

<報文>

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\*

長谷部 勇太\*\*・白子 智康\*\*\*

キーワード ①環境DNA ②ハコネサンショウウオ ③ヒガシヒダサンショウウオ ④定量PCR

要 旨

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いる。そこで、相模川水系の源流域でサンショウウオ類の捕獲調査と併せて環境DNA調査を行い、両調査の比較を行った。その結果、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が、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く、環境DNA調査の有用性が確認された。今後は環境DNA調査を捕獲調査の補完や代替手法とするため、検出率を一層高めるサンプリング手法の検討が必要と考えられた。

1. はじめに

神奈川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、両水系の現状を見ると、ダム湖上流の森林荒廃による水源涵養機能の低下や生活排水対策の遅れによるダム湖(特に相模湖)の水質汚濁、また、中下流においては河川の護岸コンクリート化による自然浄化機能の低下(水や土砂の自然な流れの障害)が懸念されている。

このため神奈川県では、相模川及び酒匂川の上流域において、水源涵養機能の向上を図るための森林の整備や水質向上のための生活排水対策の事業等に取り組んでいる。その効果を把握する目的で、サンショウウオ類を含む動植物や水質に関するモニタリング調査を、相模川では2008-09年から、酒匂川では2009-10年から5年間隔で実施している。

相模川及び酒匂川におけるサンショウウオ類に関する先行調査として、丹沢山地の全域の沢について1993年から1995年にかけて行われた丹沢大山自然環境総合調査<sup>1)</sup>とその約10年後の2004年から2006年にかけて行われた丹沢大山総合調査<sup>2)</sup>がある。両調査によって、丹沢山地ではハコネサンショウウオ(*Onychodactylus japonicus*)とヒガシヒダサンショウウオ(*Hynobius fossigenus*)の2種が分布していることが明らかとなっている。また、丹沢山

地と箱根山地のサンショウウオ類の生息状況の比較も行われ<sup>2)</sup>、丹沢山地のシカの食害による森林荒廃がサンショウウオ類の生息環境に悪影響を与えている可能性が指摘されており<sup>2)</sup>、前述のモニタリング調査においても森林整備による下層植生の回復等とサンショウウオ類の生息域の変化の関係について検証を行っているところである。

一方、水中に生息するマクロ生物(本稿においては、微生物ではなく目に見える大きさの生物を意味する)の調査方法については、従来実施されてきた捕獲等による調査の他に、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マクロ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マクロ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<sup>3)</sup>。

環境DNAによるマクロ生物の生体外DNAの存在を初めて報告したのは、2008年に報告されたフランスの研究であり<sup>4)</sup>、その後、国内外で様々な研究が行われ、環境DNAに関する研究が急速に発展している状況である。

前述のモニタリング調査において行っているサンショウウオ類調査では、従来から手網又は手取りによる捕獲調査を実施しているが、礫を裏返したり、河床を足でか

\*Comparison of Environmental DNA and Harvest Survey in Distribution Study of Salamander Species

\*\*Yuta HASEBE, (神奈川県環境科学センター) Kanagawa Environmental Research Center

\*\*\*Tomoyasu SHIRAKO (いであ株式会社) Idea Consultants, Inc.

き回したりする等、少なからず生息域の攪乱を引き起こす。そのため、神奈川県レッドデータブック掲載種でもあるサンショウウオ類の生息環境の攪乱を可能な限り防止すること、また、調査費用を低減し、長期間の調査が必要となる森林整備がもたらすサンショウウオ類の生息環境の改善効果を把握するためのモニタリング体制の構築を行うこと、捕獲調査に従事する調査者の技量に起因する結果の変動を防止することを目的として環境DNA調査の導入を検討することとした。

本研究では、相模川水系源流域に生息するサンショウウオ類について、従来実施してきた捕獲調査と環境DNA調査の比較を行うことにより、捕獲調査の代替や補完の可能性について評価を行った。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先行調査においても沢名又は水系名までの公表に留めており、本研究においても神奈川県レッドデータブック掲載種の保護の観点から同様に水系名までの公表に留めることとした。

