

# 環境DNAを用いた地域の生物モニタリング

## － 希少生物の保全と外来生物侵入の監視－



実施担当者 岐阜県立大垣北高等学校  
教諭 高木 雅紀

写真：環境DNAの抽出実験

### 1 はじめに

本研究では、貴財団の助成を利用させていただき、岐阜高校と連携をし、交流を深めながら、2年目となる今年度は、本格的に環境DNAの手法を用いて、希少野生生物と外来種についてモニタリングを進めた。

### 2 岐阜県大垣市に生息するマホロバサンショウウオとヒダサンショウウオのハビタット特性

#### 2-1 はじめに

マホロバサンショウウオの生活史を研究する過程で、ヒダサンショウウオと同所的に生息する沢、マホロバサンショウウオのみが生息する沢があることに気づいた。その違いが捕食者の有無に起因していると考え、原因解明に取り組んだ。



図1 大垣市に生息する  
マホロバサンショウウオ

#### 2-2 野外調査

大垣市内のサンショウウオが生息している5か所の沢と本流を調査地点とした。各地点で、マホロバサンショウウオ、ヒダサンショウウオの有無、捕食者であるイワナ、アマゴ等の魚類の有無、水量を調査した。結果は表1に示す通りで、沢1は入り口に滝があり、魚類は遡上できず発見されなかった。マホロバサンショウウオとヒダサンショウウオの両種の生息が確認された。沢2はイワナが多く生息し、ヒダサンショウウオは確認できず、マホロバサンショウウオのみ生息していた。沢3,4は本流との標高差があり、イワナ・アマゴ・アブラハヤは生息せず、ヒダサンショウウオとマホロバサンショウウオの両種が確認された。沢5は普段は水が流れておらず、降雨後に水が流れ

表1 調査結果

調査地	マホロバ サンショウウオ	ヒダ サンショウウオ	イワナ	アマゴ	アブラハヤ	カワヨシノボリ	水量
沢1	+	+	-	-	-	-	豊富
沢2	+	-	+	-	-	-	豊富
沢3	+	+	-	-	-	+	豊富
本流	+	-	+	+	+	+	豊富
沢4	+	+	-	-	-	-	豊富
沢5	+	-	-	-	-	-	極めて少ない

+: 生息する -: 生息しない

る程度で、完全に枯れているわけではなく表面はいつも湿っていて伏流水は流れている。マホロバサンショウウオのみの生息が確認できた。本流はイワナ、アマゴ、アブラハヤ、カワヨシノボリの4種類の魚類が生息し、ヒダサンショウウオは生息しなかったが、マホロバサンショウウオは生息していた。マホロバサンショウウオは捕食者の有無に関係なく生息し、ヒダサンショウウオは捕食者の生息していない沢周辺にのみ生息していたことが判明した。これは、マホロバサンショウウオは伏流水中に産卵し成体になると上陸するため、流水に依存せず、魚類にも捕食されないが、ヒダサンショウウオは溪流の大きな石の下等で産卵し、成長過程でマホロバサンショウウオよりも水流に依存し、魚類に捕食されやすいという違いが要因であると考えた。

### 2-3 環境DNA調査

マホロバサンショウウオの繁殖期を特定すること、両者の流水に対する依存度を調べることを目的として環境DNA調査を実施した。2019年9月から2020年8月までの12か月間、調査地点は沢2、沢3、本流の3地点で、計36回、1リットルずつ採水し、それを濾過、抽出した。使用するプライマーは、両者のミトコンドリアDNAの12SrRNAの一部の領域に特異的に結合するプライマーを「Primer3(ver0.40)」を使って設計し、PCR、電気泳動を行った。結果を表2に示す。

表2 調査結果 +: 検出 -: 非検出 /: コンタミの可能性があり、除外

地点	プライマー	野外調査結果		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
		サンショウウオ	捕食者												
沢2	① マホロバ	+	+	/	/	-	+	+	/	-	-	-	/	-	-
	② ヒダ	-	+	+	+	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-
沢3	③ マホロバ	+	-	/	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-
	④ ヒダ	+	-	/	+	+	+	+	/	/	-	+	/	+	+
本流	⑤ マホロバ	+	+	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-
	⑥ ヒダ	-	+	+	+	+	-	+	/	/	-	-	/	-	+

