

<報文>

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*

長谷部勇太**・武田麻由子**・中山駿一**・菊池宏海**・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が少なく、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、昨年度実施した相模川水系でのサンショウウオ類の捕獲調査と環境DNA調査の同時実施に引き続き、酒匂川水系でも同様の調査を行うとともに、採水時刻による環境DNA濃度の変動や環境DNAの検出可能距離に関する調査を実施した。その結果、相模川水系での調査と同様、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調査の補完調査としての有用性が確認された。また、環境DNA濃度は、採水時刻よりも種のライフサイクルの影響をより大きく受ける可能性が考えられた。

1. はじめに

神奈川県を流れる相模川及び酒匂川の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阻害)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は、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¹⁾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²⁾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*)及び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²⁾、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²⁾、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を用いた調査手法が注目されている。この調査手法は、河川や湖沼等で採取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³⁾。

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⁴⁾、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。

*The fundamental study on environmental DNA utilization in habitat distribution survey of salamander species

**Yuta HASEBE, Mayuko TAKEDA, Shunichi NAKAYAMA, Hiromi KIKUCHI

(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.

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、生息域の攪乱を引き起こす懸念があるため、昨年度の相模川における調査時には、捕獲調査と同時に、環境DNA調査の導入を目的とした試行的な調査として環境DNA調査も実施した⁵⁾。

本研究では、相模川水系での調査に引き続き酒匂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調査の比較を行い、捕獲調査の代替や補完の可能性について評価を行うとともに、採水時刻による環境DNA濃度の変動や環境DNAの検出可能距離についての調査も行った。

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のレッドデータブック掲載種の保護の観点から、同様に詳細な沢名までは公表しないこととした。

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あり、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も溪流性のサンショウウオであるが、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され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⁶⁾、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、神奈川県の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

2.2.1 捕獲と環境DNAの同時調査

捕獲と環境DNAの同時調査は、酒匂川の図1及び表1で示す位置で実施した。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



図1 酒匂川の同時調査地域図

確な位置を表示していない。

2009年及び2014年調査は捕獲調査のみ、2019年は環境DNA調査と捕獲調査を実施した。

2009年及び2014年は、8月に表1に示す酒匂川水系の25地点で、2019年8月は20地点(崩落によりSt. 8, 9, 10, 11, 12については調査不可のため)で捕獲調査を実施した。

また、2019年の調査時には、環境DNA分析用試料として捕獲調査の直前に河川水の採水を実施した。

2.2.2 採水時刻による環境DNA濃度の変動調査

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⁷⁾、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。そこで過去の酒匂川の調査から、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両方が生息している地点として図2の丹沢湖上流河内川のSt. 3 東沢A沢を調査地点に選定し、2019年6月20日午後12時から河川水の採水を開始し、その後3時間ごとに採水を実施し、6月21日の午前9時まで計8回の採水を実施した。

表1 調査地点一覧

調査地点	水系名
St.1	白石沢A沢
St.2	用木沢
St.3	東沢A沢
St.4	東沢B沢
St.5	東沢C沢
St.6	西沢
St.7	大滝沢
St.8	玄倉川A沢
St.9	玄倉川B沢
St.10	玄倉川C沢
St.11	玄倉川D沢
St.12	玄倉川E沢
St.13	玄倉川F沢
St.14	大瀬沢A沢
St.15	大瀬沢B沢
St.16	金山沢
St.17	水の木沢
St.18	大又沢A沢
St.19	大又沢B沢
St.20	大又沢C沢
St.21	へいノ沢
St.22	寄沢
St.23	勘七沢
St.24	檜沢
St.25	梶ヶ沢

