



両生類の生息状況の把握に向けた取り組み

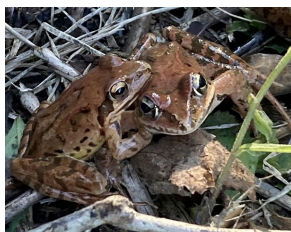
大成建設株式会社

- ✓ 両生類の生息状況調査の高度化を目指し、環境DNA分析による高頻度調査を検討した。
- ✓ 高頻度調査は、生息状況を連続的に把握し、自然再生や移植の経過、異変を知ることへの利用が期待できる。
- ✓ 両生類の環境DNA調査では、生活史（水陸利用時期）と環境DNAの有無に関係が得られている。
- ✓ 両生類の調査における環境DNA分析の課題として、環境DNAの検出傾向や分解傾向を把握し、両生類の現地調査での試料採取方法や分析手法を確立することが挙げられる。
- ✓ 課題解決のために、水槽試験により両生類の環境DNAの異なる水環境での分解状況を把握すると共に、現地調査を実施して採水地点や時間帯における生物種別の環境DNAの検出傾向を調査した。

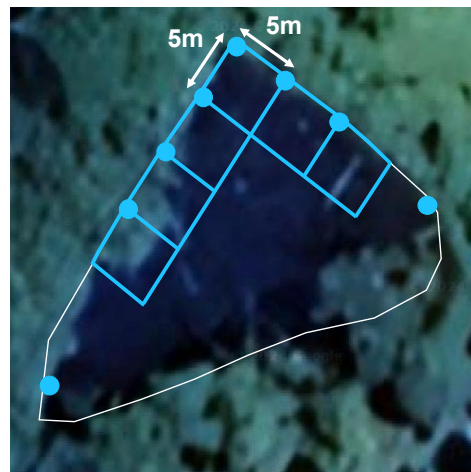
- ✓ 環境DNAの水中での分解状況を把握するため、水槽実験を実施した。現地水を用いた飼育では生体取り出し後の環境DNAの残存期間が短かった一方で、蒸留水を用いた飼育では、生体取り出し後の環境DNAの残存期間が長くなることを確認できた。
- ✓ 現地調査として、5m間隔で区切ったため池内の採水地点で採取した試料では、生息数が多い生物種は概ねどの地点においても環境DNAを検出できた。一方、生息数が少ない生物種については検出の有無のばらつきが大きかったことから、採水地点を複数設置するなどについて考慮する必要がある。

水槽実験による環境DNAの分解特性の把握

- ・対象種：アカガエル類 幼生（5匹、25匹）
ヤマアカガエル 成体（2匹、10匹）
- ・採水：10分、30分、2時間、4時間、24時間後
- ・分解確認：24時間後、48時間後



現地調査による環境DNAの検出特性の把握



- ・対象種：カエル類
サンショウウオ科
アカハライモリ
- ・調査：6月、8月
- ・目視：5分間（岸から）
- ・採捕：タモ網
- ・採水：1L

造成工事中に実施した希少両生類の長期モニタリング結果

2020年

2021年

2022年

		2月	8月	9月	11月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	2月
生活史		産卵	水中	陸上	陸上	産卵	産卵	水中	水中	水中	水中	水中	陸上	陸上	陸上	産卵
調査結果	環境DNA	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
	目視	○	—	—	—	○	—	—	—	—	—	—	—	—	—	○



