

令和2年度・令和3年度  
ふしの干潟いきもの基金報告

環境DNAおよびUAVによるカブトガニの産卵状況および  
カブトガニ幼生の生息数調査方法の検討

山口大学 創成科学研究科

山本 浩一

# 令和2年度ふしの干潟いきもの基金報告

UAVを用いたカブトガニ産卵状況・幼生数調査

# 研究背景と目的

## [研究背景]

山口湾には絶滅危惧 I 類のカブトガニが生息

カブトガニの幼生生息調査の問題

- ・ 干潟は歩行困難
- ・ 大人数の観測者(37~54名)を必要とする
- ・ 経験者の発見数が未経験者を上回る



カブトガニ

## [研究目的]

数メートル程度の低高度のUAV撮影により干潟上の表在底生生物の検出可能性を検討し、画像処理によりカブトガニの幼生を検出すること

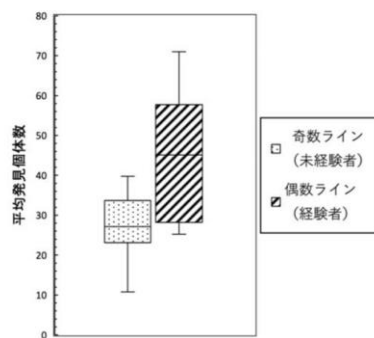


図-1 カブトガニ幼生生息調査における奇数ラインと偶数ラインの個体平均数 (2016年~2019年の各9ライン)

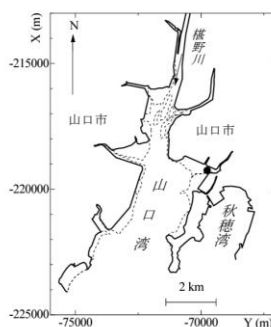


図-2 調査地点図 (榎野川河口干潟): 座標は平面直角座標系第III系

(森岡ら, 2021)

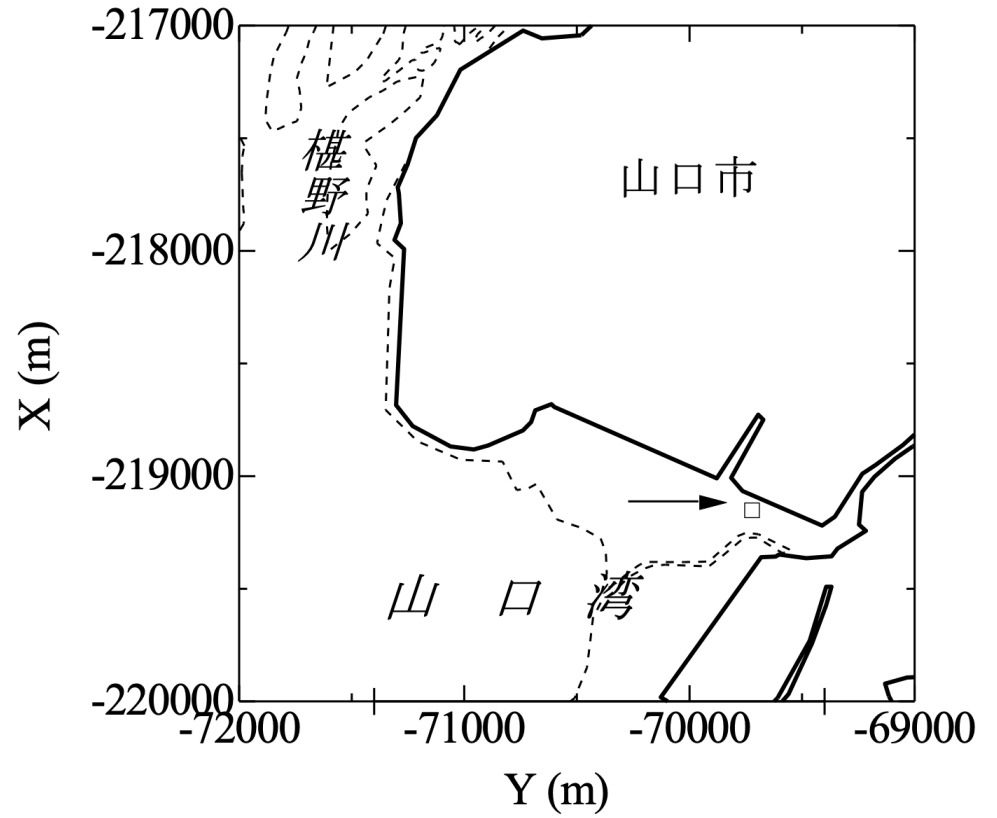
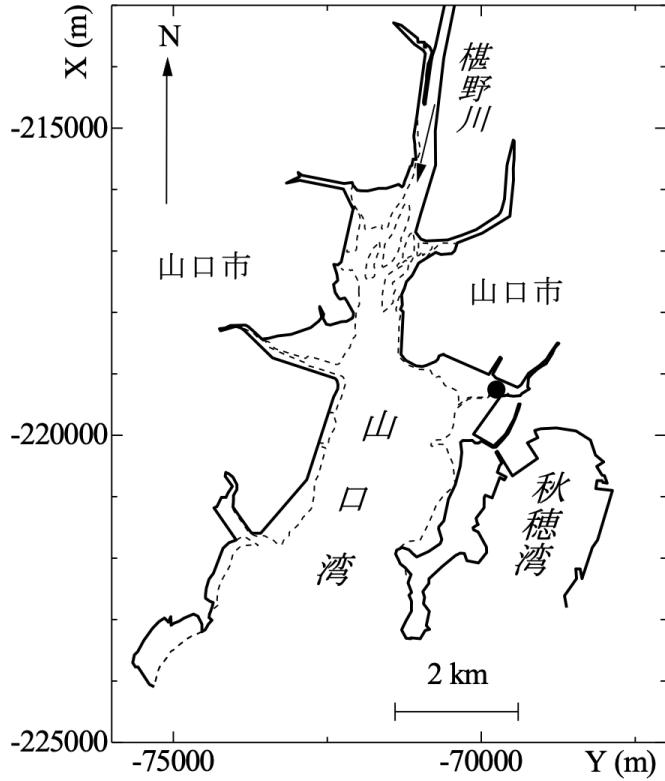
# 既往の研究