## 2. 調査方法

### 2.1 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。

ハコネサンショウウオは溪流性のサンショウウオで、成体は沢沿いの林床落ち葉や倒木の下、岩陰などに生息している。神奈川県内では小田原市、箱根町、丹沢山地の塔ノ岳、丹沢山、蛭ヶ岳、檜洞丸、大室山を囲む沢に分布している。

ヒガシヒダサンショウウオは溪流性のサンショウウオで、成体は山地のブナ帯の沢の流域に生息し、林床の落ち葉や岩の下で生活し、小動物を捕食する。神奈川県内では丹沢山地の塔ノ岳、丹沢山、蛭ヶ岳、檜洞丸を囲む限られた地域に隔離した状態で分布している。なお、ヒガシヒダサンショウウオは2018年に新種記載された種であるため<sup>5)</sup>、過去の調査結果や文献との比較の際はヒダサンショウウオに該当するものとして整理した。

いずれの種も、神奈川県レッドデータブックに掲載されており、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。

### 2.2 調査地域及び調査日時

調査を実施した相模川の位置と調査地域を図1及び表1に示す。本稿ではサンショウウオ類の保護の観点から「はじめに」に記したとおり調査地点の名称及び正確な位置

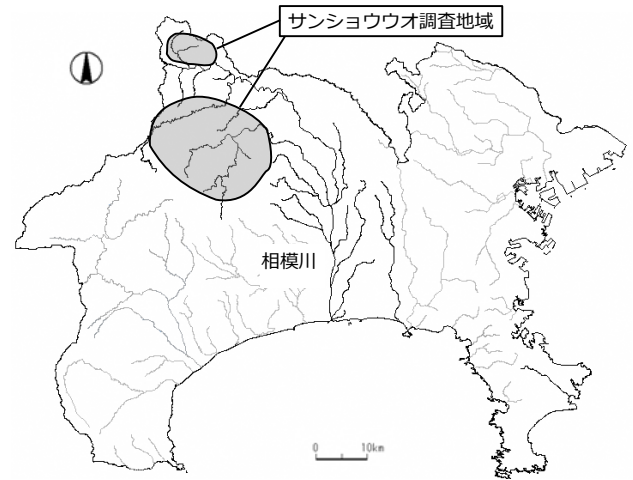


図1 相模川の調査地域図

を表示していない。

2008年、2013年調査は捕獲調査のみ、2018年は環境DNA調査と捕獲調査を実施した。

2008年は8月、2013年は6月から8月にかけて、表1に示す相模川水系の25地点で、2018年は8月に崩落により調査できなかったSt. 16を除く24地点で捕獲調査を実施した。

また、2018年8月の調査時には、環境DNA分析用試料として捕獲調査の直前に河川水1Lの採水を実施した。

### 2.3 環境DNA分析

環境DNAの分析方法は、大きく2つの方法に大別される。1つ目が種特異的なプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction:PCR)により、対象種のDNAのみを増幅して存在を確認する方法(①)であり、2つ目がユニバーサルプライマーを用いて分類群に属する種のDNAをまとめて増幅し、次世代シーケンサーを用いてそれらの塩基配列を網羅的に読み取り、既存のデータベースと照合して複数の種の存在を一度に確認する方法(②)である。①は主に2つに区分され、1つ目が電気泳動によるバンドの有無を確認する方法(①-1)と2つ目がリアルタイムPCRを用いて経時的にDNAの増幅を測定する方法(①-2)である。①-2は従来のPCRと電気泳動を用

表1 調査地点一覧

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

いた方法に比べ、検出感度、種特異性、定量性の面で優位とされている<sup>6, 7, 8)</sup>。

さらに、リアルタイムPCRは蛍光物質を用いてDNAの増幅を経時的に測定するが、その手法は主に2つあり、低コストで簡便ではあるが、特異性は劣るインターカレーション法(①-2-a)と、プローブと呼ばれる標的配列に特異的に結合するオリゴヌクレオチドの設計が必要であるが特異性に優れたハイブリダイゼーション法(①-2-b)である。

