

# 環境 DNA を利用した富山県氷見市内の生物相（絶滅危惧種等）調査 及び生物保全の教育実践活動

## — 一次期学習指導要領を見据えた探究活動 —



実施担当者 大阪学園大阪高等学校  
教諭 谷脇 鉄平

### 1 はじめに

環境問題は 21 世紀に解決すべき地球規模の危機的課題とされており、次世代の人材育成においても環境問題に関する教育は、重要な項目の 1 つである。事実、SDGs が国連サミットで採択され、2030 年までの国際目標とされている。しかしながら、昨今の子どもたちを取り巻く受験環境では、進学のための勉強に偏りがちとなり、自然と触れ合う体験が少ないことや、理科及び環境教育で重要な実験授業やフィールドワーク活動が困難であることも事実として存在している。

これまで本校科学探究部が取り組んできた「環境 DNA 分析を利用した生物相調査」の活動実績は、2017 年から始めた京都産業大学との共同研究(高大接続)は第 1 回及び第 3 回環境 DNA 学会(高校生部門：最優秀賞)等、2020 年から始めた富山大学学術研究部理学系の山崎裕治准教授との共同研究(高大接続)は第 4 回環境 DNA 学会及び令和 4 年度日本水産学会(高校生部門：最優秀賞)等で発表し、クラブ活動を通じた教育・研究実践が「高校生らしい活動」として評価いただいた。

また、科学探究部が主体的にクラブ外の生徒にも環境 DNA 体験ができるように 2021 年の夏休休暇に実習会を企画し、コロナ禍でありながらクラブ内外に問わず生徒たちにワクワク感を抱かせる「学びの実体験」を提供できた。

これらは、新学習指導要領(2022 年度実施)のねらいである探究活動の実践モデルになっただけでなく、文部科学省の「高大接続改革」や経済産業省の「未来の教室」にも関連するものになった。

### 2 研究目的

このような研究背景がある中、富山大学山崎准教授と共同研究(高大接続)を通じて、科学探究部の生徒たちが氷見市における魚類以外の希少種の生息状況を調べた。その結果、富山県氷見市で生息確認されているサンショウウオ類は、クロサンショウウオ<sup>1)</sup>及びヒダサンショウウオ<sup>2)</sup>の 2 種であったものの詳細な情報は無く、また、これまで富山県氷見市では環境 DNA 分析を利用したサンショウウオ類の生息状況調査は行われていないことが分かった。サンショウウオ類は、宅地開発や外来種等の影響により生息環境の分断や劣化が起きているため、絶滅が危惧されている。個体群を保護するためには、繁殖場所となる産卵巣穴や幼生・幼体の生息環境の保全が極めて重要であるが、幼生・幼体は隠遁性が強く、個体群が減少傾向、種類によっては夜行性であるため、直接個体を発見することは非常に困難な実情がある。その点、環境 DNA 分析は、直接生物種を確認する従来の方法に比べると調査域の水を汲むだけであるため、簡易かつ生物種を傷つけず、また、労力の削減や本校のように遠隔でも研究活動が可能である。

そこで、本研究では、氷見市ひみラボを拠点に、環境 DNA 分析によりクロサンショウウオ(環境省：準絶滅危惧)及びヒダサンショウウオ(環境省：準絶滅危惧、富山県：準絶滅危惧)の生息状況の把握から生徒たちが生物保全計画を立案し、これらの「学びの実体験」をアウトプットするために外部発表や入試選抜にも活用できる活動実績につなげながら、環境教育としての探究活動実践モデルを全国に広めることも併せて目的とする。

### 3 環境 DNA とは

自然環境(海・河川等)中に生息する魚や鳥を始めとする生物の DNA が、目には見えない状態で自然環境中に存在する。これを環境 DNA という。そのため、河川水を次世代シーケンサー(遺伝子の塩基配列を高速に読み込む装置)等を用いて分析することで、河川に生息する生物の種類や割合を迅速かつ定量的に測定することができる。捕獲調査が困難な環境においても、わずか1Lの採水で採水域周辺に生息する生物の把握や生態系の評価を可能とする画期的な手法である。

### 4 「環境 DNA」、「高大接続改革」及び「未来の教室」を活用した教育支援のねらい

- ①環境 DNA 分析で得られたサンショウウオ類の DNA 配列は、データベースの登録内容や図書に掲載されている情報だけでなく、目視調査等も併せて照合・解析することで、調査域におけるサンショウウオ類の生息分布の推定や環境 DNA 分析による定量的な遺伝的多様性の評価も期待される。また、サンショウウオ類は絶滅が危惧されているため、この探究活動を通じてサンショウウオ類の生態や保全調査の基礎情報を築くことができる。
- ②生徒たちが立案した保全計画や活動実践を、理科教育の現場や市民向けのイベント等で情報発信することで、多くの生徒や市民が身近な自然科学により興味関心を抱き、将来の進学目的や環境への意識等の芽生えにつなげたい。
- ③ワクワク感を抱かせる「学びの実体験」を提供することで、学問としての理科の重要性を生徒や教員が再認識するきっかけにつなげたい。
- ④これらの実体験を客観的に評価いただくためにも、積極的に学会等の外部発表に取組み、今後、社会で求められる「生きる力・タフな人間力を育む」ことをねらいながら、生徒たちの成長育成につなげたい。

