



環境DNAを用いた丹沢山地における 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分布調査

環境科学センター調査研究部

○中山駿一 長谷部勇太

環境DNAとは

環境DNA
(eDNA)

動植物の排泄物，組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から，環境DNAを調べることで

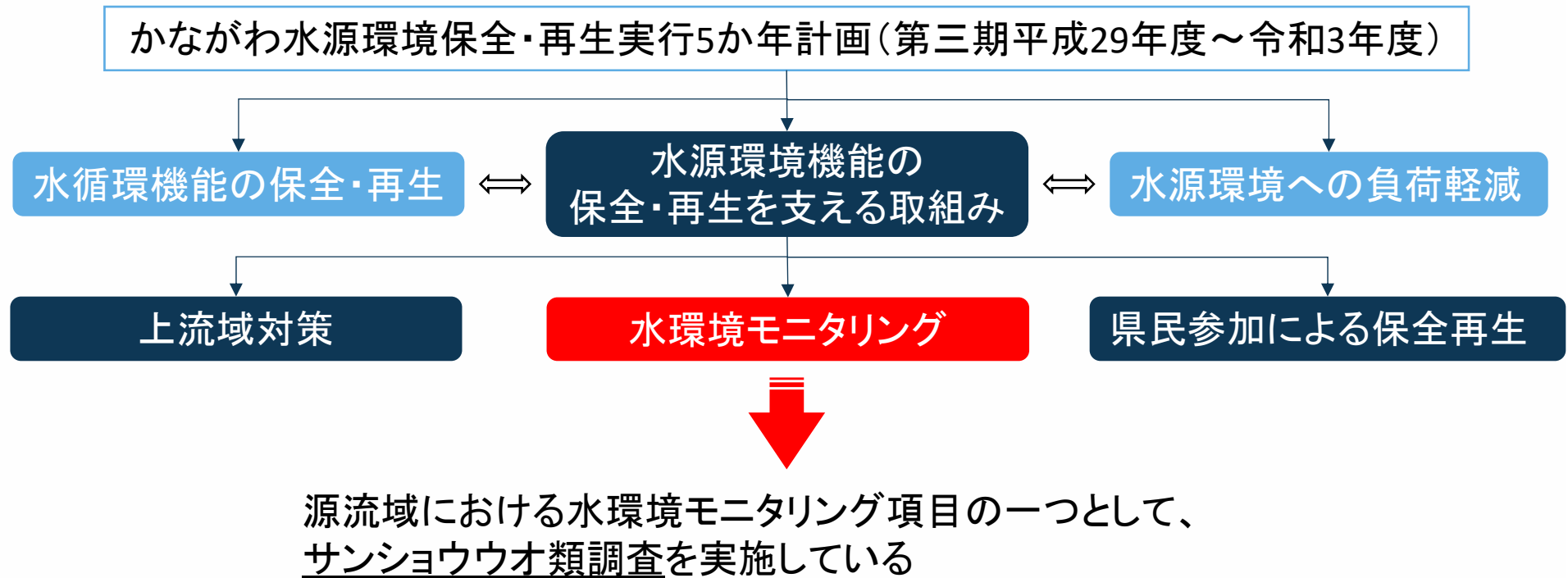
環境DNAの**有無**から**生物**の存在を推定

環境DNAの**量**から**生物量**を推定



引用1: 環境研究総合推進費ネットde研究成果報告会平成25-27年度環境研究総合推進費(若手)
4RF-1302 環境DNA技術を用いた生物分布モニタリング手法の確立

研究の背景



対象種の特徴

サンショウウオ類調査の対象種²⁾

- ・急傾斜で崩落しやすいような高高度の沢に住む
- ・成体の体長は8 cm～19 cm程度
- ・ヒガシヒダサンショウウオは丹沢に生息
- ・ハコネサンショウウオは丹沢及び箱根に生息
- ・源流域の植生の影響を受けやすいことから、水環境モニタリングの指標生物として好適

表 神奈川県レッドリスト(2006)上の分類と定義

分類	定義	両生類	内、 サンショウウオ
絶滅	すでに絶滅したと考えられる種	0	0
野生絶滅	飼育・栽培下でのみ存続している種	0	0
絶滅危惧Ⅰ類	絶滅の危機に瀕している種	3	1
絶滅危惧ⅠA類	ごく近い将来における絶滅の危険性が極めて高い種	0	0
絶滅危惧ⅠB類	ⅠA類ほどではないが、近い将来における絶滅の危険性が高い種	0	0
絶滅危惧Ⅱ類	絶滅の危険が増大している種	3	1
準絶滅危惧	現時点では絶滅危険度は小さいが、 生息条件の変化によっては「絶滅危惧」に移行する可能性のある種	1	1
...