先行研究として空中写真上の巣穴による泥質干潟の潜孔性底生生物の簡易定量手法の研究<sup>1)</sup>や地形データとUAV-SfM技術を用いた生息適地モデルによる生息適地推定の研究<sup>2)</sup>がある

しかし動画あるいはタイムラプス画像を用いて干潟上の表在底生生物の動きを利用して個体を検出する方法は検討されていない。

- 1)馬場崎 正博, 高比良 光治, 河口 洋一, 島谷 幸宏, 小野 勇一 :空中写真利用による泥質干潟の潜孔性底生生物の簡易定量手法 応用生態工学13(2),101-111,2011
- 2) Akihiko Koyama, Taiga Hirata, Yuki Kawahara, Hiroki Iyooka, Haruka Kubozono, Norio Onikura, Shinji Itaya, Tomoko Minagawa:Habitat suitability maps for juvenile tri-spine horseshoe crabs in Japanese intertidal zones: A model approach using unmanned aerial vehicles and the Structure from Motion technique PLOS ONE 15(12) e0244494

# 調査地点および撮影方法



# 現地調査方法：カブトガニ幼生の撮影方法

## [固定カメラ]

方式: タイムラプス画像

撮影時間: 2 分間

解像度: 4000 × 2250 pixels

高度: 約 1.3 m

撮影間隔: 3 秒

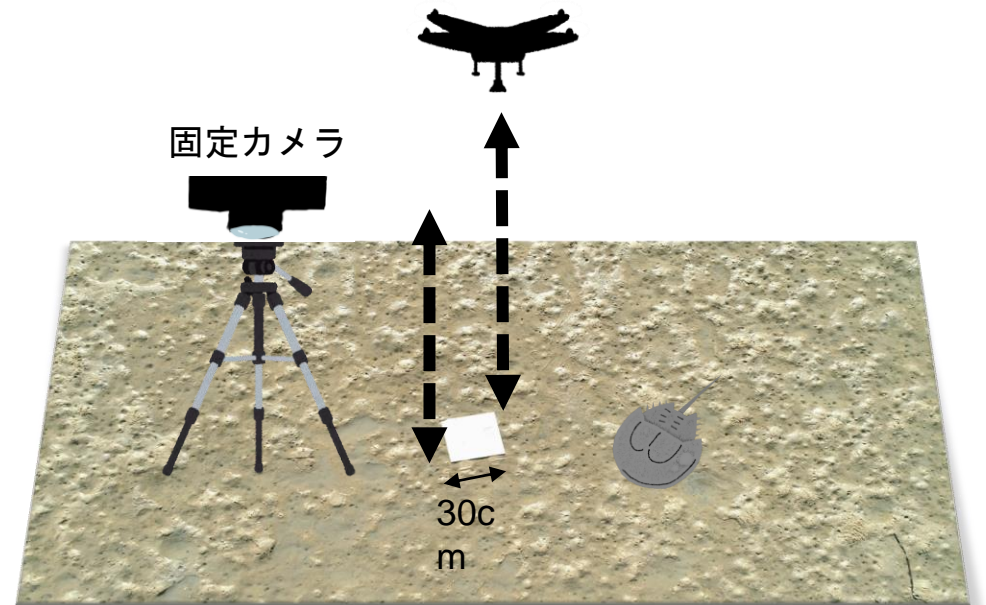
## [UAV]

方式: 動画

撮影時間: 2 分間

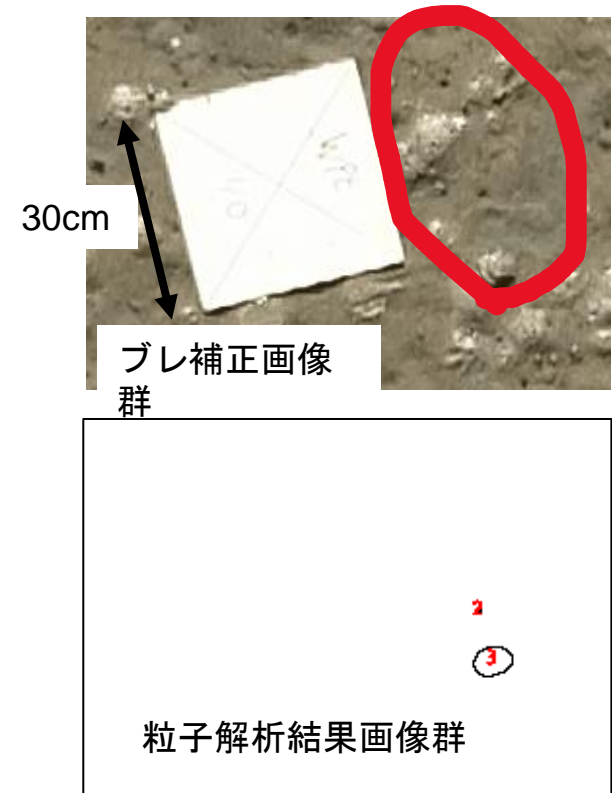
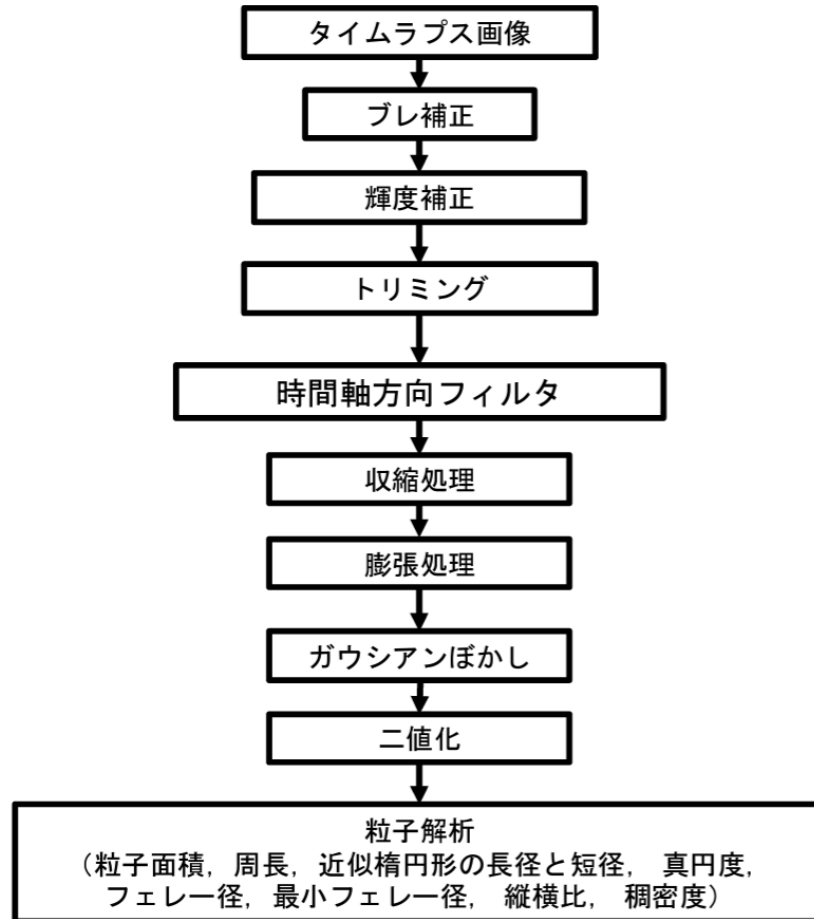
解像度: 4096 × 2160 pixels