### 5 研究計画及び実験方法

サンショウウオ類は種類によって異なるが、おおよそ1月～8月頃に繁殖期を迎える。クロサンショウウオ(止水性)及びヒダサンショウウオ(流水性)が生息する可能性のある溜池(止水性)や河川(流水性)を調査域とし、その調査域で採水した水から環境 DNA 分析によりクロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの生息状況調査を行った。なお、環境 DNA 学会が作成した標準版「環境 DNA 調査・実験マニュアル<sup>3)</sup>」の手順に沿って行ったため、詳細な手順は省略する。

以下の内容は、生徒が主体的に行ったものである。

#### <高岡龍谷高等学校理科部とのオンライン交流会> 2021年12月20日

富山大学山崎准教授から長年に渡り富山県内のサンショウウオ類の生息実態調査をされている高岡龍谷高等学校の中藪俊二先生をご紹介いただき、高岡龍谷高等学校理科部と本校科学探究部のオンライン交流会を実施した。

#### <サンショウウオ類の生息状況調査にかかる調べ学習> 2022年1月～2月

生息場所等の生態を図書館やインターネット等を用いて調べ学習を行った。

#### <富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)での生息状況調査> 2022年3月16日～18日

ひみラボを拠点にクロサンショウウオ等の探索合宿を行い、調査域の目視による調査活動、並びに調査域から採水し、採水サンプルⅠを入手した。また、高岡龍谷高等学校の中藪先生にクロサンショウウオの別の生息域での採水を依頼し、合宿時に併せて採水サンプルⅡを提供いただいた。

これらの採水サンプルから環境 DNA を抽出し、DNA サンプルを本校に持ち帰った。

**<クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの識別プライマーの設計・合成> 2022年4月～8月**

計画当初、抽出した環境 DNA サンプルを外部機関に発送し、環境 DNA 分析を委託する予定であったが、外部機関にクロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの識別プライマーが無く種の同定ができないことが 2022 年 3 月下旬に判明し、外部機関に識別プライマーの設計・合成を委託しようとした。ところが、日頃から環境 DNA に関してお世話になっている神戸大学の源利文教授から、「環境 DNA の研究は識別プライマーの作成が一番重要であるため、外部機関に委託せずに生徒自ら作成する方が主体的な学びに繋がる」と助言いただいた。そこで、トライ&エラーを繰り返しながら識別プライマーの作成を通じて生徒の主体的な学びを支援することにした。

NCBI<sup>4)</sup>、Primer3Plus<sup>5)</sup>及びSeaView<sup>6)</sup>を用いて、クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの識別プライマーを設計し、北海道システム・サイエンス株式会社に識別プライマー(各種フォワード及びリバースを1対)の合成を委託した。

**<クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの環境水からの DNA 抽出> 2022年6月～7月**

サンプル	クロサンショウウオ			ヒダサンショウウオ		
	環境水	飼育水	脱皮殻	環境水	飼育水	脱皮殻
I イダセンバラ保護池 (富山県水見市)	○	△	△	×	△	△
II ゆうれい池 (富山県南砺市)	○	△	△	×	△	△
III いしかわ動物園 (石川県)	△	○	○	△	○	○
IV 茶白山動物園 (長野県)	△	○	×	△	×	×
V 富士湧き水の里水族館 (山梨県)	△	○	×	△	×	×
VI 小矢部川 (富山県高岡市)	×	△	△	○	△	△

いしかわ動物園、茶白山動物園、富士湧き水の里水族館からクロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの飼育水等を提供いただき、それらの採水サンプルⅢ～Ⅴから環境 DNA を抽出した。

また、高岡龍谷高等学校の中藪先生にヒダサンショウウオの生息域での採水を依頼し、採水サンプルⅥを提供いただき、採水サンプルⅥから環境 DNA を抽出した。

図1 クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの採水サンプル

**<種特異的調査(PCR法及び電気泳動法)Ⅰ> 2022年7月～11月**

クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの識別プライマーと各サンプルⅠ～Ⅵを用いて実験を行った結果、各サンプルから種特異的増幅産物が全く確認されず、識別プライマーの脆弱性が見受けられた。

**<環境 DNA 学会 あなたが主役のワークショップ> 2022年11月19日**

ここまでの研究結果をオンライン発表し、「サンショウウオ類のユニバーサルプライマーで種特異的増幅産物が確認されるか検証することが望ましい」と助言いただいた。

**<サンショウウオのユニバーサルプライマーの合成> 2022年12月**

先行研究<sup>7)8)9)10)</sup>の識別プライマー情報をもとに、北海道システム・サイエンス株式会社に識別プライマー(フォワード及びリバースを1対)の合成を委託した。

