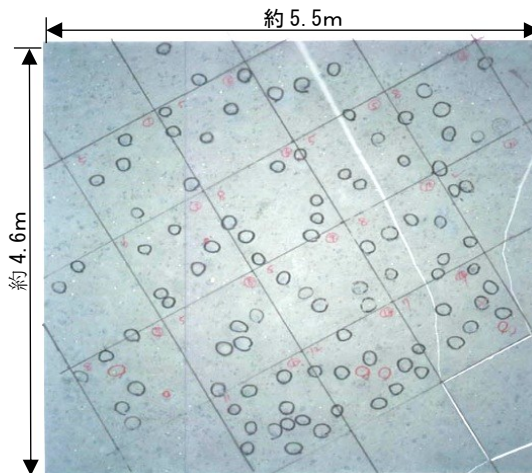


写真 8.2.6 RCヘリ撮影写真での巣穴判定例
(巣穴の形状から、○で囲った巣穴をヤマトオサガニの巣穴と判定した)

表 8.2.7 RC ヘリで撮影した写真から判別した巣穴の必要サンプル数

項目	記号・計算式	区 域								平均
		1	2	3	4	5	6	7	8	
標本数 (n)	n	16	16	16	16	16	14	15	15	15.5
自由度 (f)	f=n-1	15	15	15	15	15	13	14	14	14.5
平均 (X)	X	8.2	3.7	11.1	8.6	11.7	6.8	5.9	4.7	7.59
不偏分散	$\sigma^2 = B / (n-1)$	12.2	3.0	10.0	5.7	13.3	7.0	4.7	1.6	7.18
標準誤差	$SE = \sqrt{(\sigma^2/n)}$	0.9	0.4	0.8	0.6	0.9	0.7	0.6	0.3	0.65
t値 (信頼度90%, $\alpha=0.05$)	Z ₉₀	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.77	1.76	1.76	1.76
90%信頼範囲 (平均±U個)	U=t値×SE	1.5	0.8	1.4	1.0	1.6	1.2	1.0	0.6	1.14
誤差 (%)	U/X	18.7%	20.7%	12.4%	12.1%	13.7%	18.4%	16.8%	12.3%	15.6%
必要サンプル数 (N) (信頼度90%, 許容誤差±30%)	$N = Z_{90}^2 / (X \times 0.3)^2 \times \sigma^2$	6.2	7.6	2.8	2.6	3.3	5.3	4.7	2.5	4.4

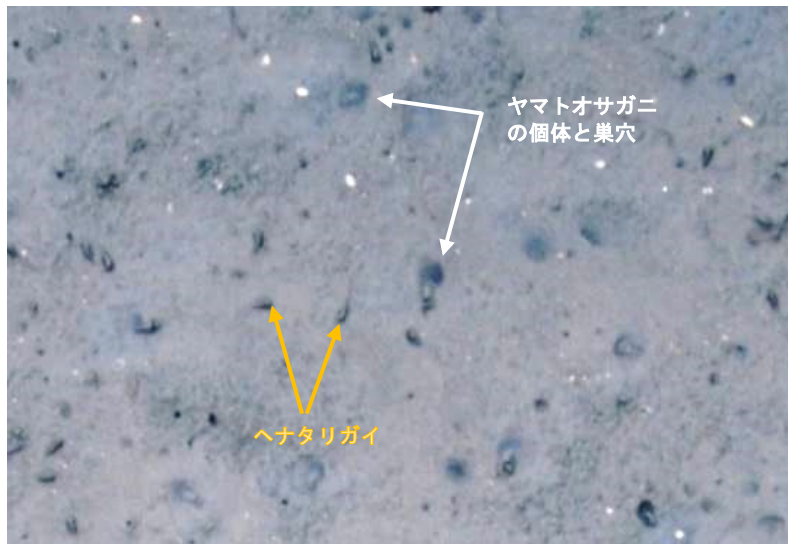


写真 8.2.7 RC ヘリ撮影写真で確認できるヤマトオサガニとヘナタリガイ

表 8.2.8 採取個体数から推定した曾根干潟全域におけるヤマトオサガニの生息数

項 目		ヤマトオサガニ	干潟面積 (㎡)	干潟全体個体数
		A	B	C = A × B × 4
平均個体数	X (個体/0.25㎡)	1.75	5,000,000	35,000,000
標本数 (n)	n	72	—	—
標準偏差	S	2.54	—	—
	$S_x = S / \sqrt{n}$	0.30	—	—
t値 (信頼度95%, $\alpha=0.05$)	Z ₉₅	1.99	—	—
誤差 (信頼度95%)	$S_x \times Z_{95}$	0.60	5,000,000	12,000,000

8.2.2 巣穴によるヤマトオサガニ生息数の推定法

軟弱地盤で人の歩行が困難な泥質域に生息するヤマトオサガニの広域・多点調査は、通常は困難である。このような場合、生息密度の異なる数点で穴と本種の個(体)数密度との相関を求め、RCヘリ等を用いた穴の数から生息数を推定する方法が現実的である。

そこで定量研では、この実証例として曾根干潟の図8.2.10に示す6地点で巣穴の数とヤマトオサガニの数の各密度の相関を求め、全域で調査した巣穴の数から、干潟全域のヤマトオサガニの生息数を推定した¹⁾。

(1) 調査方法

2002年9月26日に、図8.2.10に示す①～⑥の6地点で巣穴の計数およびカニ類の採集を行った。巣穴は、各地点の干潟上10か所に50×50cmの方形枠(写真8.2.1)を設置し、枠内の穴大(約1.5cm)以上のものを目視計数した。

カニ類は、計数した巣穴数の多い方から2か所および少ない方から2か所を除く6か所で、2000年9月26日の調査と同様の方法(写真8.2.2,写真8.2.3)で採集した。

(2) 調査結果

各地点10か所で調査した直径1.5cm以上の巣穴数とヤマトオサガニの数の地点平均値の相関は、図8.2.11に示すように $R^2=0.77$ と比較的高かった。

この相関式 $y=0.320x+0.756$ を用いて、干潟全域におけるヤマトオサガニの生息数を推定すると、表8.2.9に示すように約3,600±660万個体となり、前述の採集調査による推定値3,500±1,200万個体とほぼ一致した。

(高比良)



図 8.2.10 巣穴によるヤマトオサガニ生息数の推定法検討のための調査地点

(航空写真は2000年9月27日に定量研が撮影)

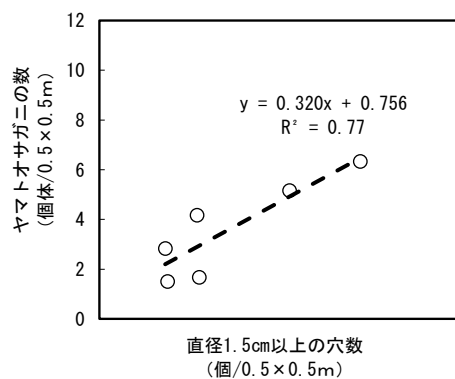


図 8.2.11 巣穴数とヤマトオサガニ個体数との相関 (各地点10か所の平均値による散布図)

表 8.2.9 巣穴の数から推定した曾根干潟全域におけるヤマトオサガニの生息数

項 目		穴数 (直径1.5cm以上)	ヤマトオサガニ A	干潟面積 (㎡) B	干潟全体個体数 C = A × B × 4
平均個数	X (個/0.25㎡)	3.25	1.80	5,000,000	36,000,000
標本数 (n)	n	68	68	—	—
標準偏差	S	4.28	1.37	—	—
	$S_x = S/\sqrt{n}$	0.52	0.17	—	—
t値 (信頼度95%, $\alpha=0.05$)	Z_{95}	2.00	2.00	—	—
誤差 (信頼度95%)	$S_x \times Z_{95}$	1.04	0.33	5,000,000	6,600,000

8.2.3 航空写真によるヤマトオサガニ生息数の推定

定法

リモートセンシングは対象物を面的かつ即時に把握できる点で優れている。このような利点をもつリモートセンシング手法を、干潟底生生物の分布状況把握に利用できないだろうかというのが、本研究のねらいである。

