

短報 (Short Report)

## 環境 DNA を用いた丹沢山地におけるサンショウウオの分布調査手法の開発

中山 駿一, 長谷部 勇太

(調査研究部)

### Development of a distribution survey method for salamanders in the Tanzawa mountains using environmental DNA

Syunichi NAKAYAMA and Yuta HASEBE

(Research Division)

キーワード：環境 DNA, ハコネサンショウウオ, ヒガシヒダサンショウウオ, 丹沢山地

#### 1 はじめに

近年, 生物が環境中に放出したDNA情報から生物の分布状況を把握する, いわゆる「環境DNA」による分析手法が急速に発展している。

環境 DNA による調査については, 現場で川の水を汲むだけでよいという簡便さがあり, 非侵襲的, つまり生息場所の攪乱を起こさないこと, 調査者の技量による違いが出にくいこと, また河川内に立ち入ることができないような危険な場所においても調査が可能なこと等の特徴があり, 様々な生物群のモニタリングに活用されている。<sup>1-4)</sup>

一方, 現在当センターでは水源環境保全事業の河川モニタリング調査を担当しており, 森林整備及び河川整備の事業効果の評価に加えて, 事業見直しの基礎資料とするため, サンショウウオ類の生息状況調査を実施している。

サンショウウオ類は, 幼体のうちは河川の源流域に生息しており, 成体になると陸地にあがり, 周辺の森林地帯で生活する。このため, 源流域の河川環境や森林の状況に影響を受けることが想定されており, 定期的に捕獲による生息状況調査を継続している。捕獲調査は調査者の技量に影響を受ける可能性があること, 調査時の河川のコンディション, 例えば増水等によって結果に変動が生じること, さらに調査自体が希少種であるサン

ショウウオ類の生息場所を攪乱してしまうこと等が課題となっている。

これらの課題を解決するため, 捕獲調査より簡便で非侵襲的な調査手法である環境DNAによる調査手法の導入を検討しているところである。

過去の当センターの研究においては, 捕獲調査実施時に同時に環境 DNA 調査を実施してその結果を比較し, 捕獲調査で生体が確認された地点では, DNA が検出されることが多いものの, 一部の地点では生体が確認されているにも関わらず, DNA が検出されない地点が存在することを明らかにした<sup>5)</sup>。また, 採水季節と採水時刻の違いが DNA 濃度に及ぼす影響を検討した研究では, 採水時刻による違いよりも季節による違いの方が大きいことが明らかとなり, 特にハコネサンショウウオの繁殖期と想定される 6 月に採水した場合には, その他の季節に比べ 10 倍以上の濃度が検出された<sup>6)</sup>。

そこで本研究では以下の 3 つの調査を実施した。

#### ① DNA 検出精度向上のための検討

既報より, サンショウウオ類の成体が水中にいる時期には環境 DNA 濃度が高くなり, 検出率が向上する可能性が示唆された<sup>6)</sup>。一方で, それ以外の時期についても環境 DNA で精度よく検出することが可能となれば, 通年での調査はもとより,

調査範囲の拡大につなげることが可能となる。

過去の研究からサンショウウオ類の環境 DNA が不検出となる原因としては、分析に用いた DNA 抽出サンプル中の濃度が低いことが考えられた<sup>5,6)</sup>。サンプル中の DNA 濃度を高めるために最も簡単な手法はろ過する水量を増加させることである。そこで、幼生のみが水中にいると考えられる時期に採水量を増やすことにより検出率の向上が認められるのかについて調査を行い、通年での環境 DNA 調査が可能か明らかにすることを目的とした。

## ② 冬季における環境 DNA 検出率の変化に関する検討

前述のとおり、ハコネサンショウウオに関しては、成体が水中にいると想定される時期には環境 DNA 濃度が高くなり、検出率が向上する可能性が示唆されているが<sup>6)</sup>、一方で、ヒガシヒダサンショウウオについては、同様の傾向は確認されなかった。これは、調査時期にヒガシヒダサンショウウオの成体が水中にいなかった可能性が考えられることから、ヒガシヒダサンショウウオの成体が水中にいると考えられる冬季において高頻度での調査を実施することにより、DNA の検出状況に変化がみられるのかについて調査を行い、適切な調査時期を明らかにすることを目的とした。

