

## Point

環境DNA調査は希少種の調査にも有効です。一般的に、希少種は生息密度が低いため、採捕調査による生息確認が難しいとされています。そこで、3種の希少種を対象にした種特異的な環境DNA検出法を開発し、効率的・高精度に調査する方法を採用した事例をご紹介します。

## 種特異的な環境DNA検出法を用いた希少種の分布調査

国土環境研究所 自然環境保全部、環境創造研究所 遺伝子解析室

※本調査は、神奈川県環境科学センターの委託により実施しました。

### はじめに

4ページに述べた神奈川県環境科学センターからの委託業務では、サンショウウオ類を対象にした採捕調査によるモニタリングも行っています。相模川水系に生息するサンショウウオ類には、ハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオの2種(写真1)が知られています。両種とも、幼生期は河川源流域の石の下などで水中生活を送り、成長して変態した成体は主に水辺近くの陸上で暮らします。また、ハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオは、それぞれ神奈川県において準絶滅危惧と絶滅危惧Ⅱ類にランクされる希少種であり、相模川水系においても生息密度は低いことが予想されました。したがって、サンショウウオ類の採捕調査では、広範囲を対象とした調査になる場合が多く、大きな労力が必要となります。

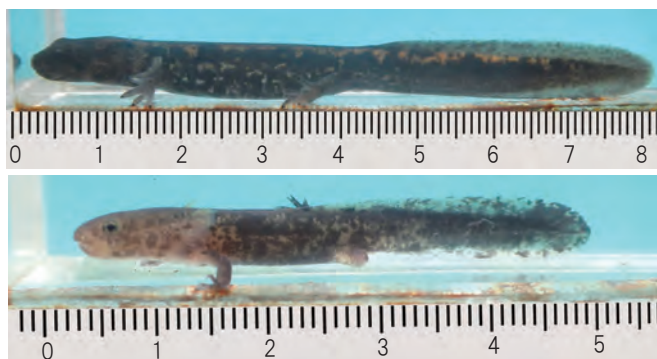


写真1 ハコネサンショウウオ(上)とヒガシヒダサンショウウオ(下)の幼生

また、相模川水系には、半水生の小型哺乳類で、神奈川県において準絶滅危惧にランクされる希少種カワネズミの生息も知られています。カワネズミの調査は、カゴ罠による捕獲やセンサーカメラによる撮影記録などの方法が用いられてきました。これらの調査には、カゴ罠やカメラの設置に関する専門知識が必要であることに加え、罠で捕獲された個体が誤って死傷してしまうこともありました。

これに対し、環境DNA調査は、現地での作業が水を汲むだけでよいという簡便さや、調査対象である希少種を傷つけないという優れた面があります。そこで、ハコネサンショウウオ、ヒガシヒダサンショウウオおよびカワネズミという希少種3種について、環境DNA調査を試験的に実施し、従来の調査方法の代替となりうる可能性があるか検討を行いました。

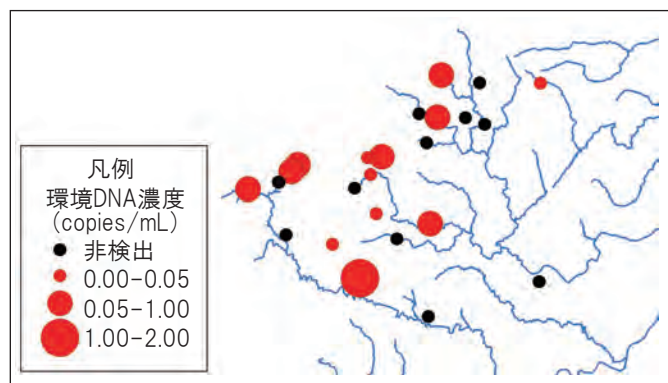
### 調査概要

本調査は、2018年8月に採水し、特定の種の環境DNAだけを特異的に検出する方法で分析を行いました。当社が独自に開発したこの方法では、採水したサンプルの中に含まれている調査対象3種のDNAのみを“種特異的に”検出するような技術的工夫をしており、それぞれの種ごとの環境DNA濃度を選択的に測定することが可能です。測定された環境DNA濃度は、採水地点周辺の生物量と強い正の相関を示すことが知られています<sup>1)</sup>。すなわち、環境DNAの濃度から、地点間の相対的な生物量を比較することができます。なお、生物量という用語にはいくつかの定義がありますが、ここでは調査地点に生息する個体の合計湿重量のようなイメージで示しています。

### サンショウウオ類2種の調査結果

#### (1)環境DNAの検出結果

分析の結果、採水を実施した全24地点のうち、13地点でハコネサンショウウオの環境DNAが検出されました(図1)。一方、ヒガシヒダサンショウウオでは、全ての地点において環境DNAは検出されませんでした。



※希少種保護の観点から架空の地点情報を掲載しています

図1 ハコネサンショウウオの環境DNA濃度のイメージ図

#### (2)採捕調査との比較

サンショウウオ類2種における採捕調査と環境DNA調査の結果を比較したところ(表1)、ハコネサンショウウオでは、採捕で12地点、環境DNAで13地点で生息が確認されました。地点ごとにみると、捕獲と環境DNAの両方で確認された地点が9地点と最も多く、環境DNA調査のみで

