

# DNA を用いた生息地分断影響予測モデルに関する研究

## Studies on the impact prediction model of habitat fragmentation using fecal DNA

(研究期間 平成 20～22 年度)

環境研究部 緑化生態研究室  
Environment Department  
Landscape and Ecology Division

室長 松江 正彦  
Head Masahiko MATSUE  
研究官 園田 陽一  
Researcher Yoichi SONODA

In order to develop DNA technique for road environmental assessment, we identified Japanese hare (*Lepus brachyurus*) individuals and sex using fecal DNA. A study area was both sides on the Route 289 road kashi in Fukushima prefecture. We sampled 96 fecal pellets on the tracks of individuals and identified 13 individual hares (6 males and 7 females) were identified. As a result, it is estimated that two hares crossed under the Karasawa bridge.

### [研究目的及び経緯]

道路事業における野生哺乳類の環境影響評価では、目視または痕跡調査によって、事業エリアの周辺部に生息する動物種をリストアップする。その結果、重要な種あるいは注目種が確認された場合には分布範囲を推定し、計画路線が移動経路を横断すると予測される場合には道路敷地内への侵入防止柵と橋梁、ボックス等の横断施設の設置が検討される。

しかし、分布範囲や移動経路は、痕跡調査と一部ラジオテレメトリー調査により得られる個体レベルの行動圏や移動パターンの断片的なデータから推定しており、簡易にかつ精度の高い調査手法の開発が求められている。さらに道路による分断において、どの程度の個体及び個体群間の交流が行われれば、保全目標とする種が存続可能であるのかといった予測評価手法の開発も求められている。

近年では、野生動物の糞や獣毛から微量な DNA を抽出し、個体識別による生息数の推定や個体群間の遺伝的交流を予測・評価する手法が確立されつつある。この方法は、直接観察や捕獲を伴う行動圏調査と比較すると、サンプリングが容易であり、DNA が標識として用いられるので、半永久的な個体の追跡が可能であるといった利点がある。

本研究では、まず文献調査により現地調査において DNA 分析が適用できる種を選定した。次に、選定種について実際に DNA 分析により、調査地内の個体数、性比、親子鑑定の把握や個体識別された個体の行動パターンを調べ、道路事業における環境影響評価技術手法として、DNA 分析を活用した新たな技術手法の方向性

等を明らかにすることを目的とした。

### [研究内容]

(1) マイクロサテライトマーカーによる個体識別法の適用可能性

検索エンジンとして CiNii (<http://ci.nii.ac.jp/>) を用いて、糞や獣毛から採取された DNA を基に個体識別を行った研究について文献調査を行った。その結果、糞抽出 DNA による個体識別のプロトコルが現在確立されている種は、ツキノワグマ、ニホンジカ、ニホンアナグマ、ホンダヌキ、ニホンノウサギ、ホンドテンの 6 種であった (表 1)。この中で、糞のサンプリングが容易な種は、ニホンジカ、ニホンノウサギ、ホンドテンの 3 種が考えられる。本研究では、もっとも個体識別率が高いノウサギを選定した。

(2) ノウサギの糞の回収

福島県南会津郡下郷町の国道 289 号線甲子道路 (図 1) の国土交通省管轄区間約周囲 1km において、ノウサギの糞抽出 DNA 用のサンプルを 2009 年 1 月 6 日～8 日、2009 年 2 月 24 日～27 日、2010 年 2 月 24 日～26 日に調査を行った。甲子道路両側の平坦地においてノウサギの各個体の足跡をトレースし、足跡上からなるべく新鮮な糞を回収することに努め、新鮮な糞が見つからない場合には、やや古い糞を回収した。なお、雪表面にある糞を新鮮な糞とし、雪中に沈んでいる糞を古い糞とした。また、糞を回収する際には位置情報を GPS (Garmin 社製) により記録した。

