

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 ○大井 涼太朗 正会員 渡邊 千佳子
正会員 内池 智広 正会員 赤塚 真依子

1. はじめに

建設工事において工事対象地での生物保全は配慮すべき重要事項である。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となることが多い。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、移動範囲が限定的である種が多いため、保全対象種に指定されやすい。

そこで、建設工事では、対象地での両生類の生息状況に応じて、移設や代替生息地の整備などの保全対策が行われる。そのため、工事前の対象地での生息状況の把握や、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。

近年、水から生物の情報を得る技術として環境 DNA 分析が注目されている。本技術は、採水した試料中の DNA の有無から対象種の在/不在にかかわる情報を入手できる手法である。本技術が両生類の生息状況調査で活用できれば、調査がより簡便に実施できることが期待される。

本研究では、環境 DNA 分析について、両生類の生息状況調査における有効性を検証した。

2. 調査地及び調査対象種

調査は、自然再生事業の一環でため池環境の保全が行われている、久保川流域にある知勝院敷地内のため池群（岩手県一関市）で実施した。当地では多数の希少な両生類の生息が既存調査で確認されている。

数あるため池の中から、希少な両生類が確認されており、且つ隣接する樹林の有無、池の大きさなど、異なる環境条件となるよう、調査対象の池を選定した。調査対象とした2つの池の概況を表1に示す。

調査対象種は、既往調査¹⁾において生息が確認されているクロサンショウウオ・トウホクサンショウウオ（サンショウウオ科）、アカハライモリ（イモリ科）、及びカエル類とした。

3. 調査方法

採水は、2022年4月～11月まで、月1回実施した。表層の水をひしゃくで掬って採水するとともに、水

深のある地点Aでは、水深50cmの深層の水もポンプで採水した。

また、4・7・10月には、採水日に、調査員が水上からの目視等による生物調査を実施した。

採水試料は、輸送中のDNAの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添加後に二重梱包の上で冷蔵輸送した。採水した翌日に、250mLをろ過したろ紙を冷凍保存した。

DNA分析は、環境DNA学会の方法²⁾に準拠した。採水試料をろ過したろ過残渣からDNAを抽出し、抽出溶液中の対象種のDNA増幅の有無を確認した。分析はそれぞれ、サンショウウオ科³⁾、イモリ科、カエル類、および両生類を対象とするプライマーを用いて実施した。

表1 調査対象の池の概況

地点A	地点B
	
・規模が大きい ・明るい ・水深が深い	・規模が小さい ・樹林に囲まれ、暗い ・水深が浅い

4. 結果及び考察

調査結果を表2～4に示す。

既往調査で調査対象の池やその周辺で確認されていたタゴガエルやアカハライモリ等は、環境DNA分析でのみ確認された。調査日に目視等による調査（以下、生物調査）では確認できなかった生物種が確認できたことから、両生類の調査において環境DNA分析が有効である可能性が示唆された。

月別の環境DNA分析の検出種数は春～夏の方が、秋よりも多くなる傾向にあった。また、ニホンアカガエルは春～秋にわたって継続的に検出され、クロサンショウウオは主に春～初夏に検出されるなど、生

キーワード 環境 DNA、両生類、生息状況調査、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 TEL03-5381-5424

物種ごとに月別の DNA 検出状況の傾向が異なっていた。このことから、環境 DNA による調査では、対象種に応じて調査時期に留意する必要があることが示唆された。各生物種の生活史との詳細な照合により、環境 DNA 分析の有効性の向上が期待できると考えられる。

一方、トウキョウダルマガエルは生物調査で確認されたが、環境 DNA 分析では確認されなかった。また、シュレーゲルアオガエル・ツチガエルなどでは、生物調査で確認された時期・地点において環境 DNA 分析で確認されず、生物調査で確認されなかった時期・地点において環境 DNA 分析で確認されるという事象が確認された。生物調査で確認されたが環境 DNA 分析では確認されなかった要因として、生物調査での確認種が調査対象の池の水中にいなかった可能性があげられる。例えば、トウキョウダルマガエルは、産卵のために水中にいる可能性が最も高い繁殖期（4月）では鳴き声による確認であったことから、水中に入っていなかった可能性が考えられる。また、本調査では目視で確認された個体数が少なかったことから、水中の DNA 量が少ないことも要因として推測される。