人工衛星や航空機は、リモートセンシングの代表的なプラットフォーム(電磁波などの観測センサーを搭載した移動体)である⁴⁾。本研究では対象範囲の面積を考慮し、以下の理由から航空写真を利用することにした。

- ・干潟干出時をねらって撮影できる。
- ・人工衛星画像よりも空間解像度の点で優れる。
- ・人工衛星画像よりも大気の影響が少なく、色の再現性に優れる。

本研究では、曾根干潟の代表種の一つであるヤマトオサガニを研究対象としたが、ヤマトオサガニに限らず底生生物を小縮尺の航空写真で直接捉えることは難しい。しかし、ヤマトオサガニの生息密度は底質の含泥率と高い相関関係を示すことから、底質の含泥率の分布が分かれば、それをヤマトオサガニの分布に置き換えることが可能である。そのため本研究では、航空写真に写る干潟表面の色から含泥率の分布を捉え、その含泥率の分布から間接的にヤマトオサガニの分布状況を捉える手法を検討した。

(1) 調査項目と推定手法

航空写真からのヤマトオサガニ分布の推定方法および調査項目は、図 8.2.12 に示すとおりである。

1) 航空写真撮影

撮影諸元は、次のとおりである。

撮影日時:2000年9月27日14時

(大潮の最干潮時)

写真種別:垂直・カラー写真,縮尺 1/10,000

撮影数量:2コース,10枚

(干潟範囲約3km×1.5km, 図 8.1.1 参照)

撮影条件:カメラRC-20, F=153, オーバーラップ°60%,

サイドラップ°30%

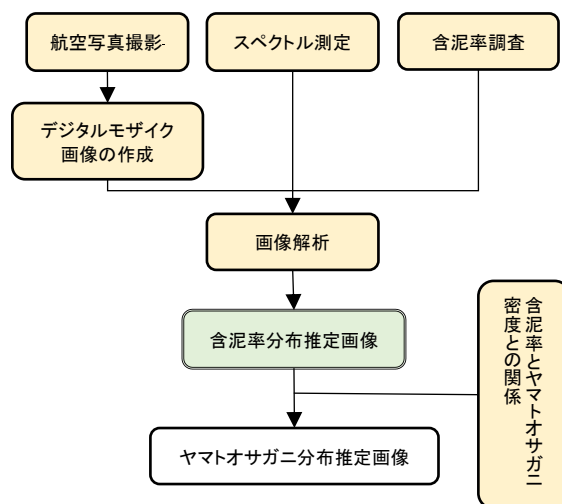


図 8.2.12 航空写真からヤマトオサガニ分布の推定方法

2) デジタルモザイク画像の作成

a) 航空写真の A/D (アナログ/デジタル) 変換

航空写真カラーポジフィルムをスキャナーで読みとり、3バンド(Blue, Green, Red)のデジタル画像に変換した。1画素の読みとりサイズは 0.1mm×0.1mm(空間解像度:地上サイズで 1m×1m 相当)とした。

b) 画像の接合 (デジタルモザイク)

各写真のデジタル画像を接合し、全撮影範囲のデジタルモザイク画像(図 8.2.13)を作成した。

3) 反射スペクトル測定

地表の物体はその種類や状態によって太陽放射光の反射特性が異なる⁵⁾。この特性を波長別にみたものを「反射スペクトル」といい、物体の種類や状態を判別するための有用な情報の一つとなる⁵⁾。ここでは、デジタルモザイク画像から含泥率を表す演算式を反射スペクトルから検討する目的で、現地で干潟面の反射スペクトルを測定するとともに同地点で採泥し(写真 8.2.8, 写真 8.2.9)、後日その泥の粒度組成を分析した。

調査日時:2003年1月25日 9時~12時

調査項目:反射スペクトル(波長毎の反射率),

粒度組成

測定機器:携帯型の可視近赤外分光装置

米国 ASD 社製 FieldSpec Pro Jr

(計測波長範囲:350~2,500nm)

調査地点:図 8.2.13 に示す 4 地点

(1 地点につき 3 回の測定値を平均)



図 8.2.13 航空写真のデジタルモザイク画像と反射スペクトル測定地点(A~D)



写真 8.2.8 スペクトルメーター



写真 8.2.9 反射スペクトル測定風景

4) 含泥率分布調査

デジタルモザイク画像の演算画像濃度と含泥率との相関関係を検証するために必要な含泥率データは、2001年6月11日、9月29日に調査した図 8.2.1 に示した 70 地点の底質調査結果を利用した。

5) 画像解析

図 8.2.14 に示すように、現地測定で得られた干潟面のスペクトル特性にもとづき、含泥率を反映すると考えられるデジタルモザイク画像の演算式を検討した。

次に、この演算式にもとづく含泥率調査地点の画像演算値と含泥率データとの相関関係を確認し、有意な相関関係が得られた演算式を用いて含泥率分布推定

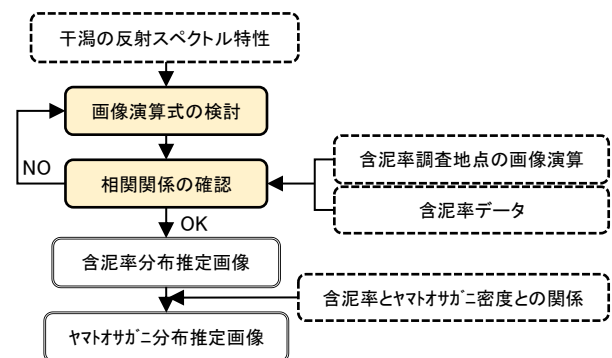


図 8.2.14 画像解析の手順

画像を作成した。さらに、含泥率とヤマトオサガニ密度との相関式により含泥率をヤマトオサガニ密度に換算し、含泥率分布推定画像をヤマトオサガニ分布推定画像とした。

(2) 調査・推定結果

1) 干潟面のスペクトル特性

測定地点の主な土質をみると、表 8.2.10 に示すように A, B, C 地点が砂泥、D 地点が砂であった。C, A, B, D の順に含泥率が高かった。

これら 4 地点のスペクトル(波長毎の反射率)は、図 8.2.15 のとおりである。本研究では航空写真を用いているので、航空写真のデジタルモザイク画像がカバーする可視域の波長帯(400~700nm)に絞ってスペクトル特性を検討した。

可視域のスペクトルを図 8.2.16 に、この図の傾きを正規化したグラフを図 8.2.17 に示す。これらの図の 400~500nm, 500~600nm, 600~700nm の各平均値がデジタルモザイク画像の Blue, Green, Red バンドの各濃度値に対応している。このグラフで注目されるのは、地点毎の①反射率の違いと②スペクトルの傾きの違いである。①反射率については、含泥率が高い C 地点と次に高い A 地点で全体的に反射率が低く、泥分を含まない D 地点では反射率が高い。また、②傾きについては含泥率の高い C 地点では右下がり、泥分を含まない D 地点では右上がり、含泥率が中位の A, B 地点ではその中間である。

2) 画像演算式

干潟面のスペクトル特性には前述のように含泥率との関係が認められたので、この関係を反映すると考えられる次の 3 つの画像演算式を含泥率分布推定画像の候補とした。

- ① $(B+G+R)/3$: 3 バンド平均濃度 ← 反射率の指標
- ② R/B : Blue バンド濃度に対する Red バンド濃度の比 ← 傾きの指標
- ③ $(R-B)/(R+B)$: 植物活力度判定に用いられる式の応用型 ← 傾きの指標

①式は 3 バンドを平均したものであり、図 8.2.16 に示すように反射率の指標と考えることができ、この値が大きくなると含泥率は低くなると考えられる。②式は Blue バンドから Red バンドにかけての傾きの指標と考えることができ、この値が大きくなると含泥率は低くなると考えられ

表 8.2.10 スペクトル測定地点の粒度組成(平均値)