(3) 糞抽出 DNA による個体識別

2009 年 1 月 6 日～8 日に採取した糞 96 サンプル、2009 年 2 月 24 日～27 日に採取した糞 156 サンプル、2010

表1 糞抽出 DNA による個体識別が可能な哺乳類種

調査種名	学名	調査内容	採餌様式	DNAによる個体識別			個体識別可能率		出典	
				使用部位	資料のサンプリング方法	サンプリング時期	マーカー数	春～夏		冬
ツキノワグマ	<i>Ursus thibetanus</i>	①雌雄判別	雑食性	毛	ヘアートラップ	2003年5月～2005年12月(1～4月の冬眠期間は除外)	10座位	47%		大西ら(2008)
		②個体識別		糞		2004年6月～9月	8座位			山内ら(2004)
				唾液	被害穀物	2004年夏	6座位	30%		Saito et al.(2008)
ニホンカモシカ	<i>Capricornis crispus</i>	①雌雄判別	草食性	糞	ため糞から採取		シロイワヤギ29座位から選別			西村(2006)
		②個体識別								
ニホンジカ	<i>Cervus nippon</i>	個体識別	草食性	糞	①有害鳥獣駆除 ②動物園	冬季(11月～3月)	4座位	51%		宮崎ら(2000)
ニホンイノシシ	<i>Sus scrofa</i>	個体識別	雑食性	毛	ヘアートラップ	2004年6月～12月		8%		石川ら(2006)
ニホンアナグマ	<i>Meles meles anakuma</i>	①種判定	雑食性	糞	ため糞から採取(鹿児島県川内)	2006年11月	6座位			松木ら(2009)
		②雌雄判別								
		③個体識別								
ホンドタヌキ	<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>	①種判定	雑食性	糞	ため糞から採取(我孫子)	2005年11月～2006年2月	8座位			松木ら(2006)
		②雌雄判別								
		③個体識別								
ニホンノウサギ	<i>Lepus brachyurus</i>	①個体識別	草食性	糞	100m×100mメッシュ内のサンプリング	①スギ林:2003年1月	7座位	7～35%	100%	松木ら(2004)
		②雌雄判別				②ブナ林:2003年2月				
ホンドテン	<i>Martes melampus</i>	①個体識別	雑食性	糞	マーキング糞のサンプリング	春～冬季にかけて各季節に約1週間連続(平成20年8月～平成21年5月)			国土交通省九州地方整備局筑後川工事事務所(2009)	
		②雌雄判別								

年2月24日～26日に採取した糞(92サンプル)を分析に用いた。ノウサギの糞からDNAを抽出し、①mtDNAハプロタイプの決定、②マイクロサテライトマーカー(sat5, sat12, sat13, sol8, sol30, sol33, sol44)による個体識別、③雌雄判別(ZFX・ZFY遺伝子およびSry遺伝子)を行った。DNA分析の方法は松木ら(2000, 2004)に従った。ただし、ノウサギのDNA配列からD-Loop領域の一部を増幅するためのプライマーは松木ら(2004)を参考に新たに設計した。また、ハプロタイプの決定とマイクロサテライトによる個体識別、雌雄判別におけるPCR反応条件は、Ampdirect Plus(島津製作所)を使用した調整方法を採用した。

(4) ノウサギの道路横断施設の利用実態調査

道路横断施設に対するノウサギの利用状況を明らかにするために、2008年10月～2010年3月まで道路横断施設に赤外線センサーカメラ(Field note II; 麻里府商事製)を設置し、施設を利用する野生哺乳類のモニタリングを行った(写真1)。また、既存文献から過去の生息種を確認し、2008年10月24日、11月20日、

2009年1月16日に糞、足跡、食痕による痕跡調査を行い、現在甲子道路周辺に生息している哺乳類の同定を行った。なお、カメラの設置施設はボックスカルバート2箇所、アーチカルバート2箇所、橋梁3箇所、600mm×600mmボックスカルバート1箇所とし、計8台のカメラを設置した。

また、GPSにより記録したノウサギの糞採取地点を個体識別の結果により分類し、個体ごとの行動パターンを視覚化した。

(5) 親子鑑定

平成20～22年度に実施されたノウサギの糞抽出DNA分析業務において、別分析を行い親子鑑定の解析プログラムにはCERVUS version3.0を用いた。

(6) ノウサギの痕跡調査

甲子道路周辺におけるノウサギの餌場環境を明らかにするために、法面、林縁、林内において植生調査と食痕調査を行った。全12箇所(法面2カ所、林縁6ヶ所、林内4カ所)を調査対象とした。

[研究成果]



