

## 環境DNA技術を用いたホタルのモニタリング手法

鹿島建設(株) 正会員 ○大野貴子, 林 文慶, 越川義功  
非会員 上野嘉之, 板川 暢

### 1. はじめに

ホタルは、豊かな里山の指標生物の1つとして注目され、全国でホタルの生息地保全や新たに生息場を創出するプロジェクトが多数実施されている。これらのホタル生息地が有効に活用されるためには、ホタルの生息状況に基づく維持管理が重要である。ホタルは幼虫期には水中、蛹化期には土中、成虫期には空中で生息する。成虫期は空中を飛翔するため、容易に生息状況を把握できるが、幼虫期、蛹化期にはホタルは捕獲しにくい生物であるため、正確な調査が困難である。ホタルの生活環境の中で最も長い水中期に幼虫の生息状況を把握できないことは、その生息場を維持していくうえで適切な管理ができないため、大きな問題である。

近年、生態学分野で応用されている環境DNA技術を用いたモニタリング手法は、生息環境中に生物が放出した微量のDNA（環境DNA）を分析することによって、生物の有無や生息状況を把握する技術である。

本報では、環境DNA技術を、ホタルのモニタリングへ適用することを目的として行った検討結果について報告する。

### 2. 飼育水による検証

環境DNA技術によるモニタリング手法を図-1に示す。環境DNAの分析は、①ホタルの生息地での採水、②採水試料のろ過処理によるフィルターへのDNAの回収、③フィルターからのDNAの抽出及び定量PCR装置（Polymerase Chain Reaction(ポリメラーゼ連鎖反応)を用いたDNA増幅装置）でのホタルDNAの検出という流れで行った。なお、DNAの定量に用いるプライマーは公開されているゲンジボタルの遺伝子配列情報をもとに設計した。モニタリング手法の妥当性を検証するために、ホタル飼育水を用いてDNAの検出確認を行った。

飼育水による検証実験は、滅菌済みのプラスチックコップに滅菌水150mLをいれたものに、ゲンジボタルの幼虫（60～100mg/個体）を1個体、5個体、10個体収容し、3日間静置した後に採水したものを試料とした（図-2）。採水試料は図-1のフローに従ってDNAの分析を行った。なお、実験は、3反復実施し、比較対照用に、滅菌水のみ、滅菌水にカワニナのみを収容した実験区も設定した。