本研究では、調査対象となる種が2種と少ないこと、捕獲調査で確認されたサンショウウオ類の数と環境DNA濃度の相関が検証可能なことから、①-2-bの種特異的なプライマーとプローブを設計するリアルタイムPCRによるハイブリダイゼーション法で分析することとし、プローブにはTaqMan<sup>®</sup>MGBプローブを用いることとした。

### 2.3.1 採水及びろ過

採水容器は、新品の酸化エチレンガス滅菌済み1L容ポリプロピレン製広口びんを使用した。調査地点に複数の沢が存在した場合は各沢において等量ずつ採水し、調査地点毎に合計で1Lとなるように混合した。採水後にDNAの分解を抑制するため、塩化ベンザルコニウムを1mL添加した<sup>9)</sup>。試料は冷蔵で実験室まで輸送し、実験室内においてカートリッジ型のステリバクスフィルター(Merck Millipore社製 Sterivex-HV, 口径0.45 μm)を使用し、ろ過を行った。このとき、ろ過ポンプと廃液タンク等を除き、コンタミネーション防止のため試料に直接触れる部分はすべて使い捨てタイプの器具を使用した。また、サンプルと同じポリ容器にDNAを全く含まない超純水を1L入れたものを用意し、トラベルブランクとした。トラベルブランクはサンプルと同様にろ過・抽出・分析を行い、ネガティブコントロールとして用いた。

### 2.3.2 フィルターからのDNA抽出・精製

ろ過したステリバクスフィルターからのDNA抽出・精製はMiya et al.<sup>10)</sup>の方法により、図2の手順で行った。

始めにフィルターに残った水分を遠心分離により除去し、プロテナーゼK溶液、リン酸緩衝生理食塩水、buffer ALの混合物を入れ、56°Cでロータリーシェーカーを用いて回転した。この工程によりDNAを抽出し、遠心分離によりDNA抽出液を回収した。

得られたDNA抽出液をQIAGEN社製のDNeasy Blood & Tissue Kitのプロトコールどおりにエタノール、Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AEを添加し、精製を行った。

### 2.3.3 プライマー及びプローブの設計

ヒガシヒダサンショウウオのプライマー及びプローブ

はオープンソースのPCRプライマー設計支援ソフトウェアであるprimer3等を使用し、いくつかの候補を作成した。それらの候補についてNational Center for Biotechnology Information Data-base s (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)からダウンロードした日本に生息するサンショウウオ属およびハコネサンショウウオ属(ヒガシヒダサンショウウオ, ヒダサンショウウオ, クロサンショウウオ, トウキョウサンショウウオ, アカイサンショウウオ, ハコネサンショウウオ)の配列と比較することにより種特異的なプライマー及びプローブを設計した。

以上の結果、ヒガシヒダサンショウウオについてはミトコンドリアDNAのCytchrome b領域の128bpを増幅するプライマー及びプローブとし、配列は表2のとおりとした。

ハコネサンショウウオについては、Katano et al.<sup>11)</sup>のものを使用したが、より特異性を高めるためプローブのみTaqMan<sup>®</sup>プローブからTaqMan<sup>®</sup>MGBプローブに変更し、表2のとおりとした。

設計したプライマー及びプローブについては、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組織から抽出したDNAサンプルを用いて分析し、種特異的に増幅することを確認した。

### 2.3.4 リアルタイムPCR定量分析

本研究では、捕獲調査で確認されたサンショウウオ類の数と環境DNA濃度の相関を検証するため定量PCR法により分析を行った。定量PCR法は、サンプル中に含まれているターゲット種のDNA濃度を測定する方法であり、本法により検出された環境DNA濃度は、採水地点におけるターゲット種の生物量と強い正の関係性があることが報告されている<sup>12)</sup>。

抽出・精製したDNA溶液を鋳型とし、種特異的なプライマー及びプローブを用いて、リアルタイムPCRシステム(ThermoFisher社製 QuantStudio3)による定量PCR分析