2.2.3 環境DNAの検出可能距離調査

生物から放出されたDNA断片は、河川を流下しながら拡散し、ある程度流下した段階

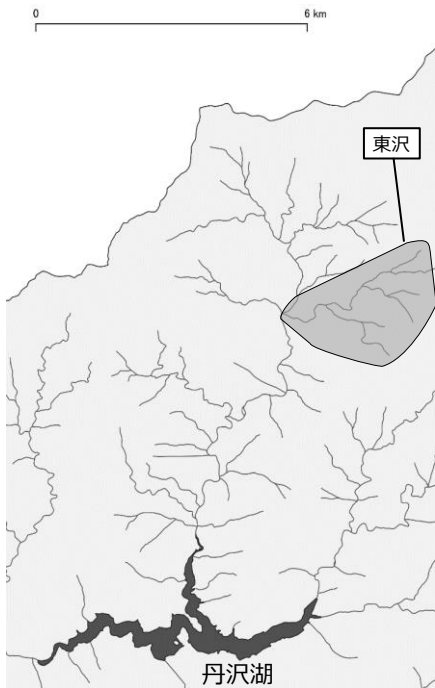


図2 環境DNA濃度の変動調査地域図

されておらず、事前の環境DNA調査においてもDNA不検出が確認された西沢を調査地点に設定し、2019年8月28日に、図3のとおり15匹のハコネサンショウウオの幼生を入れた籠の直下、100m下流、200m下流、300m下流、400m下流の計5地点で30分ごとに採水を3回実施した。

調査に用いたハコネサンショウウオはいずれも体長3cm程度の幼生であった。

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。



図3 環境DNA検出可能距離調査地点

で検出下限値以下の濃度となると推定される。環境DNAの検出を生物の生息情報と結び付けるには、生物から放出されたDNA断片がどの程度下流まで検出されるのかを調査する必要がある。そのため、過去の酒匂川の調査からハコネサンショウウオが確認

を確認する方法(①-1),そして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^{8,9,10}。

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、それぞれ、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)及び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。なお、一般社団法人環境DNA学会の環境DNA調査・分析マニュアルでは、ハイブリダイゼーション法が記載されている¹¹⁾。

本研究では、既報の調査¹¹⁾と同様に、特異性の高い分析手法である①-2-b、つまり種特異的なプライマー及びプローブを用いたリアルタイムPCRによるハイブリダイゼーション法で分析を行った。

本研究では、既報の調査¹¹⁾と同様に、特異性の高い分析手法である①-2-b、つまり種特異的なプライマー及びプローブを用いたリアルタイムPCRによるハイブリダイゼーション法で分析を行った。

2.3.1 採水及びろ過

採水容器は、2.2.1の調査では新品の滅菌済み1L容ポリプロピレン製広口びんを使用し、2.2.2及び2.2.3の調査では、新品の滅菌済み2L容ポリプロピレン製広口びんを使用した。2.2.1の調査では調査地点に複数の沢が存在する場合があります、その際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終濃度0.01%となるように添加した¹²⁾。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ベクスフィルター(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、ろ過ポンプ及び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2L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。

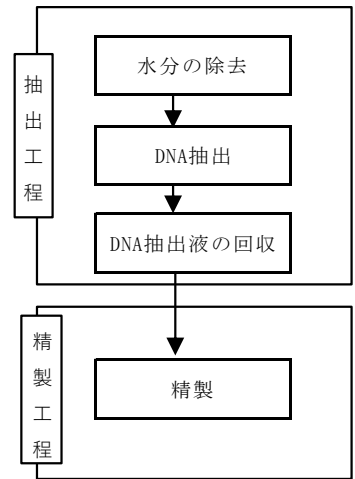


図4 DNAの抽出・精製工程

2.3.2 フィルターからのDNA抽出・精製

ろ過したステリベクスフィルターからのDNA抽出・精製はMiya *et al.*¹³⁾の方法に従い、QIAGEN社製のDNeasy Blood & Tissue Kitを用いて図4の手順で行った。

最初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及び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抽出液について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

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プライマー及びプローブは既報の配列¹¹⁾と同様とし、表2のとおりとした。

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¹⁴⁾。

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分析を行った。PCR溶液にはそれぞれ900nMのプライマー、250nMのTaqManプローブ、2×TaqPath qPCR Master Mix (Applied Biosystems社)、2μLのサンプルDNAを加え、合計で10μLとした。PCRの条件は、50°Cで2分、95°Cで20秒の後、95°Cで1秒、60°Cで20秒のサイクルを55サイクル行った。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R²値は0.981~0.994の範囲であり、PCR効率は106.15~113.86%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」として扱った。

2.3.5 PCR阻害試験

Katano *et al.*¹⁵⁾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_{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 捕獲と環境DNAの同時調査

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。

捕獲調査では、ハコネサンショウウオは2009年に7地点、2014年に9地点、2019年に7地点で確認され、ヒダサンショウウオは2009年に2地点、2014年に2地点、2019年に2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

