

陸水域における環境 DNA を活用した希少生物調査について

淡水魚類と両生類の調査事例

赤塚 真依子*¹・大井 涼太郎*²・渡邊 千佳子*²・内池 智広*²・高畑 陽*¹

Keywords : eDNA, biological survey, construction, amphibian, fish

環境 DNA, 生物モニタリング, 建設工事, 両生類, 魚類

1. はじめに

建設工事では、建設地とその周辺の自然環境に影響を与える可能性があり、特に里山など中山間地の開発では希少野生動植物や生態系の保全に向けた取り組みが必要となる。保全対象となる生物種は、地域や工種によって多種多様であり、例えば、河川付近やダムにおける工事では、魚類や陸水域に生息する生物が保全対象になることが多い。また、希少動植物の中でも両生類は、陸水域及びその周辺に生息して移動範囲が限定的である種が多いため、保全対象種に指定されやすい。建設工事期間中にその周辺に生息する動植物の保全対策では、保全対象種の生息する環境（河床地形、流れ、水質等）が変化する場合が多いため、保全対象地における生物調査を行い、保全対象となる動植物の分布や生物量の定期的な把握が重要となる。

一方、従来の生物調査は、踏査、捕獲など専門調査員による目視観察が主であり、労力が多大で、広域調査は日数が長期にわたるため、調査の頻度や範囲が限られる場合が多い。近年ではネイチャーポジティブに向けた取組みを行うプロジェクトも増えてきたことで、専門調査員の確保が困難になる場合もある。このような背景から、水域における新しい生物調査方法として、水域に存在する生物の組織片や排泄物などから生物由来の DNA を調べることで、その水域に生息する生物の情報（生物の種類、存否等）を得ることが可能な環境 DNA 分析が注目されている¹⁾。

環境 DNA 分析では、図-1 に示すように、河川やため池などから 1L 程度の水を採取し、ろ過操作によりろ紙に回収した試料残渣物から DNA を抽出する。抽出した

DNA には生物の組織片や排泄物に由来する様々な生物種の DNA が含まれているが、その中から対象とする生物種特有の DNA 配列を解読することで、多種多様な生物の存否を確認できる。環境 DNA 分析の現地作業は採水のみであるため負担が少なく、現地作業員の経験に左右されない調査ができ、捕獲などに比べ生息環境を荒らさないなどの利点がある。

環境 DNA の社会実装にむけては、環境 DNA 学会が 2018 年に発足し、環境 DNA 分析マニュアルが公開された²⁾。その後、国交省や土木研究所が中心となり、2019 年から河川水辺の国勢調査への活用が検討されている³⁾。また、環境省自然環境局生物多様性センターでは、2020 年に「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き」⁴⁾が公開され、2024 年には、両生類の事例を追加した「環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）」⁵⁾が公開され、両生類への展開も期待されている。

著者らは、本手法を建設工事の環境アセスメントや、施工中の保全対象とする動植物の生息確認を行うためのモニタリング方法として活用することを目指し、2016 年から建設現場への環境 DNA を活用した生物モニタリング技術の適用可能性について検討している。本報では、陸水域の各調査で得られた環境 DNA を活用した生物モニタリングの事例⁶⁻⁹⁾について報告する。



図-1 環境 DNA 分析の主な流れ

Fig.1 Flow of eDNA analysis

* 1 技術センター 社会基盤技術研究部 環境研究室

* 2 クリーンエネルギー・環境事業推進本部
自然共生技術部

2. 調査サイトと対象生物

2.1 ダム建設地におけるサクラマスの上流調査

調査対象としたダム建設地では、ダム上流に回遊魚の産卵場があり、回遊魚の上流をモニタリングする方法として、環境 DNA 分析の適用可能性を検討した（表-1）。ダム建設地を縦断する河川において、回遊魚が上流する期間を含む 6 ヶ月間に全 12 回の採水をした。ダム堤体近くの下流でサクラマスの DNA 量を定量 PCR 法によって測定し、堤体付近でビデオ撮影により測定したサクラマスの上流数（他機関実施）と比較した。

