環境 DNA を用いたニホンザリガニ及びウチダザリガニの分布と河川横断構造物の及ぼす影響把握

○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科　土居　秀幸
ＮＰＯ法人環境把握推進ネットワークーPEG　照井　滋晴
パシフィックコンサルタンツ株式会社　正会員　加藤　敦子
パシフィックコンサルタンツ株式会社　三塚多佳志
川井　唯史
兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科　永野真理子
北海道大学地球環境科学研究院環境起学専攻　根岸淳二郎

1. はじめに

淡水生態系は、地球上でも最も生物多様性減少の脅威にさらされている生息地である。世界中で、4,600種以上の淡水動物が絶滅の危機に瀕しており、これは1/4以上の種に該当する。特に、人間活動の結果として生じる外来種の分布拡大は、世界中の生態系に対する深刻な脅威である。侵略的外来種は、生物群集と生態系にかく乱を引き起こす。外来種は我々が気づかないうちに、急速に分布域を拡大する。このため、外来種定着と分布拡大を防ぐためには、外来種の早期発見と分布を継続して監視していくことが重要である。

近年、環境DNAを用いた生物相の調査手法が開発されている[1)2)]。環境DNAとは、生体外に放出されて水中に存在しているDNAの総称であり、皮膚片、粘液や排泄物などに由来すると考えられている。試料水の中に含まれるDNAを調べることでどのような種が調査地域に存在するかを調べることが可能である。

ニホンザリガニ(*Cambaroides japonicus*) は、北海道と青森県、秋田県及び岩手県のみに生息する。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。本種は人間による乱獲や開発行為、さらに外来種のウチダザリガニ（*Pacifastacus leniusculus*）との競合により生息地数が減少しており[3)]、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。ウチダザリガニは1920年代から国内で放流され、ニホンザリガニの生息地減少の一因と考えられており[4)]、環境省から特定外来生物に指定されている。このため、ニホンザリガニ及びウチダザリガニ両種の生息域の関係を把握することが重要である。

本稿では、環境DNAを用いて、阿寒湖に流入する河川において在来種のニホンザリガニ（図1）と1970年代に阿寒湖に導入されたウチダザリガニ（図1）を対象とし、環境DNAと捕獲採集による分布の比較を行った。また、パイプカルバート(以下、カルバートと言う、図2)の上下流を調査地点とすることで、河川横断構造物が2種のザリガニの分布に影響を与えるか否かについて考察を行った。

図1 在来種ﾆﾎﾝｻﾞﾘｶﾞﾆ(左)と外来種ｳﾁﾀﾞｻﾞﾘｶﾞﾆ(右)

図2 河川横断構造物（パイプカルバート）

2. 材料及び方法

調査は、2016年6月19日から21日に北海道阿寒郡阿寒町における阿寒湖に流入する河川で実施した。調査地は、道路がカルバート構造で河川を通過する22箇所の上下流44地点とした。河床からカルバート外周最下点までの高さは最小-10cmから最大69cmであった。はじめに各調査地から環境DNA分析のため１L

キーワード：環境 DNA、プライマー、ウチダザリガニ、ニホンザリガニ、河川横断構造物
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

の水を採水した。その後、二人で30分間、10m^{2}の範囲で捕獲調査を実施した。試料水は1 L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、0.7μm、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[5]及びウチダザリガニ（土居ら未発表データ）に特異的なプライマー・プローブセットを用いて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、ニホンザリガニ及びウチダザリガニの在不在の判定を行った。

3. 調査結果

調査の結果（表1)、ニホンザリガニは44地点中6地点で捕獲され、捕獲地点すべてにおいて環境DNAが検出された。全体で、21地点の試料水からDNAが検出された。ウチダザリガニは44地点中18地点で捕獲され、捕獲地点すべてにおいて環境DNAが検出された。全体で40地点の試料水からDNAが検出された。捕獲調査、環境DNAともにニホンザリガニよりもウチダザリガニの確認地点が多かった。環境DNAが検出されなかった地点は、ニホンザリガニが21地点、ウチダザリガニが4地点であった。カルバートの上流と下流における環境DNAの検出結果は、ニホンザリガニが10地点と11地点、ウチダザリガニが19地点と21地点であり、両種とも落差の上下流で大きな差はなかった。

表1 パイプカルバートによる落差上下流におけるザリガニ類の確認状況と落差の河床からの高さ

箇所		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
ニホンザリガニ	上流		○	○	◎	◎	○									○	◎	◎				○	○
	下流		○	○	○	○	○							○		○	◎	◎				○	○
ウチダザリガニ	上流		○	○	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	○	○	○			◎	○
	下流	○	○	○	○	○	○	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	◎	◎	○		◎	○
落差(cm)		44	25	-10	27	65	35	-6	-10	40	13	69	53	55	27	10	27	5.5	26	26	-10	18	17

凡例 ◎:捕獲及びeDNAによる確認、○:eDNAによる確認

4. 考察

河川水中の環境DNAの検出について試行し、ニホンザリガニ及びウチダザリガニが捕獲された地点すべてにおいて、それぞれのDNAを検出することができた。また、ニホンザリガニとウチダザリガニが同所的に生息している地点においても、それぞれの種の環境DNAが検出された。したがって、環境DNAを用いた調査手法は、ニホンザリガニ及びウチダザリガニの生息をほぼ正確に検出することができるものと考えられた。捕獲調査において、ザリガニ類の個体が確認できなった地点においても、ニホンザリガニで15地点、ウチダザリガニで22地点から環境DNAが検出された。この結果より、環境DNAを用いた調査は、従来の手法と比較して、広域に調査対象種の存在を把握でき、調査に要する時間や労力も軽減できる可能性がある。また、環境DNAを用いた調査では、個体数密度の低い希少種や侵入初期段階の外来種等、見つけにくい水生生物の調査への適用が期待される。

今回の調査結果では、22箇所中19箇所においてカルバートの上流でウチダザリガニが確認された。ウチダザリガニは湖と河川上流部を隔てている最大69cmの落差のあるカルバート上流でも確認されており、この程度の規模の落差はウチダザリガニの河川上流域への侵入を阻止できない可能性が示された。

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) Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N. & Kawabata, Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. Limnology, 13, 193- 197.
3) 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.
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) 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.