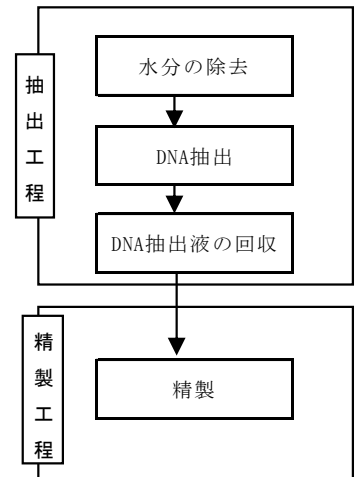


図2 DNAの抽出・精製工程

表2 サンショウウオ類のプライマー及びプローブ

種	プライマー及びプローブ	
ヒガシヒダサンショウウオ	フォワードプライマー	5'-CCCCCTCCAATCTTTCATCACTA-3'
	リバースプライマー	5'-GGATGAGAAGGCTGAGGATG-3'
	プローブ	5'-[FAM]-TGCCATAATTGTACAAATTATTACA-[MGB]-3'
ハコネサンショウウオ	フォワードプライマー	5'-TACTTGAACCACGACCGCT-3'
	リバースプライマー	5'-CGCCAAAGTCCCTTGAGTTT-3'
	プローブ	5'-[FAM]-TCCGCCAGATTACTACG-[MGB]-3'

注) 表中のA,T,G,Cは、塩基の種類、[FAM]は蛍光物質の種類、[MGB]はTm EnhancerであるMGB/Minor Groove Binderを示す。

を行った。リアルタイムPCR用試薬は、Applied Biosystems社製 TaqMan® Fast Advanced Master Mixを使用し、PCR溶液の組成及びPCRの温度条件は、酵素の推奨条件に従った。また、標準試料として調査対象種それぞれの塩基配列を人工的に合成したDNAを使用し、10000コピー、1000コピー、100コピー、10コピー、1コピーの測定結果から、検量線を作成した。標準曲線のR<sup>2</sup>値は0.987~0.997の範囲であり、PCR効率は99.20~107.66%であった。

分析の際は、DNA濃度がごく微量の場合に起こりやすい偽陰性の判定を防ぐため、1検体につき4連反復した。環境DNAの濃度は、4連反復のDNAのコピー数の平均値からサンプル1L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DNAの増幅が確認された場合、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」と扱った。

### 2.3.5 PCR阻害試験

Katano et al.<sup>11)</sup>に従って、PCR阻害試験を実施した。その際、スパイクするDNAには、河川中で検出される可能性のない海外産海水魚の人工合成DNAを使用した。

$\Delta Ct (= Ct_{\text{positive control}} - Ct_{\text{sample}})$  が3以上となった場合には、PCR阻害があったと判断した。ここで、 $Ct_{\text{positive control}}$  は超純水中に、 $Ct_{\text{sample}}$  は試料中に海外産海水魚の人工合成DNAと対応するプライマー及びプローブを入れてリアルタイムPCRで分析した時のCt値(増幅産物がある一定量に達したときのPCRサイクル数)を示す。

### 2.4 捕獲調査

捕獲調査は河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版]に準拠し、礫の下や淵等を手網もしくは手取りで行い、調査時間は、原則として1地点あたり1人×2時間(もしくは2人×1時間)とした。

## 3. 結果

### 3.1 プライマー及びプローブ試験

ヒガシヒダサンショウウオ及びハコネサンショウウオの組織から抽出したDNAサンプルを用いて、それぞれ設計したプライマー及びプローブを使用して分析したところいずれも増幅が確認された。

また、DNAサンプルとプライマー及びプローブのセットを入れ替えて分析し、DNA増幅が確認されなかったことから、設計したプライマー及びプローブは種特異的であることを確認した。

### 3.2 捕獲調査と環境DNA調査

各調査年で捕獲されたサンショウウオの数及び環境DNAの分析結果は表3のとおりであった。

表3 捕獲調査と環境DNA調査の結果

調査地点	種名	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(調査年)		環境DNA		捕獲調査(調査年)		環境DNA	
		2008	2013	2018	(copies/ml)	2008	2013	2018	(copies/ml)
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。