2.2 山間部造成地におけるサンショウウオ類の調査

調査対象とした造成予定地の周辺では、環境省レッドリスト 2020¹⁰⁾に記載のあるサンショウウオ科の一種が生息していた。希少動植物保護の観点から、本稿では調査対象種名を本サンショウウオと表記する。建設工事で土地を改変する前に、事業者が本サンショウウオの卵塊を移設する計画とした。本サンショウウオは、夜行性で成体の体長が 10cm 程と小さいため、湿地帯での成体の目視確認が難しい種である。本サンショウウオの継続的な生息状況を把握するため、卵塊を移設した湿地で定期的な採水を行い、環境 DNA の検出傾向を次世代シーケンサーによって確認した¹²⁾（表-1）。

2.3 自然整備地のため池群における両生類調査

自然再生事業の一環のため池の環境保全が行われている、久保川流域にある知勝院敷地内（岩手県一関市）のため池群で調査を実施した。本地域では、希少な両生類が多数確認されている（サンショウウオ科 2 種、イモリ類 1 種、及びカエル類 11 種）¹¹⁾。多くのため池の中から、開けた土地にある大きな A 池と樹林内の木陰の中にある小さな B 池を調査対象として選定した（表-2）。また、両生類は、ため池内の特定の場所に生息する性質があるため、面積が大きいため池では、採水地点によって環境 DNA 分析の検出結果が異なる可能性がある。そこで、本調査では、A 池に 5m×5m の調査区画（図-2）を設定し、ため池の沿岸部における調査区画の境界や調査区画外に設定した採水地点において、環境 DNA 分析用の水試料を表層から採取して、次世代シーケンサーによって配列を確認した^{12,13)}。

なお、専門調査員による従来の目視調査結果と比較するため、水試料の採取と並行して専門調査員が水上から調査区画内の水中にいる両生類の種類や位置を目視やタモ網を用いた捕獲により調べた。

表-1 調査概要(1)

Table 1 Overview of field survey(1)

	回遊魚調査	サンショウウオ調査
調査地	ダム建設地	山間部造成地
対象種	 サクラマス 都道府県指定保護種に指定されている魚類	生息地保護のため掲載なし 絶滅危惧Ⅰ類のサンショウウオ科の 1 種
採水地	河川	湿地
調査目的	回遊魚の上流確認	卵塊移設地の調査
採水期間	6 ヶ月・全12回	25 ヶ月・全16回
採水量	1 L	500mL
分析方法	定量PCR法 (qPCR)	次世代シーケンサー (NGS)

表-2 調査概要(2)

Table 2 Overview of field survey (2)

	ため池の比較調査	ため池内の採水地点調査
調査地	自然環境整備地のため池群（岩手県一関市）	
対象種	 アカハライモリ  ツチガエル  ヤマアカガエル  クロサンショウウオ  トウホクサンショウウオ  モリアオガエル等	
	両生類 サンショウウオ科 2 種、アカハライモリ 1 種、およびカエル類 11 種	
採水地	湿地	
調査目的	ため池環境の比較	ため池内の採水位置の検討
採水期間	2022年6月・8月	2023年6月・8月
採水量	500mL	
分析方法	次世代シーケンサー (NGS)	

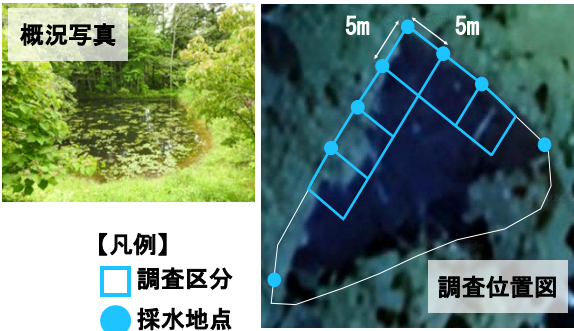


図-2 ため池内の採水地点および調査区画(A 池)
Fig.2 Water sampling point and survey area in reservoir A

