

環境影響評価における新しい調査手法の試み - 環境 DNA を用いたニホンザリガニ生息場の推定 -

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員	池田 幸資
広島大学サステナブル・イノベーション実践研究センター	土居 秀幸
広島大学大学院総合科学研究科	高原 輝彦
神戸大学大学院人間発達環境学研究科	源 利文
酪農学園大学農食環境学群・環境共生学類	鈴木 透
北海道大学地球環境科学研究院生物圏科学専攻	小泉 逸郎
北海道大学大学院文学研究科	田中 一典
北海道大学農学研究科 環境資源学部門	布川 雅典

1. はじめに

1999年に施行された環境影響評価法では、開発事業を実施する際に、生息環境への影響を可能な限り回避または低減することを義務づけている。従来の「目標クリア型アセスメント」から、「ベスト追求型アセスメント」が実施されるようになった。「ベスト追求型」の影響評価及び保全対策を取り組んでいくためには、現地調査時における環境への負荷を最小限にする高精度な生物調査を実施する必要がある。

一方で、精度の高い生物調査を行うためには、多大な労力が必要になる。また、希少種などのモニタリングに関してはできる限り影響を与えない手法が求められる。

近年、環境中に浮遊・存在しているDNAを用いた淡水域における魚類や両生類の調査手法の開発が進められている¹⁾。水中にはさまざまな生物に由来するDNAが存在しており、これまではこのような環境DNA (environmental DNA [eDNA]) は一般に微生物の検出に用いられてきた。環境DNAは、動植物に共通する縮退プライマーを作り「水」をはかることで生息する種類を調べる技術や、特定の種の環境DNA量からその種のバイオマスを推定する技術である。本稿では、環境DNAを用いて、環境省レッドリストの絶滅危惧Ⅱ類 (VU) に指定されている²⁾ニホンザリガニの分布の検出を試行し、環境影響評価における生物調査への適用について考察を行うものである。

ニホンザリガニ (*Cambaroides japonicus*) は、北海道全域と青森県、秋田県及び岩手県のみ生息する (写真1)。生息場は一般に広葉樹に囲まれた河川源流部で、まれに山上の湖沼にも生息する。ニホンザリガニは冷たく清澄な水環境を好み、湧水に対しての

依存性が強い。また隠れ場所が不可欠であり、礫や倒木、落ち葉の下などを利用している。本種は人間による開発行為の影響を受けやすいため生息地数の減少が著しい。したがって保全のための技術開発が望まれ、特に生息を制限する環境要因の解明は緊急性が高い。

ニホンザリガニの生息に影響する環境要因としては、広葉樹の有無、水温20℃以下³⁾の水が安定して緩やかに流れること、魚類が生息しないこと、転石等の隠れ場所が豊富なこと等⁴⁾が報告されている。また、ザリガニ類は河川の表面水と河床下の地中水が混じり合う移行帯、いわゆる間隙水域に生息する生物であり、水位の安定が必要となる。本種の調査には、多大な労力を要するとともに、踏査を伴う調査は、生息域に少なからず負荷を与えているものと思われる。



写真1 ニホンザリガニ (*Cambaroides japonicus*)

2. 材料及び方法

調査は、過去にニホンザリガニの生息調査⁵⁾が実施された北海道札幌市、小樽市の10地点の沢を対象とした。調査地点はニホンザリガニの生息している場所を5地点、生息していない場所を5地点とした (表1)。2015年1月22日から23日に、各沢から1Lの水を採水した。試料水は1Lのポリプロピレンボトル (ナ

ルゲン社) に採取し、運搬中は冷却ボックス内にて

キーワード：環境影響評価、環境DNA、プライマー、ニホンザリガニ、モニタリング

発表者連絡先：北海道札幌市北区北7条西1丁目2番地6 TEL 011-700-5227、FAX 011-709-0628

保存した。その後、試料水をガラスフィルター (GF/F、直径47mm、0.7 μm、ワットマン) を通して濾過した。フィルター上の試料からDNeasy Blood and Tissue kit (キアゲン) を用いてDNAを抽出し、ニホンザリガニ特異的なプライマー・プローブセット (土居ら未発表データ) を用いてPikoRealリアルタイムPCRシステム (ThermoFisher社) によりDNAを増幅・定量し、ニホンザリガニの在不在の判定を行った。

