

1.2 環境影響評価の技術支援に関する研究

- 3) DNAを用いた生息地分断影響予測モデルに関する研究
【試験研究費】 11
- 4) 動植物・生態系分野の環境保全措置と事後調査手法に関する調査
【地方整備局等依頼経費】 15

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が設置が検討される。

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、簡易にかつ高精度の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の微量な 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 を標識として利用できるため、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、DNA 分析により調査エリア内に生息するニホンノウサギ *Lepus brachyurus* の個体数、性比の把握や個体ごとの行動パターンの把握、さらには生息地の分断化に伴うノウサギ個体群への影響を解明するために、DNA 分析がどこまで活用できるかを探り、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) ノウサギの糞の回収

福島県南会津郡下郷町の国道 289 号線甲子道路周辺周囲約 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 日にかけて採取した。なるべく新鮮な糞を回収することに努め、足跡上から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、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、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。糞を回収する際に位置情報を GPS (Garmin 社製) により記録した。会津田島の気象データ (気象庁) によると 2009 年 1 月 3 日の午前ころまで降雪があり、その後の降雪が記録されていないことから、ノウサギの糞は 3 日午後～6 日の早朝に排泄された糞であることが推測される。

(2) 糞抽出 DNA による個体識別

ノウサギの糞 (全 96 検体) (写真 1) から DNA を抽出し (写真 2)、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, sol130, sol133, sol144) 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 (表 1)。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。

(3) 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～2009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。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6台のカメラを設置した（写真3）。

(4) 糞抽出 DNA による個体識別結果による行動パターンの評価

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、行動パターンを視覚化した。道路両側で糞が発見された個体が利用したと考えられる横断施設について、カメラによる道路横断施設の利用状況調査とのDNAによる個体識別結果による行動パターンとの関係から考察を行った。

[研究成果]

(1) ノウサギの糞の回収

ノウサギの糞は個体の足跡上、餌場など91箇所にて回収を行った。餌場のように1箇所にて複数個体の足跡が混在し、糞が大量に散在している場合には、1箇



写真1 ノウサギの糞サンプル（一部）



写真2 抽出されたノウサギ糞 DNA サンプル

所から5個程度を1粒ずつ回収した。

(2) 糞抽出 DNA による個体識別

すべての糞サンプルから分析に十分な量と質のDNAが得られた。得られた塩基配列のうち、松木ら(2004)の解析領域に該当する347bpの配列を使用し、mtDNAのハプロタイプを分類した。分析を行った全96検体から計7種類のハプロタイプ(Hp01～Hp07)が検出された(表2)。そのうち、Hp02及びHp04は、複数の個体から確認された。さらに、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96検体から13個体を識別した。また、ZFX/ZFY遺伝子のPCR増幅産物を電気泳動した結果、すべての検体で目的のバンド(DNA断片)が検出され、さらにSry遺伝子のPCR産物を電気泳動した結果、32検体で目的のバンドが確認された。これを個体識別結果に当てはめると、識別された13個体のうち、雄は6個体、雌は7個体であることが明らかとなった。

(3) 道路横断施設におけるノウサギの利用状況

カメラでの道路横断施設の利用の結果はアーチカルバート1、柄沢橋においてノウサギの利用頻度が高かった(表3)。

(4) ノウサギの道路横断施設の利用実態

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1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1あるいは柄沢橋を利用しているものと推測される。

[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.

表1 mtDNA 分析に使用したプライマーセット

遺伝子座名	プライマー名	塩基配列	得られるPCR産物の長さ
D-Loop領域	LepusDL678-F	5'-TGTAACCAGAAAACGGAGAT-3'	678bp
	LepusDL678-R	5'-TGGGCTGATTAGTCATTAG-3'	

表2 mtDNA ハプロタイプの分析結果

ハプロタイプ名	Hp01	Hp02	Hp03	Hp04	Hp05	Hp06	Hp07
検出された検体数	17	16	4	46	10	2	1
松木ら(2004)の分類	—	—	—	A07	—	—	A21