← ヒダサンショウウオ
← ハコネサンショウウオ

課題と目的

捕獲調査

礫の下や淵等を手網もしくは手取り
(1地点あたり1人×2時間)



- ×危険
- ×現場作業量が多い
- ×生態系へのかく乱あり
- △精度は調査者の技能に依存

eDNA分析³⁾

1リットル採水



フィルターろ過



DNA抽出



リアルタイムPCR



- 安全
- 現場作業量が少ない
- 生態系へのかく乱なし
- △十分な精度を得るための
サンプリング手法等の検討が必要

目的:eDNA分析法を確立し、専門家による捕獲調査の地点選定や事業効果の検証精度の向上に資する。

目標:生息において重要となる環境条件を抽出し、生息分布を完成させる。

Kan 引用3:環境研究総合推進費ネットde研究成果報告会平成25-27年度環境研究総合推進費(若手)
4RF-1302 環境DNA技術を用いた生物分布モニタリング手法の確立

これまでの研究

2018年度

水源環境保全事業の河川モニタリング調査におけるサンショウウオ類調査において、捕獲調査とeDNA調査の結果の比較を行った。

【ヒガシヒダサンショウウオ】

捕獲調査での確認地点が少なく、eDNA調査との十分な比較は困難であった。

eDNA調査にあたって、ライフサイクルを考慮すると検出率が向上できる可能性が考えられた。

【ハコネサンショウウオ】

捕獲調査とeDNA調査の両手法で確認された地点が多く、補完調査としては有用と考えられた。

捕獲調査のみで確認された地点もあり、十分なDNA量が採取できなかった可能性が考えられた。

捕獲数とeDNA濃度に正の相関は見られなかった。

2019年度

eDNAの検出可能距離について検討した

→かごに入れたハコネサンショウウオの幼生15匹では直下で2 L採水してもeDNAは検出できなかった。

季節・時刻による検出率の変化について検討した

→時刻変動はほとんどなかったが、繁殖期においては繁殖期以外よりも高濃度で検出された

現地サンプリング手法の検討

課題

これまでの調査で、かごに入れたハコネサンショウウオの幼生15匹では2 L採水してもeDNAが検出できないことがわかっている。また、繁殖期以外では検出下限に満たない濃度でしか検出されていない。

→繁殖期以外では調査ができないことになってしまう

成体 (約6歳～)												
幼体 (約3歳～ 約6歳)												
幼生 (5ヶ月～ 約3歳)												
卵 (0～4ヶ月)												
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月

ハコネサンショウウオが水中に存在する時期

成体 (約6歳～)												
幼体 (1歳5ヶ月～ 約6歳)												
幼生 (4ヶ月～ 1歳5ヶ月)												
卵 (0～3ヶ月)												
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月

ヒダサンショウウオが水中に存在する時期

幼生しか水中にいない時期でも分析できるサンプリング手法を開発する

現地サンプリング手法の検討

検証方法

- ・幼生のみが水中にいる時期を狙うため、調査時期は10月上旬とし、対象はハコネサンショウウオとした。
- ・地点はこれまでの捕獲調査で存在が確認されている場所とした。
- ・試料水2 Lでは検出されなかったため、10 L採水を行った。
- ・手動では試料の濃縮の負担が大きいので、使い捨てシリンジではなく電動チュービングポンプを用いた。
- ・フィルターが目詰まりを考慮し、DNAを透過させることができ、粒子状物質(D < 10 nm)を除くことができる綿栓つきパスツールを採水チューブの入り口に取りつけたものと取り付けしていないものとを比較した。
- ・綿栓つきパスツールの有無以外の条件は統一した。