高度: 約 9m



日付	対象	撮影方法
2020年 9月20日	カブトガニ幼生(N=11) 37 mm ~ 53 mm (平均47mm)	固定カメラ(1.3m) UAV(約9m)
2021年 3月31日	カニ(オサガニ属)	固定カメラ(1.3m)

# 研究方法：画像解析方法(検出処理)



# 検出例

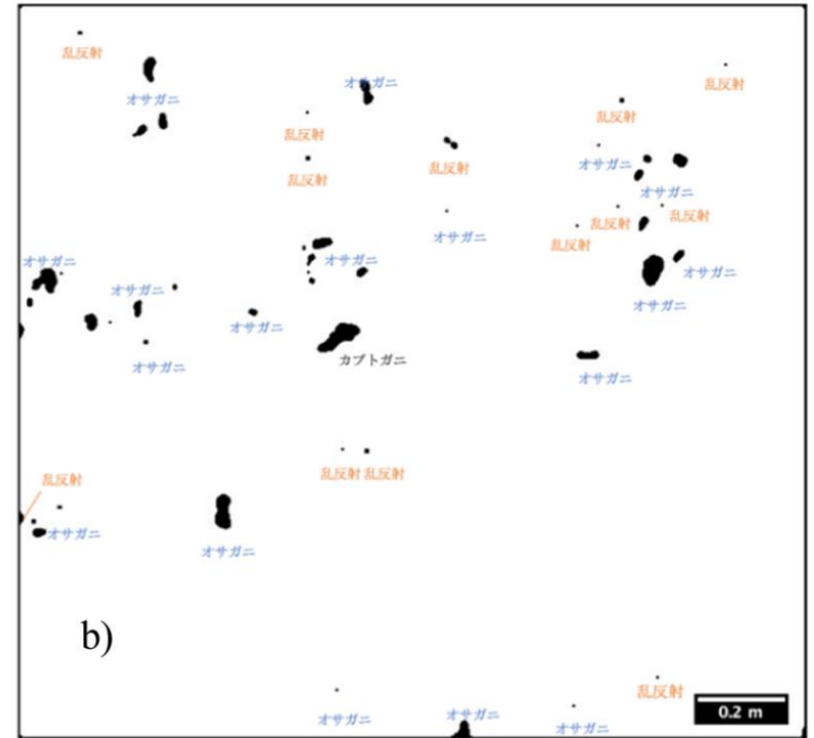
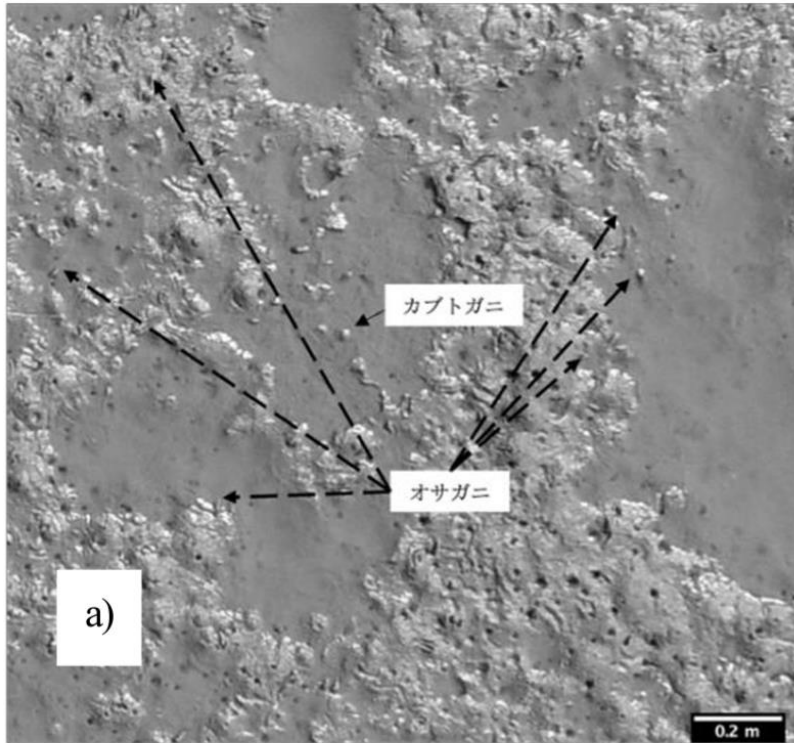