## ③ 西丹沢地域のサンショウウオ類分布調査

上記の調査結果を踏まえて、過去の丹沢周辺におけるサンショウウオ類調査の結果<sup>7)</sup>（以下「過去調査」）を参考に、生息情報の少ない西丹沢地域において環境 DNA 調査を実施することにより、西丹沢におけるサンショウウオ類の生息状況を明らかにすることを目的とした。採水時に併せて水質の測定も実施することで、サンショウウオ類の生息において重要となる環境条件の抽出を試みた。

本研究の成果は、今後の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

る予定としている。

## 2 調査方法

### 2. 1 DNA 検出精度向上に関する検討

#### 2. 1. 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とした。

#### 2. 1. 2 調査地域及び時期

過去の捕獲調査でハコネサンショウウオの生息が確認されている図 1 の酒匂川水系上流の檜洞丸の沢において、令和 2 年 10 月 2 日に環境 DNA 調査を実施した。

なお、本稿では希少種であるサンショウウオ類の保護の観点からサンプリング地点については詳述しない。

#### 2. 1. 3 分析方法

環境 DNA サンプルのろ過、抽出方法及び PCR 分析条件（温度条件、PCR 溶液の組成）については既報によったが<sup>5,6)</sup>、その他の条件について次



図 1 檜洞丸の沢調査地点図

のとおり変更した。

- ・ 採水量を 1L から 2L と 10L の計 2 通りに変更
  - ・ 標準サンプルを用いた定量分析から定性分析に変更
  - ・ 各サンプル 4 連反復から 3 連反復に変更
- 分析結果の評価については、3 連反復のうち 1 回でも DNA の増幅が確認された場合、検出されたものとして扱った。

## 2.2 冬季における DNA 検出状況の変化に関する検討

### 2.2.1 調査対象種

調査対象種は、ヒガシヒダサンショウウオとした。

### 2.2.2 調査地域及び時期

ヒガシヒダサンショウウオは越冬のために 12 月ごろに入水すると考えられていることから<sup>8)</sup>、令和 2 年 12 月 3 日から令和 3 年 3 月 24 日にかけて、前項で調査を実施した地点と同じ地点において、概ね週 1 回の頻度で環境 DNA 調査を実施した。

### 2.2.3 分析方法

環境 DNA サンプルのろ過、抽出方法及び PCR 分析条件は前項と同様とした。ただし、採水量は 1L とした。また、分析結果の評価についても同



図 2 西丹沢地域分布調査エリア

様とした。

## 2.3 西丹沢地域のサンショウウオ類分布調査

### 2.3.1 調査対象種

調査対象種は、ハコネサンショウウオ及びヒガシヒダサンショウウオの 2 種 とした。

### 2.3.2 調査地域及び時期

前述した 2 つの検討結果を踏まえ、サンショウウオ類 2 種の新たな生息地の発見と生息適地の推察のため、令和 3 年 4 月 5 日から 5 月 28 日にかけて、図 2 のとおり西丹沢地域に流れる沢を踏査し、採水可能だった沢である大滝沢、西沢、ユースン、ヤブ沢、東沢、ヤヒチ沢、大又沢、中津川及び四十八瀬川沿い等計 40 か所において、水のサンプリングを行った。4~5 月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の産卵時期となり、成体が水中にいる機会が多く、また生殖活動に由来する DNA を検出できる可能性が高いと想定されることから、この時期に集中的にサンプリングを実施した。

### 2.3.3 分析方法

環境 DNA サンプルのろ過、抽出方法及び PCR 分析条件は前項と同様とした。また、分析結果の評価についても同様とした。

さらに現場での採水に合わせ、水温、溶存酸素量(DO)及び水素イオン濃度(pH)といった環境データも測定し、サンショウウオ類の DNA が検出された地点に特徴的な環境データの有無についても検討を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 DNA 検出精度向上に関する検討

分析の結果、2L ろ過したサンプルでは DNA は検出されず、10L をろ過したサンプルからは DNA が検出された。ろ過水量を多くすることは、サンショウウオ類の DNA を増やすだけでなく、フィ

ルターに吸着される PCR 阻害物質の量も増やすため、PCR による DNA の増幅に悪影響を与えることが懸念されたが、両種が生息するような源流域における 10 月頃の調査においては、検出精度向上のためにろ過水量を増やすことは有効であることが明らかとなった。

