

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

大成建設株式会社 正会員 ○赤塚真依子 正会員 内池 智広 正会員 高山百合子
 正会員 望月 聖 正会員 神野 桂子 正会員 守田 巧
 正会員 古屋 俊祥 正会員 佐藤 寛和

1. はじめに

中山間地における開発の建設工事では、希少な動植物が生育している地域が多く、希少種の移設や代替生息地の整備など保全対策が重要となる。本研究で調査対象としたサンショウウオ類（図1）は、小型で活動範囲が限られることから建設工事の影響を受けやすく、保全対象に指定されやすいが、目視での生息確認が困難である。保全対象となり、移設や保全対策を実施した際の従来の調査は、産卵期に目視での卵塊分布調査が主となる。そこで産卵期以降の幼生（水中）期・成体（陸上）期を通じた生息調査への環境 DNA の活用を目的として、建設工事期間中の環境 DNA 調査を25か月間実施し、その検出傾向を確認した。

2. 現地調査

現地調査は、サンショウウオ属の一種の生息が確認されている建設工事区域内で実施した。希少動植物保護の観点から、本稿では調査対象種名を本サンショウウオと表記し、調査地の詳細は割愛する。

環境 DNA 分析の試料採取作業は採水となるが、本サンショウウオが生息する湿地は水深が浅く、採水時に底泥を巻き上げやすい環境である。調査1年目に底泥が混入することによる分析への影響が確認されたことから¹⁾、底泥の混入を避けて採水し、ろ過量を500mLとした。広域調査として、産卵期、水中期、陸上期に調査地点 A~H の全8地点で採水した（図2、写真1）。

A, D, F 点は卵塊移設地であり、G 点では2020年に卵塊を目視確認していることから本サンショウウオの幼生の生息が期待される地点である。F 点は、E 点の上流で成体の生息地に近い地点、B, E, H 点は各卵塊を確認した地点の支流が集まる下流域であり、2020年の産卵期以降に土地改変された地点である。また、定点調査として、環境 DNA の検出傾向を確認するため、本サンショウウオの卵塊を移設した D 点において、25か月間（全16回）採水した。

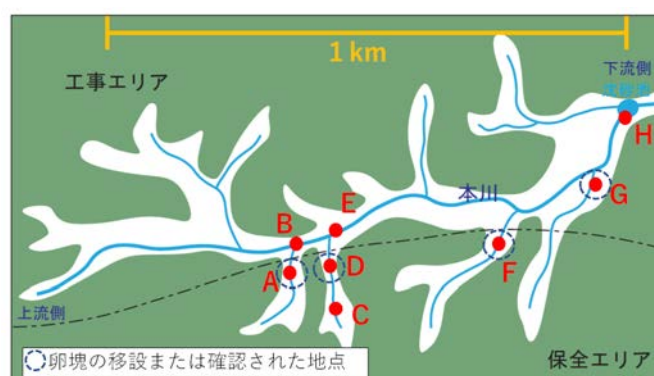
3. 分析方法

現地で採水した試料は、DNA 分解抑制を目的に塩化ベンザルコニウム 10%水溶液を 1mL/L 添加して、冷蔵輸送した。実験室でろ過し、ろ紙に回収したろ過残渣（排泄物や組織片）から DNA を抽出した。抽出した DNA は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で増幅させた。サンショウウオ属の分析方法²⁾を採用し、DNA 増幅キーワード 環境 DNA, サンショウウオ, 生物調査, 環境影響, 季節変化

連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター TEL 080-9579-4355



図1 サンショウウオ類の一般的な生活史



	概要	土地改変		概要	土地改変
A	卵塊移設地	なし	E	本川 (D下流)	あり
B	本川 (B下流)	あり	F	卵塊移設地	なし
C	支流 (D上流)	なし	G	産卵確認地	なし
D	卵塊移設地	なし	H	本川最下流	あり