図1 甲子道路の位置

(1) 糞抽出 DNA による個体識別

7つのマイクロサテライトマーカー座について各対立遺伝子のサイズを調べた結果、全ての検体の全てのマーカー座でデータが得られた。これらのデータを解析した結果、全344検体から計43個体(平成20年度:13個体、平成21年度:8個体、平成22年度:22個体)が識別された。全43個体のうち、平成22年度業務で識別された個体と平成21年度業務で識別された個体の内7個体については同一個体であることが確認されたため、以降の解析からは除外した。したがって、本業務では、これまでに識別された43個体のうち、36個体(平成20年度:13個体、平成21年度:8個体、平成22年度:15個体)の対立遺伝子データを用いて親子鑑定の解析を行った。なお、36個体の性別の内訳は、メスが8個体、オスが28個体である。

(2) 道路横断施設における野生哺乳類の利用状況

赤外線センサーカメラを用いた道路横断施設の利用状況の結果はノウサギがもっとも利用頻度が高く、アーチカルバートI、600×600BOX、柄沢橋においてノウサギの利用頻度が高かった(図2)。

野生哺乳類の種ごとの利用頻度を変数としてクラスター分析を行ったところ、クラスター1(ノウサギ)は、いずれの施設においても利用頻度が高かった。また、クラスター2(キツネ、ハクビシン、タヌキ)は水田に近接した南倉沢のボックスカルバートにおいて出現頻度が高かった。クラスター3(テン、イタチ、ネズミ類他)は小型のボックスカルバート(600×600BOX)に対する利用頻度が高かった(図2, 3)。

(3) ノウサギの道路横断施設の利用実態



写真1 道路横断施設と赤外線センサーカメラの設置例

最も採集サンプル数が多かったのは個体番号 No. 6 の21検体、最も少なかったのは個体番号 No. 11、No. 12 及び No. 13 の1検体であった。図4に個体の分布を示した。その結果、No. 1、No. 4、No. 5、No. 6 の4個体の横断が確認された。2個体 (No. 1 と No. 5) は柄沢橋下を横断していることが推測された。No. 4、No. 6 がどの横断施設を利用したのかは明確ではないが、カメラによる道路横断施設の利用状況調査の結果から、アーチカルバートIあるいは柄沢橋を高頻度で利用しているものと推測される。

(4) 周辺におけるノウサギの痕跡調査

43種の餌植物を確認した。年間を通して摂食頻度が高かった種はモミジイチゴ *Rubus palmatus var. coptophyllus* であり、積雪期に摂食頻度が高かった種は、クロモジ *Lindera umbellata* であった(表2)。そのため、ノウサギは林縁の植物に対する選好性が高く、道路法面や道路沿いの伐採跡地はノウサギの採食場所として利用される。特に冬季は積雪等により道路への侵入を防止する擁壁が積雪等で埋まるため法面への侵入が増加することが推測される。

【成果の活用】

道路環境影響評価の技術手法の改定時にDNAを用いた影響評価手法として新たな提案を行う。

【参考文献】

1) 松木吏弓・矢竹一穂・梨本真(2000) DNA多型を利用したノウサギの個体識別. 電力中央研究所報告 U00016, 18pp.

- 2) 松木吏弓・矢竹一穂・竹内亨・阿部聖哉・石井孝・梨本真 (2004) イヌワシを頂点とする生態系の解明 -DNA 解析を利用したノウサギの生息数推定法の開発. 電力中央研究所報告 U03066、25pp.
- 3) Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C.

(2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006.

