

環境 DNA を用いたサンショウウオ調査の試行結果と今後の展開

○長谷部勇太（神奈川県環境科学センター）

相模川水系の源流域でサンショウウオ類の捕獲調査と環境 DNA 調査の比較を行った。その結果、捕獲調査と環境 DNA 調査の両方でサンショウウオ類が確認された地点が多かったものの、捕獲調査のみで確認された地点、環境 DNA 調査のみで確認された地点も存在した。環境 DNA 調査は現場での作業量の少なさや生息環境の攪乱を起こさないことなどから有用な生物調査方法であると期待されており、今回の結果からも捕獲調査の代替や補完に利用できる可能性が見出された。今後はより検出精度を高めるサンプリング手法の開発が必要と考えられた。

1 はじめに

近年環境中に存在する DNA、いわゆる環境 DNA を用いた調査方法が注目されている。この調査方法は、河川や湖沼等で採水した水に存在する大型水生生物の糞や粘液に由来する生体外 DNA を適切な手法でろ過・抽出・分析することで間接的に当該生物の存在を把握する手法であり、従来の捕獲による調査に比べ、現場での作業時間や人的コストの軽減、生息環境の攪乱の防止などの点で多くのメリットがある¹⁾。

しかし、大型水生生物の環境中 DNA の存在が初めて報告されたのが 2008 年であり²⁾、従来実施されてきた捕獲調査との比較に関する研究はまだ十分とは言えない状況である。

2 目的

本県を流れる相模川と酒匂川の 2 つの水系は、県内の水道水の約 9 割を賄っており、県民の重要な水源となっている。しかし、両水系上流の森林エリアは人工林の手入れ不足やシカの増加により荒廃が進んでいる。このため本県では、「かながわ水源環境保全・再生施策大綱」を策定し、平成 19 年度から森林の整備等の事業に取り組んでいる。

当センターではこれらの事業が河川に与える影響を生物や水質を調査することにより検証しており、森林との関連が深い水生生物としてサンショウウオ類の調査を 5 年毎に実施している。

サンショウウオ類の生息状況を把握するには一般的に捕獲による調査が必要であるが、調査に伴い少なからずサンショウウオ類の生息環境の攪乱を引き起こしてしまう。そのため、生息域への攪乱が少なく、現場での作業が簡便な調査手法として近年注目を集めている環境 DNA を用いた調査について、捕獲調査の代替や補完が可能か検証を行ったので結果を報告する。

3 方法

3.1 調査対象種

調査対象種は丹沢山地に生息が確認されているハコネサンショウウオ及びヒガシヒダサンショウウオの2種とした。

いずれの種も、本県のレッドデータブックの掲載種であり、ハコネサンショウウオは準絶滅危惧種、ヒガシヒダサンショウウオは絶滅危惧Ⅱ類に該当する。また、ヒガシヒダサンショウウオについては、環境省レッドリストの準絶滅危惧種に該当する。

3.2 捕獲調査及び環境 DNA 分析方法

平成 20 年 8 月、平成 25 年 6 月及び 8 月に表 1 に示す相模川水系源流域の 25 地点で、平成 30 年 8 月に崩落により調査ができなかった St. 16 を除く 24 地点で捕獲調査を実施し、平成 30 年度捕獲調査時には同時に河川水の採水を実施した。なお、調査地点の詳細についてはサンショウウオ類の保護の観点から詳細な地点は示さないこととする。

捕獲調査については原則として 1 地点あたり 1 人×2 時間とした。

環境 DNA 調査は、滅菌済み容器に 1 L 採水したものをを用いた。採水後は DNA の分解を抑制するため、塩化ベンザルコニウムを添加し³⁾、速やかにろ過を実施した。ろ過及び DNA の抽出については Miya *et al.*⁴⁾の方法により行った。

サンショウウオの DNA の検出・定量はハコネサンショウウオ及びヒガシヒダサンショウウオを特異的に検出できるプライマー・プローブセットを開発し、リアルタイム PCR を用いた定量 PCR 法により行なった。分析は 1 検体につき 4 連反復で実施し、4 連反復の DNA コピー数の平均値からサンプル 1 L 中のコピー数を算出し、copies/mL に換算した。4 連反復のうち 1 回でも定量下限値以上となった場合、平均値が定量下限値未満となった場合でも「不検出」とはせず、「検出」として扱った。

4 結果

4.1 捕獲調査と環境 DNA 調査の比較

捕獲調査の経年変化と環境 DNA 調査結果を表 2 に示す。

ヒガシヒダサンショウウオについては、捕獲調査で 1 地点確認されたのみで環境 DNA 調査では全地点で DNA 検出はなかった。

ハコネサンショウウオについては、平成 30 年度調査では捕獲調査で 12 地点、環境 DNA 調査で 13 地点とわずかに環境 DNA 調査の方が多い結果となった。このうち 10 地点については両手法でハコネサンショウウオの存在が確認された。

表 1 調査地点

調査地点	水系名
St.1	沢井川水系
St.2	底沢水系
St.3	神ノ川A沢
St.4	神ノ川B沢
St.5	神ノ川C沢
St.6	神ノ川D沢
St.7	神ノ川E沢
St.8	道志川A沢
St.9	道志川B沢
St.10	早戸川A沢
St.11	早戸川B沢
St.12	早戸川C沢
St.13	早戸川D沢
St.14	早戸川E沢
St.15	早戸川F沢
St.16	早戸川G沢
St.17	早戸川H沢
St.18	布川A沢
St.19	布川B沢
St.20	布川C沢
St.21	布川D沢
St.22	布川E沢
St.23	布川F沢
St.24	布川G沢
St.25	谷太郎川水系