図-6 UAV 撮影画像群に表在底生生物軌跡の検出処理を行なった結果の例の拡大図。a):元画像, b):2秒間隔30枚(60秒間撮影)の画像群の処理画像結果, カブトガニ1個体, オサガニ18個体



# 機械学習(SVM)による識別結果

表-1 同日の撮影画像を用いた場合 (①), 別日の撮影画像を用いた場合 (②) のそれぞれの訓練 (学習・検証) データ・テストデータ数

ケース	訓練		テスト
	学習	検証	
①	3070	3070	27577
②	16718	16719	45427

表-2 学習・検証と同日のテストデータの識別結果 (ケース①)

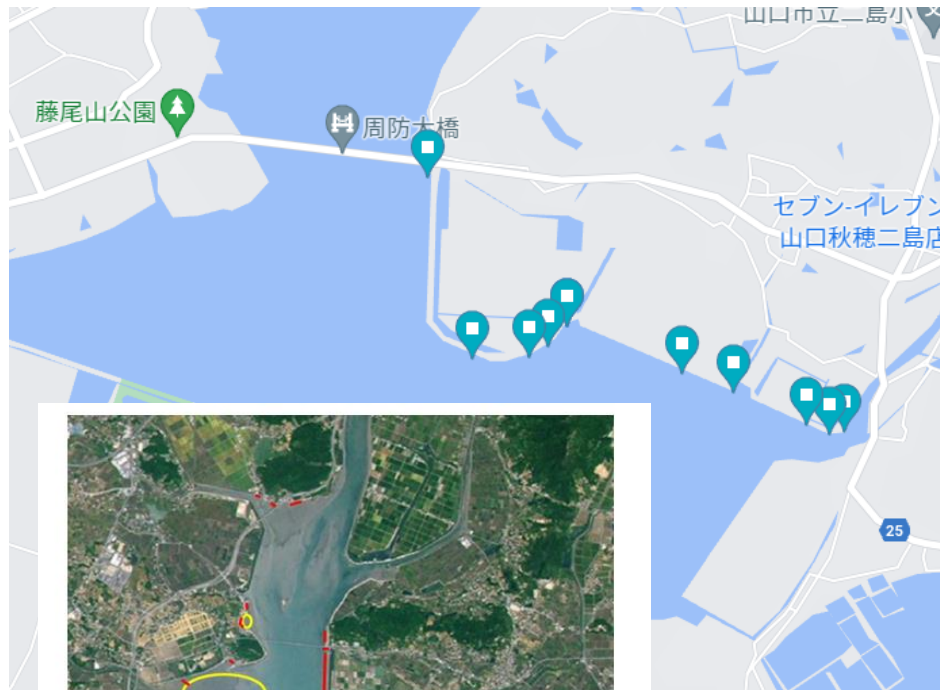
	検出された	検出されない
カブトガニである	55	215
カブトガニでない	10	27297

表-3 学習・検証と別日のテストデータの識別結果 (ケース②)