マホロバサンショウウオは、全体的にほとんど検出されなかったが、沢2では4月から5月にかけて検出され、この時期がマホロバサンショウウオの繁殖期であると考えた。ヒダサンショウウオは、沢2と本流では冬季に検出され、沢3では11月から9月にかけて検出された。この期間は、ヒダサンショウウオの成体が流水に入り産卵し、幼生が流水から上陸するまでの期間と一致した。この結果から、マホロバサンショウウオの繁殖期が4月から5月であること、ヒダサンショウウオは流水に依存し、マホロバサンショウウオは流水には依存しない繁殖生態であることを確かめることができた。

### 3 環境 DNA の手法を用いたオオサンショウウオの分布調査

#### 3-1 はじめに

世界最大級の両生類であるオオサンショウウオは、日本の固有種であり、岐阜県以西の本州・四国・九州に生息している。しかし、国の特別天然記念物にも指定されている世界に誇るオオサンショウウオではあるが、岐阜県内の分布状況や生息条件などの調査は、近年、しっかりと行われていないのが現状である。そこで、環境 DNA の手法を用いてオオサンショウウオの岐阜県内の分布や生息条件を明らかにしたいと考えた。また、近隣の三重県や京都府などで侵入が確認されている外来種のチュウゴクオオサンショウウオの侵入についても同時に調査した。

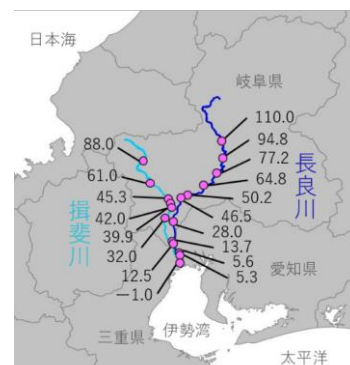


図 2: 長良川・揖斐川調査地点地図

#### 3-2 環境 DNA 調査

図 2 の通り、長良川 10 地点、揖斐川 8 地点で環境 DNA 調査を実施した。まず、調査地点でオオサンショウウオの移動が活発な 8 月に採水を行い、それをろ過し、環境 DNA を検出した。オオサンショウウオとチュウゴクオオサンショウウオのミトコンドリア DNA の一部にそれぞれ結合するプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動で解析した。

その結果、長良川では 6 地点からオオサンショウウオの環境 DNA が検出され、長良川の中流部と上流部にオオサンショウウオの環境 DNA を検出した。揖斐川ではオオサンショウウオの環境 DNA は検出されなかった。このことから、揖斐川にはオオサンショウウオが生息できない何らかの要因があるのではないと考えられる。同時に行ったチュウゴクオオサンショウウオの調査で、揖斐川の 2 地点からチュウゴクオオサンショウウオの環境 DNA が検出された。チュウゴクオオサンショウウオは外来種で、本来日本にはいない種であり、チュウゴクオオサンショウウオの人為的な移入の可能性が考えられる。生態系の保全のためにも、今後詳しく調査していきたい。また、今後は支流などにも調査範囲を拡大し、岐阜県におけるオオサンショウウオの保全に寄与していきたい。

表 3: 長良川, 揖斐川計 17 地点で採水したサンプルの環境 DNA の電気泳動実験の結果

Aj: オオサンショウウオ  
Ad: チュウゴクオオサンショウウオ  
+ : 検出    - : 非検出

	地点	河口からの距離 (km)	Aj	Ad
揖斐川	① 伊勢湾	-1.0	-	-
	② 海津市	12.5	-	-
	③ 輪之内町	32.0	-	+
	④ 大村町	39.9	-	+
	⑤ 安八郡	42.0	-	-
	⑥ 瑞穂市	45.3	-	-
	⑦ 揖斐川町	61.0	-	-
	⑧ 徳山ダム	88.0	-	-
長良川	① 河口堰下	5.3	-	-
	② 河口堰上	5.6	-	-
	③ 海津市	13.7	-	-
	④ 岐阜市	28.0	-	-
	⑤ 鏡島	46.5	+	-
	⑥ 忠節町	50.2	+	-
	⑦ 関市	64.8	+	-
	⑧ 美濃市	77.2	+	-
	⑨ 美並町	94.8	+	-
	⑩ 郡上市	110.0	+	-