捕獲調査では、ハコネサンショウウオは2008年に13地点、2013年に13地点、2018年に12地点で確認され、ヒダサンショウウオは2008年に4地点、2013年に1地点、2018年に1地点で確認された。

環境DNA調査では、ハコネサンショウウオの環境DNAが13地点で検出され、その平均濃度は0.01~1.51 copies/mLであった。そのうちの4地点(St. 8, St. 11, St. 13, St. 14, St. 25)では、平均濃度は定量下限値(0.05 copies/mL)未満となった。ヒガシヒダサンショウウオは全地点で不検出であった。また、トラベルブランクからは両種のサンショウウオのDNAは検出されなかった。

2018年調査におけるハコネサンショウウオの捕獲調査による確認と環境DNA調査による検出(以下、共に「生息確認」という。)の状況を比較すると、前者は12地点、後者は13地点で生息確認した。いずれかの手法で生息確認した地点は15地点であり、両手法で生息確認した地点は10地点(66%)、環境DNA調査のみの地点が3地点(20%)、捕獲調査のみの地点が2地点(13%)であった。

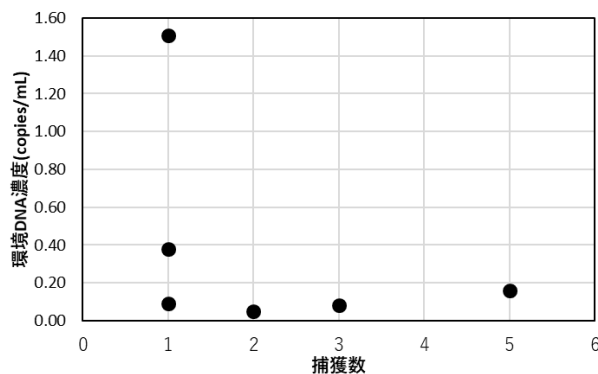


図3 2018年度のハコネサンショウウオ捕獲数と環境DNA濃度の関係

2018年調査のハコネサンショウウオの捕獲数とDNA濃度の関係を図3に示す。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環境DNA濃度との間に正の相関は見られなかった。

### 3.3 PCR阻害試験

PCR阻害試験の結果、 $\Delta Ct$ が3以上となった地点は無かったことから、いずれの地点においても定量PCRの結果に影響を及ぼす阻害物質はなかったと判断した。

## 4. 考察

### 4.1 ハコネサンショウウオについて

捕獲調査と環境DNA調査の同時調査の結果から、ハコネサンショウウオでは両手法で確認された地点が10地点といずれかの手法のみで確認された地点よりも多く、また捕獲調査では確認されなかった地点について、環境DNAが検出された地点もあることから、ハコネサンショウウオの生息状況の調査において、捕獲調査を補完する手法としては十分有用であると考えられ、より改良を重ねることにより代替する手法となる可能性も見出された。

更に前述のとおり、環境DNA調査は対象となる種の生息域を攪乱する恐れがなく、このような特徴は特にサンショウウオ類のようにレッドデータブックに掲載される種の調査にあたっては重要となる。

今回の結果で、環境DNAのみが検出された地点については、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ハコネサンショウウオが生息していた可能性が考えられた。

一方、捕獲調査のみで確認された地点もあり、河川を流れるDNA量が少なく、1L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濃度が時間的・空間的に不均一で採水した場所がその時点では検出するのに十分な濃度ではなかった可能性が考えられた。

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が、生物量と環境DNA濃度の関係についてはカエルやサンショウウオの調査でも正の相関が確認されたという報告<sup>13)</sup>や、相関がみられなかったという報告<sup>14)</sup>がある。流水環境においてDNA濃度から生物量を予測するには、当該水域の流速・流量等の河川の物理的な情報や調査対象種の環境DNAの放出形態に関する情報等をより詳細に検討する必要があると考えられた。