	検出された	検出されない
カブトガニである	7	10
カブトガニでない	408	45002

- 同日のデータを学習させた, モデルの場合, 実際のカブトガニを8割見逃してしまうが, 検出された場合8割近くはカブトガニと判定
- 別日の学習データを適用した場合は成績が悪い

# UAVによる産卵場の確認 2020年7月26日カブトガニつがい確認状況(UAV)



環境省資料

# カブトガニ産卵場(環境省資料)



図9 山口湾



図10 護岸下の産卵場とその前面の干潟

<https://www.biodic.go.jp/relatedinst/23rd/P01.pdf>

# 令和3年度 ふしの干潟いきもの基金報告

- 環境DNAを用いたカブトガニ産卵状況調査

# 背景

- 山口県でカブトガニの産卵がある河口域は榎野川河口域のほか、木屋川河口、平生湾が知られている。
- しかし、その他の河口域で産卵が行われていないとはいえない。
- 環境DNAによりカブトガニの産卵があることがわかれば、これまで知られていない産卵場を発見できる可能性がある。
- 環境DNAによる産卵場発見の可能性を明らかにすることを目的とした



# 調査方法

## ① 調査期間

R3.4.30-R3.7.23

## ② 調査方法

長沢川の最下流の橋である惣栄橋（N地点）大潮満潮時の表層水について採水

また、R3.7.23には榎野川最下流の周防大橋（F地点）、カブトガニが産卵を行っているすぐ傍でも採水

採水された水はGF/Fフィルターで1Lをろ過して冷凍保存し、環境DNA分析に供した。

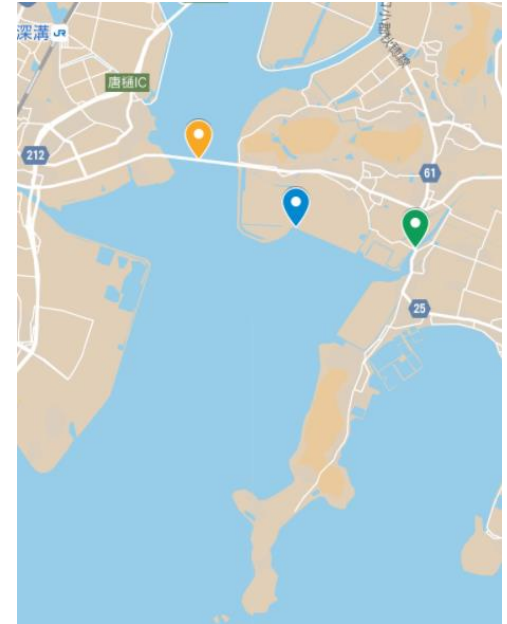


図1 カブトガニの環境DNA調査地点，F:榎野川，Sp:産卵地点，N:長沢川

# 採水地点



- Sp地点(産卵泡近傍)



- N地点(長沢川河口)



- F地点(周防大橋中央部)

# 環境DNA分析方法

- 環境DNA分析は定量PCR（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、定量PCR試薬であるTB Green Premix Ex Taq IIを用いて行った。
- 使用したプライマーはカブトガニのミトコンドリアシトクロロムb遺伝子領域に設計されたものである。
- 分析は九州環境管理財団に委託した。



# 結果 環境DNAの検出状況

- 長沢川(N地点)においては5月15日まではカブトガニの環境DNAは検出されなかった
- 5月26日以降はCt値が徐々に低下し、環境DNAの濃度が増加
- 榎野川周防大橋(F地点)においては7月23日のみの調査であったが、7回中1回の検出となり、長沢川よりも10倍低い濃度で検出された。
- カブトガニが産卵している脇で採水されたサンプル(Sp地点)はN地点で採水されたものよりも1000倍近い濃度
- 明らかにカブトガニは産卵に伴って環境DNAを放出していることがわかる。