**<種特異的調査(PCR法及び電気泳動法)Ⅱ> 2022年12月**

ユニバーサルプライマーと各サンプルⅠ～Ⅵを用いて実験を行った結果、一部のサンプルから種特異的増幅産物が確認され、サンプル中にサンショウウオ類の DNA が含まれていることが確認できた。

**<公益財団法人中谷医工計測技術振興財団 成果発表会> 2022年12月24日～25日**

ここまでの研究結果を口頭及びポスター発表し、「種特異的調査の成功の秘訣として、系統樹を作成しながら識別プライマーをより多く試すことが望ましい」と助言いただいた。

**<クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの識別プライマーの再設計・合成> 2023年1月**

サンショウウオ類の系統樹を作成し、クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの識別プライマーを再設計し、北海道システム・サイエンス株式会社に識別プライマー(各種フォワード及びリバースを7対)の合成を委託した。

**<種特異的調査(PCR法及び電気泳動法)Ⅲ> 2023年1月～2月**

再設計したクロサンショウウオの識別プライマーと各サンプルⅠ～Ⅵを用いて実験を行った結果、サンプルから種特異的増幅産物が確認され、一部の識別プライマーに有効性が確認された。

**<令和5年度公益財団法人日本水産学会春季大会> 2023年3月30日**

ここまでの研究結果をオンライン発表し、「研究計画がよく練られており、目的の達成に向けて着実に研究を進めることができている」と講評いただき、最優秀賞を受賞した。

## 6 実験結果

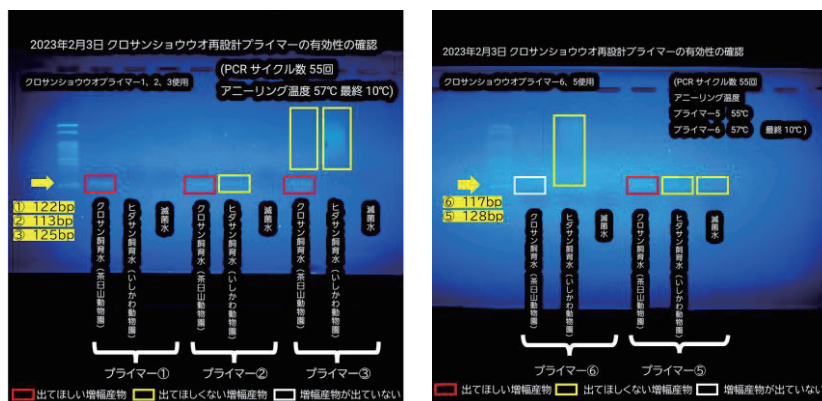


図2 再設計したクロサンショウウオの識別プライマーの有効性

再設計したクロサンショウウオの識別プライマー候補7対をPCR法及び電気泳動法を行った結果、図2のとおり、識別プライマー①に種特異的増幅産物が確認され、有効性が確認できた。なお、識別プライマー④及び⑦については、事前の実験で有効性が全く無かったため対象外とした。

## 7 今後の展望

本来であれば、クロサンショウウオ及びヒダサンショウウオの生息マップの作成を目指していたが、クロサンショウウオの識別プライマーの有効性の確認までに留まったことは大変残念である。しかしながら、約1年間の研究活動は令和5年度公益財団法人日本水産学会春季大会(高校生部門)で最優秀賞を受賞し、しっかりと生徒の育成を支援することができた。将来的には生息マップが作成できるように、引き続き生徒たちを支援していきたい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご支援をいただいた富山大学山崎裕治准教授及び高岡龍谷高等学校中藪俊二先生、いしかわ動物園、茶臼山動物園、富士湧水の里水族館、研究助成をいただいた公益財団法人中谷医工計測技術振興財団及び関係の方々へ深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 弘前大学フィールドサイエンス研究会 2017年3月7日付 氷見市でクロサンショウウオの個体を生息確認。  
<https://ameblo.jp/field-science-society/entry-12254168905.html>
- 2) 北日本新聞及び富山新聞 2020年4月2日付 氷見市でヒダサンショウウオの卵のうを発見。  
[http://library.city.himi.toyama.jp/news/Himi\\_kiji2020/kiji202004.html](http://library.city.himi.toyama.jp/news/Himi_kiji2020/kiji202004.html)
- 3) 環境DNA調査・実験マニュアル <https://ednasociety.org/manual/>
- 4) NCBI(National Center for Biotechnology Information) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 5) Primer3Plus <https://www.primer3plus.com/>
- 6) SeaView <https://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview3.html>
- 7) Katano *et al.*, 2017. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0176541>  
 「Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods」
- 8) Sakai *et al.*, 2019. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/edn3.31>  
 「Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis」
- 9) Takeshita *et al.*, 2020. <https://peerj.com/articles/9764/>  
 「Projection range of eDNA analysis in marshes: a suggestion from the Siberian salamander(*Salamandrella keyserlingii*) inhabiting the Kushiro marsh, Japan」
- 10) Jo *et al.*, 2020. <https://www.int-res.com/abstracts/esr/v43/p341-352/>  
 「Seasonal monitoring of Hida salamander *Hynobius kimurae* using environmental DNA with a genus-specific primer set」

以上