従来法

1~2 L

採水量



or



ろ過方法

新規手法

10 L



モバイル
バッテリー



電動ポンプ



綿栓つきパスツール

試料水

フィルター

現地サンプリング手法の検討結果

結果

綿栓	採水量[L]	採水時間[min]	検出
あり	10	115	○
なし	10	139	△

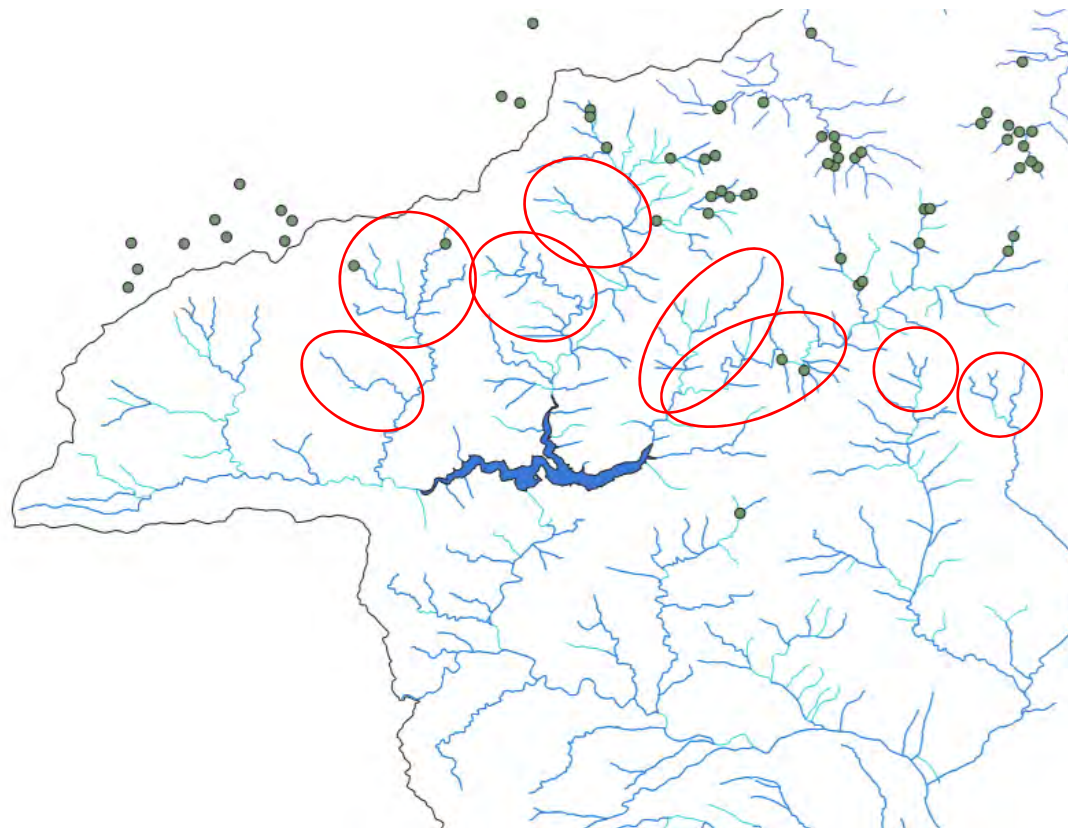
考察

- ・綿栓ありなし共に検出された。
- ・綿栓なしでも10 Lの採水ができたが、実施時期が10月上旬であったので、ナノプランクトン(藻類等)が少なかったためであると考えられる。
- ・綿栓ありの方が測定のばらつきが少なかったが、操作の繰り返し誤差によるものか、綿栓で妨害物質が除去できたことによるものかは不明であり、引き続き検証が必要である。
- ・採水時間にはあまり差がないが、どちらも2時間近くかかっており、実用上時間がかかり過ぎた。

