

ため池群における環境 DNA を用いた希少両生類の生息状況調査

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 渡邊 千佳子

正会員 高山 百合子

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、特に里山など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い。希少動植物の中でも、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。この場合、実施した保全対策の効果確認として生息状況調査が必要となる。

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、両生類の生息状況調査についてサンショウウオを中心に試行し、年間を通じた生息状況把握の可能性を検証した。

2. 調査地及び調査対象

調査は、自然再生事業として侵略的外来種の排除によるため池環境の保全が行われている、北上川水系碧井川の支流である久保川流域のため池群（知勝院敷地内：岩手県一関市）において実施した。当地では多数の希少な両生類の生息が既往調査によって確認されている。数あるため池の中から、多くの生物種が確認されており、且つ隣接する樹林の有無、池の大きさなど、環境条件が異なる3つの池を選定した。各池で其々流れのある箇所と流れの停滞部など、条件の異なる2～3地点を採水地点とした（表1）。既往調査において生息が確認されている両生類のうち、サンショウウオ科2種（クロサンショウウオ、トウホクサンショウウオ）を中心に、イモリ科1種（アカハライモリ）及び無尾目（カエル類）を調査対象とした。




3. 調査方法

環境 DNA 分析は、環境 DNA 学会の方法¹⁾に準拠し、対象とする水域で採水した試料をろ過した。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対象種の DNA 増幅の有無を確認して、サンショウウオ科²⁾、イモリ科とカエル類を含む両生類（プ

ライマー未公表）を対象とした分析を実施した。

調査は、サンショウウオが水中で生活する幼生期の5月（18-20日）、6月（14-16日）、7月（27・28日）、上陸して陸上で生活する変態後の10月（25-27日）、繁殖期である2月（28・3月1日）に実施した。地点Bの状況を図1に示す。なお、2月については繁殖期を想定したが、当年の積雪量が多かったため水面が氷結しており、繁殖期前の採水となった。水深の比較的深い地点A・Bでは、表層及び水深50cm、地点Cでは表層から採水した。採水試料は、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1mL/L添加後に冷蔵輸送した。採水日には、調査員が水際から目視等による生物調査を併せて実施した。

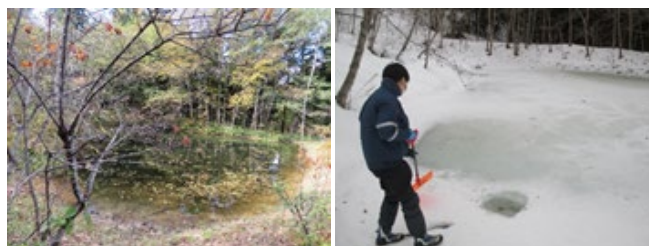
表1 調査対象の池 概要

地点 A	地点 B	地点 C
		
<ul style="list-style-type: none"> ・明るく開けた池 ・規模大 ・2地点で採水（通路側/河川側） 	<ul style="list-style-type: none"> ・樹木に囲まれた池 ・規模大 ・2地点で採水（流入側/堤体側） 	<ul style="list-style-type: none"> ・樹木に囲まれた池 ・規模小・3連の池 ・3地点で採水（上池・中池・下池）



2021年6月

2021年7月



2021年10月

2022年2月

図1 各採水時期の状況（地点B）

キーワード 環境 DNA, 両生類, 生息調査, 生活史

連絡先 〒163-0606 東京都新宿区西新宿 1-25-1 新宿センタービル 大成建設株式会社 TEL03-5381-5191

4. 結果及び考察

サンショウウオを対象とした調査結果を表2～4に示す。なお、地点Bの流入側表層では、前述の4回に加え予備調査として2021年5月にも採水した。

クロサンショウウオは、生物調査で5～7月に地点Bのみで確認され、環境DNA分析では5月は地点B、6月は地点B・C、7月には地点Aで確認された。

トウホクサンショウウオは、生物調査ではいずれも確認されなかったが、環境DNA分析では6月に地点A・C、7月に全地点で確認された。

環境DNA分析では、生物調査では記録されていない地点においてもサンショウウオのDNAを確認でき、水中で隠れて生息する本種に対する調査手法としての有効性が示唆された。