図-3にホタルの個体数とDNAコピー数の関係を示す。実験

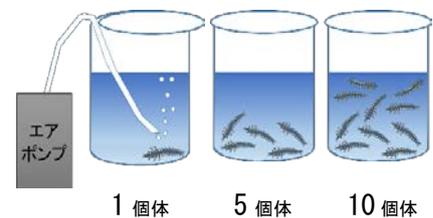


図-2 飼育水検証実験 概要

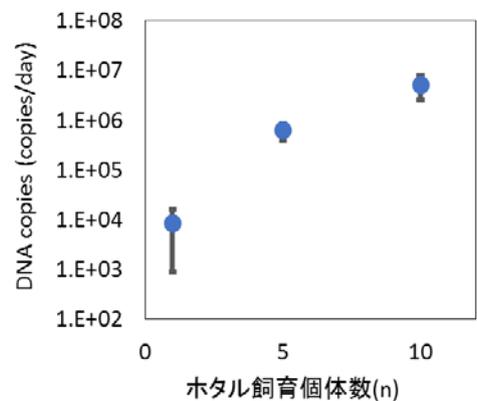


図-3 個体数とDNAコピー数の関係

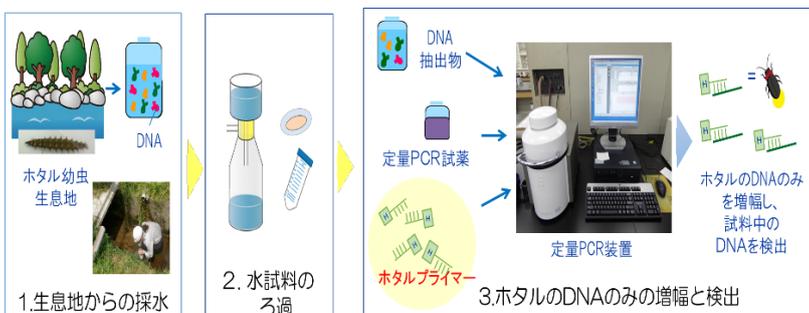


図-1 環境DNA技術によるモニタリング概要

キーワード：環境DNA ホタル モニタリング 生物多様性

連絡先：〒182-0036 東京都調布市飛田給2-19-1 鹿島建設(株)技術研究所 TEL 042-489-6332

の結果、ホタル幼虫の個体数の増加と共に、DNA の検出濃度（コピー数）の増加が確認された。また、個体数が少ない試料ではばらつきが大きくなることが明らかになった。この要因は、DNA の放出量の個体差が表れたためと推測される。また、比較対照区であるカワニナのみ、滅菌水のみともに DNA は非検出であった。以上の結果から、環境 DNA 技術を用いたモニタリング手法にてホタルが飼育水中に放出した DNA を検出可能であることが確認できた。

### 3. ホタル生息地における検証

前述したように飼育水から DNA が検出でき、分析手法としての妥当性が確認できた。そこで、環境水中からの検出すなわち、ホタル生息地での適用を目的として、環境 DNA 分析を行った。

調査地は、事前ヒアリングの結果をもとに、毎年飛翔が確認されている生息地 A と隣にあるが飛翔が確認されていない非生息地 B と C を選定した（図-4）。採水場所は、各調査地を流れるせせらぎ内の上流部と下流部にて採水をおこなった（生息地 A のみ中流部も実施）。採水は 2018 年 4 月上旬に行い、各地点約 1L の水試料を 3 反復採水した。採水後の水試料は図-1 のフローに従って分析を行った。なお、採水地点のホタルの生息状況を確認するために、当地の飛翔期にあたる 2018 年 6 月上旬の午後 7 時～9 時にかけてホタルの飛翔調査を行った。飛翔調査は採水地点ごとに目視で 2 分間飛翔総数を計測する方法を採用し、6 反復行った。

表-1 に調査地点での飛翔調査と DNA の検出結果を示す。飛翔調査の結果、事前ヒアリング同様に、生息地 A では、上、中、下流すべての地点で飛翔が確認され、非生息地 B と C では上、下流いずれでも飛翔が確認されなかった。生息地 A の飛翔数は、特に中流部の最大飛翔数が 12 個体と多く、上下流部では、半分の 6 個体にとどまった。

DNA の検出結果は、非生息地 B と C では非検出であったため、図-5 に生息地 A のみの採水地点の DNA コピー数測定結果を示す。生息地 A では、上流部、中流部ともに DNA が検出されたが、中流部では 3 反復中すべての試料で 10,000 コピーを超える DNA が検出された。この要因として、ホタルの飛翔数が最も多かったことから、中流部の幼虫の生息密度が高いことが示唆される。一方で、採水地が流水環境であるため、上流部に生息する幼虫が放出した DNA が中流部で集積し、検出された可能性も考えられる。

### 4. おわりに

検討の結果、環境 DNA 技術をホタルのモニタリングに適用できることが明らかになった。一方で、生息地では、ホタルの DNA を検出できたが、採水地点により DNA の検出結果に差が生じた。今後、さらなる検証によって、正確なモニタリング手法の確立を図りたい。



図-4 ホタル調査地点

表-1 生息地の飛翔調査と DNA 検出結果

		最大飛翔数 (個体/2min)	平均飛翔数 (個体/2min)	DNA検出 の有無
生息地A	上流	6	4	△
	中流	12	9	○
	下流	6	3	×
非生息地B	上流	0	0	×
	下流	0	0	×
非生息地C	上流	0	0	×
	下流	0	0	×

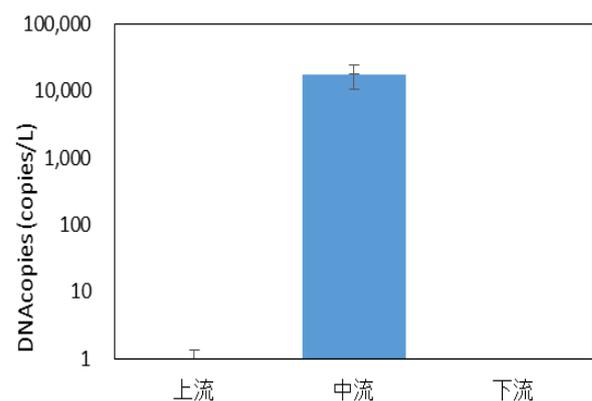


図-5 生息地 A の採水地点の DNA コピー数測定結果