一部の地点では環境 DNA のみが検出される結果となり、調査範囲よりも上流に生息するハコネサンショウウオの DNA を検出した可能性や捕獲調査ができない深い淵等に生息していた可能性等が考えられた。

一方捕獲調査では捕獲されたものの、環境 DNA は検出されなかった地点もあり、河川を流れる DNA 量が少なく、1 L の採水では十分な DNA 量が採取できなかった可能性や河川を流れる DNA 濃度が不均一で採水時にたまたま低濃度であった可能性等が考えられた。

表 2 捕獲調査の経年変化と環境 DNA 調査結果

調査地点	種名	水系名	ヒガシヒダサンショウウオ				ハコネサンショウウオ			
			捕獲調査(捕獲数)			環境DNA (copies/ml)	捕獲調査(捕獲数)			環境DNA (copies/ml)
			H20	H25	H30		H20	H25	H30	
地点 番号	St.1	沢井川	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.2	底沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.3	神ノ川A沢	-	-	2	-	7	5	2	0.05
	St.4	神ノ川B沢	2	-	-	-	8	5	1	0.38
	St.5	神ノ川C沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.6	神ノ川D沢	-	-	-	-	6	8	-	0.26
	St.7	神ノ川E沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.8	道志川A沢	-	-	-	-	-	1	-	検出
	St.9	道志川B沢	-	-	-	-	2	1	1	1.51
	St.10	早戸川A沢	1	-	-	-	6	34	5	0.16
	St.11	早戸川B沢	-	7	-	-	6	32	34	検出
	St.12	早戸川C沢	1	-	-	-	-	-	-	-
	St.13	早戸川D沢	-	-	-	-	9	3	2	検出
	St.14	早戸川E沢	-	-	-	-	-	3	1	検出
	St.15	早戸川F沢	-	-	-	-	2	-	-	0.09
	St.16	早戸川G沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.17	早戸川H沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.18	布川A沢	-	-	-	-	-	-	4	-
	St.19	布川B沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.20	布川C沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.21	布川D沢	-	-	-	-	3	5	3	0.08
	St.22	布川E沢	1	-	-	-	5	1	5	-
	St.23	布川F沢	-	-	-	-	5	4	1	0.09
	St.24	布川G沢	-	-	-	-	1	-	-	-
	St.25	谷太郎川	-	-	-	-	-	4	1	検出
確認地点数			4地点	1地点	1地点	0地点	13地点	13地点	12地点	13地点

注1) 捕獲調査の数字は個体数

注2) 環境DNAの分析は地点毎に4反復で行い、4回の平均値を記載。

注3) 定量下限値は0.05copies/ml(1copy/2μl)。4回のうち1回でもDNAが検出されたもののうち、平均値が定量下限値未満の場合は「検出」とした。

注4) 環境DNAの確認地点数については、「検出」も含めた。

注5) 表中の「-」は未検出及び未確認を示す。

注6) 表中の網掛け部分は調査未実施を示す。

4.2 ハコネサンショウウオ捕獲数と DNA 濃度の関係

捕獲数と DNA 濃度の関係を図 1 に示す。なお、用いたデータは 4 連反復の平均値が定量下限値以上となったデータのみとした。

今回の結果では捕獲数と DNA 濃度には正の相関はみられなかった。生物量と環境 DNA 濃度の関係については、正の相関が確認されたという報告⁵⁾もあるが、相

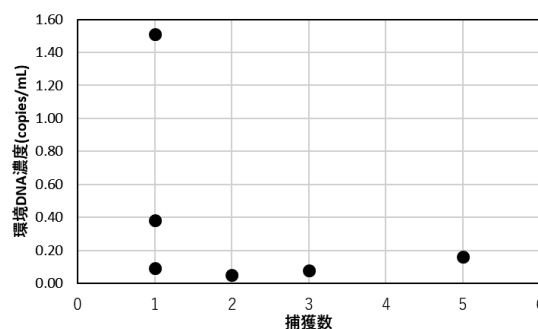


図 1 捕獲数と DNA 濃度

関がみられなかったという報告⁶⁾もあり、流水環境において DNA 濃度から生物量を予測するにはさらに詳細な検討が必要と考えられた。

5 おわりに

捕獲調査と環境 DNA 調査を同時に実施した結果、ハコネサンショウウオについて捕獲調査で生息が確認された地点の多くで環境 DNA が検出され、環境 DNA 調査による捕獲調査の代替・補完の可能性が見出された。

特に捕獲調査よりも広範囲の生息状況を把握できる可能性があることや河川環境に影響を受けない点については環境 DNA の長所となりうる。

一方で、捕獲調査では検出されたものの環境 DNA は検出されなかった地点もあり、より検出精度の高い調査手法を開発するため、採水時間による検出率の変化や流下に伴う環境 DNA の拡散等を検証していく予定である。

また、ヒダサンショウウオについては捕獲調査で生息が確認された地点が少なく、環境 DNA 調査の評価は難しいが、今後ヒダサンショウウオの生活サイクル(繁殖期や幼体の上陸時期等)を踏まえた適切な採水時期の検討を行っていくこととする。

引用文献

- 1) Darling JA, Mahon AR(2011) From molecules to management:adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*,111,p978-988.
- 2) Ficetola. *et al.* (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4,p423-425.
- 3) Yamanaka. *et al.* (2017) A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant,*Limnology*, 18(2),p233-241.
- 4) Miya. *et al.* (2016) Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments*,117, e54741.
- 5) Pilliod. *et al.* (2013) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70,p1123-1130.
- 6) Spear. *et al.* (2015) Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender(*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. *Biological Conservation*,183,p38-45.