サンプリング及び前処理に時間がかかり過ぎ、
機動性を活かさないため、現地分析法の検討は断念した。

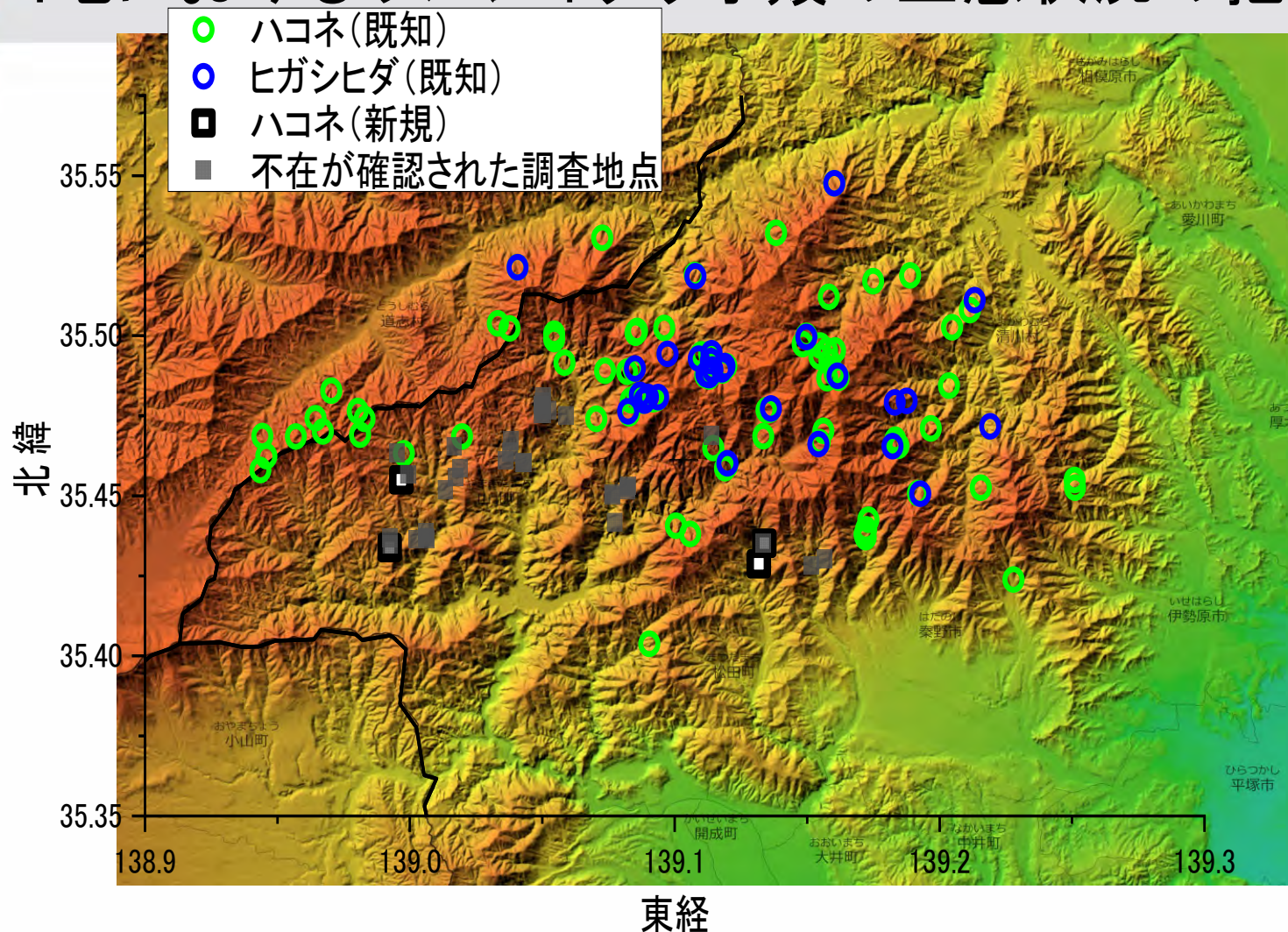
丹沢山地におけるサンショウウオ類の生息状況の把握調査

- ・調査対象はハコネサンショウウオとヒダサンショウウオ
- ・時期は両サンショウウオの繁殖期である4～5月
- ・過去に学術調査等で生息がわかっている地点の近くでサンプリングを行い、生息しているかどうかを確認した。
- ・生息適地の推定を行った。



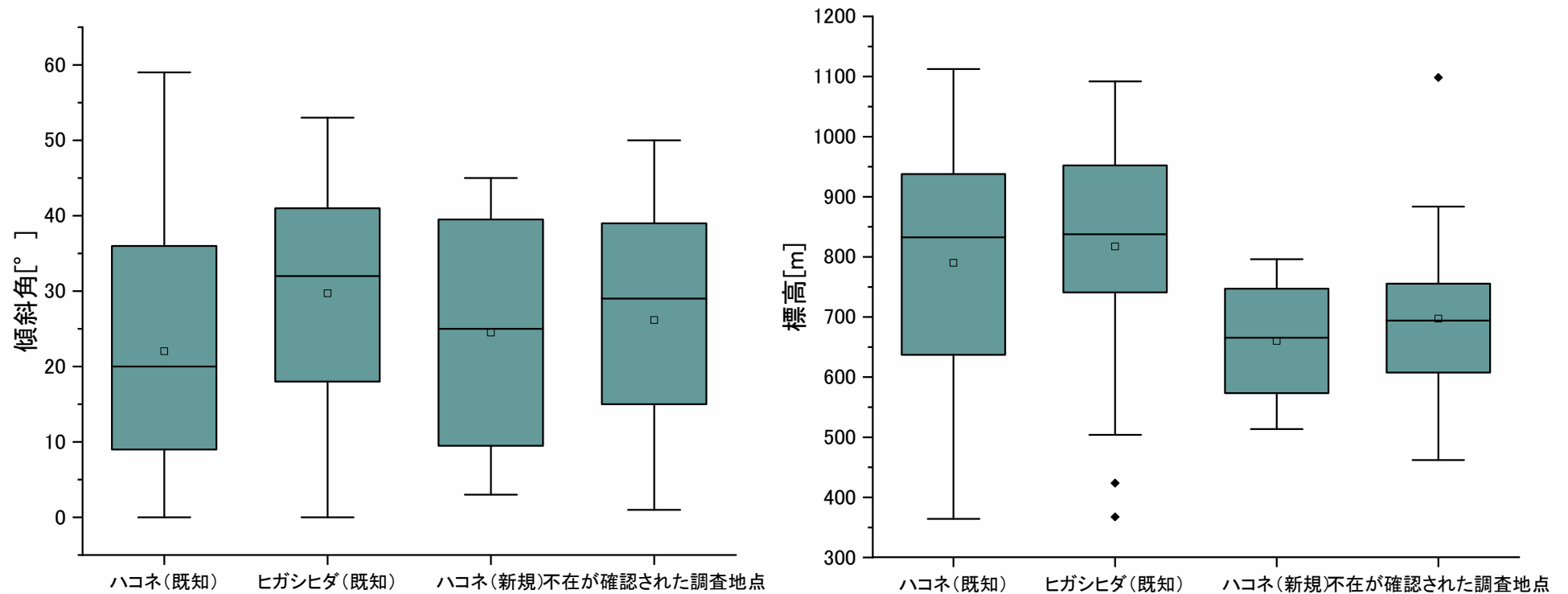
日時	場所
4月5日	大滝沢
4月9日	西沢
4月15日	ユーシン
4月19日	ヤブ沢、東沢、ヤヒチ沢
4月22日	大又沢
5月14日	中津川
5月24日	四十八瀬川
5月26日	大又沢
5月28日	大又沢