3. 環境 DNA 分析

3.1 環境 DNA 分析手順

環境 DNA の分析手順を図-3、PCR の分析条件を表-3 に示す。環境 DNA 分析は、採水試料のろ過から DNA 抽出までは同じ作業であり、環境 DNA 学会のマニュアルに準拠した²⁾。現地で採水した試料は、微生物による DNA 分解を抑制するために試料 1L に対して塩化ベンザルコニウム 10%溶液を 1mL 添加し、実験室まで冷蔵して輸送した。採水日の翌々日までに、採水試料をろ過し、ろ紙を冷凍保存した。冷凍したろ紙から DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit) を用いて DNA を抽出した。回遊魚調査では、サクラマスの遺伝子を対象とした定量 PCR 分析(qPCR)して、検出された遺伝子コピー数を環境 DNA 量とした。両生類 (サンショウウオ類、イモリ科、カエル類) の調査では、NGS 解析^{12,13)}を行い、抽出した DNA 中の調査対象とする生物種の DNA 配列の有無を確認した。

3.2 ダム建設地におけるサクラマスの遡上確認

ダム建設地において、1 回の採水当たり 4 試料を分析したサクラマスの環境 DNA 量を図-4 に示す⁶⁾。各採水日における 4 試料の環境 DNA 量は、平均値から 10%以内の偏差に収まっており、水中においてサクラマスの環境 DNA はほぼ均一に存在していることが示された。環境 DNA 量は、6 月、7 月における値に対して、8 月～10 月上旬に高い値を示し、10 月上旬以降は 6 月と同程度の値まで減少した。

同時期にビデオカメラで計測したサクラマスの遡上数 (他機関実施¹⁴⁾) を図-5 に示す。この結果から、7 月中旬からサクラマスの遡上が確認され、8 月中旬～9 月末にかけて遡上の最盛期を迎えたことが確認された。遡上を確認した直後の 7 月 23 日の環境 DNA 量は、遡上前の 6/18 に比べて増加した。サクラマスの遡上最盛期である 8 月中旬以降、8/21～10/1 の間に採水した試料の環境 DNA 量は調査期間を通じて最も多くなった。サクラマスの遡上が終了した 10 月以降は、遡上前と同程度まで環境 DNA 量が低下した。

サクラマスの遡上数と採取した試料の環境 DNA 量 の関係を考察するため、週 1 回の頻度で採水した期間 (9/3～10/22) について、環境 DNA 量と遡上数の関係を図示した (図-6)。サクラマスの遡上数をビデオカメラで確認した地点と環境 DNA 分析用の水試料の採水地点が近かったため、環境 DNA 量と遡上数には概ね正の相関が得られた。以上の結果から、河川の定点において環境 DNA 分析を実施することにより、回遊魚

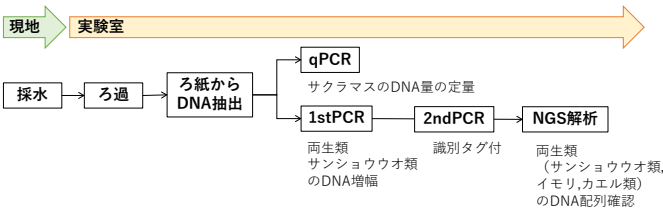


図-3 環境 DNA の分析手順

Fig.3 eDNA analysis procedure

表-3 環境 DNA 分析の PCR 条件

Table 3 PCR conditions of eDNA analysis

	qPCR分析	NGS解析
対象種	サクラマス	両生類・サンショウウオ類
温度条件	95℃ 10分 95℃ 15秒 } サイクル数 55回 60℃ 1分 4℃ ∞	95℃ 3分 95℃ 30秒 } サイクル数 55℃ 30秒 } 1stPCR 35回 72℃ 30秒 } 2ndPCR 8回 72℃ 5分 4℃ ∞
酵素	TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 10 μl	KAPA HiFi® Hot Start Ready Mix 12.5 μl
SDW	8.615 μl	9.5 μl
Primer F	0.18 μl	0.5 μl
Primer R	0.18 μl	0.5 μl
Probe	0.025 μl	—
環境DNA	2 μl	2 μl

