

## 1.2 環境影響評価の技術支援に関する研究

---

2) 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】 .....	13
3) 福島県国道 289 号甲子道路道路横断施設等検討調査	
【地方整備局等依頼経費】 .....	17

# 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, sex and parentage using fecal DNA. A study area was both sides on the Route 289 road kashi in Fukushima prefecture. We sampled 344 fecal pellets on the tracks of individuals and identified 36 individual hares (28 males and 8 females) were identified. As a result, it is estimated that four hares crossed between the both sides of road.

### 【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、従来の標識のような脱落がなく長期間の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、選定した種について個体数、性比の把握や個体ごとの行動パターンを把握した。これらの成果から、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) 糞抽出 DNA 分析の環境影響評価への適用可能性を検討するための先行研究の整理
- 2) 調査対象種として選定したノウサギの糞の回収、抽出 DNA による個体識別、雌雄判別、個体数把握、親子鑑定
- 3) DNA 分析結果と道路周辺環境、餌資源との関連性解析
- 4) 従来の調査手法と糞抽出 DNA 分析との比較

### 【研究成果】

- 1) 糞抽出 DNA による個体識別法の現状  
微量 DNA による個体識別法が試行されている種は 8 種程度であり、この内、手法が確立されている種は、クマ、シカ、アナグマ、タヌキ、ノウサギ、テンの 6 種である (表-1)。しかし、森林性の哺乳類であるムササビ、リス、モモンガといった種についての DNA による個体識別法はまだ確立されていない。Forman et al. (2003) は、道路の影響を受けやすい種の特徴を 8 つに分類し、アンブレラ種や希少種、林縁種、林内種などの特徴をもつ種は道路の生態学的影響を受けやすいことを指摘している (表-2)。特に、樹上性哺乳類は、森林の分断・孤立化により個体群の存続可能性が減少するという問題がある。したがって、今後の課題として、樹上性哺乳類に関する微量 DNA を用いた個体識別法を開発したい。
- 2) 調査対象種として選定したノウサギの糞の回収、抽

表-1 微量 DNA による個体識別法の現状

種名/学名	調査内容	DNAによる個体識別				個体識別率	出典
		使用部位	試料のサンプリング方法	サンプリング時期	マーカー数		
ツキノワグマ <i>Ursus thibetanus</i>	①個体識別 ②雌雄判別	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)
		糞	不明	2004年6月～9月	8座位	不明	山内ら(2004)
		唾液	被害穀物(トウモロコシ)	2004年夏	6座位	30%	Saito et al.(2008)
ニホンカモシカ <i>Capricornis crispus</i>	①個体識別 ②雌雄判別	糞	ため糞から採取	不明	シロイワヤギの29座位から選別	不明	西村(2006)
ニホンジカ <i>Cervus nippon</i>	個体識別	糞	有害鳥獣駆除	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	毛	ヘアートラップ	2004年6月～12月	不明	8%	石川ら(2006)
ニホンアナグマ <i>Meles meles anakuma</i>	①個体識別 ②雌雄判別	糞	ため糞から採取	2006年11月	6座位	45%	松木ら(2009)
ホンドタヌキ <i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>	①個体識別 ②雌雄判別	糞	ため糞から採取	2005年11月～2006年2月	8座位	88%	松木ら(2006)
ニホンノウサギ <i>Lepus brachyurus</i>	①個体識別 ②雌雄判別	糞	100m×100mメッシュ内のサンプリング	スギ林:2003年1月 ブナ林:2003年2月	7座位	春～夏:7～35% 冬:96～100%	松木ら(2004)
ホンドテン <i>Martes melampus</i>	①個体識別 ②雌雄判別	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)	不明	不明	国土交通省九州地方整備局筑後川工事事務所(2009)

表-2 道路の影響を受けやすい種の特徴と主要な影響との関係

道路の影響を受けやすい種の特徴	道路の主要な影響			想定される種の例
	道路死亡	生息地消失	連続性の減少	
a.道路生息地へ誘引される	○			ノウサギ
b.高い移動能力を持つ	○			クマ、シカ、キツネ
c.幅広い環境に対応できる	○			キツネ、タヌキ
d.多様な資源要求性を持つ	○		○	クマ、シカ、キツネ
e.個体群密度が低い	○	○	○	ヤマネ、モモンガ
f.繁殖率が低い	○	○	○	クマ
g.林内を利用する		○	○	ムササビ、リス
h.道路に対して忌避行動を示す			○	ネズミ類

