

環境 DNA を用いたニホンザリガニ生息場の推定における季節影響

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員	池田 幸資
兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究所	土居 秀幸
北海道大学大学院文学研究科	田中 一典
北海道立総合研究機構水産研究本部	川井 唯史
北海道大学大学院農学研究院	荒木 仁志
島根大学生物資源科学部生物科学科	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所	小泉 逸郎
北海道大学地球環境科学研究所	根岸 淳二郎

1. はじめに

近年、環境DNA（以降、eDNA）は、水生動物の分布を把握するツールとして使われている⁽¹⁾。また、水域におけるeDNA検出は、希少種、外来種の検出にも用いられている⁽²⁾。淡水生態系は、地球上で最も危機的な状況にあり、甲殻類の23%が絶滅危惧種（<http://www.iucnredlist.org/>）となっており、保全の重要性が高いにもかかわらず、eDNAの検出例は多くない。ニホンザリガニ(*Cambaroides japonicus*、写真1)は、日本の北部に分布する固有種であり、近年、生息数が減少している。このため、本種は環境省レッドリストの絶滅危惧Ⅱ類（VU）に指定されており、保全の必要性が高まっている⁽³⁾。ニホンザリガニの生息地はその一部が把握されているが、生息分布の調査が行われていない場所も多い。ニホンザリガニの主要な生息場である河川源流部は、総流路長の2/3以上の割合を占めるほど広範囲に及ぶが、アクセス性が悪いことと生息密度が低いことから、本種の正確な分布情報の取得は困難である。

ニホンザリガニは、北海道全域と青森県、秋田県及び岩手県にのみ生息する。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⁽⁴⁾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⁽⁵⁾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る。本種の生息地調査には、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。

我々の目的は、eDNAを用いて絶滅危惧種であるニホンザリガニの生息状況を推定する技術を確立することである。調査は、河川源流域において、採捕による目視確認とeDNA検出を行い、双方の結果の比較を行った。



写真1 ニホンザリガニ(*Cambaroides japonicus*)

2. 材料及び方法

採水及び野外調査は、2014年11月、2015年1月、6月に北海道札幌市、小樽市、江別市の10箇所の沢で実施した。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保存した。採水終了後、

キーワード：環境影響評価、環境DNA、リアルタイムPCR、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

ニホンザリガニの採捕調査を行い、生息の有無を記録した。試料水はガラスフィルター (GF/F、直径47mm、0.7 μ m、GE Healthcare) 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 (Thermo Scientific社) によりDNAを検出した。PCRの繰り返し回数は8回とし、1回でもポジティブならニホンザリガニが生息していると判断した。

3. 結果

10地点中7地点において、ニホンザリガニが採捕され、それら7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、採捕されなかった3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1)。季節ごとにみると、採捕調査では、冬は1地点、夏は7地点で個体が捕獲された。eDNA分析では、冬は4地点、夏は7地点でDNAが検出された。

表1 捕獲調査及びeDNA検出結果

時期 地点	冬(11月、1月)		夏(6月)	
	採捕	eDNA	採捕	eDNA
1	○	+	○	+
2	×	+	○	+
3	×	+	○	+
4	×		×	
5	×		×	
6	×		○	+
7	×	+	○	+
8	×		○	+
9	×		×	
10	×		○	+

4. 考察

河川水中のニホンザリガニeDNAの検出について試行し、採捕で観察された7地点の沢すべてにおいて、本種の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3地点の沢においては、DNAが検出されなかった。したがって、eDNA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た。一方で、冬と夏の比較では、採捕及び、eDNAとも夏に確認地点数が多かった。その理由として、ニホンザリガニの活動期は夏であり、冬は川底に潜り活動が低下していることが影響していると思われる。ニホンザリガニは、生息密度が低く、常に石の下や倒木の下に隠れ、硬い外骨格に覆われていることから、環境中に放出さ

れる皮膚片や組織に由来するDNAが魚類に比べて少ないと思われる。採捕では、河川内を歩行し、河床礫をめぐ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、eDNAを用いた調査手法は、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、eDNA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希少種や外来種についても、調査対象とする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分布の有無を検出することが可能であると考えられる。

本研究結果は、eDNAを用いた調査が従来の調査手法より簡易にかつ確実に水生生物の有無を明らかにできることを示唆しており、河川上流域における生物モニタリングへの応用が期待できる。なお、今回の研究では個体の生息密度と検出されたDNA量の関係について明かにできなかったが、今後の課題として取り組んでいきたい。

参考文献

- 1) Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*. 2012. pp. 193- 197. doi:10.1007/s10201-011-0362-4
- 2) Lodge DM, Turner CR, Jerde CL, Barnes MA, Chadderton L, Egan SP, et al. Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Mol Ecol*. 2012;21: 2555- 2558. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x
- 3) Tadashi K, Kazuyoshi N, Tatsuo H. Temporal changes of the density in two crayfish species, the native *Cambaroides japonicus* (de Haan) and the alien *Pacifastacus leniusculus* (Dana), in natural habitats of Hokkaido, Japan. *Freshw Crayfish*. 2014;13: 198- 206.
- 4) 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.
- 5) Usio N. Endangered crayfish in northern Japan: Distribution, abundance and microhabitat specificity in relation to stream and riparian environment. *Biol Conserv*. 2007;134: 517- 526. doi:10.1016/j.biocon.2006.09.002