一方で、10L の水をステリベクスフィルターでろ過するには約 2 時間程度かかり、現地でのろ過には向かないこと、また水サンプルを持ち帰ることを想定した場合、調査可能地点数の減少にもつながることから、多地点調査での導入については有効とは言えなかった。

多地点調査をより効率的に実施するためには、最近の研究で報告されたステリベクスフィルターからの効率的な DNA 抽出法<sup>9)</sup>を導入するなど、ろ過量が少なくても検出率が向上するような手法を採用することが必要と考えられた。

### 3.2 冬季における DNA 検出状況の変化に関する検討

分析の結果は図 3 のとおりであった。調査開始初日の令和 2 年 12 月 3 日のサンプルからは、ヒガシヒダサンショウウオの DNA が検出されなかったものの、12 月 11 日以降は調査が終了した令和 3 年 3 月 24 日まで、全てのサンプルで少なく

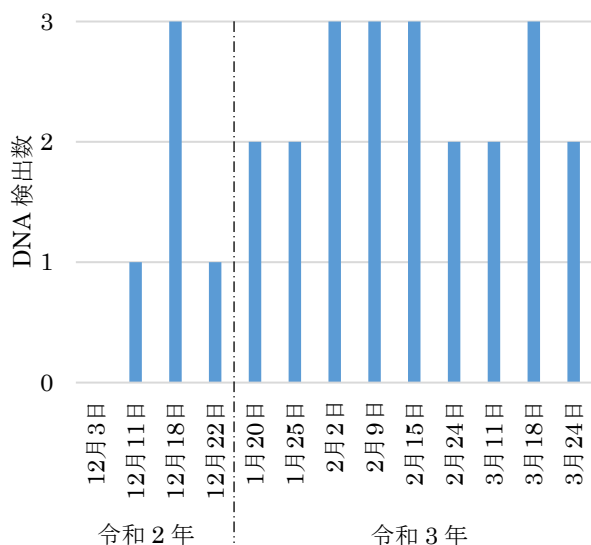


図 3 冬季 3 反復調査の検出結果

とも 3 反復のうちの 1 つは DNA が検出された。このことから、ハコネサンショウウオと同様にヒガシヒダサンショウウオについても、成体が河川に存在する時期には環境 DNA の検出率が向上することが明らかとなった。

サンショウウオ類が環境中に放出する DNA は非常に微量であり、調査時期によっては 2L 程度の水から分析しただけでは偽陰性を生じる可能性が高い。この問題を解決するには採水量の増加などフィルターに吸着される DNA の量を多くする工夫が有効ではあるが、環境 DNA 調査の特徴である簡便性を犠牲にすることが懸念される。現状においては、成体が河川にいる時期を狙って調査を実施することで、環境 DNA が比較的高濃度となるように採水することが有効と考えられた。

また、本研究において使用したステリベクスフィルターからの DNA 抽出については、環境 DNA 学会が推奨する方法では、フィルターに捕捉された DNA を全て回収しきれていない可能性が示唆されており、DNA 抽出工程を見直すことで、より検出率を高められる可能性も考えられた。

### 3.3 西丹沢地域のサンショウウオ類分布調査

ヒガシヒダサンショウウオについては、全ての調査地点で DNA は検出されなかった。一方で、ハコネサンショウウオは、中津川水系で 2 地点、丹沢湖西側の大又沢水系で 2 地点の計 4 地点で DNA が検出された。丹沢山地において水源環境保全事業に基づき実施している捕獲調査でも、ヒガシヒダサンショウウオが確認されている地点が少なく<sup>7)</sup>、今回の分布調査においてもヒガシヒダサンショウウオの DNA が検出されなかったことは、丹沢山地における生息域が非常に限定されていることを示しているものと考えられた。気候変動に伴う水温の上昇や降水量の変動は、当該種の生息環境に悪影響を与える可能性があることから、継続的なモニタリングが重要と考えられた。一方でハコネサンショウウオについ

では、4地点でDNAが検出されており、水源環境保全事業に基づき実施している捕獲調査においても丹沢山地において広く生息が確認されていることから、森林環境の指標としても活用できる可能性が示された。