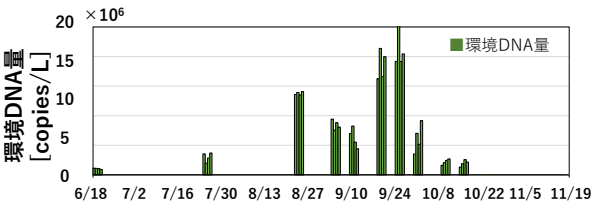


図-4 サクラマスの環境 DNA 量の推移

Fig.4 Changes in the amount of eDNA in cherry salmon

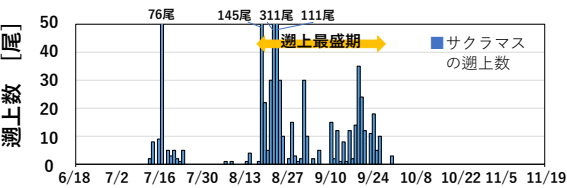


図-5 サクラマスの通過数 (他機関実施)

Fig.5 Number of cherry salmon passing through

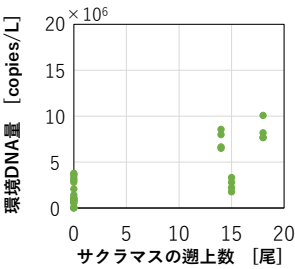


図-6 サクラマスの遡上数と環境 DNA 量 の関係

Fig.6 Relationship between the number of cherry salmon migration and the amount of eDNA

の遡上のような生物の移動状況をモニタリングできる可能性が示唆された。なお、本調査では、前日に降雨がない日を調査日として設定したが、流況（水量や濁度）が変化した時の影響については十分な検討ができていない。定期的に継続した調査を計画する場合の流況条件の設定については今後の検討課題と考えている。

3.3 山間部造成地におけるサンショウウオ類調査

現地調査は、本サンショウウオの保全対策として、工事エリアから保全エリアに卵塊が移設された地点で実施した（図-7、写真-1）⁷⁾。環境 DNA 分析を行うための水試料は、25 ヶ月間にわたって 16 回採取した。採取した水試料には DNA 回収・増幅効率を阻害する底泥が多く混合したため、ろ過時に濁質の混入を避けるため、水試料 1L に対して 500mL のみを濾過した。

2021 年は、2 月から 12 月まで、月 1 回の定期採水を行った結果、2 月から 8 月まで連続して本サンショウウオの環境 DNA が検出された（表-4）。図-8 にサンショウウオ類の一般的な生活史を示すが、卵塊から幼生までは水中に生息し、変態後、幼体および成体は陸上で生活する。本サンショウウオの産卵期は初春であり、幼生が変態して水中から陸上に移動するのが夏頃である。この間に継続して本サンショウウオの環境 DNA が確認できたことから、従来の目視調査では、卵塊時期以外の目視確認が困難になるが、環境 DNA 分析では、従来調査に比べて長期的なモニタリングが可能となった。また、環境 DNA 分析を活用することで、本サンショウウオのふ化後の生存可能性や幼生が幼体となって陸上に上陸した時期を推定できる可能性が示唆された。

3.4 自然整備地のため池群における両生類調査

3.4.1 ため池の比較調査

自然整備地のため池群の中で選定した 2 つの池の調査結果を比較すると、開けた大きな A 池で 7 種、樹林内の木陰にある B 池で 9 種となり、A 池に比べ B 池の方が環境 DNA の検出された種数が高い傾向があった（表-5）⁸⁾。A 池でのみ、水田などの開けた環境を好むシュレーゲルアオガエルが検出され、樹林近くの木陰にある B 池でのみ、森林内の流れを好むタゴガエルや水温が低い水域を好むアカハライモリ、外来種のウシガエルが検出された。この結果から両生類の環境 DNA 調査では、採水地点の環境条件（水深、明暗、広さ等）によって結果が異なることが示唆された。そのため、より正確な情報を得たい場合には、同一地域内であっても多様な環境条件下にある地点で採水する必要があると考えられる。