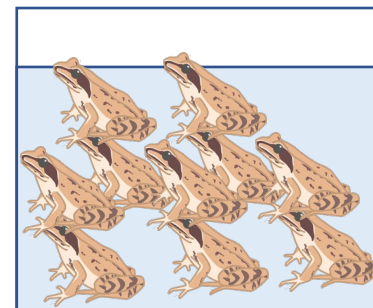
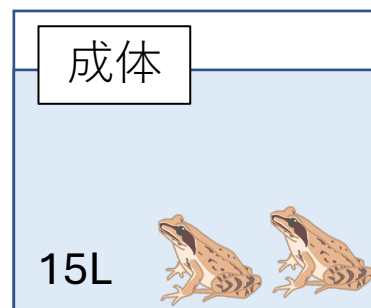
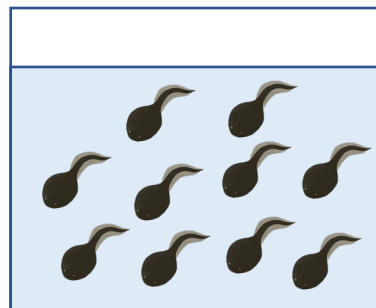
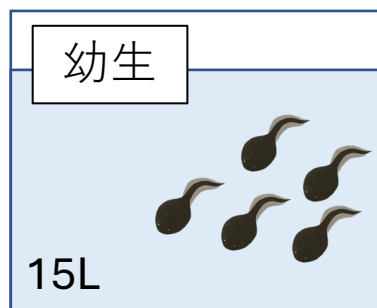
- ✓ 両性類の環境DNA調査：生活史（水陸利用時期）と環境DNA有無に相関あり。
- ✓ 年に1回の従来調査と比較して、定点での高頻度調査は、生息状況を連続的に把握するため、移植などの影響で生物の存在状況に異変が生じている可能性を確認できる。

■目的：環境DNAの検出および分解特性の時間経過の観察

⇒捕獲した幼生、成体を水槽に投入し、環境DNAの検出状況を把握

■試験条件

- ・対象種：アカガエル類 幼生（5匹、25匹）
ヤマアカガエル 成体（2匹、10匹）
- ・水槽水：蒸留水（総量15L、採取量3L）
- ・試料採取 水槽投入後 **10分、30分、60分、120分、240分、24H**
水槽から生体取り出し後 **24H、48H**
- ・環境DNA分析：Amph16S領域（ユニバーサルプライマー領域）
- ・分析方法：定量PCR法

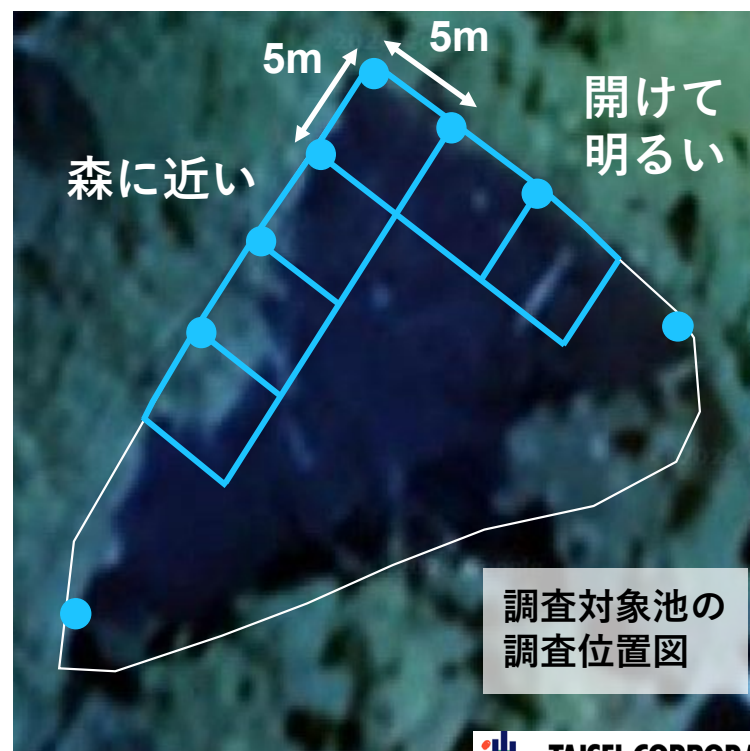
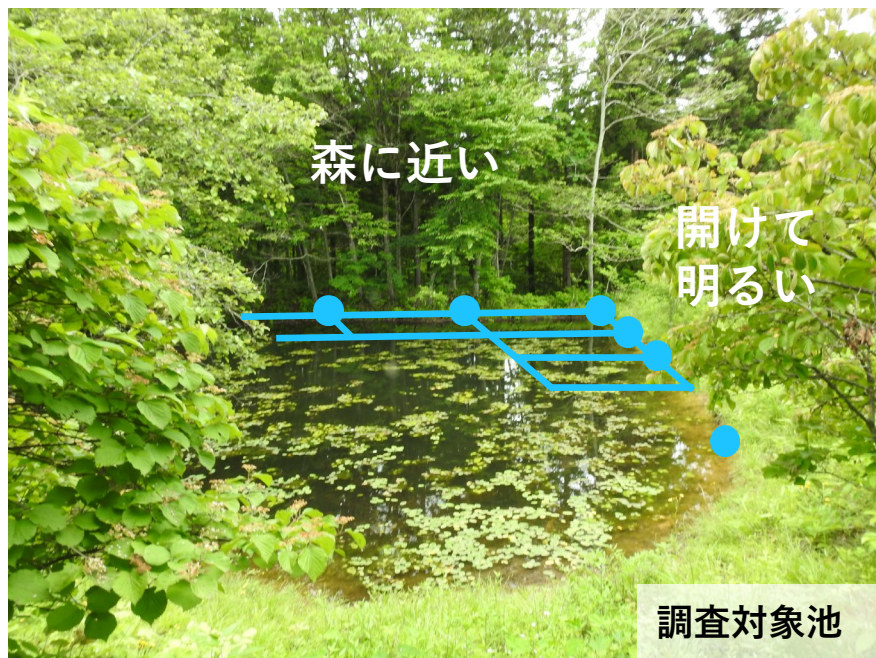