また、調査地点毎の環境データのうち、過去調査との比較が可能な標高、調査地点の緯度経度から作成した傾斜及び水温について比較を実施したが、明確な差は見られなかった。しかしながらDOについては、ハコネサンショウウオのDNAが確認された地点と確認されなかった地点を比較したところ、図4のとおり、F検定により危険率5%でDOの値の分布が有意に狭く、中央値が9.3mg/L程度であった。このことからハコネサンショウウオが生息する河川環境には一定の傾向があることが確認された。加えて、生息が確認された地点の付近は、石や岩が堆積している斜面、いわゆる「ガレ場」となっており、ハコネサンショウウオの産卵適地である、夜は完全な闇となりかつ沢が枯れない場所との関連が考えられた。また、通常捕獲調査の実施が困難である細く傾斜がきつく、伏流しているような地点においても、採水さえできれば問題なくDNAを検出することが可能であった。

また、ヒガシヒダサンショウウオの新たな生息地は発見できなかったが、これは、近年の相模川・酒匂川水系におけるサンショウウオ類の捕獲

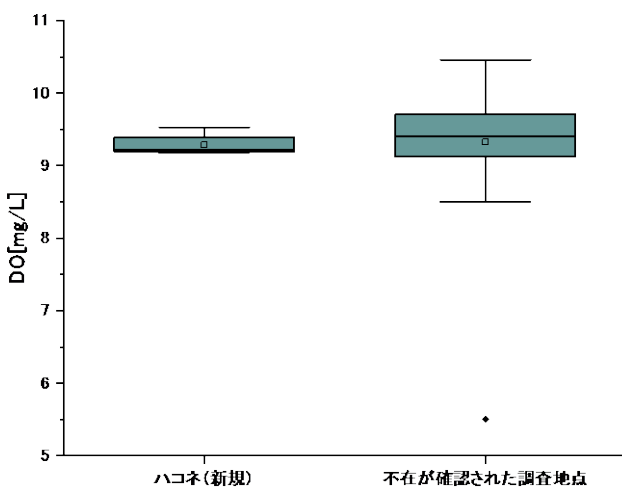


図4 DNA 検出地点と不検出地点の DO 分布

調査においてもヒガシヒダサンショウウオの確認地点数は減少する傾向がみられており、丹沢山地における生息地が非常に少なくなっていることを反映している可能性が考えられた。

## 6 まとめ

ハコネサンショウウオの生息のための至適DOは9.3 mg/L程度であることが示唆された。加えて、生息が確認された地点の付近はガレ場が多かった。これは、産卵適地との関連が考えられた。また、ヒガシヒダサンショウウオの新たな生息地は発見できなかったが、これは、丹沢山地における生息地が非常に少なくなっていることを反映していると考えられた。

## 参考文献

- 1) Gentile, F.F., Claude, M., François, P. and Pierre, T.: Species detection using environmental DNA from water samples, *BIO.LETT.*, 4(4), 423-5(2008)
- 2) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. and Iwasaki, W.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, *Royal Society Open Science*, 2(7):150088(2015)
- 3) Alice V., Pierre T., Claude M., Raphaël C., Jelger H., Philip Francis T., Eva B., Aurélien B., Eric C., Frédéric B., Coline G., Pauline J., Nicolas P., Nicolas R., Gordon H. C., Philippe G., Didier P., Christine A., Jean-Marc B., Tiphaine P., Alain J. C., Anthony O., Manon A., Matthieu L., Peter R. M., Eske W. and Tony D.: Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding, *Molecular Ecology*, 25(4), (2015)
- 4) Uchida, N., Kubota, K., Aita, S. and Kazama,

- S.: Aquatic insect community structure revealed by eDNA metabarcoding derives indices for environmental assessment, PeerJ, 2020(6), (2020)
- 5) 長谷部勇太, 白子智康:サンショウウオ類の分布調査における捕獲調査と環境 DNA 調査の比較, 全国環境研会誌, 44(2), (2019)
- 6) 長谷部勇太, 白子智康:サンショウウオ類分布調査における環境 DNA 活用のための基礎的検討, 全国環境研会誌, 45(1), (2020)
- 7) 石原龍雄, 林義雄, 草野保, 山崎泰, 北垣憲仁: サンショウウオからみた丹沢, 丹沢大山総合調査学術報告書, 321-327(2007)
- 8) 内山りゅう, 前田憲男, 沼田研児, 関慎太郎: 決定版日本の両性爬虫類, 平凡社(2002)
- 9) Wong MK, Nakao M, Hyodo S, : Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter, Sci Rep, 10(1):21531, (2020)