丹沢山地におけるサンショウウオ類の生息状況の把握調査



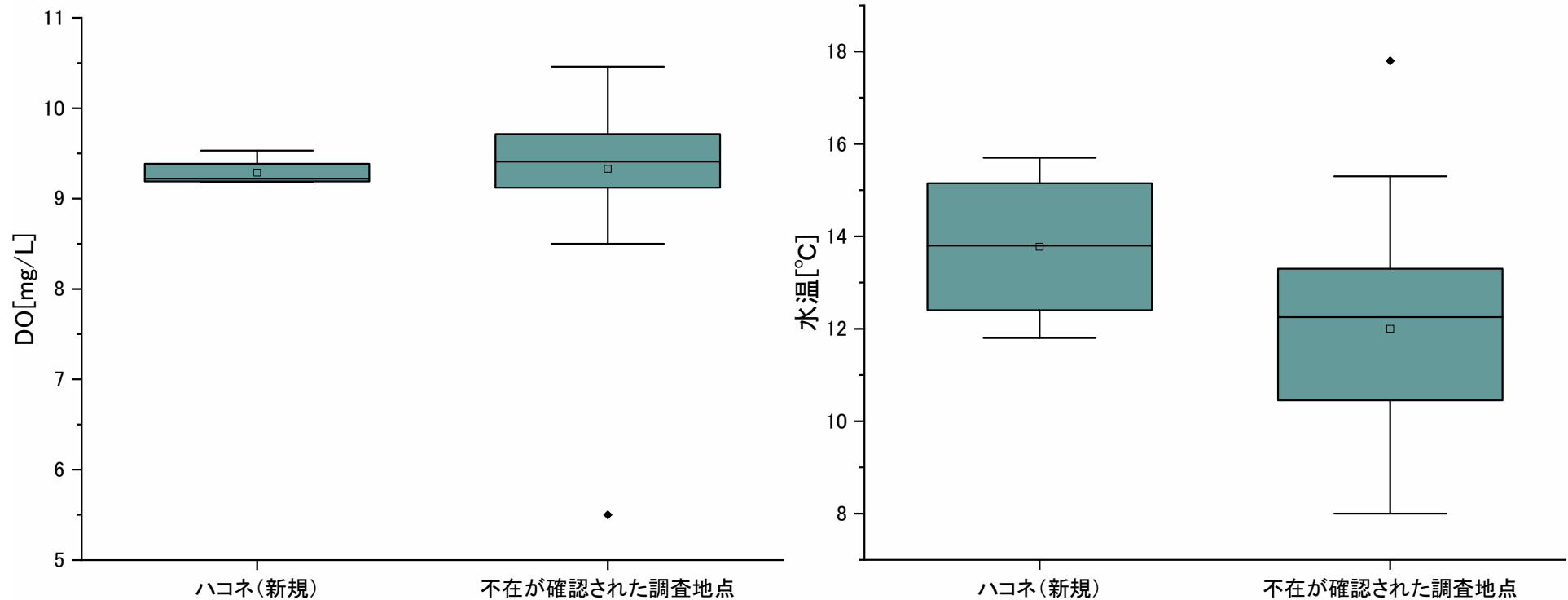
ハコネサンショウウオのDNAが40地点中4地点で発見された。
ヒガシヒダサンショウウオのものは発見できなかった。