地点名	含水率 (%)	中央粒径 (mm)	粒度組成 (%)					泥 (粘土+シルト)
			中礫	細礫	粗砂	中砂	細砂	
A	39.5	0.23	16.4	7.4	5.5	17.8	33.1	19.9
B	41.9	0.18	0.0	0.0	0.9	23.9	62.0	13.2
C	44.3	0.12	0.0	0.0	1.1	17.7	47.6	32.9
D	0.9	-	0.0	0.0		100.0		0.0

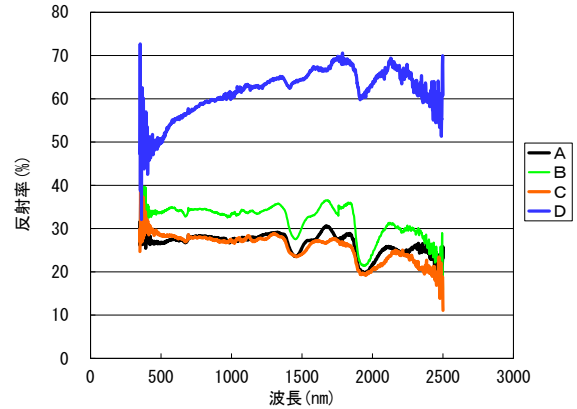


図 8.2.15 干潟面のスペクトル

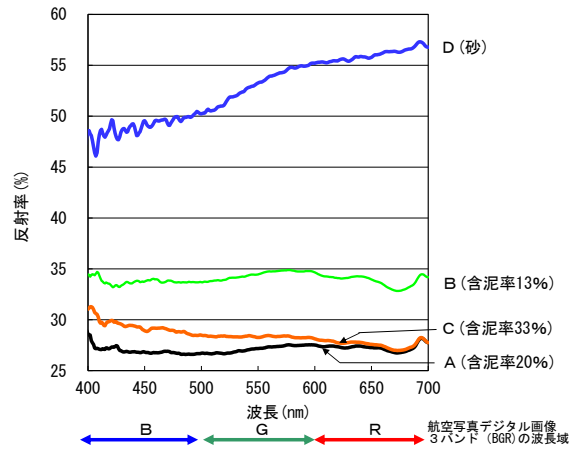


図 8.2.16 干潟面のスペクトル(可視域)

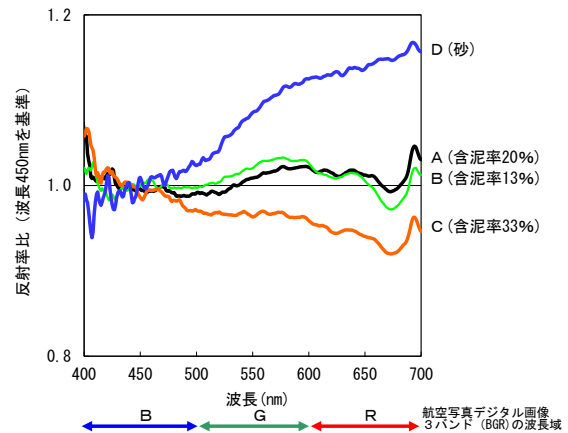


図 8.2.17 干潟面のスペクトル(波長 450nm の反射率で正規化)

る。③式は植物活力度判定に用いられる正規化植生指数(NDVI)⁴⁾の応用型で、2バンドの値の大きさにもよるが、②式と同様にBlueバンドからRedバンドにかけての傾きの指標となる可能性がある。その場合は、この値が大きくなると含泥率は低くなると考えられる。

3) 画像演算値と含泥率の相関

画像演算値と含泥率の関係は図8.2.18に示すとおりであり、②式および③式には有意な相関関係が認められた。したがって、②式および③式による演算画像は含泥率の分布傾向を表現しているものといえる。

今回は、この2式のうち決定係数(R^2)=0.27とより相関の高い③式による演算画像を、含泥率分布推定画像とした。

以後、含泥率を示す画像演算値をSI値(Silt Index)と呼び、曾根干潟のSI値は③式の演算値 $(R-B)/(R+B)$ とする。

なお、図8.2.18の③図のばらつきは、次のようなノイズ成分を完全に除去できていないことによるものと考えられ、現時点では本手法の精度上の限界となっている。

- ・航空写真で得られる含泥率の情報は干潟表面の色であるため、たとえば砂の表面に薄く泥がつもっているような場所では、実際の粒度組成に比べて含泥率が過大評価される。
- ・海水はRedバンドの波長をBlueバンドに比べて多く吸収するため⁶⁾、完全に水がひききっていない場所ではSI値が小さくなり、実際よりも含泥率が過大評価される。

4) 含泥率とヤマトオサガニ密度との関係

曾根干潟において含泥率とヤマトオサガニ密度との間には図8.2.7(下段)に示す相関関係がみられるので、含泥率分布推定画像の含泥率をヤマトオサガニ密度に換算し、図8.2.19に示す画像を得た。

画素ごとのヤマトオサガニ密度を干潟全体について合計した値、すなわち2000年9月調査時点における干潟全体のヤマトオサガニ現存量は3,067万個体と推定され、72地点の現地サンプリング結果からの推定値である約 $3,500 \pm 1,200$ 万個体と同等の値が得られた。