確認された地点が4地点、採捕調査のみで確認された地点が3地点となりました。また、ヒガシヒダサンショウウオでは、採捕で1地点のみ確認されていましたが、環境DNAは検出されませんでした。このことから、どちらか一方の調査方法が優れているというよりも、両方の調査を併用することで、生息密度が低いサンショウウオ類をより確実に確認できると考えられます。

表1 環境DNA調査結果と採捕調査結果の比較

地点名	ハコネサンショウウオ		ヒガシヒダサンショウウオ	
	捕獲個体数	環境DNA	捕獲個体数	環境DNA
St.1	0	×	0	×
St.2	0	×	0	×
St.3	2	検出	2	×
St.4	1	検出	0	×
St.5	0	×	0	×
St.6	0	検出	0	×
St.7	1	×	0	×
St.8	0	検出	0	×
St.9	0	検出	0	×
St.10	5	検出	0	×
St.11	34	検出	0	×
St.12	0	×	0	×
St.13	2	検出	0	×
St.14	1	検出	0	×
St.15	0	検出	0	×
St.16	0	×	0	×
St.17	4	×	0	×
St.18	0	×	0	×
St.19	0	×	0	×
St.20	3	検出	0	×
St.21	5	×	0	×
St.22	1	検出	0	×
St.23	0	×	0	×
St.24	1	検出	0	×
確認地点数	12	13	1	0

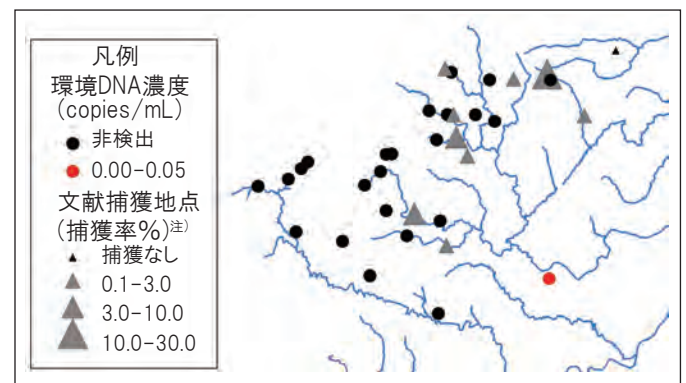
採捕調査のみで確認    両方の調査で確認    環境DNA調査のみで確認

今回の調査では、ヒガシヒダサンショウウオに比べて、ハコネサンショウウオで多数の地点から環境DNAが検出される傾向にありました。これは調査地点における両種の生息密度を反映しているのはもちろんですが、ヒガシヒダサンショウウオが孵化から1年間程度のみの中生活であるのに対し、ハコネサンショウウオは孵化から2~4年間と長期間に渡って水中生活を送ることも関係している可能性があります<sup>2)</sup>。また、両種において、採捕調査で個体が確認されていながら、環境DNA調査では検出されない地点がいくつかありました。その原因としては、分析時にDNA抽出液をピペットで分取する際に、採取した抽出液の中に、DNAが入るか入らないかが確率論的に決まるため、サンプル中に含まれる環境DNA濃度が非常に低いとDNAがピペットで分取されない確率が増え、結果的に検出されない確率も高くなるからと考えられます。一般的な環境DNA分析では、1検体あたり2  $\mu$ L  $\times$  4回繰り返しでサンプルを使用しますが、検出力を向上させるためには、1検体あた

りに使用するDNA量をさらに増やす工夫も必要であると考えられます。

## カワネズミ調査結果

カワネズミ調査では、1地点でのみ環境DNAが検出されました。カワネズミは捕獲調査を実施していないため、既報の調査結果<sup>3)</sup>を参考に確認状況を比較しましたが、過去に分布が確認された地点周辺では環境DNAは検出されませんでした。本種は、移動や捕食の際に水中を利用する性質のため、休息時などは陸上に上がります。また、地域によっては昼間より夜間の方が活動が活発との知見<sup>4)</sup>もあることから、採水した時間や頻度が検出力に影響した可能性があります。今後は、採水頻度を高くしたり、夜間にも採水することで検出力を向上させられるか検討を進める予定です。



注)捕獲率は、罟を1晩設置した際の捕獲確率を示します  
※希少種保護の観点から架空の地点情報を掲載しています

図2 カワネズミの環境DNA濃度と文献捕獲地点のイメージ図

## まとめ

今回の調査結果から、生息密度が低い希少種の調査においては、従来の採捕調査と環境DNA調査を併用することで、生息確認の頻度を向上させられることが明らかとなりました。一方で、分析時や採水時には、対象種の生態的特性に応じて、さらなる技術的な改良が必要であることもわかりました。今後は、そうした課題を解決するための技術開発を進め、環境DNA技術がさまざまな希少種の調査に実用レベルで活用されるよう一層の努力を進めます。

### 【参考文献】

- Doi *et al.* (2017), Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshwater Biology*, 62: 30-39.
- 草野保, 植田健仁, 初芝伸吾 (2001), 東京都におけるヒダサンショウウオとハコネサンショウウオの生息分布, *爬虫両棲類学会報*, 1: 1-7.
- 藤本竜輔, 安藤元一, 小川博 (2011), カワネズミ *Chimarrogale platycephala* における効率的な捕獲調査方法の検討, *東京農大農学集報* 55: 290-296.
- 横畑泰志, 川田伸一郎, 一柳英隆 (2008), *哺乳類科学* 48: 175-176.