■目的：両生類が好む場所の偏りと環境DNA分析の採水地点の関係の把握

⇒ため池に複数の採水地点を設け、両生類の環境DNAの検出状況を整理

■調査区画・採水地点の設定

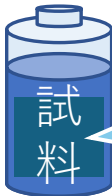
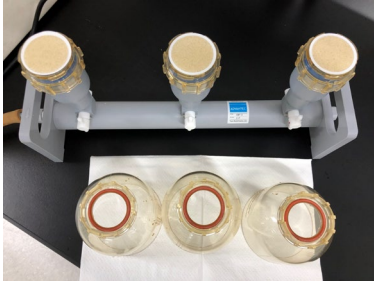
- 調査対象池には、面積が大きく、希少な両生類6種が確認されている池を選定。
- 5m×5mの調査区画と、調査区画の境界や調査区画外に採水地点8点を設定。



【凡例】 □ 調査区画 ● 採水地点

■環境DNA分析

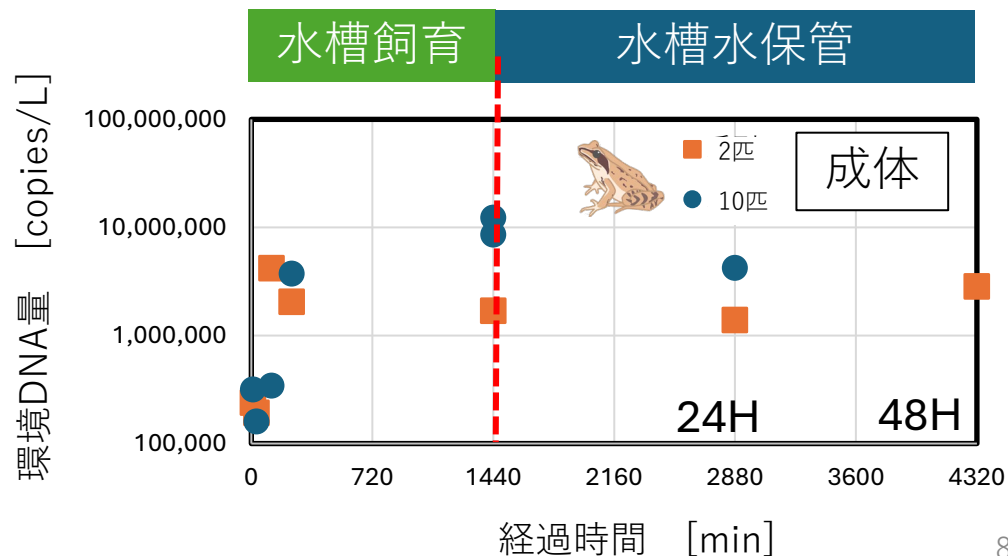
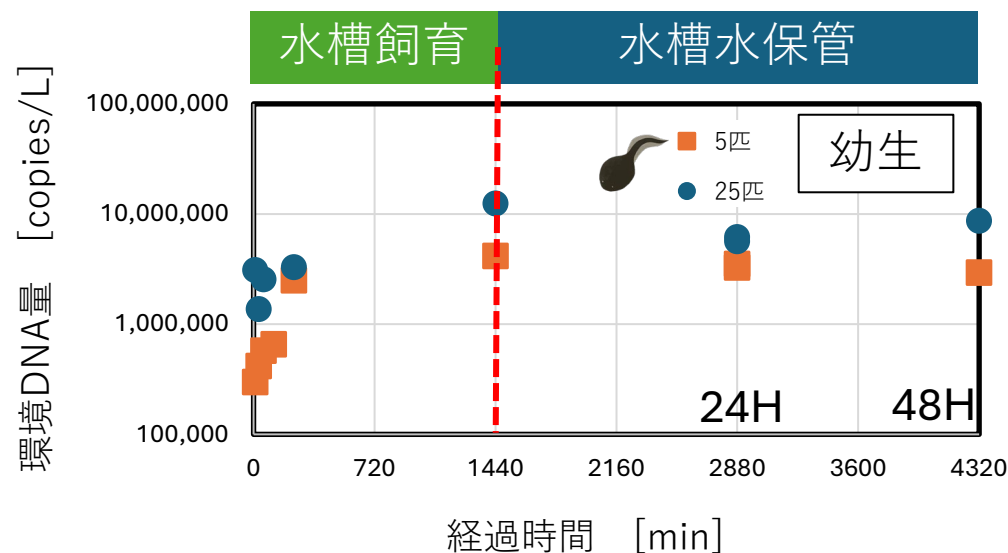
- 現地で採取した試料は、両生類（Amph16S）¹⁾・サンショウウオ科（12S rRNA）²⁾を対象とする2種類のプライマーを使用してDNA分析。

現地	 - 表層から採取 - 冷蔵輸送  塩化ベンザルコニウム10% 水溶液（1ml/L）を添加 （輸送中のDNA分解の抑制）
実験室	採水翌日  ろ過 （250ml）   ろ過後、ろ紙 を冷凍保存
	分析当日  ろ過残渣から DNA抽出   - NGS解析を実施 - 対象種のDNA 増幅の有無を 確認