表1 環境調査実施場所

調査地点	確認個体数 (N/m ² ・時間)	水温 (°C)	流速 (cm/s)	水深 (cm)	川幅 (cm)	底質の平均粒径 (mm)
沢1	9.1	10.7~18.9	0~1.0	0~1.0	76.5	16
沢2	0.2	11.1~19.8	0~5.0	0~3.8	52	2
沢3	0.9	11.3~18.4	0~1.0	0~7.2	30	5
沢4	1.6	10.7~14.9	0~5.0	0.3~1.3	100	5
沢5	0.8	11.7~17.8	0~5.0	0.3~1.0	100	2
沢6	0	12.7~17.2	0~1.0	0~13.9	25	8
沢7	0	12.3~15.4	0~1.0	0~11.0	80.7	2
沢8	0	11.7~17.8	0~1.0	0~8	54	2
沢9	0	11.2~17.5	0~1.0	0~8	54	2
沢10	0	11.1~19.8	0~29.9	0~10.9	62.6	19

3. 調査結果

調査により、10地点中5地点において、ニホンザリガニが目視観察され、それら5地点の沢すべての試料水からニホンザリガニのDNAが抽出された。一方、目視観察されなかった5地点の沢の試料水では、ニホンザリガニのDNAが検出されなかった(表2)。

表2 環境DNAの検出、非検出の状況

	確認	環境DNA	
		検出	非検出
目視観察	確認	5	0
	未確認	0	5

4. 考察

河川水中の環境DNAの検出について試行し、ニホンザリガニが目視で観察された5地点の沢すべてにおいて、ニホンザリガニのDNAを検出することができた。一方、ニホンザリガニが観察されなかった5地点の沢においては、DNAが検出されなかった。したがって、環境DNAを用いた調査手法は、ニホンザリガニの在否を正確に検出することができるものと判断される。

一方で、今回の採水は、冬季に実施したものであり、季節により水中の環境DNAの含有量が変化する可能性もある。このため、今回と同地点での季節を通じた調査を実施し、季節ごとの環境DNAの量の変化を比較していく必要がある。

環境DNAが検出された沢のニホンザリガニの生息密度は、0.2~9.1個体/m²・時間であり、生息密度の低い沢においても環境DNAの検出を行うことがで

きた。このため、環境DNAを用いた調査では、個体サイズが小さい場合や生息密度が低い場合においても、高精度でニホンザリガニの存在を検出することができることが期待される。また、直接観察法では、河川内を歩行し、河床礫をめくりながら確認していくことから、少なからずニホンザリガニの生息域を攪乱する。しかし、本調査で行った環境DNAを用いた調査手法は、生息地下流における採水のための生息環境の攪乱はほとんどない。このため、生息地を保全しながら、精度の高い成果が必要とされる希少種の調査において、本調査手法は有効であると思われる。さらに、ニホンザリガニ以外の調査対象種についても、種特異的なプライマーを開発することにより、本研究と同様の手法で希少種、外来種などの分布の有無を検出することが可能であると考えられる。

今後、環境DNAを用いた観測技術を用いることにより、河川上流域における生物モニタリングが簡略化されることが明らかになった。さらに、本研究結果は、環境DNAを用いた調査を行うことで、従来の調査手法より簡易にかつより確実に非生息域の可能性を明らかにできることを示唆している。本研究の手法を用いることで、環境影響評価における生物調査の技術精度は、格段に進歩するものと思われる。

参考文献

- 1) Takahara, T., Minamoto, T. & Doi, H. (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. PLOS ONE, 8, e56584.
- 2) Kawai, T., & Labay V. S. (2011) Supplemental information on the taxonomy, synonymy, distribution of *Cambaroides japonicus* (Decapoda: Cambaridae). New Frontiers in Crustacean Biology, 15, 275- 284.
- 3) 中田和義(2010)生理・生態：基礎生態・繁殖・生理. PP. 343- 396. ザリガニの生物学 (川井唯史・高畑雅一編著), 北海道大学出版会, 札幌.
- 4) Usio, N., (2007) Endangered crayfish in northern Japan: distribution, abundance and microhabitat specificity in relation to stream and riparian environment. Biological Conservation, 134, 517- 526.
- 5) 田中一典・布川雅典・池田幸資 (2014) 小樽市と野幌森林公園におけるニホンザリガニ (*Cambaroides japonicus*) の分布を制限する生息環境要因としての河床間隙水位, 小樽市総合博物館紀要, 27, 9-16.