出 DNA による個体識別、雌雄判別、個体数把握、親子鑑定

福島県南会津郡下郷町の国道 289 号線甲子道路周辺において、ノウサギの糞抽出 DNA 用のサンプルを採取した(図-1)。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、雪の中に埋没したやや古い糞を回収した。個体識別には、ミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) とマイクロサテライトによって分析した。mtDNA の分析には、松木ら(2004)の解析領域を参考に D-loop 領域の一部を増幅するように設計したプライマーセット(5'-TGTAACCAGAAACGGAGAT-3')

5'-TGGGCTGATTAGTCATTAG-3')を用いた。糞から抽出した DNA について、ZFX/ZFY 遺伝子(Aasen & Medrano, 1990)を用いて PCR 増幅を行った。

サンプル(n=344)から抽出された DNA については、98～100%で個体識別、雌雄判別が得られた。全体で36個体(♀8個体、♂28個体)が識別された。親子鑑定の結果から、2組(4個体)が親子関係にあり、それ以外は親子関係が認められないことが推定された。しかし、親子鑑定を解析するソフトの解析精度は今後の課題である。今回の調査では、36個体中4個体(♀1個体、♂3個体)の糞が道路両側で確認された(図-2は調査箇所の一部)。その他の個体の分布は道路両側で分断されており、バリアーとなっている可能性が示唆された。

### 3) DNA 分析結果と道路周辺環境、餌資源との関連性

DNA 分析の結果から多数の個体が利用する場所が明らかになり、植生、地形などの環境傾度との関連性の解析にも応用できることが明らかとなった。さらに、利用頻度の高い環境について餌となる植物について調査したところ、林縁に生育するキイチゴ属(モミジイ