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]-TGCCTAATTGTACAAATTATTACA-[MGB]-3'
ハコネサンショウウオ	フォワードプライマー	5'-TACTTGAAACCACGACCGCT-3'
	リバースプライマー	5'-CGCCAAAGTCCTTGAGTTTT-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)を表す。

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)		eDNA(2019)	(copies/mL)	捕獲調査(調査年)		eDNA(2019)	(copies/mL)
		2009	2014	2019		2009	2014	2019	
St.1	白石沢A沢	-	-	-	-	31	21	43	検出
St.2	用木沢	-	-	-	-	-	1	20	0.82
St.3	東沢A沢	3	5	12	-	-	3	2	0.30
St.4	東沢B沢	2	6	2	-	-	-	2	-
St.5	東沢C沢	-	-	-	-	30	30	23	検出
St.6	西沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.7	大滝沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.8	玄倉川A沢	-	-	-	-	20	23	-	-
St.9	玄倉川B沢	-	-	-	-	34	48	-	-
St.10	玄倉川C沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.11	玄倉川D沢	-	-	-	-	5	2	-	-
St.12	玄倉川E沢	-	-	-	-	17	26	-	-
St.13	玄倉川F沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.14	大瀬沢A沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.15	大瀬沢B沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.16	金山沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.17	水の本沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.18	大又沢A沢	-	-	-	-	12	13	2	0.06
St.19	大又沢B沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.20	大又沢C沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.21	ヘイソ沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.22	番沢	-	-	-	-	-	-	1	検出
St.23	勘七沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.24	檜沢	-	-	-	-	-	-	-	-
St.25	楓ヶ沢	-	-	-	-	-	-	-	検出
	確認地点数	2地点	2地点	2地点	0地点	7地点	9地点	7地点	7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。

7地点で検出され、平均値が定量下限値未満となったのが4点、定量下限値以上となった地点の平均濃度は0.06～0.82copies/mLであった。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。

2019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7地点、後者は7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8地点であり、両手法で生息確認した地点は6地点(75%)、環境DNA調査のみの地点が1地点(12.5%)、捕獲調査のみの地点が1地点(12.5%)であった。

3.2 採水時刻による環境DNA濃度の変動調査

採水時刻ごとの環境DNA濃度の平均値を図5に示す。ヒガシヒダサンショウウオについては検出されたすべての時刻で定量下限値未満となったため、検出された時刻は「*」を表示した。

捕獲と環境DNAの同時調査では、当該地点のハコネサ

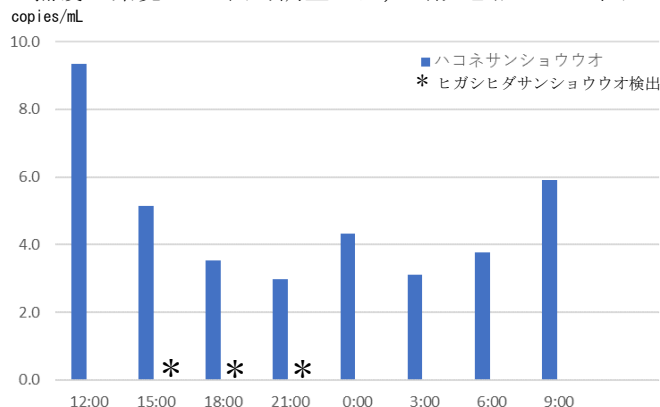


図5 採水時刻による環境DNA濃度の変動

ンショウウオの環境DNA濃度は0.30copies/mLであったが、今回の調査では、いずれの時間帯においても10倍以上の濃度で検出された。また、夜活発に活動する性質から夜間に環境DNA濃度が高まると予想していたが、結果からはそのような傾向はみられなかった。

ヒガシヒダサンショウウオについては当該地点での捕獲調査の結果からは6倍の個体数が確認されたが、環境DNAの濃度は低く、定量下限値以上となる時刻はなかった。

3.3 環境DNAの検出可能距離調査

ハコネサンショウウオが入った籠の直下を含め、すべての地点で不検出となった。

3.4 PCR阻害試験

PCR阻害試験の結果、ΔCtが3以上となった地点はなかったことから、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 捕獲と環境DNAの同時調査について

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6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、相模川での調査結果と同様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有用であると考えられた。