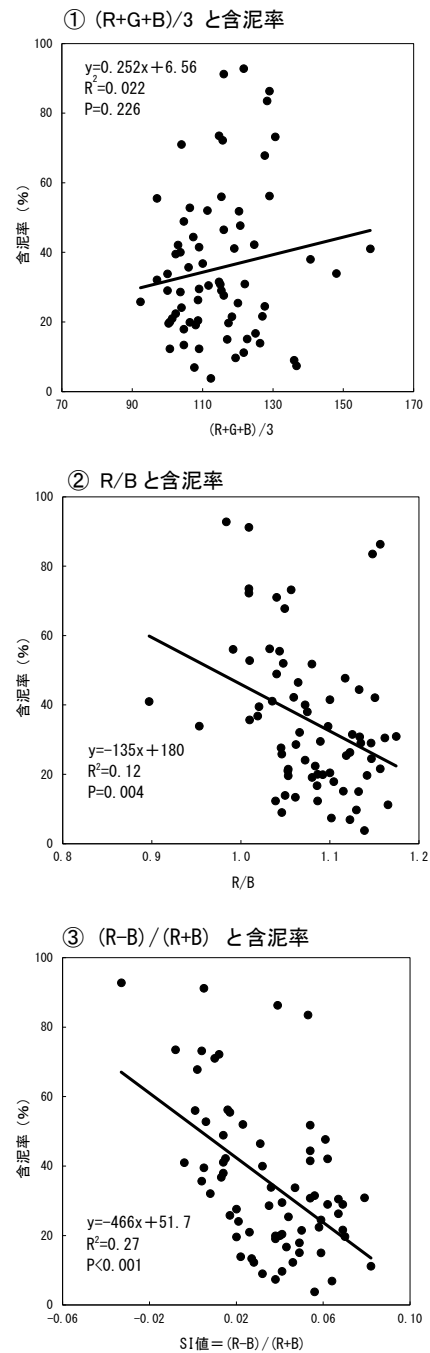


図 8.2.18 画像演算値と含泥率との関係

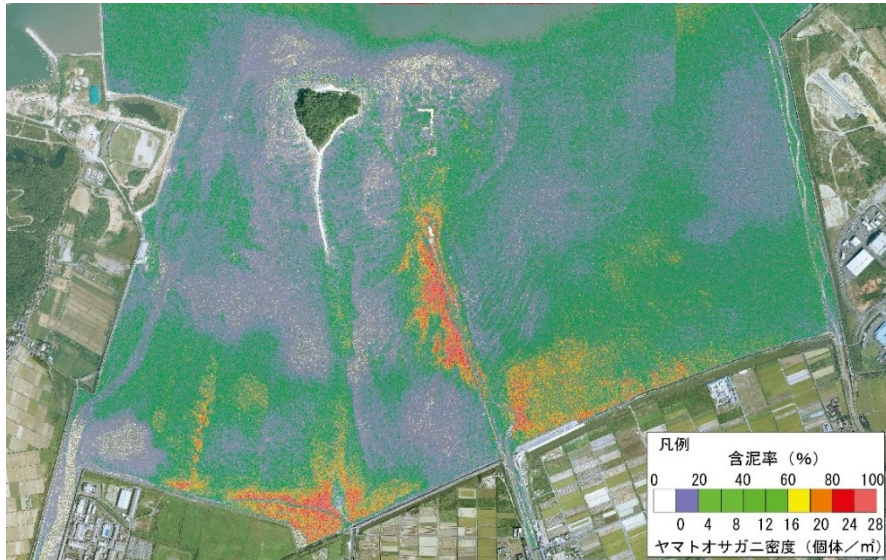


図 8.2.19 航空写真による曽根干潟のヤマトオサガニ分布推定画像(2000年9月時点)
* ヤマトオサガニの現存量は本画像より約3千万個体と算定される

(3) 本手法の標準化について

本研究で対象とした曽根干潟のヤマトオサガニについては、図 8.2.20 に示す調査手順によって今後継続的なモニタリングが可能である。

他の干潟ないし他の指標種については、事前の調査等で以下を明らかにすれば本手法の適用が可能である。他干潟での現地情報の蓄積が今後の課題である。

- 含泥率とスペクトル特性との対応関係
- SI 値と含泥率との相関関係 (SI 値の汎用性)
- 含泥率と指標種個体数密度との相関関係

なお、著者らはこれらの現地情報がない干潟でも底質性状の相対的分布までは把握可能であることを、福岡市博多湾内にある今津干潟で確認した(図 8.2.21)¹)。

(山内)

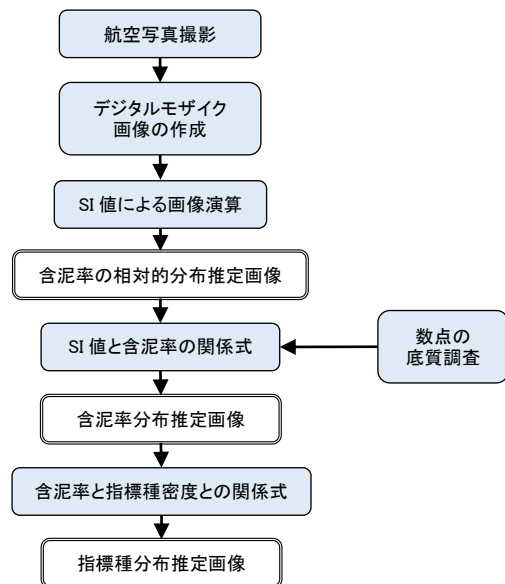


図 8.3.20 本手法による干潟底生生物指標種分布の調査手順

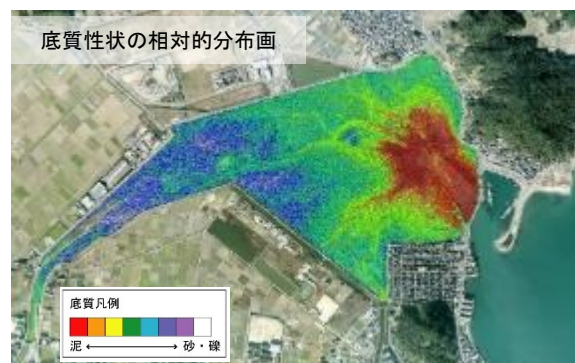


図 8.2.21 今津干潟への本手法の適用例(2003年1月17日撮影画像による底質性状の推定)

8.2.4 まとめ

・巣穴の数からヤマトオサガニ等大型底生生物の分布を把握するため、両者の分布実態等を現地踏査による干潟表面の写真撮影や現地採集により調査し、その関係を求めた。その結果、ヤマトオサガニの個体数密度と直径 15mm 以上の穴の個体数および底質の含泥率との間に高い相関関係が認められ、穴の数や底質からヤマトオサガニの個体数の推定が可能なが明らかとなった。

・曾根干潟でオサガニ類の個体数を定量的に把握するための必要サンプル数(信頼度 90%, 誤差±30%)は、50×50cm コドラート採集法ではヤマトオサガニが 67, オサガニが 40 と見積もられた。

・アサリ, シオフキ等二枚貝類の必要サンプル数(同信頼度, 同誤差)は 400~2,200, ヘナタリ, アラムシロ等巻貝類やオサガニ類は 40~550 で, 大型底生生物の定量的把握には多数のサンプルが必要であることが分かった。

・巣穴の数の定量的把握のための必要サンプル数(同信頼度, 同誤差)は, 穴大(直径 15~20mm)が 63, 穴極大(直径 20mm 以上)が 54 で, オサガニ類の必要サンプル数 40~70 と概ね一致した。

・現地採集調査から, 曾根干潟に約 3,500±1,200 万個体(信頼度 95%)のヤマトオサガニが生息していることが推定された。

・干潟代表 6 地点で目視調査した巣穴の数とヤマトオサガニ採集個体数の各密度の相関式を用いて, 曾根干潟全域 68 地点の平均巣穴数(目視による写真判定)からヤマトオサガニの生息数を推定すると約 3,600±660 万個体(信頼度 95%)で, 採集調査による推定値と概ね一致した。

・ヤマトオサガニが分布する干潟表面の巣穴をデジタルカメラ搭載の RC ヘリを用いて上空 5m から撮影した結果, 1 枚の写真で 1×1m 枠のサンプル(写真)14~16 個が取得でき, 撮影した区域の巣穴の数を目視による写真判定で把握するための必要サンプル数(信頼度 90%, 誤差±30%)の 2~8 個を十分確保できた。したがって, RC ヘリを使用すると巣穴の数が効率的に精度良く, しかも安全に調査できると考えられる。

・RC ヘリによる写真では, カニの活動個体, 巻貝類も確認でき, RC ヘリが上空 2m 程度まで近づいてもカニが逃げないことなども明らかとなった。さらに, 近年急速に開発が進み広く普及しているドローンを使用すれば, かなり低予算で同様の調査が可能になったと考えられる。

・曾根干潟の航空写真の画像解析を行い, 含泥率と相関の高い画像演算値 $(R-B)/(R+B)$ を選定し, その相関式から干潟全面の含泥率の分布を推定した。この推定した含泥率, および含泥率とヤマトオサガニの個体数密度との相関式を用いて, 曾根干潟におけるヤマトオサガニの分布, 生息数を推定した。その結果, ヤマトオサガニの生息数は約 3,000 万個体と推定され, 現地採集による推定結果約 3,500 万個体と概ね一致した。

謝辞:本研究は(財)河川環境管理財団の河川整備基金助成事業として実施しました。また, 九州大学工学研究院環境社会部門教授の中山裕文氏にはスペクトル測定および画像処理に際して多大なご協力と適切なご助言をいただきました。心よりお礼申しあげます。

(奥田, 山内, 高比良)

参考文献

- 1) 小野勇一:河川整備基金助成事業「河口干潟生態系における環境評価手法の研究」報告書(助成番号 14-1-II-2-5), 40 pp., 河川環境管理財団, 2003.
- 2) 伊藤嘉昭:3. 個体数調査法(統計), 生物学教育講座7 動物の個体群と群集, pp.19-41, 東海大学出版会, 1980.
- 3) StatSoft: *STATISTICA*, StatSoft, Tulsa, Oklahoma.
- 4) リモートセンシング学会(編):基礎からわかるリモートセンシング, 319pp., 理工図書, 2011.
- 5) (独)国立環境研究所:多バンド画像解析手法, 平成15年度環境省委託業務結果報告書—不法投棄等衛星監視システム開発調査(平成16年3月), pp.9-26, 2004.3.
- 6) 松村皐月:可視光リモートセンシングが持つ深度情報, 水産工学, Vol.27, No.1, pp.65-68, 1991.