写真3 甲子道路（国土交通省直轄区間）における道路横断施設

表3 赤外線センサーカメラによる横断施設の利用実態調査
数字は、赤外線センサーカメラによる撮影回数を示す。

哺乳類種			周辺環境		道路横断施設					
目	科	種	既存資料*	生息痕跡	アーチカル パート1	柄沢橋	600×600 Box	アーチカル パート2	雨沼橋	観音川橋
モグラ	トガリネズミ	ジネズミ					4			
		トガリネズミ	○							
	モグラ	ヒミズ アズマモグラ	○ ○							
コウモリ		コウモリ目の一種					1			
サル	オナガザル	ニホンザル	○							
ウサギ	ウサギ	ノウサギ	○	○	31	22			4	1
		ニホンリス	○	○	1					
ネズミ	リス	ホンドモモンガ	○							
		ムササビ	○							
		ヤマネ	○							
	ネズミ	スミスネズミ	○							
		アカネズミ	○	○			43	1		
ネコ	クマ	ツキノウグマ	○							
		キツネ	○	○						
	イヌ	タヌキ	○	○	6	6	2	2	3	5
		テン	○	○		8	18		2	2
	イタチ	イタチ	○	○	1	7	5		1	2
		ホンドオコジョ	○							
		アナグマ	○							
	ジャコウネコ	○		4	3	16	3		1	
ウシ	ウシ	○	○		1					
	シカ	○								

* H10年度甲子道路報告書

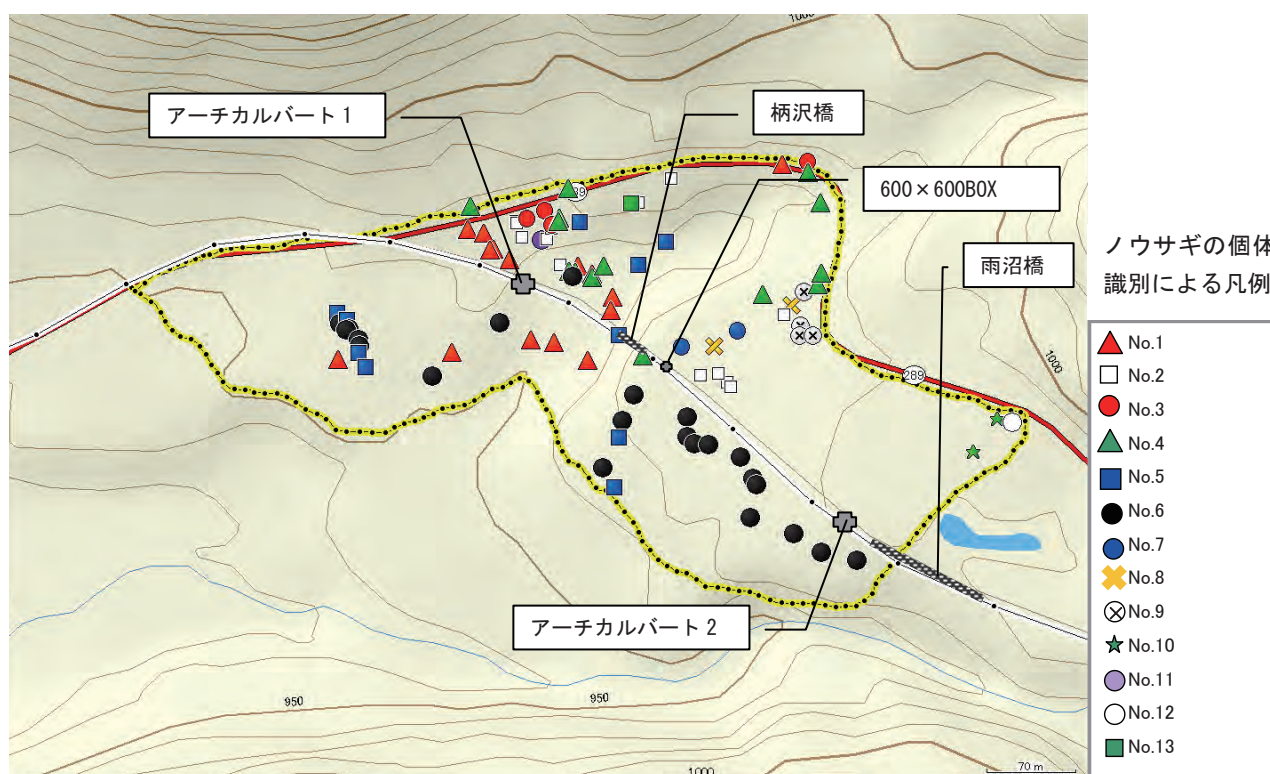


図1 ノウサギの個体識別の結果
赤線は旧道、黄色点線は調査範囲、白色点線は甲子道路

動植物・生態系分野の環境保全措置と事後調査手法に関する調査

Survey on the preservation measures and the monitoring methods for wildlife and ecosystem during and after construction works