水槽実験の結果



- ✓ 生体数が多いとDNA量は高い傾向
- ✓ 蒸留水との接触10分後から環境DNAは検出
- ✓ 蒸留水の場合、生体取り出して48時間後も環境DNAが残存



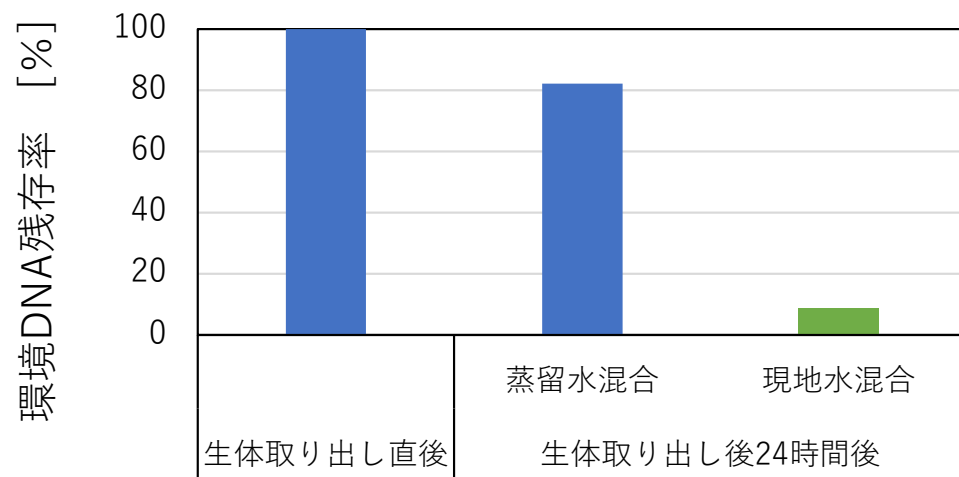
水槽実験の結果



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目2 環境DNAの活用による環境調査の高度化

■飼育24時間後、生体を取り出した直後の環境DNAの残存率



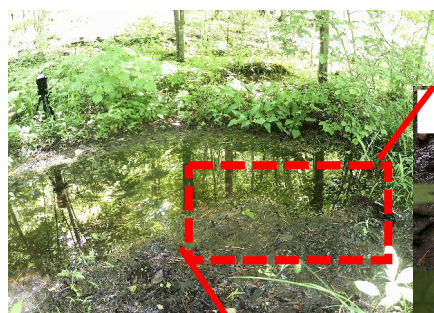
✓ 蒸留水混合条件

残存率80%以上 ⇒ 環境DNAが残存

✓ 現地水混合条件

残存率10%以下 ⇒ 環境DNAが減少

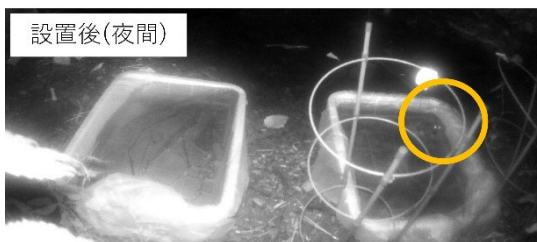
■設置型採取容器の検討



設置直後(昼)



設置後(夜間)



✓ 定点観測 4 回調査 × 6月、8月
両生類 **7種～10種検出**
(全11種)

✓ 蒸留水による水場創出
両生類 **11種検出**
(48時間設置)

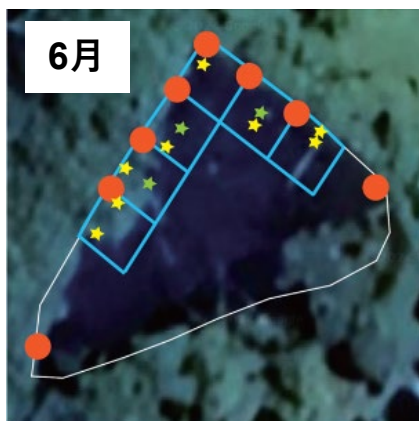
目視・捕獲調査：アカハライモリ、クロサンショウウオは**水中**にいる個体を確認。
ニホンアカガエル、モリアオガエルは**陸上**で多くの個体を確認