### 4 学会等での発表について

#### 4-1 一般の研究者と肩を並べた学会発表

高校生対象の発表会にとどまらず、爬虫両棲類学会では一般の研究者に肩を並べ、積極的に学会発表を行った。多くの研究者から、質問、コメント、励ましをいただき、生徒たちには大きな刺激となった。

2021年9月18~19日 日本爬虫両棲類学会第60回大会 (オンライン開催・ポスター発表)

演題: 岐阜県大垣市に生息するマホロバサンショウウオの生活史の解明 II

## 4-2 高校生対象の発表会

高校生対象の発表会にも、岐阜県内外を問わず、積極的に参加・発表を行った。  
高校生同士、お互いの発表を聴きながら、交流を深めることができた。

- ① 2021年9月20日 「集まれ！理系女子」女子生徒による科学研究発表Web交流会  
～第2回高校生両生類サミット～(オンライン開催・口頭発表)  
演題：「大垣市に生息するマホロバサンショウウオの生活史Ⅱ」  
「揖斐川になぜオオサンショウウオがいないのか？～特別天然記念物オオサンショウウオの生息条件の解明～」
- ② 2021年11月20～21日 環境DNA学会第4回大会(オンライン開催・ポスター発表)  
演題：「大垣市に生息するマホロバサンショウウオの生活史Ⅱ」  
「揖斐川になぜオオサンショウウオがいないのか？～特別天然記念物オオサンショウウオの生息条件の解明～」
- ③ 2021年12月11日 東海地区理科研究発表会(オンライン開催・口頭発表)  
演題：「大垣市に生息するマホロバサンショウウオの生活史Ⅱ」 **【学長賞(全体の第3位)受賞】**  
「揖斐川になぜオオサンショウウオがいないのか？～特別天然記念物オオサンショウウオの生息条件の解明～」
- ④ 2022年2月11日 「アユ・長良川等を対象とした調査研究」の成果発表会(オンライン開催・口頭発表)  
演題：「清流・長良川のオオサンショウウオ ～オオサンショウウオの生息条件の解明～」
- ⑤ 2022年3月19日 第69回日本生態学会高校生ポスター発表(オンライン開催・ポスター発表)  
演題：「大垣市に生息するマホロバサンショウウオの生活史Ⅱ」
- ⑥ 2022年3月28日 令和4年度日本水産学会春季大会高校生ポスター発表会(オンライン開催・ポスター発表)  
演題：「大垣市に生息する小型サンショウウオ類2種及びカエル2種のハビタット特性」 **【最優秀賞(第1位)】**  
「揖斐川になぜオオサンショウウオがいないのか？～特別天然記念物オオサンショウウオの生息条件の解明～」 **【優秀賞(第2位)】**

## 5 まとめ

2年間の助成を受けて、環境DNAのろ過、抽出、分析に関する機材が揃い、共同実施校の岐阜高校の先生や生徒の協力で、環境DNA分析のテクニックを身に付けることができた。この研究環境を活用し、環境DNAの分析を本格的に行い、成果をあげることができた。その成果を高校生対象の発表会にとどまらず、一般の学会にも積極的に参加し、成果を広く発信することができた。

## 謝辞

本研究は、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団科学教育振興【プログラム助成(2年目)】の助成を受けて実施した。高度な実験や考察、学会発表、研究成果の地域への還元等、今回のご支援なしでは、実現することはできなかった。今回のご支援により、本校の生徒が大いに成長することができた。心から感謝いたします。

## 参考文献

- 一般社団法人環境DNA学会編 2019 環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.1  
Oyake N, Sasaki N, Yamaguchi A, Fujita H, Tagami M, Ikeya K, Takagi M, Kobayashi M, Abe H & Kishida O. 2019. Comparison of susceptibility to a toxic alien toad (*Bufo japonicus formosus*) between predators in its native and invaded ranges. *Freshwater Biology*;65:240-252