図2 調査地及び調査地点概要



写真1 採水地点の状況 (2020年2月: C点・D点)

表1 環境DNA分析結果（広域調査）

調査時期	生活史	A 卵塊移設	B 下流	C 上流	D 卵塊移設	E 下流	F 卵塊移設	G 産卵確認	H 最下流
2020年2月	産卵期	○	○	○	○	○	○	○	○
8月	水中期	○	×	×	○	×	○	○	×
11月	陸上期	×	×	×	×	×	○	×	×
2021年3月	産卵期	○	○	○	○	×	○	○	×
8月	水中期	○	×	×	○	×	×	○	×
11月	陸上期	×	×	×	×	×	×	×	×
2022年2月	産卵期	○	○	×	○	×	○	○	×

《凡例》

○：DNA増幅あり
 ×：DNA増幅なし
 ■：土地改変エリア
 ■：保全エリア

表2 環境DNA分析結果（定点観測 D点）

	2020				2021												2022
	2月	8月	9月	11月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2月	
	(水中)	(水中)	(陸上)		産卵(水中)	ふ化～幼生(水中)						変態～幼体(陸上)				(水中)	
環境DNA	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	
目視観察	○	—	—	—	○	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	○	

の有無を確認した。水中に存在する環境DNAは、微生物や紫外線等により数日で分解されることから、採水日までの数日間の生物情報を反映していると考えられる。

4. 試験結果

(1) 広域調査 全8地点で2年間、産卵期、水中期、陸上期に調査した結果を表1に示す。土地改変前の2020年産卵期には、敷地内の全地点で本サンショウウオの環境DNAを確認できていたが³⁾、土地改変後の2021年、2022年の産卵期には、地形が変化したE、H以外の6地点で環境DNAを確認する結果となった。卵塊を移設または確認した地点(A、D、F、G)のほか、上流(C)、下流(B)など周囲で広く環境DNAが得られる傾向となった。一方、幼生(水中)期には卵塊を移設または確認した地点(A、D、F、G)で環境DNAの増幅を確認し、上流(C)、下流(B)では非検出となり、環境DNAを確認できる地点が卵塊期に比べて限られる傾向となった。また、成体(陸上)期には、環境DNAを確認できたのが2020年のF地点において1回のみとなり、DNAが非検出になる傾向が得られた。陸上期の場合、環境DNAが確認できる要因として、成体や越冬幼生が周辺に生息している可能性、成体を捕食した大型生物の排泄物由来等が挙げられる。本調査では、環境DNA検出傾向と水陸利用期の関連性が高いことを確認できた。

(2) 定点調査 25か月のうち約1年間、概ね月1回の定期採水を行い、環境DNA検出傾向を確認した結果、本サンショウウオの産卵期である2月から水中期である8月まで環境DNAは継続して確認でき、陸上期にはDNAが確認されなかった(表2)。環境DNAが産卵期から水中期に継続して確認できたことから、本サンショウウオのふ化後の生存可能性、陸上に上陸した推定時期の確認に活用できる可能性が示唆された。

5. おわりに

建設工事区域内において、25か月間、本サンショウウオの環境DNA調査として広域調査と定点調査を実施した。環境DNA検出傾向と水陸利用期に関連が得られ、調査期間が産卵期に限定されていた従来調査に比べ、本調査では産卵期から水中期までの希少両生類の生息状況の把握が可能となった。土地の改変等、工事影響が考えられる希少種の生息地においては、環境DNAによる調査を活用することにより、保全対策の有効性の確認や異変があった際の早期対策が可能になると考えられる。

参考文献

- 赤塚真依子 他：環境DNA分析を活用した希少両生類の生息地調査における底泥の影響について、土木学会全国大会第76回年次学術講演会，VII，72，pp.1-2
- Sakai, Y. 他：“Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis”, *Environmental DNA*, Vol.1, 3, pp.281-289, 2019.
- 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