(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
主任研究官	武田 ゆうこ
Senior researcher	Yuko TAKEDA
研究官	園田 陽一
Researcher	Yoichi SONODA

To reduce the impact of construction, measures should be taken to protect wildlife and ecosystem but practical methods for this have not yet been established. Also, since the environmental impacts on wildlife and ecosystem are difficult to predict prior to construction, it is often important to monitor them during and after the construction works. The purpose of the present study is to collect and summarize the several methods that are currently undertaken as wildlife and ecosystem preservation measures and monitoring during and after construction works.

[研究目的および経緯]

道路事業の実施にあたっては、生物多様性の確保、多様な自然環境の体系的保全、人と自然の豊かな触れ合いの確保の観点から、動植物・生態系、自然との触れ合い分野における予測、環境保全措置の検討が重要である。

しかし、検討の際に参考となる「科学的知見や類似事例」については、全般的に不足しており、事業者は予測、保全措置の検討と、効果の不確実性の把握、さらには事後調査計画の立案に苦慮している現状がある。

本研究は、野生動物の道路横断施設におけるモニタリング調査を行うことにより、野生動物の道路横断施設に対する選好性や設置環境による利用頻度とその要因を明らかにし、道路横断施設の設置指針を検討するための生態的情報を明らかにすることを目的とした。本報告では、業務全体の調査内容について示しているが、データ量が多大なため研究成果については道路横断施設のモニタリング調査についてのみ記載した。

[研究内容]

(1) 道路横断施設のモニタリング調査

モニタリング調査は、豊富バイパス（北海道）、東富士五湖道路（山梨県）、江津道路（島根県）とした（図 1）。東富士五湖道路では 19 施設 27 箇所、豊富バイパスでは 24 施設 31 箇所、江津道路では 17 施設 17 箇所（赤外線センサーカメラ Field note II 麻里府商事）を

ボックスカルバート（BC）、パイプカルバート（PP）、橋梁（BR）、オーバークリッジ（OV）に常設した。調査期間は、2008 年 8 月～2009 年 3 月まで行い、月に 1 度フィルム回収を行った。解析の際、10 分以内に同種が連続撮影された場合には、10 分以内における最大個体数を代表値として、その他のデータを除外することとした。さらに、カメラあたりの観察日数（以下カメラ日とする）は調査サイト間で相違があるため、その影響を排除するためにカメラ日あたりの撮影枚数を出現頻度として比較を行った。

(2) 哺乳類相および生息環境要素調査

哺乳類相は痕跡調査（食痕、足跡、糞 etc.）により



図 1 調査対象地

表 1 林床植生区分の概要

高さ	説明	密度	説明
2.0m以上	移動に際し大型獣でも隠れられる高さ。	高	植被率 90%以上で、連続して密閉した状態。
1.0～2.0m	移動に際し、中型獣は隠れられる、大型は隠れられない高さ。	中	植被率 20～90%で、下方に空間があり、不連続な状態。
0.5～1.0m	移動に際し中型獣が隠れられる境。イタチやテンは隠れられるが、キツネやタヌキは難しい。	低	植被率 20%未満で、裸地に近い状態もしくは裸地。
0.5m未満	移動に際し、中型獣以上は全て隠れることが難しい。		

密度のイメージ

確認し、補足的に赤外線センサーカメラを獣道に設置することにより確認を行った。生息環境要素調査は、各路線において路線から 250m Buffer 圏内の範囲とし、哺乳類の生息環境からみた相観植生および林床植生の区分を行った。相観植生区分については、あらかじめ航空写真並びに既存の現存植生を用いて相観植生図を作成し、現地踏査により確認・補正並びに区分を行った。林床植生区分については、哺乳類の利用環境（特に、移動の際の見通しやすさ）の観点から、高さを 0.5 m 未満、0.5～1.0m、1.0～2.0m、2.0m 以上の 4 区分とした（表 1）。