生息適地の考察(傾斜角及び標高)



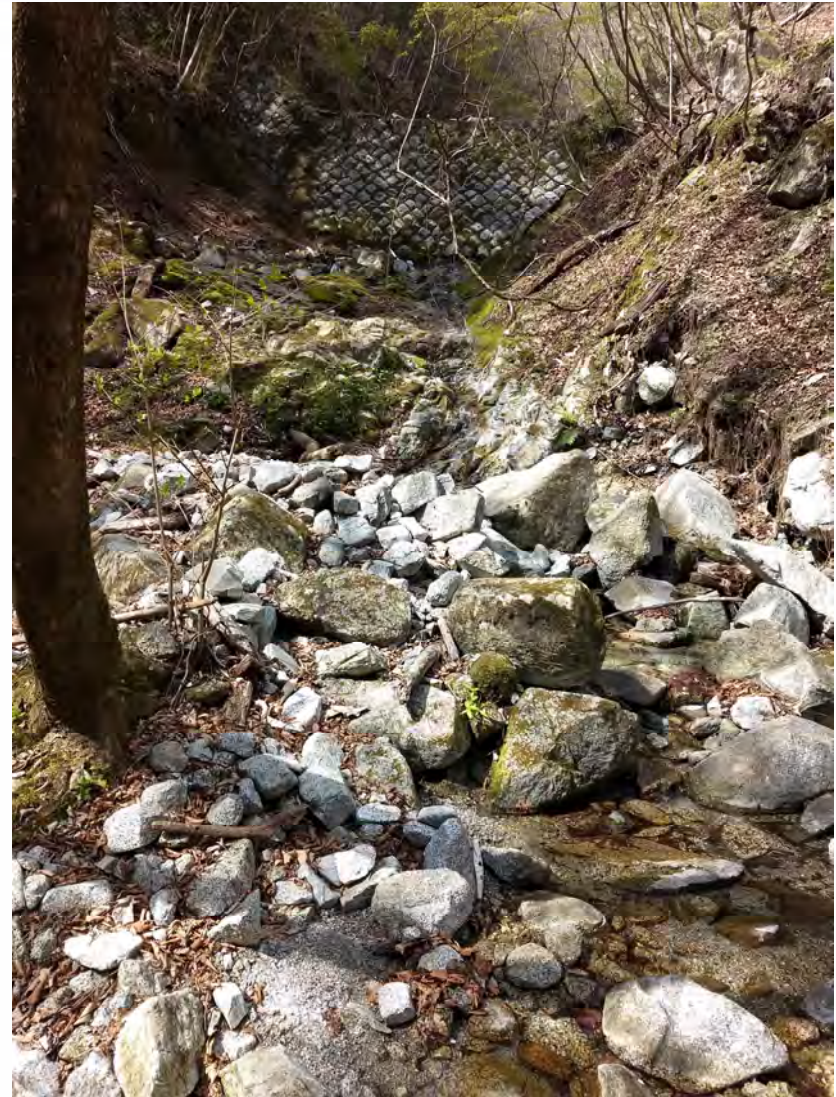
傾斜角や標高の違いによる分布の特性は見いだせなかった。

生息適地の考察(DO及び水温)



F検定 (< 0.05) により、DOの値は有意に分布が狭いことがわかった。
→生息のための至適DOが9.3 mg/L程度である可能性があることがわかった。

生息適地の考察(ガレ)