8.3 環境 DNA による干潟生物の定量・定性評価

2015 年、宮らによってバケツ一杯ほどの水をくんで環境 DNA を分析すると、そこにいる魚の種類が検出できるという画期的な調査手法が発表され¹⁾、テレビや新聞等のメディアにも多数取り上げられた。その後、本手法を用いた多くの研究が行われ、技術も進歩し、魚類だけでなく哺乳類や鳥類ほか様々な生物への適用も進んできたところである²⁾⁴⁾。

定量研でもカブトガニをはじめとする干潟生物調査への環境 DNA の活用方法について、これまで調査・検討を進め、学会等で発表してきた^{注1)}。その内容を以下に紹介する。

8.3.1 環境 DNA によるカブトガニ幼生分布調査の可能性

カブトガニの幼生調査は、前述のように干潮時に干潟を踏査し目視で個体を確認するのが一般的である。この目視調査では、幼生が干潟上を活発に這いまわっているときはその個体を見つけやすいが、泥中に潜って動いていない個体を見つけるのは難しい。特に、若い 1～2 齢の小さい個体の発見は困難であり熟練を要する。

また、九州大学等で産卵のために来浜するカブトガニ成体を対象に環境 DNA の研究が既に進められているとの情報があった。

そこで、定量研では幼生調査の新たな手法として環境 DNA に着目し、当時、カブトガニ成体の DNA 分析で実績のあった(一財)九州環境管理協会と共同で 2017 年から研究を開始した。これまでの研究成果は以下のとおりである。

(1) 底泥由来環境 DNA の検出確認調査

1) 採取地点・方法

曽根干潟内でカブトガニ幼生が多く生息する南干潟の地点と、ほとんど幼生がない北干潟の地点(図 8.3.1)の底泥(採取日:2017 年 10 月 1 日)、干潟表面水および干潟間隙水(採取日:2018 年 9 月 9 日)を採取し、カ

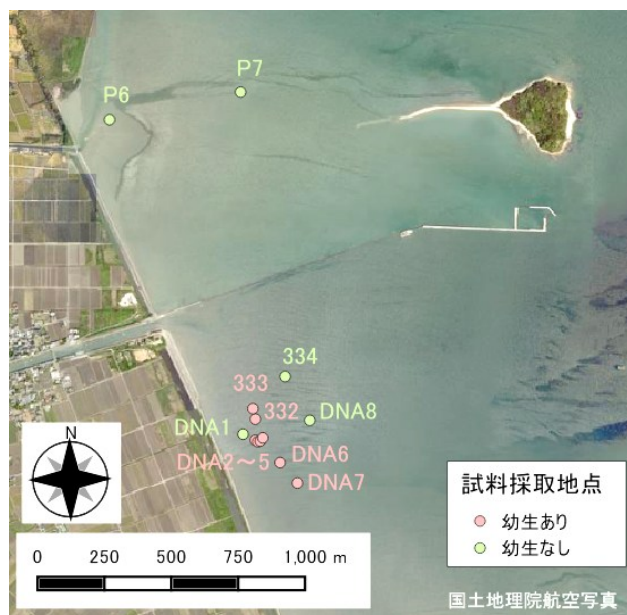


図 8.3.1 底泥由来の環境 DNA 調査地点



写真 8.3.1 底泥由来の環境 DNA の採取状況

ブトガニの DNA が検出できるかを調査した。各試料の採取方法は次のとおりである。

- 底泥:表面をプラスプーンですくって 15mL チューブに採取(写真 8.3.1 左)。
- 干潟表面水:干出後に泥のくぼみ等に残っている水をプラカップですくい 500mL ポリ瓶に採取(写真 8.3.1 中央)。
- 干潟間隙水:泥をスコップで 15cm ほど掘って湧き出してくる水をプラカップですくい 500mL ポリ瓶に採取(写真 8.3.1 右)。

2) DNA 抽出方法

底泥は、冷凍保存した試料約 0.5g から ISOIL(ニッポンジーン)を使用して DNA を抽出した。

水試料は 4～8℃で静置し、土粒子が沈殿した状態で上澄みを GF/F フィルターでろ過し、フィルターから DNeasy Blood & Tissue kit(キアゲン)を使用して DNA を抽出した。

注1)・第1回環境 DNA 学会東京大会, 2018 年 9 月 29-30 日, 日本科学未来館。P04「干潟底質の環境 DNA によるカブトガニ空間利用調査の試み」大井和之, 高比良光治, 小島治幸。

・環境 DNA 学会第 3 回大会 第 36 回個体群生態学会 合同大会, 2020 年 11 月 14-16 日, オンライン。PP065「干潟の生物調査への環境 DNA 分析活用の試み」大井和之, 貞末加織, 宇野潔, 高比良光治, 小島治幸。

3) DNA 検出方法

カプトガニのミトコンドリア全塩基配列から Primer3plus を使用して cytb 遺伝子領域と ND5 遺伝子領域に各 1 組の Forward primer と Reverse primer と Internal probe を設計した。Internal probe は FAM-TAMRA で標識した。

Primer のみのインターカレーター法 (TB Green premix Ex Taq タカラバイオ) と Probe を用いる蛍光標識プローブ法 (Probe qPCR mix) の両方法での定量 PCR (qPCR) 分析を試行した。

定量 PCR 分析では、標本から採取したゲノム DNA の濃度 (38.7ng/ μ L) を濃度標準 1 としてカプトガニ DNA 濃度を計測した。また、陽性対照として、カプトガニを飼育した水槽水および水槽底泥を使用し小さい。

4) 調査結果

曾根干潟で採取した試料の DNA の検出結果を、カプトガニの飼育水槽から採取した試料の DNA 検出結果と併せて図 8.3.2 に示す。

カプトガニを継続的に飼育している施設 (まもる一む福岡) の飼育水槽水 (飼育水槽水 A) からは、カプトガニの標本から採取したゲノム DNA 溶液の DNA 濃度 (38.7ng/ μ L) を濃度標準 1 としたとき、 10^{-3} のオーダーの濃度のカプトガニ DNA が検出された。カプトガニ成体 1 個体を 2 日間飼育していた水槽水 (飼育水槽 B) から 10^{-4} のオーダーの濃度の DNA が検出された。3 齢幼生 1 個体を 2 日間飼育していた小型水槽の底泥からは 10^{-6} のオーダーの濃度の DNA が検出された。

干潟の表面水からは、付近で幼生が確認されている地点で 10^{-6} 未満の濃度の DNA が検出された。同一試料の反復で検出されない場合もあった。

干潟の底泥からは、幼生の這った痕跡を含むように

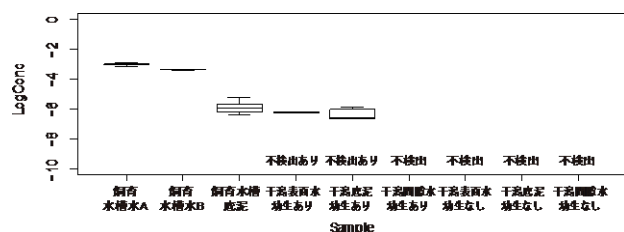


図 8.3.2 カプトガニ環境 DNA 濃度※

※標本から採取したゲノムDNAを濃度標準とした

採取した試料から 10^{-7} のオーダーの濃度の DNA が検出された。ただし、3 反復全て不検出の試料も多かった。

干潟の間隙水からは、付近で幼生が確認されている地点でも全て不検出であった。

付近で幼生の確認がない地点の試料からは、表面水、底泥、間隙水のいずれも不検出であった。

5) 考察

幼生あり地点の干潮時の干潟表面水 500mL からは底泥 0.5g の数倍の濃度のカプトガニ DNA が検出されたが、満潮時には海水が混合・拡散するため DNA 濃度が低く、検出が難しいものと考えられた。

干潟間隙水はいずれの地点でもカプトガニ DNA は検出できなかった。底泥内では微生物による有機物の分解が速く進行するため、検出が難しいことも要因と考えられた。

干潟表面の底泥は満潮水没時にも対象生物の DNA を保持している可能性があると考えられた。しかし、底泥、土壌試料は 0.5g 程度から DNA 抽出を行うので、0.5~2L をフィルターろ過する水試料に比べて、対象生物の老廃物や粘膜細胞などが含まれる確率が低くなり、幼生あり地点での低濃度の検出にとどまったと考えられた。