### 4.2 ヒガシヒダサンショウウオについて

本調査においてはヒガシヒダサンショウウオの環境

DNAは検出されなかった。2018年調査では捕獲調査においても1地点しか確認されず、確認個体数も2個体のみとなったことから、今回の調査地点においてはヒガシヒダサンショウウオの生息数が少なく、1Lの採水では十分なDNA量が採取できなかった可能性が考えられた。ハコネサンショウウオが孵化から2~4年間水中生活を送るのに対し、ヒガシヒダサンショウウオは、孵化から1年程度経過した初夏頃に上陸し、その後成体は陸上で生活する<sup>15)</sup>。そのため、本調査時期の8月では、ハコネサンショウウオは、水中に3つの年齢群(生まれてから3年目までの個体)が生息しているが<sup>16)</sup>、ヒガシヒダサンショウウオは孵化後1年が経過した個体は上陸済みのため、今年孵化した個体のみが生息している<sup>17)</sup>。このような生態の違いから、ヒガシヒダサンショウウオがハコネサンショウウオに比べ、当該河川中に生息する個体数が少なかったと考えられた。

### 4.3 環境DNA調査における課題

環境DNA分析は、水を採取するだけで生物の生息の有無がわかるため、生息域の攪乱を起こさないこと、調査コストが削減できること、調査者の経験の違いによる結果のバラツキを小さくできることなど、多くのメリットがある。

一方で、当該水域に対象の種がいたとしても100%の確率で検出できるわけではないことが報告されており<sup>18)</sup>、今回の結果もそれを裏付ける結果となった。また、検出されたDNAが、いつ、どこで放出されたものなのか不明なことが多く、解明されるべき課題も多く残されている<sup>19)</sup>。

これまでに環境DNA分析が適用された調査事例は、比較的水の流れの緩やかな河川下流域や止水域で行われたものが多く、採水地点と個体が生息する場所とはそれほど離れていないと考えられる。しかし、本調査のような河川の源流域での調査では、採水地点と対象種が実際に生息する場所との距離が調査地点によって大きく異なることが考えられる。環境DNAが検出可能な距離範囲は、ターゲット種の生態学的な特性や、調査地点の水理特性等に強く影響されることも報告されている<sup>20)</sup>。

以上を踏まえ、環境DNAの検出率が一層高くなるサンプリングを行うためには、次の4つの課題を検討する必要があると考えられる。

まず1つ目には、採水時刻による変動の把握があげられる。環境DNAは生物から排出される糞や脱落した細胞、粘液、配偶子等を由来とすると考えられており<sup>21)</sup>、対象の生物が活動的に行動する時間帯において多くの環境DNAが検出されることが想定される。

2つ目として、採水をする季節による変動の把握があげられる。今回ヒガシヒダサンショウウオのDNAが検出されなかったのは、孵化後1年が経過した個体が上陸してしまい、河川での個体数が少なかったことが考えられ、採水する季節によるDNAの検出率を調査することで適切な調査時期を設定できると期待される。

3つ目として、より低濃度のDNAを検出できるように採水量を増やすことがあげられる。今回は採水量を1Lとしたが、サンショウウオの1種(*Cryptobranchus a-lliganiensis*)を調査した例では、1Lの採水では信頼性は不十分であり、2L採水すると検出率が向上すると報告されている<sup>22)</sup>。一方で、環境水中にはPCR反応を阻害する物質(フミン酸等)が含まれている場合もあり、季節や場所によってどの程度まで採水量を増やすことが可能かという問題も考慮する必要がある<sup>23)</sup>。

4つ目として、サンショウウオ類から放出されたDNAがどの程度下流まで検出が可能なのかという点について検証を行う必要性がある。

## 5. まとめ

ハコネサンショウウオに関する環境DNA調査及び捕獲調査から、両手法でもともに生息確認できた割合は66%であった。環境DNA調査は、捕獲調査では生息確認できなかった地点においても生息確認できるなど、捕獲調査を補完する調査方法として有用と考えられた。

