

環境 DNA を活用した希少両生類の生息状況調査の試行

大成建設株式会社    正会員    ○内池   智広    正会員    赤塚真依子   正会員    望月   聖  
正会員    高山百合子   正会員    松宮   綾香

1. はじめに

建設工事において生物の保全は配慮すべき重要な事項であり、特に谷戸地などの中山間地の開発では希少動植物の保全対策が必要になるケースが多く存在する。その中でも、陸水域及びその周辺に生息する両生類は、移動範囲が限定的な種が多いことから保全対象種に指定されやすく、移設や代替生息地の整備など、状況に応じた保全対策が行われる。建設工事においては実施した対策の効果確認として生息状況調査が必要となる。

両生類の中でもサンショウウオ属は、国内 37 種の生息が確認されており、その多くが絶滅危惧ⅠA 類、ⅠB 類、準絶滅危惧に指定されている<sup>1)</sup>。従来の生息状況調査、特に個体数量の把握を意図した調査は、上陸後の個体発見が困難であることから繁殖期の卵塊調査（水中）となることが多い。そのため、調査は繁殖期に限定されやすく、年間を通じた連続的な状況把握は難しいのが実情である。そこで、採水試料から生物情報を入手する方法として注目されている環境 DNA を活用したサンショウウオ属の生息状況調査を試行し、繁殖期以降の年間を通じた生息状況把握の可能性を検証した。

2. 調査対象及び調査地概要

調査対象は国内に生息するサンショウウオ属の一種とした。なお、調査対象種名及び調査地の詳細については希少動植物保護の観点から非開示とする。（以降、調査対象種は本サンショウウオと表記。）

図 1 に調査地の概要と採水地点の位置を示す。調査地は、山林の中に小さな沢が複雑に入り組んだ中山間地であり、造成工事が順次進められているエリアである。本川の周辺には耕作放棄された水田や棚田の跡地が湿地として存在しており、水の動きは穏やかである。本川における採水地点は、地点 A, B, D, J の 4 地点であり、対象エリア最上流の地点 A から最下流の地点 J までは概ね 1 km 離れている。その他は支流における採水地点であり、地点 H・I は 2020 年 2 月に周辺で卵塊を

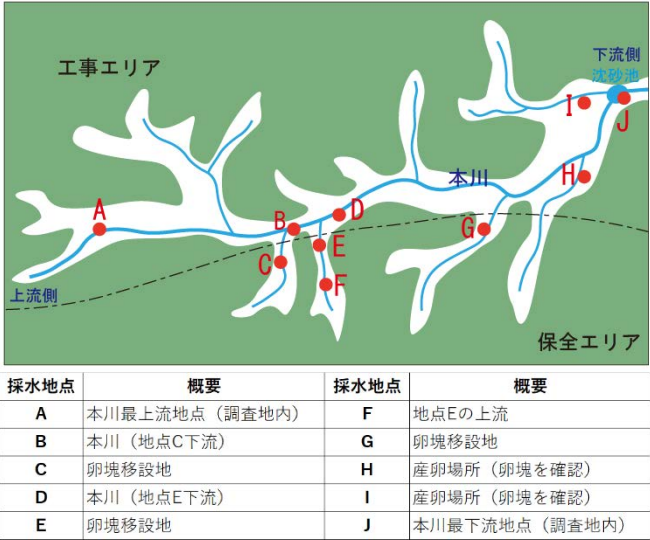


図 1 調査地及び採水地点概要



図 2 採水地点の状況（左：地点 F、右：地点 G）

確認した地点である。地点 C・E・G は 2020 年 2～4 月に造成工事エリアから卵塊を移設する予定地（8 月・11 月の調査時点では移設後）である。地点 F は移設予定地 E の上流である。

3. 調査方法

環境 DNA 分析では、試料採取として、対象とする水域で採水した試料をろ過する。ろ紙に回収されたろ過残渣から DNA を抽出し、抽出溶液に含まれる DNA の増幅の有無からその種の在/不在を判断する。

採水は、繁殖期（2020 年 2 月 25 日）、水中で生活する幼生期（8 月 4・5 日）、上陸して陸上で生活する変態後（11 月 10・11 日）に実施した。採水地点の状況を図 2 に示す。採水した試料は、輸送中の DNA 分解を抑制するため、塩化ベンザルコニウム 10% 水溶液を 1 mL/L 添加後に二重梱包の上で冷蔵輸送した。採水した翌日

キーワード 環境 DNA, サンショウウオ, 生息調査, 生活史

連絡先 〒163-0606 東京都新宿区西新宿 1-25-1 大成建設株式会社環境本部 TEL 03-5381-5191

表1 採水地点情報及び環境 DNA の分析結果

| 採水地点 及び 概要      | 2020年2月 | 2020年8月 | 2020年11月 |
|-----------------|---------|---------|----------|
|                 | 繁殖期     | 幼生期     | 変態後      |
|                 | 水中期     |         | 陸上期      |
| A 本川最上流地点（調査地内） | ○ ○ ○   | —       | —        |
| B 本川（地点C下流）     | ○ ○ ○   | —       | —        |
| C 卵塊移設地         | ○ ○ ○   | —       | —        |
| D 本川（地点E下流）     | ○ ○ ○   | × × ×   | × × ×    |
| E 卵塊移設地         | ◎ ◎ ◎   | ◎ ◎ ◎   | × ○ ×    |
| F 地点Eの上流        | ◎ ◎ ◎   | —       | —        |
| G 卵塊移設地         | ◎ ◎ ◎   | —       | —        |
| H 産卵場所（卵塊を確認）   | ○ ○ ○   | —       | —        |
| I 産卵場所（卵塊を確認）   | ○ ○ ○   | —       | —        |
| J 本川最下流地点（調査地内） | 実施なし    | × × ×   | × × ×    |