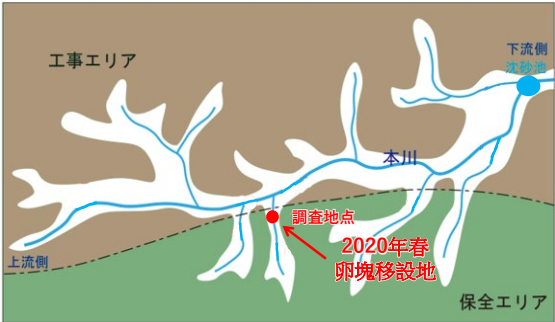


図-7 調査地及び調査地点

Fig.7 Survey area and sampling point



写真-1 採水地点の状況（2020 年 2 月）

Photo.1 Water sampling point

表-4 環境 DNA 分析結果

Table 4 Results of eDNA detection in reservoirs

			環境DNA分析結果		
			2020年	2021年	2022年
1月	繁殖期		降雪のため未実施		
2月		水中	●	●	●
3月		水中	—	●	—
4月	幼生期	水中	—	●	—
5月		水中	—	●	—
6月		水中	—	●	—
7月		水中	—	●	—
8月		水中	●	●	—
9月	変態～ 陸上期	陸上	×	×	—
10月		陸上	—	×	—
11月		陸上	×	×	—
12月		陸上	—	×	—

●：環境DNA検出 ×：環境DNA非検出 —：未実施



図-8 サンショウウオ類の一般的な生活史

Fig.8 General life history of salamanders

表-5 ため池における環境 DNA 検出結果

Table 5 Results of eDNA detection in reservoirs

検出地点	生物種名
両地点 (地点A・B)	ニホンアカガエル・ヤマアカガエル モリアオガエル・ツチガエル クロサンショウウオ・トウホクサンショウウオ
	シュレーゲルアオガエル
	タゴガエル・アカハライモリ・ウシガエル
地点Aのみ	
地点Bのみ	

3.4.2 ため池内の採水地点検討

調査対象の両生類のうち、代表的な生物種について、環境 DNA 分析が検出された位置と目視および捕獲調査で生体が確認された位置を図-9 に示す⁹⁾。なお、捕獲調査については、正確な確認位置の把握が困難なため、生物の存在が確認できた場合は確認位置を調査区画の中央にプロットした。

アカハライモリは 6 月と 8 月に、クロサンショウウオは 6 月に、目視および捕獲調査で多数確認された。これらの種は環境 DNA 分析において、全ての採水地点で環境 DNA が検出された (図-9 a, b)。一方、ニホンアカガエルやモリアオガエルなどは、目視および捕獲調査で水中でほとんど確認できなかったが、環境 DNA 分析では調査対象としたほとんどの地点で検出された (図-9 c, d)。これらの種は、調査日に調査対象池の周辺の陸上で複数個体が確認されており、調査実施時には水中にいる様子を確認できなかったものの、調査実施時ではない時間帯に水辺に滞在していたと推察され

る。調査対象のため池やその周辺で数多く生息する生物種を、環境 DNA 分析で調査する場合には、ため池のどの地点で採水しても生息の有無を概ね確認可能であると考えられた。

一方、ニホンアマガエルやトウキョウダルマガエルなどは、目視および捕獲調査で水中にいる様子が確認される頻度は少なかった (図-9 e, f)。これらの種は、水中にいる様子が確認されることは非常に稀で、調査実施時に対象地周辺の陸上でもほとんど確認されなかったため、調査対象池やその周辺における個体数も少なかったと考えられる。環境 DNA の検出状況と目視および捕獲調査結果の間に一定の傾向はなく、環境 DNA が検出される地点とされない地点が混在した (図-9 e, f)。このように、環境 DNA 分析を用いて、生息数が少ない生物種を調査する場合や、なるべく多くの種類の両生類を調査したい場合には、複数地点から採水した試料を混合して一つの試料として測定するなど、試料の採水手法の工夫が必要であることが示唆された。