一方、捕獲調査で生息確認されたものの、環境DNAでは生息確認できなかった地点があることやヒガシヒダサンショウウオが全地点で生息確認されなかったこと等、実用化に向けての課題もあり、環境DNAの検出率を高めるためサンプリング方法の改善が必要と考えられた。サンプリング方法の改善にあたっては、採水時刻や採水季節による検出率の変動の把握、採水量の増加によるPCR阻害物質の影響の把握、サンショウウオ類が放出したDNAがどの程度下流まで検出されるか等、生息場所と採水場所との関係に関する検討が必要と考えられた。

## 6. 引用文献

- 1) 山崎泰, 石原龍雄, 梶野稔, 北垣憲仁: 丹沢のサンショウウオ類. 丹沢大山自然環境総合調査報告書, 480-493, 1997
- 2) 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
- 3) Darling JA, Mahon AR: From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments.

- Environmental Research*, **111**, 978-988, 2011
- 4) Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**, 423-425, 2008
  - 5) Okamiya H, Sugawara H, Nagano M, Pooyarkov NA: An integrative taxonomic analysis reveals a new species of lotic *Hynobius* salamander from Japan. *PeerJ*, **6**, e5084, 2018
  - 6) Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Jane SF, Lowe WH, Whiteley AR, Schwartz MK: Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLOS ONE*, **8**, e59520, 2013
  - 7) Díaz-Ferguson E, Herod J, Galvez J, Moyer G: Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Management of Biological Invasions*, **5**, 121-131, 2014
  - 8) Turner CR, Miller DJ, Coyne KJ, Corush J: Improved Methods for Capture, Extraction, and Quantitative Assay of Environmental DNA from Asian Bigheaded Carp (*Hypophthalmichthys* spp.). *PLOS ONE*, **9**, e114329, 2014
  - 9) Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J, Sakurai S, Tsui S, Motozawa H, Hongo M, Sogo Y, Kakimi N, Teramura I, Sugita M, Baba M, Kondo A: A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, **17**(2), 233-241, 2017
  - 10) Miya M, Minamoto T, Yamanaka H, Oka S, Sato K, Yamamoto S, Sado T, Doi H: Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments*, **117**, e54741, 2016
  - 11) Katano I, Harada K, Doi H, Souma R, Minamoto T: Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. *PLOS ONE*, **12**(5), e0176541, 2017
  - 12) Doi H, Inui R, Akamatsu Y, Kanno K, Yamanaka H, Takahara T, Minamoto T: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, **62**(1), 30-39, 2017

- 13) Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP, Richardson J: Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **70**, 1123-1130, 2013
- 14) Spear SF, Groves JD, Williams LA, Waits LP: Using environmental DNA methods to improve detect-ability in a hellbender (*Cryptobranchus Alleganiensis*) monitoring program. *Biological Conservation*, **183**, 38-45, 2015
- 15) 草野保, 植田健仁, 初芝伸吾: 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, 2001
- 16) 早瀬長利, 山根爽一: 茨城県筑波山系におけるハコネサンショウウオ *Onychodactylus japonicus* (HOULTUYN) の水中生活期の生態. 日本生態学会誌, **32**, 395-403, 1982
- 17) Misawa Y, Matsui M: Larval Life History Variation in Two Populations of the Japanese Salamander *Hynobius kimurae* (Amphibia, Urodela). *Zoological Science*, **14**, 257-262, 1997
- 18) Roussel J-M, Paillisson J-M, Tréguier A, Petit E, Cadotte M: The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology*, **52**, 823-826, 2015
- 19) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 環境DNA分析の手法開発の現状—淡水域の研究事例を中心にして—. 日本生態学会誌, **66**, 583-599, 2016
- 20) 山中裕樹・源利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸: 環境DNA分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, **66**, 601-611, 2016
- 21) Barnes MA, Turner CR: The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, **17**, 1-17, 2016
- 22) Santas AJ, Persaud T, Wolfe BA, Bauman JM: Non-invasive method for a statewide survey of Eastern Hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis* using environmental DNA. *International Journal of Zoology*, **2013**, 17456, 2013
- 23) McKee AM, Spear SF, Pierson TW (2015) The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*, **183**, 70-76, 2015