◎：明瞭な増幅 ○：増幅を確認 △：不明瞭な増幅 ×：増幅確認なし

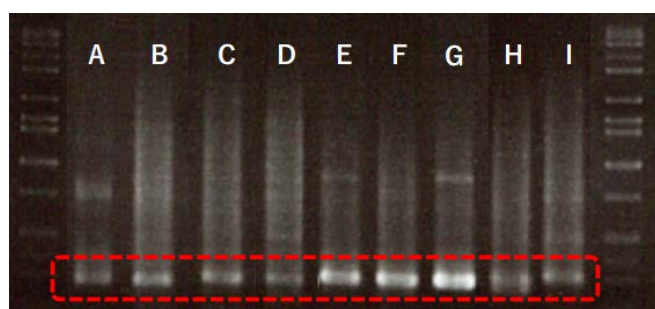


図3 電気泳動法による環境 DNA 増幅の確認

に、250mL をろ過したろ紙を冷凍保存した<sup>2)</sup>。

本サンショウウオと種は異なるが、サンショウウオ属の DNA 増幅実績がある分析方法（PCR、ポリメラーゼ連鎖反応の条件）を採用し<sup>3)</sup>、ろ過残渣から抽出した DNA を 1 つの抽出液につき 3 検体 PCR で増幅した。2 月に得られた全 9 地点の環境 DNA が、目的のサンショウウオの配列であることを確認できたため、8 月、11 月の試料は電気泳動法で目的の位置に蛍光を確認した試料について、DNA が増幅したと判断した（図 2）。

#### 4. 結果及び考察

##### (1) 生息状況調査への環境 DNA 分析の適用可能性

本サンショウウオの繁殖期である 2 月に採水した試料の環境 DNA 分析結果を表 1 及び図 3 に示す。

卵塊移設前の調査ではあったが、移設予定地の上流なども含めた全地点（地点 J：2 月時点では沈砂池未完成のため採水の実施なし）において DNA の増幅を確認した。本サンショウウオの環境 DNA が今回の調査条件で分析できることを確認し、生息状況調査への適用可能性が示唆された。

##### (2) 環境 DNA 分析への生活史の影響

保全エリアに位置する地点 E（卵塊移設地）では、水中期である 2 月（繁殖期）及び 8 月（幼生期）の試料から明瞭な DNA の増幅を 3 検体全てから確認した。上陸後の時期である 11 月の試料からは 3 検体中 1 検体で不

明瞭な増幅となった。

このことから、本サンショウウオの環境 DNA の増幅傾向は、水中期、陸上期など生活史によって異なる可能性が示唆された。なお、11 月に 1 検体から増幅が確認された理由としては、上陸した個体が一時的に水中に入った、水中で冬を越す越冬幼生がいたなどの要因が考えられ、今後の検討が必要である。

##### (3) 採水試料による評価領域

水中期である 8 月（幼生期）の地点 E（卵塊移設地）及び地点 E の下流に位置する本川の地点 D、本川最下流部の沈砂池である地点 J の結果をみると、環境 DNA の増幅を確認した地点 E から約 50m、約 500m 下流に位置する地点では DNA の増幅が確認されなかった。

このことから、水の動きの穏やかな陸水域の湿地・河川等においては、本サンショウウオの比較的狭いエリアの生息状況を把握できる可能性が示唆された。

繁殖期に、全地点から本サンショウウオの環境 DNA が確認できたことは、本調査エリアに本サンショウウオが広く分布し、成体が産卵のために水辺・水中に降りている状況が得られた可能性が考えられる。

#### 5. まとめ

本試行により、本サンショウウオの生息状況調査への環境 DNA 分析の適用可能性が得られた。従来は調査が困難であった繁殖期以降において、水中期には環境 DNA の増幅が確認でき、陸上期には水中期に比べて増幅されにくい結果となった。生活史によって環境 DNA 分析結果が変化する傾向が明らかとなった。

環境 DNA 分析は、採取した試料中の DNA を増幅させ、DNA 増幅の有無からその種の在/不在を判断する手法である。試料に含まれる環境 DNA が希薄な場合や DNA の増幅を阻害する底泥が多く含まれる場合には、対象生物の直近で採取した場合であっても増幅を確認できないことが報告されている<sup>2)</sup>。環境 DNA を活用した生息状況調査に向けては、対象水域の流速や水量、周辺の水質、生息する生物量との関係など、幅広い調査を生活史が異なる季節ごとに実施し、長期的に結果を蓄積していく必要があると考えられる。

##### 参考文献

- 1) 日本爬虫両棲類学会，日本産爬虫両生類標準名リスト，2020。
- 2) 赤塚真依子 他：建設現場への環境 DNA を活用した生物モニタリング技術の適用について，土木建設技術発表会 2020 講演概要集，IV，7，pp1-8，2021。
- 3) 坂井雄祐 他：“Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis”，*Environmental DNA*, Vol.1, 3, pp281-289, 2019。