環境DNA分析：概ね、採水地点から環境DNAを検出

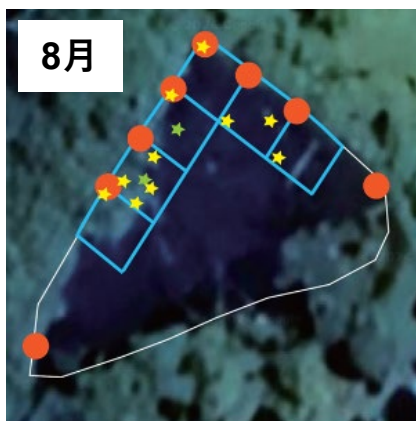
アカハライモリ



6月



8月



【凡例】

● 環境DNA検出地点

● 環境DNA非検出地点

★ 目視調査確認地点

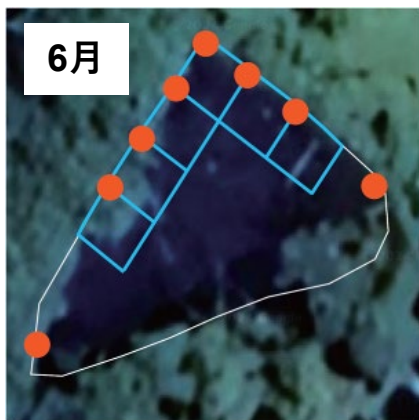
★ 捕獲調査確認地点※

※正確な位置の把握が困難なため、暫定的に調査区画の中央にプロット

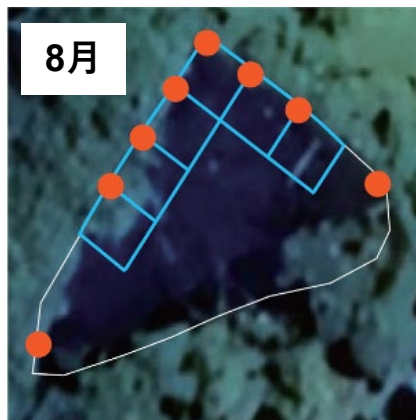
ニホンアカガエル



6月



8月



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)