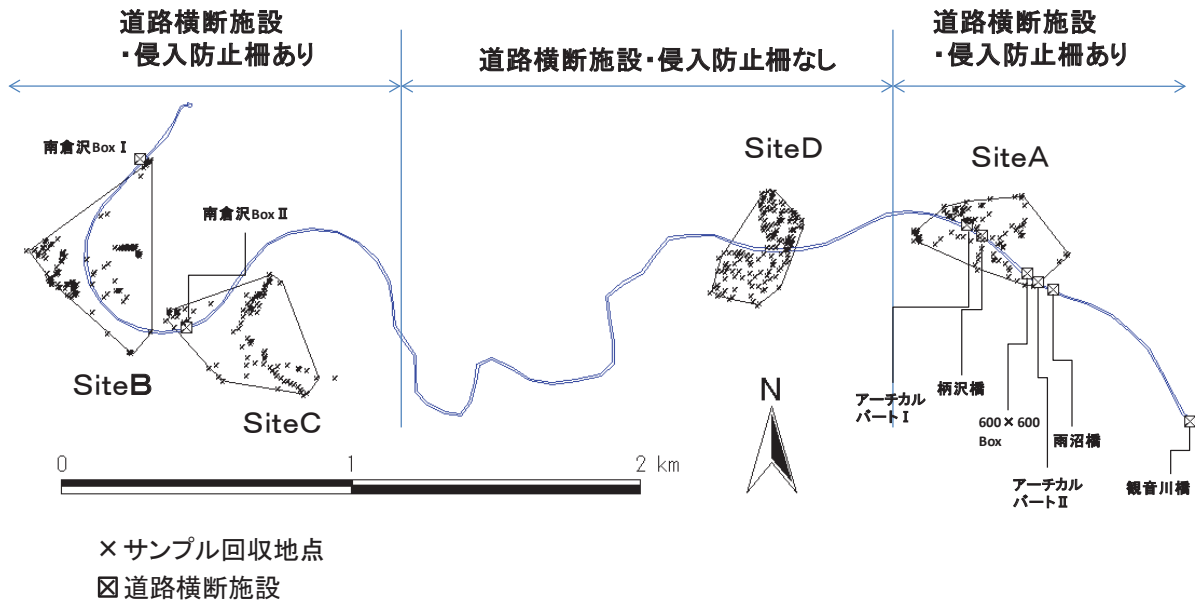


図-1 ノウサギの糞を回収したサンプリングエリアと地点

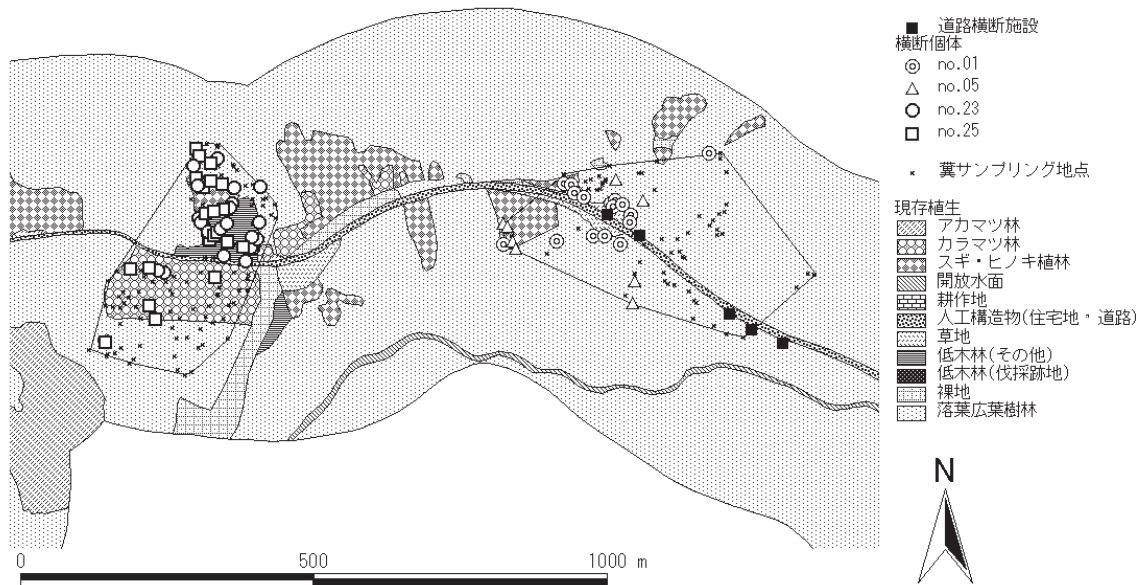


図-2 道路横断が確認された4個体の糞の分布

チゴ、クマイチゴ) やササ、クロモジに対する利用頻度が高かった。

ノウサギの食痕調査の結果から、林縁に生育する木本のモミジイチゴを選好しており、その他にクロモジやヨモギ、クマイチゴなど比較的明るい環境に多く生育している植物を食草としていることより(表-3)、林縁環境に依存していると考えられる。このため、道路に近接した林縁環境に多くの個体が生息していることが推測される。本調査地の生息密度は、0.52~1.75 個体/ha であり、一方、松木ら(2004)の秋田駒ヶ岳山麓におけるスギ林内の生息密度の、

およそ0.41 個体/ha よりも高かった。このことより、道路によって林縁が人為的に形成され、餌資源が豊富なため、道路周辺として本調査地では、林内よりも密度が高い結果になったと考えられる。

#### 4) 従来の調査手法と糞抽出 DNA との比較

ラジオテレメトリー法により1 個体を追跡する場合と糞抽出 DNA により1 個体を追跡する場合とのコストの比較を行った。ラジオテレメトリー法は¥2,735,000、糞抽出 DNA 法により344 サンプルを解析するのに費やした額は¥8,174,000 であり、本研究における糞抽出 DNA の個体識別によって確認された36 個体で除算し