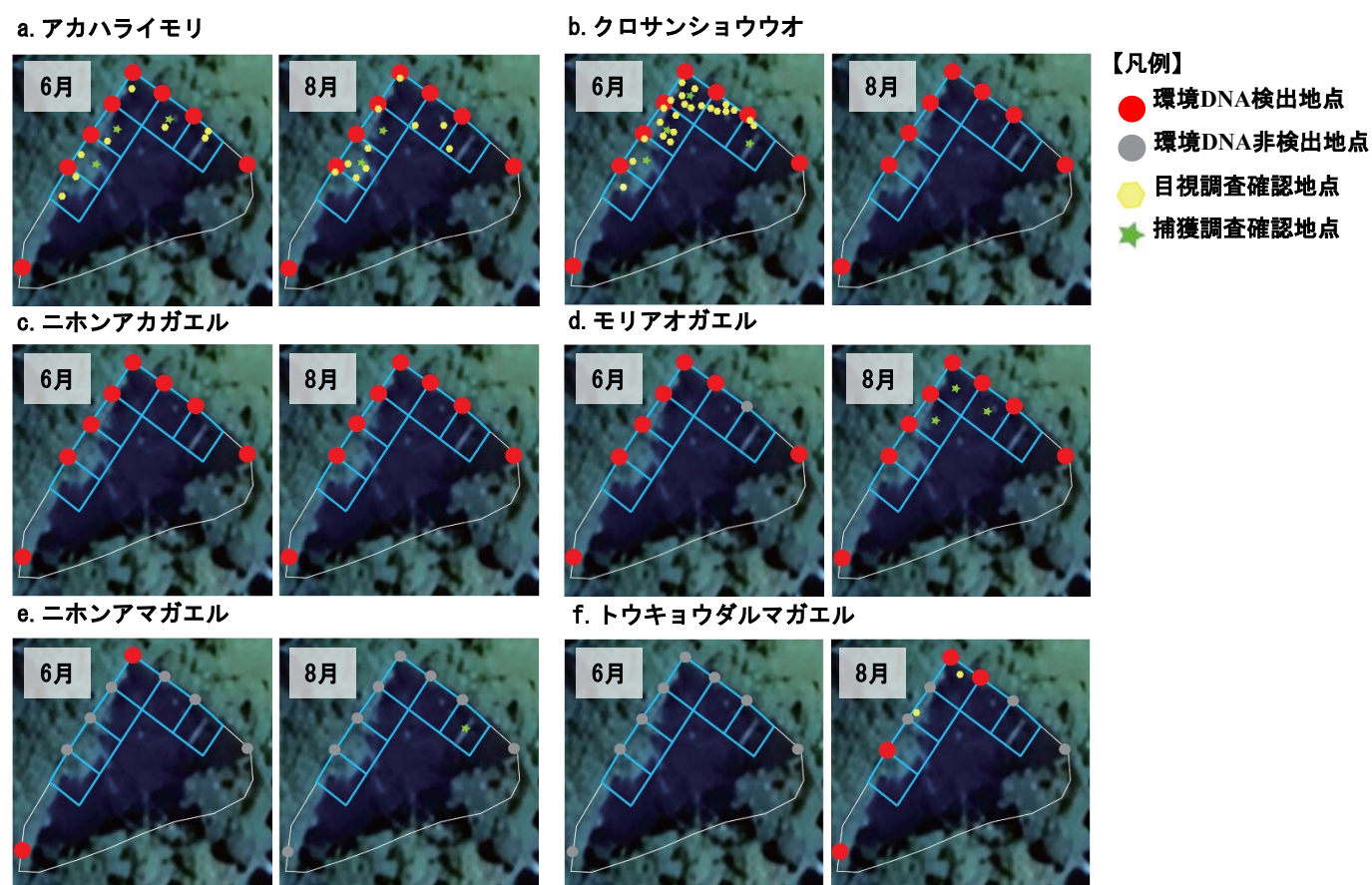


図-9 生物種ごとの環境 DNA 分析の結果と目視・捕獲調査の確認位置図 (衛星写真の出典：Google Map)