地点間で比較すると、地点 B の方が環境 DNA の検出数の合計や、検出された種数が高い傾向があった。また、地点 A でのみシュレーゲルアオガエルが検出され、地点 B でのみタゴガエル・ウシガエル・アカハライモリが検出された。環境 DNA による調査は、水深が浅く暗いなど、採水地点の環境条件の選定が結果に影響を与える可能性が示唆された。また、環境ごとに生息する生物種の違いが環境 DNA 分析の結果に反映されていることから、より正確な情報を得るためには、同一地域であっても可能な限り多様な条件の地点で採水する必要があることがうかがえる。

地点 A において、ニホンアカガエル・ツチガエルは表層・深層の両方で DNA が検出されたが、その他の種は表層でのみ DNA が検出された。

深層で環境 DNA が検出されなかった要因としては、採水時に混入した泥等によって分析が阻害された可能性や、生息環境が表層であった可能性があげられる。採水時には採水の深さに注意する必要があると推察される。

キーワード 環境 DNA, 両生類, 生息状況調査, 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 TEL03-5381-5424

表 2 環境 DNA 分析及び生物調査の月ごとの確認状況

○：環境DNA分析で確認 ●：生物調査で確認

地点A	手法	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	環境DNA検出数
ニホンアカガエル	環境DNA	○	○	○	○	○	○			6
	生物調査	●			●			●		-
ヤマアカガエル	環境DNA	○		○						2
	生物調査									-
モリアオガエル	環境DNA			○						1
	生物調査									-
シュレーゲルアオガエル	環境DNA				○					1
	生物調査	●								-
トウキョウダルマガエル	環境DNA									0
	生物調査	●			●					-
ツチガエル	環境DNA	○		○	○					3
	生物調査									-
クロサンショウウオ	環境DNA	○								1
	生物調査									-
トウホクサンショウウオ	環境DNA							○		1
	生物調査									-
環境DNA検出種数の合計		4	1	4	3	1	1	1	0	15

○：環境DNA分析で確認 ●：生物調査で確認

地点B	手法	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	環境DNA検出数
タゴガエル	環境DNA	○		○			○			3
	生物調査									-
ニホンアカガエル	環境DNA	○	○	○	○	○	○	○	○	8
	生物調査				●					-
ヤマアカガエル	環境DNA	○	○	○	○	○	○		○	7
	生物調査				●			●		-
モリアオガエル	環境DNA		○	○	○	○	○			5
	生物調査									-
ウシガエル	環境DNA					○				1
	生物調査									-
ツチガエル	環境DNA				●					0
	生物調査									-
アカハライモリ	環境DNA	○	○	○		○	○			5
	生物調査									-
クロサンショウウオ	環境DNA	○	○	○	○		○		○	6
	生物調査	●								-
トウホクサンショウウオ	環境DNA	○	○	○				○		4
	生物調査									-
環境DNA検出種数の合計		6	6	7	4	5	6	2	3	39

※ 4月・7月・10月に目視調査を実施
※ 緑色背景：環境DNA分析でのみ確認された種
※ 灰色背景：生物調査でのみ確認

表 3 地点ごとの環境 DNA 検出種

生物種	地点A	地点B
ニホンアカガエル	○	○
ヤマアカガエル	○	○
モリアオガエル	○	○
ツチガエル	○	○
タゴガエル	×	○
シュレーゲルアオガエル	○	×
ウシガエル	×	○
アカハライモリ	×	○
クロサンショウウオ	○	○
トウホクサンショウウオ	○	○

※ 緑色背景：地点Aでのみ確認
※ 灰色背景：地点Bでのみ確認

表 4 表層・深層の環境 DNA 検出状況（地点 A のみ）

生物種	表層	深層
ニホンアカガエル	○	○
ヤマアカガエル	○	×
シュレーゲルアオガエル	○	×
ツチガエル	○	○
クロサンショウウオ	○	×
トウホクサンショウウオ	○	×

5. まとめ

本調査では、対象種や採水時期、環境条件等を考慮することで、環境 DNA 分析を両生類の調査において有効に活用できる可能性が示された。生活史との照合や生物調査における生物の確認位置と採水位置の検証、サンプル数の追加等、DNA 分析の工夫などにより、環境 DNA 分析の精度を向上できると考えられる。今後、更なる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、佐藤良平氏に謝意を表します。

参考文献
1) 環境省東北地方環境事務所 (2013) :『久保川イーハトーブ世界の自然といきもの』
2) Minamoto, T. 他: An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, Environmental DNA , Vol.3, 8-13, 2021.
3) 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.