■アカハライモリ・クロサンショウウオ・ニホンアカガエル・モリアオガエル

- 調査対象池やその周辺に多数生息すると推察。
- 環境DNAが広く検出される。

水中で多数確認



アカハライモリ



クロサンショウウオ

水中では未確認だが、陸上で多く確認



ニホンアカガエル



モリアオガエル

調査対象池やその周辺に多数生息

+

環境DNAが広く検出

生息数が多い種では、調査対象池のどの地点で採水しても生息の有無を概ね確認可能

目視・捕獲調査：ニホンアマガエル・トウキョウダルマガエルは、**水中**、**陸上**にいる様子がほとんど確認できなかった。

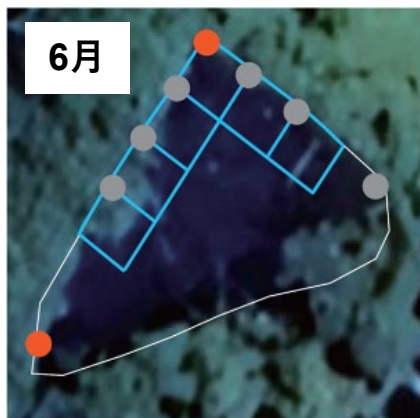
環境DNA分析：環境DNAの検出/非検出の地点が混在。

⇒環境DNA分析と目視・捕獲調査の結果にも一定の傾向は見られない。

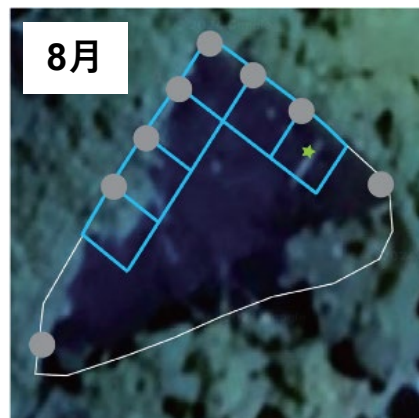
ニホンアマガエル



6月



8月



【凡例】

● 環境DNA検出地点

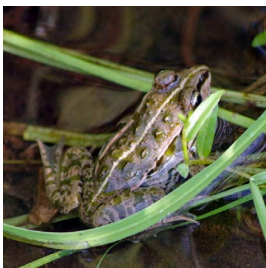
● 環境DNA非検出地点

★ 目視調査確認地点

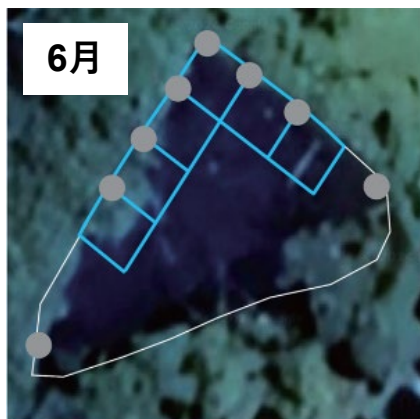
★ 捕獲調査確認地点※

※正確な位置の把握が困難なため、暫定的に調査区画の中央にプロット

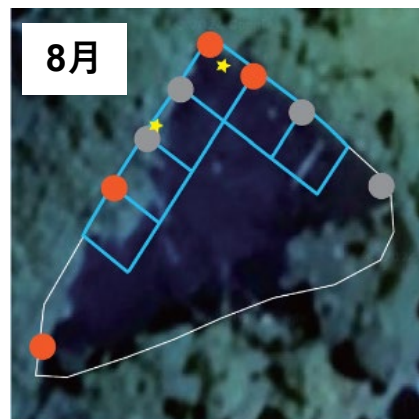
トウキョウダルマガエル



6月



8月



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)

■ニホンアマガエル・トウキョウダルマガエル

- ・ 調査対象池やその周辺の生息数が少ないと推察
- ・ 環境DNAの検出/非検出の地点が混在、環境DNAと目視・捕獲調査の結果に一定の傾向がない。

水中・陸上



ニホンアマガエル



トウキョウダルマガエル

調査対象池やその周辺の生息数が少ない

+

- ・ 環境DNAの検出/非検出の地点が混在
- ・ 環境DNAと目視・捕獲調査の結果に一定の傾向がない。

生息数が少ない種で、環境DNAの検出率を高めるためには試料の採取方法の検討が必要

例：採水地点を多く設定する
複数地点の試料を混合する