Fig.9 Results of eDNA analysis for each species and confirmation location map of visual and capture surveys

4. おわりに

ダム建設地、造成現場、保全地のため池において魚類、両生類を対象とした環境 DNA 調査を実施した。その結果、いずれの調査でも目的とする対象種を環境 DNA 分析で確認でき、様々な環境下における生物調査への適用性を実証できた。

建設工事では土地改変等による生態系への影響が避けられないが、希少種の生息地等において環境 DNA 分析を活用することにより、保全対策の有効性の確認や、異変があった際の早期対策が行える可能性がある。今後も環境 DNA 分析を建設工事に関連した生物モニタリングへの活用に向けて、様々な調査を継続していく予定である。

謝辞

久保川イーハートブ自然再生研究所には、長年にわたり保全されたきた地域における両生類をはじめとする希少動植物の既往調査結果のご提供、現地調査へのご協力、ご指導をいただきました。感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 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, 日本生態学会誌, 66, pp.583-599, 2016.
- 2) Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., Nakamura, K., Takahara, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Iwasaki, W., Kasai, A., Masuda R. & Uchii K.: An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, *Environmental DNA*, Vol.3, 8-13, 2021.
- 3) 村岡敬子, 菅野一輝, 篠原隆佑, 天羽淳, 中村圭吾: 河川水辺の国勢調査への環境 DNA 導入に向けた取組み, 土木技術資料, 64, 5, pp.12-17, 2022.
- 4) 環境省自然環境局生物多様性センター: 環境 DNA 分析技術を用いた湛水魚類調査手法の手引き第 1 版, pp.1-47, 2020.
- 5) 環境省自然環境局生物多様性センター: 環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き (淡水魚類・両生類) 第 1 版, pp.1-136, 2024.
- 6) 赤塚真依子, 高山百合子, 伊藤一教: 河川における環境 DNA を活用した魚類遡上のモニタリングに関する検討, 第 47 回土木学会関東支部技術研究発表会, II, 42, pp.1-2, 2020.
- 7) 赤塚真依子, 内池智広, 高山百合子, 渡邊千佳子, 望月聖, 神野桂子, 守田巧, 古屋俊祥, 佐藤寛和: 建設工事現場における環境 DNA を活用した希少両生類の年間調査, 土木学会全国大会第 77 回年次学術講演会, VII, 19, pp.1-2, 2022.
- 8) 大井涼太郎, 渡邊千佳子, 内池智広, 赤塚真依子: 環境 DNA を用いた希少両生類の生息状況調査, 土木学会全国大会第 79 回年次学術講演会, VII, 48, pp.1-2, 2023.
- 9) 大井涼太郎, 渡邊千佳子, 内池智広, 赤塚真依子: 同一ため池内の異なる採水地点における環境 DNA の検出傾向について, 土木学会全国大会第 79 回年次学術講演会, VII, 82, pp.1-2, 2024.
- 10) 環境省: 環境省レッドリスト, 2020.
- 11) 須田真一: 久保川イーハートブ世界の自然といきもの, 環境省東北地方環境事務所発行, pp.1-32, 2013.
- 12) Sakai Y., Kusakabe A., Tsuchida K., Tsuzuku Y., Okada S., Kitamura T., Tomita S., Mukai T., Tagami M., Takagi M., Yaoi Y. and Minamoto T.: Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis, *Environmental DNA*, Vol.1, Issue3, pp.281-289, 2019.
- 13) Sakata, M., Kawata M., Kurabayashi A., Kurita T., Nakamura M., Shirako T., Kakehashi R., Nishikawa K., Hossmann M., Nishijima T., Kabamoto J., Miya M. and Minamoto T.: Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia, *Metabarcoding and Metagenomics*, Vol.6, 15-26, 2022.
- 14) 天塩川魚類生息環境保全に関する専門家会議: 天塩川における魚類等の生息環境保全に関する平成 30 年度年次報告書, p47, 2019.