本調査結果から、底泥由来の環境 DNA からカプトガニ幼生の分布を把握するためには、表面土壌の効率的な採取方法の工夫、例えばドローンの活用や数十 g~1kg 程度の土壌試料から安価に DNA を抽出できる方法の開発が必要と考えられた^{注2)}。

そこで、定量研では 2019 年に DNA 抽出に DNA の収率の向上および土壌に含まれる PCR 阻害物質の除去効果が期待される DNeasy PowerSoil Kit を使い、底泥供試量の増量の試みとして 0.25g, 2.5g (0.25g を 10 回抽出), 2.5 g (0.25g を 10 回抽出後に再精製、濃縮) の泥からの DNA 抽出・分析を行ったが、どのサンプルからもカプトガニ DNA の検出は確認できなかった。

以上の結果から、幼生生息地点の底泥中または底泥に接触する間隙水や干潟表面水に含まれるカプトガニ DNA に分解したカプトガニ DNA 断片が含まれる可能性はあるものの、DNA 量は非常に僅かであり、底泥由

注2) 本調査結果は 2018 年 9 月 29 日、30 日に東京 (日本科学未来館) で開催された第 1 回環境 DNA 学会大会でポスター発表を行った。

来の環境 DNA を用いてカブトガニ幼生分布の定量評価を行うのは現時点の技術では難しいと考えている。

(2) 表層水に含まれる環境 DNA の検出確認調査

定量研では、底泥由来の環境 DNA からの幼生分布の把握は現時点の技術では難しいと考え、既に技術が確立している環境水中の環境 DNA による幼生分布把握の可能性を2019年～2020年に検討したので以下に紹介する。

1) 採取地点・方法

2019年は9月15日の満潮時に図 8.3.3 に示す堤防沿い4地点(A1',E0',P10',P6')の各水際で500mLの滅菌ポリ瓶を直接海水中に沈め、500mLの表層水を採取した。DNAの分解を防止するため、採取した表層水に10%核酸分解防止剤(BAC:塩化ベンザルコニウム、商品名オスバン-S)を終濃度0.01%になるように0.5mL添加し、転倒混和して撹拌した。採取試料は持ち帰りから過まで保冷した。

2020年は10月4日の上げ潮時に表層水を図 8.3.3 に示すD3で、満潮時にD1～D6の各地点で、下げ潮時にD3とD4で各1サンプルの計9サンプルを護岸から紐付きバケツを使用して採取した。現地ろ過ではカートリッジフィルター(ステリベクスHV、孔径0.45 μ m)を使用し、RNA laterを2mL入れて保冷して持ち帰った。採水時間の都合で現地ろ過できなかったサンプルは、1Lポリ瓶に入れ塩化ベンザルコニウムを1.2mL添加して保冷して実験室に持ち帰り、その日のうちにステリベクスでろ過した。ステリベクスによる各サンプルのろ過量は500～700mLで、ろ過後は-20℃で冷凍保存した。

なお、サンプリングから保存までの方法は、環境DNA学会が発行する「環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.2(2020年4月3日発行)」⁹⁾を参照した。

2) DNA抽出方法

2019年は、試料の入ったポリ瓶を4～8℃で静置し、土粒子が沈殿した状態で上澄み液をガラス繊維ろ紙(GF/F:粒子保持能0.7 μ m)でろ過し、DNA抽出作業を行うまで-20℃で冷凍保存した。DNA抽出はろ紙から市販のDNA抽出キットであるDNeasy Blood & Tissue kitを使用してプロトコルに従って行った。

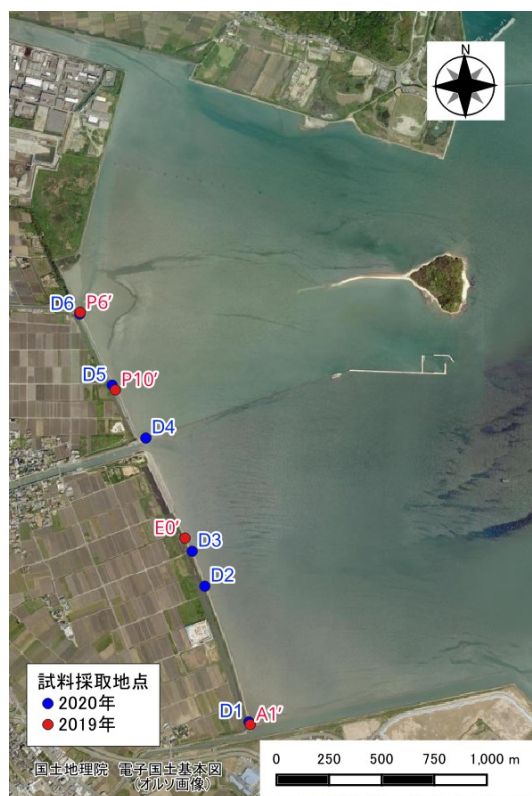


図 8.3.3 表層水に含まれる環境 DNA の調査地点

2020年は、解凍したカートリッジフィルターの注入口を下にして3000×gで30秒遠心し、フィルター内に残っている水分を除去した後、DNA抽出バッファー(AL+PBS+ProK)440 μ Lをフィルター内に入れてローテーターで回転させながら56℃で20分保温した。遠心で抽出バッファーをマイクロチューブに移し、環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.2⁹⁾に従ってDNeasy Blood & Tissue kitを使用してカラムによるDNA抽出を行い、200 μ LのAEバッファーで溶出した。

3) 定量PCR

2019年はインターカレーター法により、リアルタイムPCR装置を用いて、定量PCR試薬TB Green premix Ex Taqを使用してプロトコルに従って行った。予備試験は各地点4反復、本試験は各地点8反復であった。標準試料には今津干潟のカブトガニ幼体の脚から採取したゲノムDNAを用い、プライマーは前述の泥試料と同様のものを使用した。蛍光色素を加えてPCRを行い1サイクルごとの蛍光強度を測定してDNAの増幅曲線を描き、反応液中の対象DNA濃度を評価した。分析の最後には融解曲線分析を追加した。

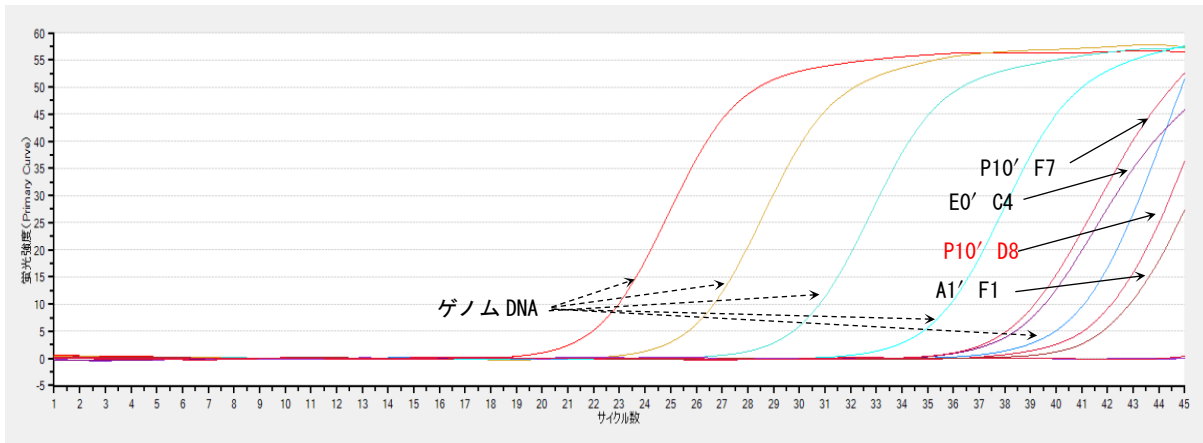


図 8.3.4 定量 PCR における増幅曲線(2019 年)