(3) 行動圏調査

① エゾシカ

エゾシカ（メス・成獣）の捕獲は、斜里エコロード（株）エゾシカファームの協力を得て、囲いわなにより生け捕りにした。捕獲後、GPS アルゴス（Lotek 社製）を装着し、調査期間を 2009 年 1 月 21 日から 2010 年 3 月 1 日（首輪の脱落予定日）とした。GPS の測位スケジュールは①シカの季節移動の時期にあたる 2009 年 1 月 21 日～3 月 1 日、2009 年 5 月 1 日から 2010 年 3 月 1 日は 3 時間に一回（アルゴス衛星のデータ受信は 5 日に 1 回）、②シカが斜里エコロード周辺に出現する時期にあたる 2009 年 3 月 1 日～5 月 1 日は 30 分に一回とした（アルゴス衛星のデータ受信は 3 日に 1 回）。首輪にはオプションとして、アクティビティセンサー及びモータリティセンサーがある。

② ホンドテン

テンの捕獲は、江津道路において 2008 年 11 月 25 日から開始し、2008 年 12 月 3 日まで行った。哺乳類の利用頻度の高い道路横断施設（ボックスカルバート）の周辺に、ライブトラップ（WoodStream 社製）およびソフトキャッチ（Victor 社製）を設置した。ライブトラップは延べ 23 地点 122 晩、ソフトキャッチ

は延べ 9 地点 13 晩設置し、1 頭（オス・成獣）のみ捕獲した。捕獲した際に麻酔により不動化し、外部計測を行い、首輪型無線発信機（ATS 社製）を装着して放逐した。

テレメトリー調査は 2 回実施し、第 1 回調査は 2008 年 12 月 8 日～11 日、第 2 回調査は 2009 年 2 月 2 日～5 日まで実施した。追跡は日没前から次の日の午前 7:00 まで実施し、追跡のインターバルは原則 30 分とした。

【研究成果】

本報告では、豊富 B P（北海道稚内）、東富士五湖道路（山梨県富士吉田町～山中湖町）における道路横断施設の利用状況調査の結果について報告する。

痕跡調査およびカメラにより哺乳類相を把握した結果、豊富バイパスでは 6 目 10 科 18 種、東富士五湖道路では 6 目 15 科 20 種であり、道路横断施設内において確認された種は哺乳類相調査の結果とほぼ一致した（表 2）。さらに、道路横断施設に対する野生動物の嗜好性を明らかにするため、各施設の撮影頻度指標を [カメラの撮影枚数] / [カメラ日] により求めた。多様な種によって道路横断施設が利用されているかどうかを検証するために Shannon-Wiener の多様度指数と種数が施設の構造によって差があるかどうかを求めた。

いずれの地域においても、道路横断施設の構造（BR、BC、PP）によって野生動物の多様度および種数に有意差は認められなかった（Kruskal-wallis 検定、 $p > 0.05$ ）。

次に、各道路横断施設に対する野生哺乳類の撮影頻度指標を下に主成分分析により序列化し、各横断施設に対する主成分得点との関係を解析した。

その結果、豊富 BP では、ノウサギ、シカなどの BR を利用するグループ（橋梁グループ）、キツネ、コウモリなどの BC を利用するグループ（BOX グループ）、テン、ネズミなどの PP を利用するグループ（パイプグル

ープ)、選好性のはっきりしないグループ(無選好グループ)の4グループに分類された(図2左、図3)。また、東富士五湖道路では、シカ、イノシシなどのBRを利用するグループ(橋梁グループ)、キツネ、ハクビシンなどのBCを利用するグループ(BOXグループ)に分類された(図2右、図4)。

以上のことから、施設構造に対する選好性について整理する。BRはシカやイノシシなどの大型獣による利用が多く、その他の多様な種によっても利用されることから、大型獣を保全目標とする際には谷部は盛土をせず、橋梁によって代償すると良いと考えられる。次にBCはキツネによる利用が多く、その他の多様な種によって利用されることから、小・中型哺乳類の多様な

種の利用を考えるとBCを設置すると良いと考えられる。さらに、PPは北海道ではクロテンとアカネズミ類(アカネズミ、ヒメネズミ)による利用が多いことから、テンなどを保全目標とする際には、小型のPP(犬走付)で対応可能であると考えられる。そのほかの生態的な利用としては、北海道のコウモリは夏季にBCの利用が高まることから、夏季のねぐらとしての利用が考えられる。

[成果の活用]