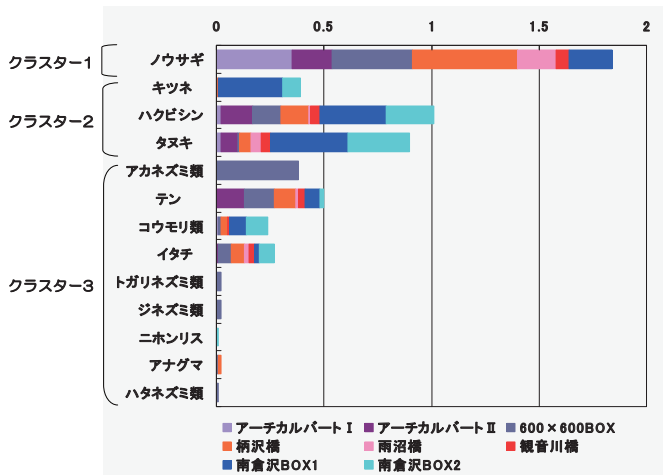


図2 道路横断施設の利用頻度

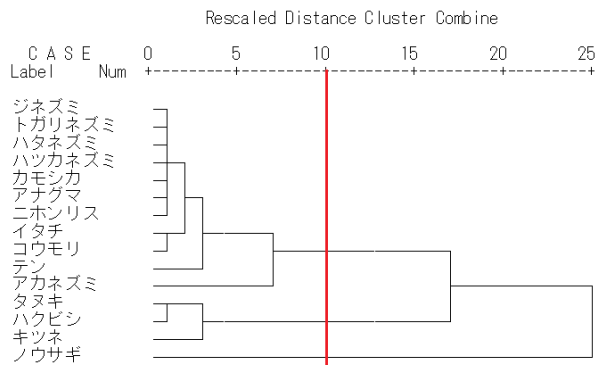


図3 クラスタ分析の結果

表2 ノウサギの利用植物

種名	1E	2E	2F	2S	3E	3F	3S	4E	5E	5F	6E	6F	総計
	自然 裸地	林縁	林内	法面	林縁	林内	法面	林縁	林縁	林内	林縁	林内	
モミジイチゴ			4	3	2	72				5		2	91
クロモジ										3	7	1	20
ヨモギ		9				5				2			16
クマイチゴ	10					4							14
ササsp.	1		6				7						14
ガマズミ	4		3										7
クズ	6												6
セリ									5				5
コウゾリナ	5												5
イタヤカエデ				1				1				2	4
キブシ			1			1				2			4
コゴメウツギ					2						2		4
リョウブ										3		1	4
コハウチワカエデ								1	2				3
サクラsp.					1								2
タラノキ					3								3
ノイバラ	3												3
ヤマハンノキ								1				2	3
ウリハダカエデ									1	1			2
サルトリイバラ						2							2
ヤマアジサイ									2				2
アオキ								1					1
アカショウマ									1				1
アマドコロsp.								1					1
ウド													1
ウリカエデ													1
ウリハダカエデsp.				1									1
オノエヤナギ					1								1
カラスシキミ													1
キジムシロ													1
キブシsp.	1			1									1
クロウメモドキ				1									1
コマユミ										1			1
チダケサシ									1				1
ツルシキミ								1					1
トウカエデ						1							1
バッコヤナギ	1												1
ヒメムカシヨモギ	1												1
フサザクラ									1				1
ホソエカエデ												1	1
ミズキ										1			1
ミツバ										1			1
ミツマタ	1												1
不明	1				1					4			6

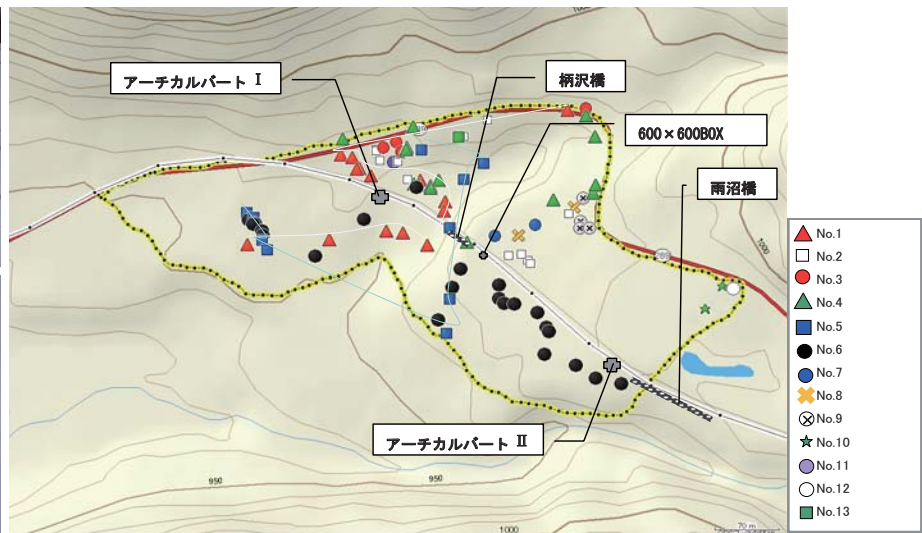


図4 ノウサギの糞抽出 DNA 分析による個体識別と行動パターン