同じ地点Aの池内であっても、止水性のクロサンショウウオは流れのほぼ無い通路側で、流水環境を好むトウホクサンショウウオは近くに流水のある河川側で環境DNAが検出された。また、地点A・Bのいずれもトウホクサンショウウオは表層で検出されず、生息環境の違いや流れの影響が環境DNA分析結果に表れていることが推測された。このことから、環境DNAを用いた調査ではそれぞれの種の生活環境を考慮した採水が重要であることが判る。

水から離れて生活する時期である10月と2月は、両種ともにいずれの調査方法でも確認されなかった。別種のサンショウウオを対象とした調査^{3,4)}では、サンショウウオの生活史と環境DNAの検出状況の関連性が高いことが示唆されており、今回の調査でも同様の傾向を確認できた。

また、6月に地点Bにおいてイモリ科及びカエル類を対象として検証を実施した結果を表5に示す。生物調査ではイモリ1種、カエル4種が確認されたが、うちカエル1種(ニホンアマガエル)の環境DNAが確認されなかった。確認できなかった要因としては、他のカエルに比べ水中にいる機会が少なかった可能性や個体数が少ない傾向であったことが挙げられる。6月はモリアオガエルの繁殖最盛期であり、水上に張り出した樹上に卵塊が確認されたことから、卵塊から落下した幼生等の環境DNAが確認されたものと考えられる。また、ヤマアカガエルは上陸幼体が確認されていたが、環境DNAも確認されたことから、水中に幼体が残っていた可能性が考えられる。

表2 クロサンショウウオの環境DNA確認状況

環境DNA	地点A				地点B				地点C		
	通路側		河川側		堤体側		流入側		上池	中池	下池
	表層	50cm	表層	50cm	表層	50cm	表層	50cm	表層	表層	表層
2021年 5月								○			
6月	×	×	×	×	×	×	○	○	×	×	○
7月	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
10月	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
2022年 2月	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

表3 トウホクサンショウウオの環境DNA確認状況

環境DNA	地点A				地点B				地点C		
	通路側		河川側		堤体側		流入側		上池	中池	下池
	表層	50cm	表層	50cm	表層	50cm	表層	50cm	表層	表層	表層
2021年 5月							×				
6月	×	×	×	○	×	×	×	×	○	○	○
7月	×	×	×	○	×	×	×	○	×	○	×
10月	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
2022年 2月	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

表4 生物調査によるサンショウウオ類の確認状況

生物調査	地点A	地点B	地点C
2021年 5月	×	クロサンショウウオ	×
6月	×	クロサンショウウオ	×
7月	×	クロサンショウウオ	×
10月	×	×	×
2022年 2月	×	×	×

※クロサンショウウオ、トウホクサンショウウオを対象種として実施

表5 イモリ科及び無尾目(カエル類)の確認状況

	調査員記録	環境DNA
ツチガエル	○	○
ヤマアカガエル	○	○
モリアオガエル	○	○
ニホンアマガエル	○	×
アカハライモリ	○	○

生物調査の場合、調査員は池周辺でのコーリングも含めて記録しており、採水による環境DNA分析で得られる情報とは異なる部分がある。環境DNA分析を効果的に活用するためには、検出の特性とその要因について理解することが重要となる。

5. まとめ

サンショウウオ、カエルの環境DNA分析では、生活史や生活環境が異なることもあり、時期や場所によって検出される種が異なる傾向が得られた。生息状況に合わせた調査が重要になると考えられる。

今後、環境DNAを活用した生態系調査の有効性の検証を進めると共に、環境保全活動に活用していく。

謝辞：本調査を実施するにあたり、敷地内での調査を快諾いただいた知勝院様、調査にご協力いただいた須田真一氏に謝意を表します。

参考文献

- 1) Minamoto, T.他: An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, Environmental DNA, Vol.3, 8-13, 2021.
- 2) Sakai, Y.他: "Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (Hynobius vandenburghi) by GIS and eDNA analysis", Environmental DNA, Vol.1, 3, pp281-289, 2019.
- 3) 内池智広他: 環境DNAを活用した希少両生類の生息状況調査の試行, 土木学会全国大会第76回年次学術講演会, VII, 71, pp.1-2
- 4) 赤塚真依子他: 建設工事現場における環境DNAを活用した希少両生類の年間調査, 土木学会全国大会第77回年次学術講演会, VII (投稿中)