環境保全措置の設置及び改善指針を作成し、地方整備局等に配布し、事業への活用を図る。また、今後の「道路環境影響評価の技術手法」改訂時に本業務の成果を反映させる。

表2 痕跡調査および赤外線センサーカメラによる哺乳類相と横断施設における確認種の結果

A. 豊富バイパス

No.	目名	科名	和名	学名	哺乳類相調査結果	2008年9月	10月	11月	12月	2009年1月	2月	3月
1	モグラ	トガリネズミ	オオアシトガリネズミ	<i>Sorex unguiculatus</i>			●		●			
2	コウモリ	ヒナコウモリ	ウサギコウモリ	<i>Plecotus auritus</i>		●						
3			コテングコウモリ	<i>Murina tenebrosa</i>		●						
4	ネコ	イヌ	タヌキ	<i>Nyctereutes procyonides</i>	○	●		●				●
5			キツネ	<i>Vulpes vulpes</i>	○	●		●	●			●
6			ノイヌ・飼犬	<i>Canis familiaris</i>	○	●	●	●	●	●		●
7	ネコ		ノネコ・飼猫	<i>Felis catus</i>	○	●		●				●
8	イタチ		クロテン	<i>Martes zibellina</i>	○	●	●	●	●		●	●
9			イタチ	<i>Mustela itatsi</i>	○			●	●			
10			イイズナ	<i>Mustela nivalis</i>	○							
11	アライグマ		アライグマ	<i>Procyon lotor</i>	○	●	●	●			●	●
12	ウシ	シカ	ニホンジカ	<i>Cervus nippon</i>	○	●	●	●	●	●	●	
13	ネズミ	リス	シマリリス	<i>Tamias sibiricus</i>		●	●					
14		ネズミ	ヤチネズミ属の一種	<i>Clethrionomys sp.</i>	○	●			●			
15			アカネズミ属の一種	<i>Apodemus sp.</i>	○	●	●	●	●			
16	ウサギ	ウサギ	ユキウサギ	<i>Lepus timidus</i>	○				●	●	●	●
合計	6目	10科	16種		11	17	12	11	10	3	5	6

B. 東富士五湖道路

No.	目名	科名	和名	学名	哺乳類相調査結果	2008年9月	10月	11月	12月	2009年1月	2月	3月
1	モグラ	トガリネズミ	ジネズミ	<i>Crocidura dsinezumi</i>	○					●		
2	モグラ		モグラ科の一種	<i>Talpidae sp.</i>	○							
3	コウモリ	キクガシラコウモリ	キクガシラコウモリ	<i>Phinolophus ferrumequinum</i>	○	●	●	●				
4		ウサギコウモリ	ウサギコウモリ	<i>Plecotus auritus</i>	○							
5	ネコ	イヌ	タヌキ	<i>Nyctereutes procyonides</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
6			キツネ	<i>Vulpes vulpes</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
7			ノイヌ・飼犬	<i>Canis familiaris</i>		●	●	●	●	●	●	●
8	ネコ		ノネコ・飼猫	<i>Felis catus</i>		●	●	●	●	●	●	●
9	イタチ		テン	<i>Martes melampus</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
10			イタチ	<i>Mustela itatsi</i>	○	●	●	●				
11			アナグマ	<i>Meles meles</i>	○	●	●	●				●
12	アライグマ		アライグマ	<i>Procyon lotor</i>	○	●						
13	クマ		ツキノワグマ	<i>Ursus thibetanus</i>	○	●						
14	ジャコウネコ		ハクビシン	<i>Paguma larvata</i>	○	●	●	●	●			●
15	ウシ	イノシシ	イノシシ	<i>Sus scrofa</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
16		シカ	ニホンジカ	<i>Cervus nippon</i>	○	●	●	●	●		●	●
17	ネズミ	リス	ニホンリス	<i>Sciurus lis</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
18		ネズミ	アカネズミ属の一種	<i>Apodemus sp.</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
19	ウサギ	ウサギ	ノウサギ	<i>Lepus brachyurus</i>	○	●	●	●	●	●	●	●
合計	6目	15科	19種		17	16	15	15	11	10	10	12