捕獲調査のみで確認された地点については、生息する個体数が少ないことが環境DNAが不検出となった原因の一つと考えられたが、多くのハコネサンショウウオが捕獲されたSt. 1においても、DNA濃度が定量下限値未満となるなど、必ずしも個体数とDNA濃度に正の相関があるわけではなかった。これについても相模川での調査結果と同様の傾向を示しており、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に加えて、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。

一方でヒガシヒダサンショウウオについては、2地点で捕獲されたものの、いずれも環境DNAは不検出となった。St. 3については12個体と比較的数多く捕獲されているにもかかわらず、環境DNAが検出されなかったことから、種による環境DNA放出量の違い等についても検討する必要があると考えられた。

4.2 採水時刻による環境DNA濃度の変動調査及び環境DNAの検出可能距離調査について

採水時刻による環境DNA濃度の変動調査はSt. 3で実施したが、捕獲調査と環境DNAの同時調査では検出されなかったヒガシヒダサンショウウオの環境DNAが定量下限値未満であったが増幅が確認された。この要因の一つとして、同時調査が採水量1Lであったのに対し、この調査では2Lの採水を行ったことが検出率を向上させたと考えられたが、検出数は8検体中3検体であり、検出率としては依然として低い結果となった。

一方でハコネサンショウウオについては、同時調査に比べて10倍以上の環境DNA濃度が検出された。この要因としては、一般的にハコネサンショウウオの繁殖期が4月下旬から6月にかけて、まれに8月上旬までとされており¹⁶⁾、6月中旬に実施したこの調査では繁殖に伴う精子由来のDNAなどをサンプリングしたことにより、環境DNAが高濃度に検出されたのに対し、8月に実施した同時調査時にはすでに繁殖期は終わっていたために、環境DNA濃度が低濃度であったことが考えられた。また、採水時刻については濃度に変動はあるものの、夜行性のために生物の活性が高い夜間で環境DNA濃度が高くなるといった傾向は認められず、むしろ繁殖期といった種のライフサイクルの方が結果に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

環境DNAの検出可能距離調査では、直下での採水を含めてすべての地点で不検出となったことから、流下による希釈の影響を判断することはできなかった。これは鮎を使った野外実験で1km下流までDNAが検出された報告¹⁷⁾とは異なる結果となった。その原因としては、①鮎を用いた実験では鮎を50匹使っており、生物量が多く、DNAの放出量が多いと想定されること、②籠の中で常に泳いでいる鮎に比べ、サンショウウオは籠の中に設置した石の下で動かなかつたため、代謝や活動に由来するDNAの放出量が少なかったことなどが考えられた。

5. まとめ

ハコネサンショウウオに関する環境DNA調査及び捕獲調査結果から、両手法でともに生息確認できた割合は75%であった。相模川での調査結果と同様、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情報が示されるなど、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では生息が示されなかった地点があること、またヒガシヒダサンショウウオが生息確認されなかったことについても相模川での調査結果と同様となり、依然とし

て代替手法として利用するには課題が残る結果となった。

これらの課題については、ハコネサンショウウオの繁殖期に採水した結果が繁殖期終盤の10倍の濃度になるなど、種のライフサイクルを考慮したサンプリング計画を立てることで検出率を大幅に高めることができる可能性が見いだされた。

今後は、特定の調査地点で高頻度調査を実施することにより、サンショウウオ類の生息状況を的確に把握するためのサンプリング手法構築につなげていきたい。

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) 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. *全国環境研究会誌*, 44, 62-68, 2019
- 6) 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
- 7) Barnes MA, Turner CR: The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17:1-17, 2016
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 一般社団法人環境DNA学会, 環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.1(2019年4月25日発行), http://ednasociety.org/eDNA_manual_ver2_1_3.pdf(2020.2.7アクセス)
- 12) 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, **18**(2), 233-241, 2017
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 大野正男: 24.ハコネサンショウウオ. 第2回自然環境保全基礎調査(緑の国勢調査)動物分布調査(両生類・は虫類)報告書 日本の重要な両生類・は虫類の分布 全国版. 134-141, 1982
- 17) 山口皓平, 赤松良久, 乾隆帝, 後藤益滋, 河野誉仁, 栗田喜久: 河川における環境DNA含有物質の動態に関する基礎的研究. 土木学会論文集B1(水工学), **74**, I_409-I_414, 2018