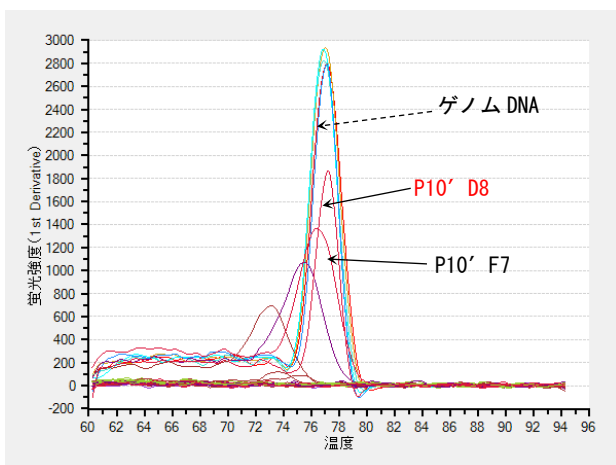


図 8.3.5 定量 PCR における融解曲線(2019 年)

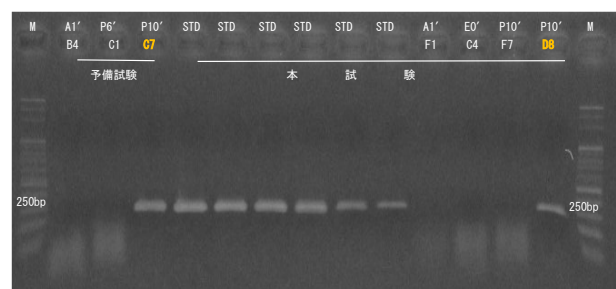


図 8.3.6 アガロース電気泳動像(2019 年)

M :DNA ラダーマーカー
 上段:地点名, 上段 STD:ゲノム DNA
 下段:ウェル(分析時配置名)

表 8.3.1 カブトガニの環境 DNA 測定結果(2019 年)

試料名	採取日	採水時刻	分析回数 (検出数)	DNA濃度*
A1'	2019.9.15	8:00	12 (0)	不検出
E0'	2019.9.15	8:10	12 (0)	不検出
P10'	2019.9.15	8:32	12 (2)	不検出 検出: 6.54×10^{-9} 検出: 5.55×10^{-7}
P6'	2019.9.15	8:45	12 (0)	不検出

*DNA濃度は標本から採取したゲノムDNA溶液(濃度 $38.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$)を1とした相対値である。

2020 年も 2019 年と同様の方法で定量 PCR (qPCR) 分析を行った。

4) 2019 年調査結果

抽出した DNA 溶液の濃度は、蛍光光度計で測定した結果、 $1.5\text{-}6.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の範囲であった。

定量 PCR において増幅が認められ(図 8.3.4)、かつカブトガニゲノム DNA の融解温度と近似するサンプル(図 8.3.5)はアガロースゲル電気泳動を行い(図 8.3.6)、250 塩基対程度に増幅が認められたサンプルを検出した。図 8.3.4、図 8.3.5 において F7, D8 は分析時の配置名を示す。本試験 P10' 地点の F7 と D8 は近似するが、図 8.3.6 で P10' 地点の F7 は増幅が認められなかったため不検出、D8 は増幅が認められたため検出とした。その結果、採水地点 P10'において、予備試験で 1 サンプル(4 反復中)、本試験で 1 サンプル(8 反復中)、合計 2 サンプル(合計すると 12 反復中)の検出が認められた。

カブトガニの DNA 濃度標準 1 に対して、採水地点 P10'において予備試験では 6.54×10^{-9} (C7, 図 8.3.6)、本試験では 5.55×10^{-7} (D8, 図 8.3.6)の DNA 濃度が検出された(表 8.3.1)。操作上、コンタミネーションの可能性は低いため、非常に微量な DNA が検出されたと考えられる。

5) 2020 年調査結果

標本から採取したゲノム DNA を濃度標準として、定量 PCR によりカブトガニ DNA 濃度を計測した。CT 値の算出は CP 法で行い、融解曲線が陽性対照(ゲノム DNA)の Tm(76.0~77.2°C)の範囲に含まれたサンプルのみ陽性と判定した。カブトガニの環境 DNA は、D1 のサンプルで 4 回中 3 回検出された(表 8.3.2)。そのほかのサンプルからは DNA は検出されなかった。対照サンプルとして 2018 年に 4 分析中 1 回検出されていた地点 332(図 8.3.1)の表面水の DNA を 1 回測定したところ陽性であった。検出された D1 地点はカブトガニ幼生が多く確認されている曾根干潟南部の末端であり、採水時刻は満潮前の午前 9 時 5 分であった。カブトガニの DNA を含む糞などが水中に含まれる量はごくわずかであるが、上げ潮に乗って沿岸まで到達していると考えられる。それが満潮になると希釈・拡散、あるいは沈降・分解してしまい、検出が困難になるものと推察される。

護岸での上げ潮時の採水サンプルでも、DNA 供給と分解、潮の流れをモデリングすることにより沖合のカブトガニの分布を推定することは可能と考えられるが、現在の環境 DNA の検出感度とコストから考えるとあまり現実的な手法ではないといえる。

8.3.2 環境 DNA による生物相把握の試み

定量研では、2019 年から 2021 年にかけてカブトガニの環境 DNA 調査に併せて、甲殻類や魚類を対象にした網羅的解析(メタバーコーディング法)を実施し、干潟域での環境 DNA を用いた生物相把握の可能性について検討した。以下に、2019 年と 2021 年の調査結果を紹介する。

(1) 環境 DNA サンプルの採取地点・方法

図 8.3.7 に示す地点で 2019 年は 9 月 15 日に水試料と泥試料を、2021 年は 9 月 19 日に水試料のみを採取した。

水試料は満潮時に海水を護岸から 500mL 滅菌ポリ瓶に直接採水した。DNA の分解を防止するため、採取した表層水に 10%塩化ベンザルコニウムを終濃度 0.01%になるように 0.5 mL 添加し、転倒混和して攪拌し

表 8.3.2 カブトガニの環境 DNA 測定結果(2020 年)

試料名	採取日	採水時刻	分析回数 (検出数)	DNA濃度*
D1	2020.10.4	9:05	4(3)	5.12~8.90×10 ⁻⁷
D2	2020.10.4	9:45	4(0)	不検出
D3-1 上げ潮時	2020.10.4	8:30	4(0)	不検出
D3-2 満潮時	2020.10.4	9:50	4(0)	不検出
D3-3 下げ潮時	2020.10.4	13:00	4(0)	不検出
D4-1 満潮時	2020.10.4	10:15	4(0)	不検出
D4-2 下げ潮時	2020.10.4	13:15	4(0)	不検出
D5	2020.10.4	10:05	4(0)	不検出
D6	2020.10.4	10:25	4(0)	不検出
(対照)332泥表面水	2018.9.9	—	1(1)	8.21×10 ⁻⁷

*DNA濃度は標本から採取したゲノムDNA溶液(濃度38.7ng/μL)を1とした相対値である。



図 8.3.7 曾根干潟における甲殻類や魚類を対象にした環境 DNA の網羅的解析調査地点

た。持ち帰りからろ過まで保冷した。

泥試料は底泥表面をプラスチックですくって 50mL チューブに採取した。試料は保冷して持ち帰り、-20°C で冷凍保存した。

2021 年は満潮時に北干潟のヨシ原近傍(D-1)と南干潟の貫川南護岸近傍(D-2)のそれぞれ周辺 5 か所で採水・混合した。2021 年は各地点周辺の水を混合することで、2019 年より多くの種とヨシ原依存種の検出を期待した。

(2) DNA 抽出・解析方法

水試料は 4~8℃で静置し、土粒子が沈殿した状態で上澄みを GF/F フィルターでろ過し、フィルターから DNeasy Blood & Tissue kit(キアゲン)を使用して DNA を抽出した。