○は痕跡調査および直接観察のみ確認した種を示す。

●は赤外線センサーカメラで確認した種を示す。

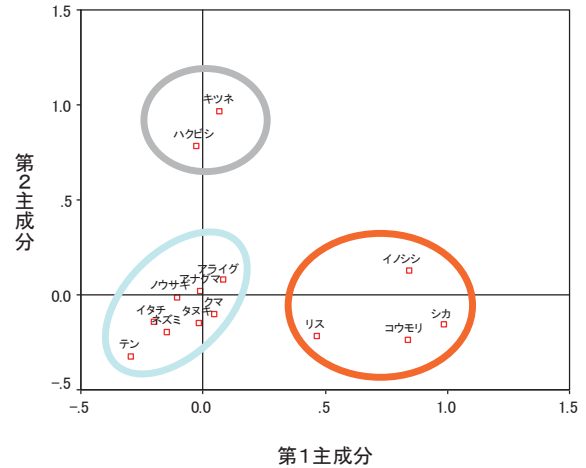
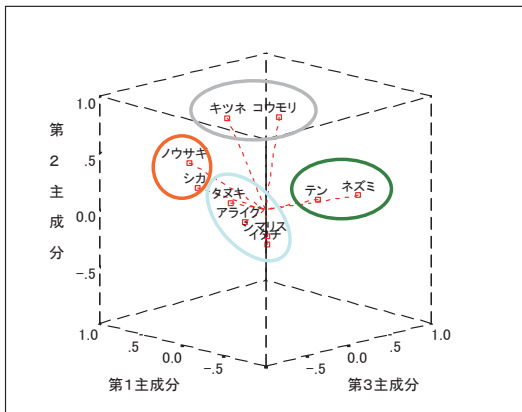


図2 道路横断施設に対する野生動物の利用頻度の主成分分析の結果

左: 豊富BP

右: 東富士五湖道路

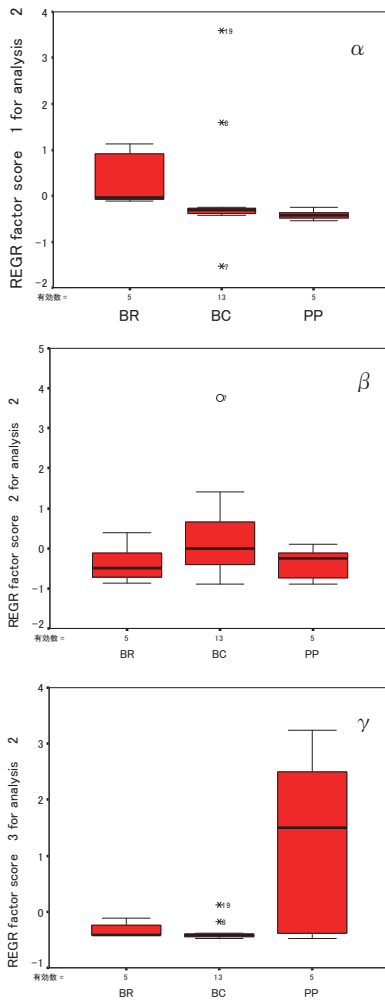


図3 豊富BPにおける野生動物群の道路横断施設に対する選択性

αは各施設に対する第1主成分得点の箱ひげ図

βは各施設に対する第2主成分得点の箱ひげ図

γは各施設に対する第3主成分得点の箱ひげ図

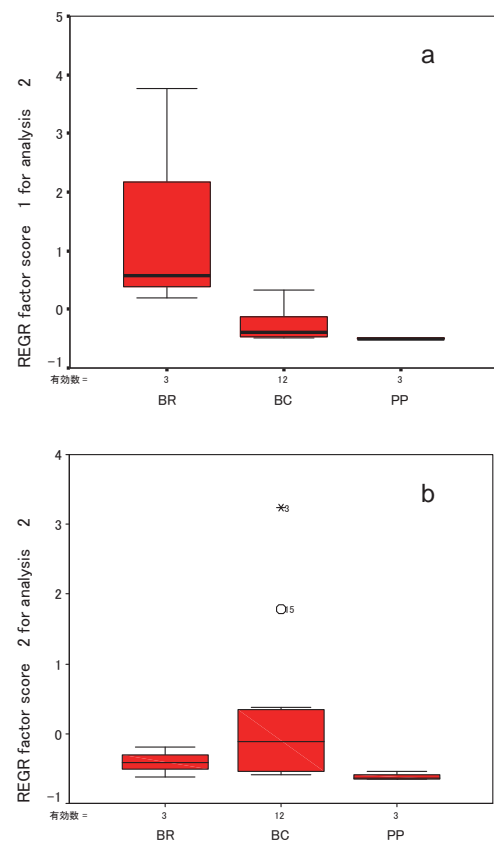


図4 東富士五湖道路における野生動物群の道路横断施設に対する選択性

aは各施設に対する第1主成分得点の箱ひげ図

bは各施設に対する第2主成分得点の箱ひげ図