

## 環境影響評価における新しい調査手法の試み： 環境 DNA を用いたヒメタイコウチ生息場の推定

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員	小菅 敏裕
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
奈良女子大学理学部科学生命環境学科	片野 泉
兵庫県立大学環境人間学部	酒田 勇輔
兵庫県立大学大学院環境人間学研究所	相馬 理央
兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究所	永野真理子
パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員	池田 幸資
信州大学大学院総合理工学研究所	谷野 宏樹
信州大学理学部理学科	東城 幸治

### 1. はじめに

豊かで良好な環境に対する国民からの要請が高まる中、1999年に環境影響評価法が施行された。環境影響評価法では、開発事業は可能な限り生息環境への影響を回避または低減することを義務づけている。これにより、従来の「目標クリア型アセスメント」ではなく、「ベスト追求型アセスメント」が実施されるようになった。開発事業に対する動植物への影響評価及び保全対策に「ベスト追求型」で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し、精度の高い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、多大な労力が必要である。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。そこで、近年、淡水域において環境中に存在しているDNAを用いた魚類や両生類などの生息場所調査手法の開発が進められている<sup>1)2)3)</sup>。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、動植物に共通するプライマーを作りDNAを解読ことで生息する種類を網羅的に調べる技術や、特定の種の環境DNA量からその種の生物量を推定する技術である。本稿では、環境DNAを用いて、絶滅危惧種等に指定されているヒメタイコウチ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。

ヒメタイコウチ(*Nepa hoffmanni*)は、カメムシ目タイコウチ科に属する体長23mmほどの昆虫で、湿地や細流に生息する<sup>4)</sup>。中国、ロシアウスリー地方、朝鮮半島および日本に分布するが、日本国内での分布はきわめて局地的で、東海地方、近畿地方ならびに

四国の一部に分布するに過ぎない。ヒメタイコウチの生息地である湿地及び細流は、宅地造成等の開発により、急激に減少や劣化しており、兵庫県で「絶滅危惧種Aランク」、愛知県で「準絶滅危惧」とされるなど保全上注目される種となっている。本種の調査には、多大な労力を要するとともに、捕獲を伴う調査は、生息域に少なからず影響を与えているものと思われる。



写真1 ヒメタイコウチ (*Nepa hoffmanni*)

### 2. 材料及び方法

調査は、2014年と2016年の8月から12月に兵庫県と愛知県の14箇所の湿地及び細流で行った。調査地の水深は、0~10cm程度であった。はじめに各調査地から1Lの水を採水した。その後、一人で20分間の捕獲調査を実施した。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。その後、試料水をガラスフィルター(GF/F、直径47mm、0.7 $\mu$ 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、ヒメタイコウチに特異的なプライマー・プローブセ

キーワード：環境影響評価、環境DNA、プライマー、ヒメタイコウチ、モニタリング

発表者連絡先：東京都千代田区神田錦町三丁目22番地 TEL 03-6777-4572、FAX 03-3296-0527

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 Fisher社）によりDNAを増幅・定量し、ヒメタイコウチの存在の判定を行った<sup>5)</sup>。



写真2 調査地の状況

### 3. 調査結果

調査により、14地点中6地点において、ヒメタイコウチが捕獲され、5地点の試料水からヒメタイコウチのDNAが抽出された。また、捕獲されなかった8地点のうち、5地点の試料水では、ヒメタイコウチのDNAが検出された(表1)。

表1 環境DNAの検出、非検出の状況 (n=14)

		環境DNA調査		計
		検出	非検出	
捕獲調査	確認	5	1	6
	未確認	5	3	8
	計	10	4	14

### 4. 考察

湿地及び細流の環境DNAの検出について試行し、ヒメタイコウチが捕獲された5地点において、ヒメタイコウチ由来の環境DNAを検出することができた。また、ヒメタイコウチが捕獲されなかった5地点においても、環境DNAが検出された。しかし、捕獲確認された1箇所において、ヒメタイコウチの環境DNAが検出されなかった。この地点は、水深がほとんど0cmに近く、採水できた水がヒメタイコウチ生息地と分断されている可能性が高かった。したがって、環境DNAを用いた調査手法は、ヒメタイコウチの生息をほぼ正確に検出することができるものと判断される。

環境DNAが検出された地点のヒメタイコウチの捕獲個体数は、0~8個体/人・20分であり、生息密度の低い地点においても環境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の低い場合においても、高精度で水生昆虫の存在を検出できることが期待される。また、捕獲調査では、湿地及び細流内を歩行し、水底の落ち葉をめくりながら調査するため、少なからずヒメタイコウチ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、生息地での採水のみですむため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、ヒメタイコウチ以外の水生昆虫についても、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。

今回、環境DNAを用いた観測技術により、水域における生物モニタリングが簡略化でき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生息域の可能性を明らかにできることを示している。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) Ikeda, K., Doi, H., Tanaka, K., Kawai, T. & Negishi, J.N. (2016) Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. Conservation Genetics Resources, 8, 231- 234.
- 3) Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N. & Kawabata, Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. Limnology, 13, 193- 197.
- 4) Ban, Y., Shibata, S. & Ishikawa, M. (1988) *Nepa hoffmanni*. Bun-ichi Sogo Publishing Co., Tokyo, Japan (in Japanese).
- 5) Doi H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. & Minamoto, T. (2017) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. Freshwater Biology, 6, 30- 39.