- ✓ 水槽実験の結果、生体と水との接触時間が10分程度でも、環境DNAとして検出できる生物断片等が放出されている可能性を確認した。
- ✓ 蒸留水のみの条件では環境DNAは数日経過後も検出でき、現地水と混合した条件では環境DNAが短時間で検出されにくくなった。
- ✓ 環境DNAは、実環境で現地の微生物等により速やかに分解されていると推察された。したがって、分解状況を考慮した採水方法や採水計画を立案することが重要となる。
- ✓ 生息数が多い生物種の現地調査では、5 m間隔で採水地点設定した場合にどの地点で採取しても環境DNAを検出でき、生息の有無を概ね把握できることを確認した。
- ✓ 一方、生息数が少ない生物種の調査を実施する場合、採水地点を複数設置するなど試料採取を考慮することで、検出できる可能性がある。
- ✓ 今後も、両生類の生息調査における環境DNAの活用に向けて、模擬的な環境下や現地調査での環境DNAの分析結果を積み重ねていく必要がある。

1. Sakata, M., Kawata, M., Kurabayashi, A., Kurita, T., Nakamura, M., Shirako, T., Kakehashi, R., Nishikawa, K., Hossman, 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*, Volume 6, pp.15-26, 2022.
2. 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*, Volume 1, Issue3, pp.281-289, 2019.
3. 赤塚真依子, 大井涼太郎, 渡邊千佳子, 内池智広: 環境DNA調査における両生類のDNA分解特性, 土木学会全国大会第78回年次学術講演会, VII-49, pp.1-2, 2023.
4. 大井涼太郎, 赤塚真依子, 渡邊千佳子, 内池智広, 須田真一, 佐藤良平: 同一ため池内の異なる採水地点における両生類の環境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.
5. 赤塚真依子, 大井涼太郎, 渡邊千佳子, 内池智広, 須田真一, 佐藤良平: ため池における環境DNAの検出種数の時間変化と設置型採取容器の検討について, 土木学会全国大会第79回年次学術講演会, VII-83, pp.1-2, 2024.