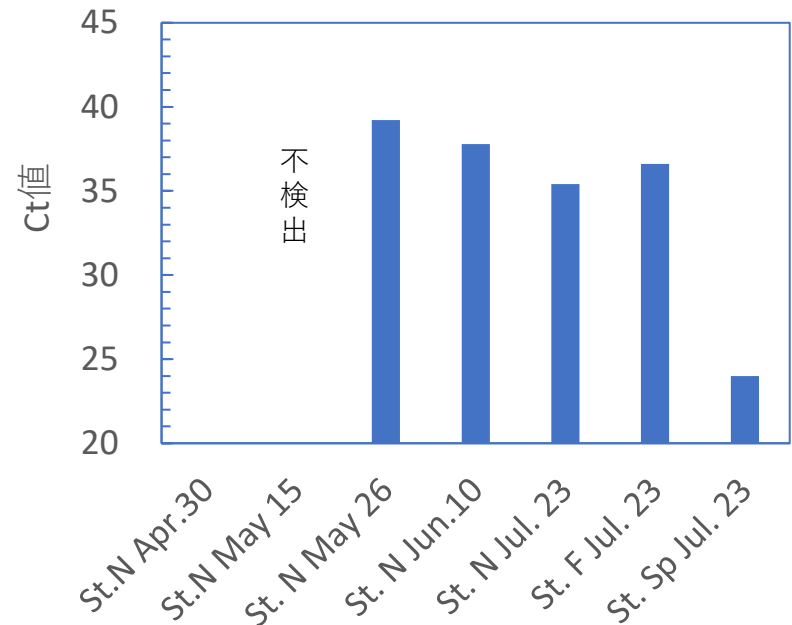


図2 カブトガニの環境DNAのリアルタイムPCRにおけるCt値の変化

# つがい発見数(周防大橋左岸)との関係

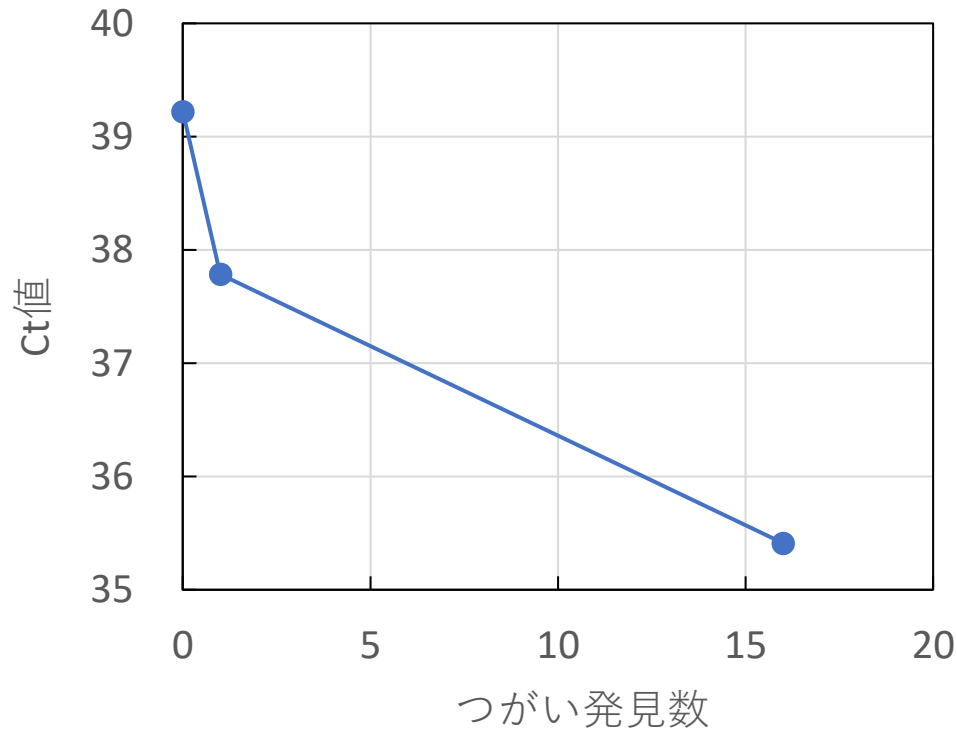


図3 長沢川N地点におけるカブトガニの環境DNAのリアルタイムPCRのCt値と山口湾周防大橋左岸におけるつがい発見数の関係（つがい発見数は周防大橋左岸における山口大学酒井大樹助教による調査結果）

# まとめ

カブトガニの産卵時には環境DNAが放出され、産卵最盛期に河口域で採水することによりある河口域におけるカブトガニの産卵の有無を推定することができる。

産卵場から遠ざかると環境DNAのCt値が低下するため遠方の河口域からの影響は避けられる