表-3 ノウサギの食痕が確認された植物種

種名	調査区												株数 平均 本数	株内 平均 本数	法面 平均 本数
	A (林縁)	B (法面)	C (林縁)	D (林内)	E (法面)	F (林縁)	G (林内)	H (林縁)	I (林内)	J (林縁)	K (林内)	L (林縁)			
キイチゴ属	10		76		2	4	3	5		2	3		16.3	1.3	1.0
クワガタ								9	7				0.7	4.0	0.0
ヨモギ	0		5					2					2.7	0.0	0.0
ササユ	1			7				6					0.2	3.3	0.0
ガマズミ	4							3					0.7	0.8	0.0
クス	6												1.0	0.0	0.0
セリ									5				0.8	0.3	0.0
コウゾリナ		5									1		0.8	0.0	0.0
イタヤカエデ													0.5	0.3	0.0
キバナ				1				1	2				0.5	0.3	0.0
コメウツギ				2							2		0.3	0.5	0.0
リョウブ											3		0.0	1.0	0.0
コハウチハカエデ									1	2			0.2	0.5	0.0
サクラ		1										2	0.2	0.5	0.0
クワ			3										0.5	0.0	0.0
ノイバラ	3												0.5	0.0	0.0
ヤマハシノキ											1		0.5	0.0	0.0
ウリハダカエデ									1	1			0.2	0.3	0.0
サルトリイバラ				2									0.0	0.5	0.0
ヤマアジサイ									2				0.3	0.0	0.0
アオキ											1		0.2	0.0	0.0
アキノウマ										1			0.2	0.0	0.0
アマドコロ											1		0.2	0.0	0.0
ウド												1	0.0	0.3	0.0
ウリカエデ												1	0.0	0.3	0.0
ウリハダカエデ													0.0	0.3	0.0
オノエヤナギ				1									0.2	0.0	0.0
カラスノミ												1	0.0	0.3	0.0
キジムシロ	1												0.2	0.0	0.0
キジシロ													0.0	0.3	0.0
クロウメモドキ													0.0	0.3	0.0
コマユミ											1		0.0	0.3	0.0
チダケサシ									1				0.2	0.0	0.0
ツルシノミ													0.2	0.0	0.0
トウカエデ				1									0.2	0.0	0.0
ハバコヤナギ	1												0.2	0.0	0.0
ヒメムカシヨモギ	1												0.2	0.0	0.0
フサザクラ									1				0.2	0.0	0.0
ホノエカエデ												1	0.2	0.0	0.0
ミスギ										1			0.2	0.0	0.0
ミツバ													0.2	0.0	0.0
ミツマタ	1									4			0.2	0.0	0.0
不明	1		1										1.0	0.0	0.0
食痕数全体	43	0	91	9	2	4	17	30	16	5	18	9	30.3	15.0	1.0

表-4 追跡調査におけるコスト比較

項目	調査内容	ラジオテレメトリー法	糞抽出DNAによる個体識別法
		1個体追跡に費やすコスト	344サンプル集めるコスト
人件費		¥2,707,000	¥4,834,000
消耗品	調査機器	¥27,000	¥0
	試薬・消耗品	¥1,000	¥3,340,000
コスト	全体	¥2,735,000	¥8,174,000
	1個体あたり	¥2,735,000	¥227,056

た結果、1個体あたり¥227,056と計算された(表-4)。

保全目標種に対する環境影響評価を行う際に、従来メトリー調査によって行われきた。しかし、糞抽出DNA調査はDNAサンプルの取り扱いが困難であることや、分析に特殊な機器や技術が必要であるものの、生息密度や個体の追跡等、個体単価に換算すると低いコストで詳細な調査が実施できることが明らかとなった。

[成果の活用]

今後、樹上性哺乳類等の個体識別技術を開発し、道路による分断・孤立化の影響を評価し、道路横断施設によるミティゲーション手法を開発することで、環境影響評価手法の新たな技術として提案していく。

[参考文献]

- 1) Aasen E., Medrano J.F. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *BioTechnology*, 8, 1279-1281
- 2) Forman, R. T. T, D. Sperling, J. A. Bissonette, A. P. Clevenger, C. D. Cutshall, V. H. Dale, L. Fahrig, R. France, C. R. Goldman, K. Heanue, J. A. Jones, F. J. Swanson, T. Turrentine and T. C. Winter (2003) : Road Ecology - science and solutions : Island press, Washington, D.C., 481pp
- 3) Kalinowski, S. T., Taper, M. L. & Marshall, T. C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increase success in paternity assignment, *Molecular ecology* 16, 1099-1106.
- 4) 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.
- 5) 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

# 福島県国道 289 号甲子道路道路横断施設等検討調査

Research of road crossing structures on the Route 289 road kashi in Fukushima prefecture

(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

Amphibians are selected to indicator species in environmental assessment and become objects of estimation and evaluation on environmental impact. Environmental protection measures are necessary as a result of evaluation and estimation. However, it is difficult that environmental protection measures are selected because scientific knowledge about salamander habitat is scarce. Moreover, investigative techniques monitoring the environmental protection measures still lag behind in Japan. Therefore, habitat evaluation techniques and monitoring methodology for amphibians were identified using microchips on our present study.