泥試料は 0.25g を DNeasy PowerSoil Kit を使用して DNA を抽出し、この 10 回分をまとめて1試料とした(供試料 2.5g)。

網羅的解析には、甲殻類を対象としたプライマー MiDeca⁴⁾を使用し、2019 年の水試料については魚類を対象にしたプライマー MiFish¹⁾も使用した。

次世代シーケンサー(NGS)は iSeq100(イルミナ社製)を使用し、FASTAQ ファイルの解析には USERCHv11 を使用した。

(3) 調査結果

1) MiDeca による甲殻類の DNA 検出

MiDeca を用いて DNA が検出された甲殻類は、表 8.3.3 に示す 23 種類(OTU^{注3)})で、曾根干潟に普通に生息するものである。

これまでの目視確認や採集記録と比較すると採水地点が限られていたためか、クロベンケイガニやアシハラガニなどヨシ原に生息する種は検出されなかった。

マメコブシガニは、リファレンス^{注4)}から当初カネココブシに判定されたが、カネココブシは曾根干潟での確認記録がなかったため、現地で採取したマメコブシガニ標本の 16SrRNA 領域塩基配列をシーケンスしたところ 100%一致した。

エビ類では、サクラエビ科、テナガエビ科、テッポウエビ科などリファレンスが 80~90%しか一致しない種類(OUT)が 3 つあった。種名の明らかな標本のリファレンス配列の整備が必要と考えられる。

泥試料 S1~S4 は、水試料 W1~W4 に比べて検出種数が圧倒的に少なく、本手法による泥試料からの甲殻類の DNA の検出は難しいと考えられる。

表 8.3.3 MiDeca による甲殻類の DNA 検出結果

+: 検出

和名	2019年								2021年	
	W1	W2	W3	W4	S1	S2	S3	S4	D-1	D-2
1 シバエビ						+				
2 サクラエビ科		+				+	+			
3 ミナミヌマエビ				+						
4 カワリヌマエビ属				+						
5 テナガエビ科	+									
6 シラタエビ										+
7 テッポウエビ科		+								
8 ユビナガホンヤドカリ			+	+						
9 ハサミシヤコエビ										+
10 アナジャコ		+	+	+		+		+		
11 マメコブシガニ	+									
12 タイワンガザミ/ガザミ			+	+						
13 ガザミ				+						
14 サワガニ				+						
15 アカテガニ				+						+
16 フタバカクガニ				+						
17 モクスガニ				+						
18 ヒライソガニ						+				
19 ケフサイソガニ				+						+
20 タカノケフサイソガニ	+	+								+
21 オサガニ		+		+	+					
22 ヤマトオサガニ	+		+	+					+	+
23 ハクセンシオマネキ										+
種類数	4	5	4	13	1	4	1	2	5	3

注) W1~W4は水試料, S1~S4は泥試料, D-1~D-2は水試料

水試料では、ヨシ原や大野川河口に近い W4 で検出された種類が最も多く、実際の生物多様性の高さを反映しているものと考えられた。

2021 年の試料は調査地点周辺 5 か所の混合水であったが、D-1 が 5 種、D-2 が 3 種と期待したほど多くの種類は検出できなかった。この理由の一つとして、調査前の 9 月 17 日夜に台風 14 号が曾根近傍を通過し、その影響で DNA が希釈・拡散した可能性が考えられた。

2) MiFish による魚類の DNA 検出

MiFish を用いて DNA が検出された魚類は、表 8.3.4 に示す 29 種で、曾根干潟やその流入河川に普通にみられるものである。

W4 地点は MiDeca の場合と同様に種類数が多かった。これは W4 地点が大野川河口に近く、純淡水魚が 8 種類検出されたことが要因である。

注3) OTU:Operational Taxonomic Unit 操作的分類単位の略で、塩基配列をコンピュータ上でその類似度を指標に分類したときに得られる単位をいう。クラスタリングで相関性が高い塩基配列を1まとまりとして扱うための単位⁹⁾。今回の MiDeca の解析結果では甲殻類 23OTU(本稿では同一の意味で「種類」を使用し、「種」と区別した)が得られ、この中にはサクラエビ科など種名が確定していないものも含まれる。

注4) リファレンス:種の同定に参照する塩基配列(リファレンス配列)のことで、分析で得られた代表配列に対して、このリファレンスのデータベースを参照して種を特定する。

表 8.3.4 MiFish による魚類の DNA 検出結果

和名	+ : 検出			
	W1	W2	W3	W4
1 ツバクロエイ	+			
2 ニホンウナギ (通し回遊魚)				+
3 サッパ ^{※1}	+	+		+
4 フナ属の一種 (純淡水)	+			+
5 ギンブナ ^{※2} (純淡水)				+
6 コイ (純淡水)	+			
7 タモロコ (純淡水)				+
8 オイカワ (純淡水)				+
9 カマツカ (純淡水)				+
10 タカハヤ ^{※4} (純淡水)	+	+		+
11 セスジボラ				+
12 ボラ	+	+	+	+
13 メナダ	+			+
14 トウゴロウイワシ		+		+
15 ミナミメダカ				+
16 サヨリ		+	+	
17 スズキ				+
18 ヒイラギ		+		
19 クロダイ		+		
20 ドンコ				+
21 マハゼ				+
22 アシシロハゼ				+
23 ツマグロスジハゼ			+	
24 タビラクチ ^{※3}				+
25 ヒモハゼ	+			
26 ビリンゴ				+
27 トビハゼ		+		+
28 ヨシノボリ属 ^{※5} (通し回遊魚)	+			
29 クサフグ類	+			
種類数	10	8	3	21

※1 DNAの解析結果ではカタボシイワシまたはサッパと判定された。曾根干潟域ではサッパが普通にみられるためサッパとした。

※2 解析結果ではキンギョギベリオブナに判定されたが、これらの種は本流入河川では希であり、普通にみられるギンブナとのMiFishでは判別がつかないため、ギンブナとして掲載した。

※3 解析結果ではタビラクチ属と判定された。我国で確認されているタビラクチ属は曾根に生息するタビラクチ一種のみであり、タビラクチとした。

※4 タカハヤ及び同属の一種 (*Phoxinus* sp.) の2種類が検出されたが、近隣で生息しているのはタカハヤのみであるため、あわせてタカハヤとした。

※5 ヨシノボリ属とは別にピワヨシノボリ(当地域及び周辺で確認されたことがない)とDNAが類似する種が検出されたが、北部九州にはMiFishで本種と判別がつかないトウヨシノボリ、シマヨシノボリ等のヨシノボリ属が普通に生息しており、あわせてヨシノボリ属とした。

8.3.3 まとめ

カブトガニをはじめとする干潟生物調査への環境DNAの活用方法について検討した結果の概要は次のとおりである。

- 干潟の表面水および間隙水、底泥からカブトガニ幼生由来の環境DNAの検出を試みた結果、表面水および底泥からDNAが検出されたが、その濃度は低く、検出頻度も低かった。また、間隙水からは環境DNAは検出されなかった。

- 底泥由来の環境DNAからカブトガニ幼生の分布を把握するためには、表面土壌の効率的採取方法、例えばドローン採取や底泥からのDNA抽出技術の開発が必要と考えられた。

- 表層水からカブトガニ幼生由来の環境DNAの検出を試みたが、その濃度は低く、検出は困難と考えられた。

• 環境DNAによる魚類、甲殻類の生物相の把握を試みた結果、魚類相については一度に多数の種が把握でき、有効と考えられたが、甲殻類については現状では目視調査の方が確認種類数が多いこと、DNAのリファレンスデータがまだ不十分であることなどから、現時点では有効な調査方法とまではいえない状況にあった。今後リファレンスデータの充実を含めた調査手法の進展に期待したい。

(大井, 貞末)

参考文献

- 1) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088, 2015.
- 2) Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., Nikaido, M., Sado, T., Sato, Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M. & Miya, M.: Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), e63-e75, 2017.
- 3) Ushio, M., Murata, K., Sado, T., Nishiumi, I., Takeshita, M., Iwasaki, W., & Miya, M.: Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific reports*, 8(1), 4493, 2018.
- 4) Komai, T., Gotoh, R. O., Sado, T. & Miya, M.: Development of a new set of PCR primers for RedNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3, e33835, 2019.
- 5) 環境DNA学会: 環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.2, 2020.
- 6) 環境省自然環境局生物多様性センター: 環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き(第1版), 42pp., 2020.6.