ガレが少ない地点ではDNAが検出されなかった。
→ ハコネサンショウウオの産卵場所として適さないためと考えられた。

生息適地の考察

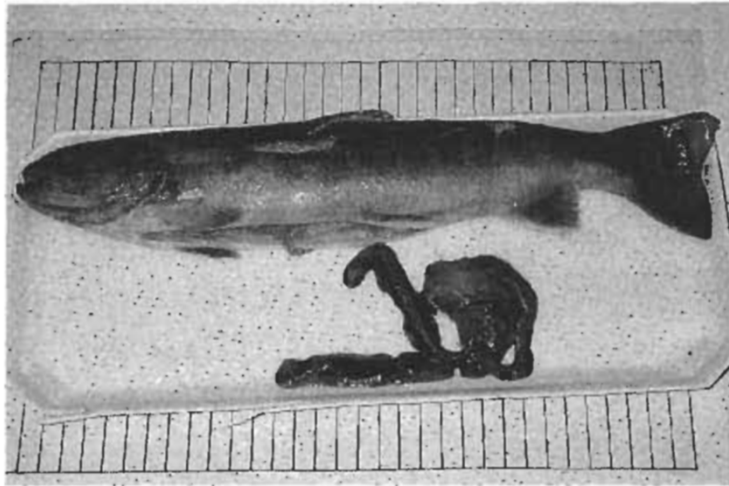


調査法別調査適地

	捕獲調査	環境DNA
伏流	×	△
ガレ	△	○
急斜面	×	○

- ・ハコネサンショウウオのDNAはガレの多い沢で発見された。
→捕獲調査と環境DNA調査の使い分けが有用であることが示唆された。

生息適地の考察(捕食者の分布)



図版6-1-20. ハコネ成体2個体とヒダ成体1個体を捕食していた全長360mmのイワナ 丸山川水系. 栃本武良氏提供.

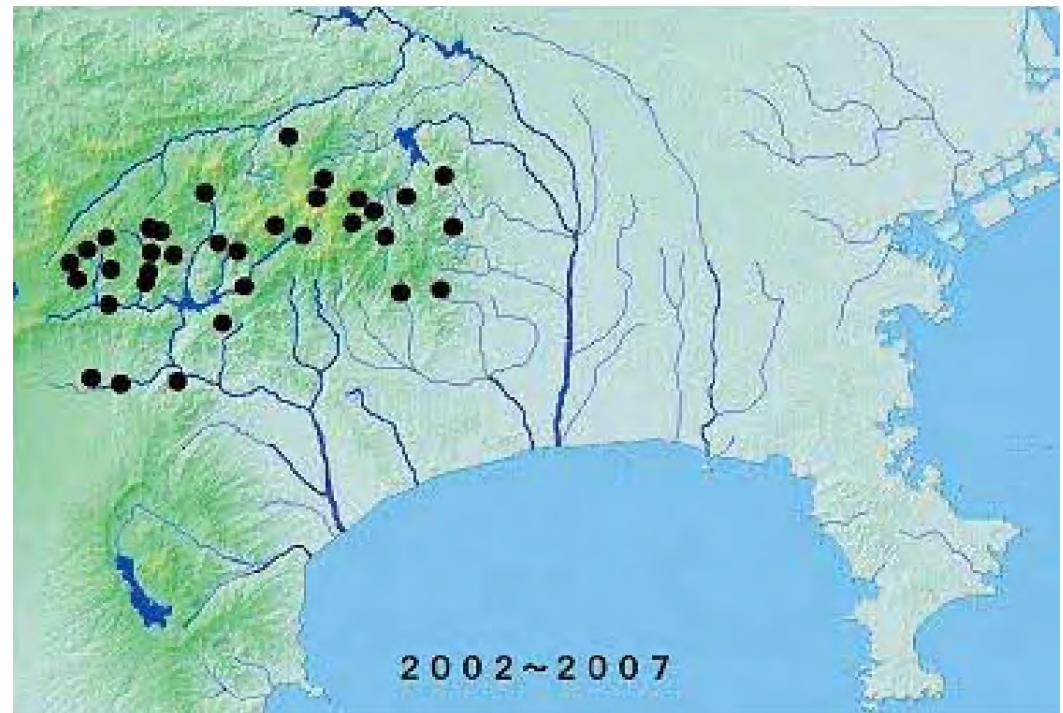


図2. 丹沢山塊におけるイワナの分布域の変遷

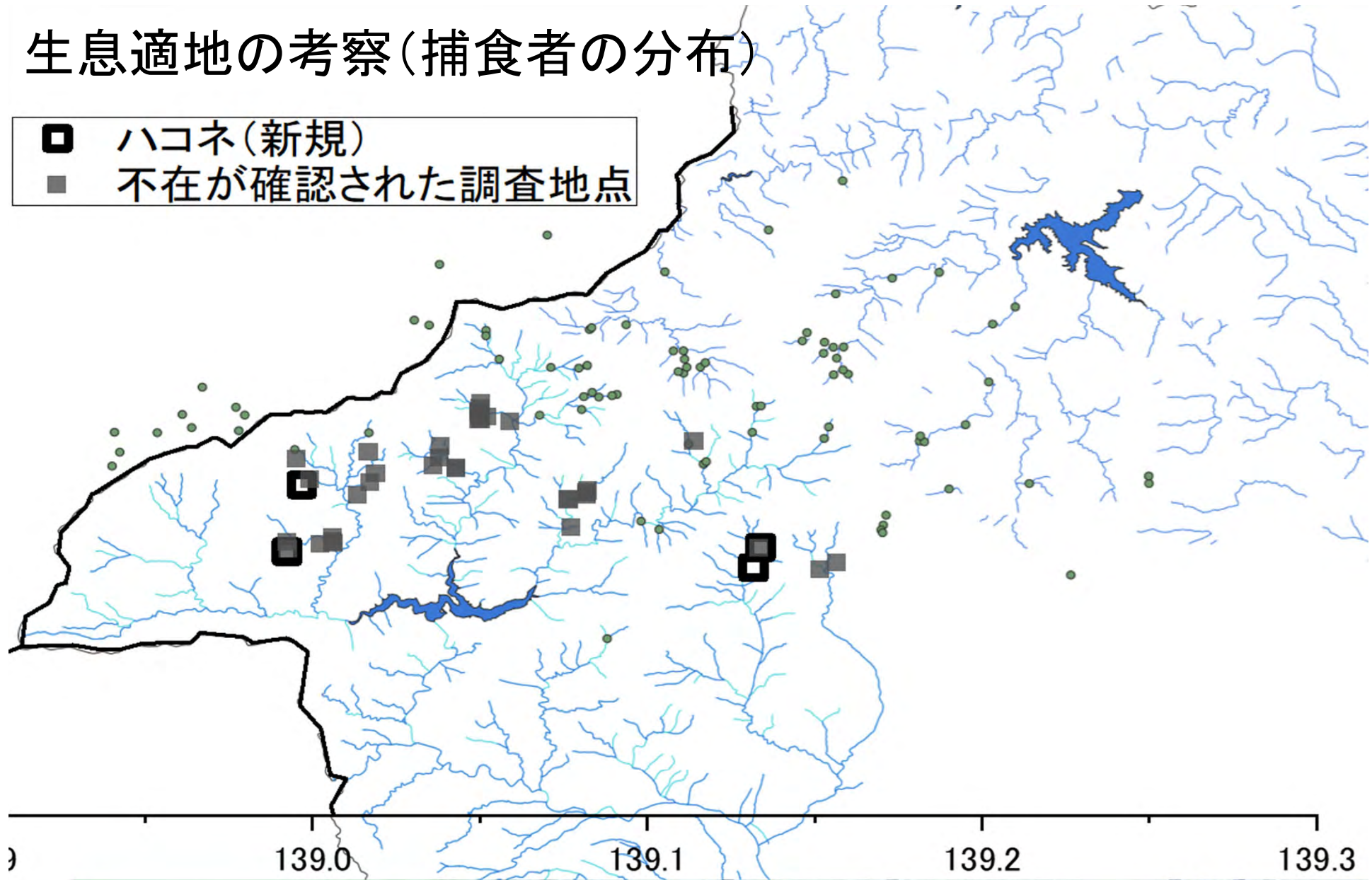
丹沢山地において、放流イワナは分布を拡大しており、また、サンショウウオ類の捕食者となっていることが指摘されている。

引用5: 丹沢大山地前環境総合調査報告書(神奈川県環境部,1997),p491

引用6: 丹沢山塊に生息するイワナの分布と系統(神奈川自然史資料(29):113-120)2008,金子ら,p115

生息適地の考察(捕食者の分布)

- ハコネ(新規)
- 不在が確認された調査地点



イワナの分布と今回の調査地点との相関は見いだせなかった。
→イワナによるサンショウウオの捕食の分布への影響はわからなかった。

まとめ

結果

- ・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非繁殖期における分析法の検討を行ったが、サンプリングの時間短縮をすることができず、検討を断念した。
- ・ハコネサンショウウオ、ヒガシヒダサンショウウオ両種の繁殖期を狙って、丹沢地域のサンショウウオの生息が確認されている地域の付近40地点において、環境DNAサンプルを採取した。結果、4地点でハコネサンショウウオの新規の生息地を発見した。
- ・生息地はガレが多い場所が多かった。
- ・捕獲調査の実施が困難な、細く、傾斜がきつく、伏流しているような地点においてもハコネサンショウウオのDNAを検出することができた。
- ・現地での簡易的な水質分析の結果から、DOが9.3 mg/L程度となる地点において、ハコネサンショウウオが生息している可能性が高いことがわかった。

今後の予定

- ・今後の水環境モニタリング調査を実施する際に、捕獲調査の実施が困難な沢において、環境DNA分析を行うことを提案する。
- ・捕獲調査の際にDOの測定をしてもらい、データを補強することで、ハコネサンショウウオの生息地の推定に有用かどうかを検証してもらう。