## 〔研究目的および経緯〕

両生類、特にサンショウウオ類の多くはレッドリスト掲載種が多く、環境アセスメントにおいては「重要な種」に選定され、環境影響の予測、評価の対象となる。そして、予測、評価の結果として環境保全措置が求められ、産卵池などの生息地の復元が行われる。しかし、環境保全措置の方法やその施工場所を選定するための調査方法や保全措置の効果を確認する調査には非常に労力が必要であることが多い。そこで、本研究では、マイクロチップを利用した効果的・効率的な生息適地評価、モニタリング技術の開発を行うことを目的とした。

## 〔研究内容〕

### 1. サンショウウオの捕獲

調査対象地は那須塩原の舗装道路脇の斜面側に沿って埋設されたコンクリート製のU字溝(内幅約40cm×深さ約30cm;北緯36度57分57秒,東経139度52分20秒)において、トウホクサンショウウオ *Hynobius nigrescens* の捕獲を産卵期にあたる2011年3月11日と3月23日の2回行った。調査地点のU字溝は、斜面から流れ出た湧水が溜まっており、水面の大きさは短径40cm、長径約23m、最大水深20cmであった(図1)。湧水口はU字溝に近く、U字溝内には多量の落ち葉が堆積していた(図2)。

捕獲は、成体を対象とし、全長(体長及び尾長)の計測、雌雄の別を記録し、捕獲地点の環境や捕獲個体の写真撮影を行った。

### 2. マイクロチップ装着

捕獲したトウホクサンショウウオの成体は、マイクロチップ(Trovan社製,長さ約11mm×直径約2mm)を用いて標識した。マイクロチップは、捕獲個体の左体側の前肢付け根付近の皮下に挿入した。

### 3. サンショウウオモニタリングシステムの開発

マイクロチップを挿入したトウホクサンショウウオの産卵行動や道路横断施設の横断の際のモニタリングシステムの開発を行った。

## 〔研究成果〕

### 1. サンショウウオの標識

2011年3月11日に実施した事前踏査で15個体(すべて雄)、2011年3月23日に実施した現地調査では雄28個体(うち4個体は再捕獲)、雌6個体の34個体、合計45個体を捕獲した。新規捕獲個体の体長及び尾長の計測、写真撮影、マイクロチップ装着(図3)による標識を実施した後、速やかに産卵場へ放逐した。なお、再捕獲した4個体についてマイクロチップを皮下に挿入する際に生じた傷を3月23日に確認したところ、治癒して塞がっていた。捕獲したトウホクサンショウウオの体サイズの平均値について表1に示した。

### 2. マイクロチップリーダーの開発(図4)

アンテナは、縦50cm×横50cmのスクエア型でISO11784準拠マイクロチップに対応する。記録部は、マイクロチップを装着した野生動物が通過した時間、個体IDを記録する仕様とした。記録されたマイクロチップの情報は専用ソフトによりPCへ出力が可能である。今まで調査員による捕獲や直接観察により行ってい

た小型サンショウウオ類のモニタリング調査は、今回開発したマイクロチップリーダーにより、道路横断施設の季節的な利用状況や個体の横断頻度を効率的・効果的にモニタリングすることができるものと考えられ

る。

[成果の活用]

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予定である。

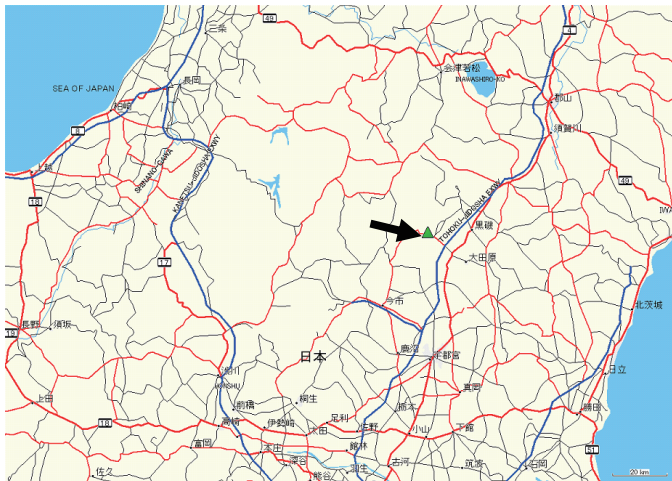


図1 那須塩原のサンショウウオ捕獲地点 (▲)



図2 サンショウウオの捕獲環境 (側溝)



図3 マイクロチップの装着  
 左上：マイクロチップ (Trovan 社製)  
 右上：マイクロチップの挿入  
 下：リーダーによるマイクロチップの確認



図4 据置型マイクロチップリーダー  
 左上：マイクロチップリーダーアンテナ部  
 縦 50 cm × 横 50 cm  
 左下：マイクロチップリーダー記録部  
 右：八箇峠道路におけるサンショウウオの通過実験

表1 捕獲したトウホクサンショウウオの体サイズの平均値 (mm)

性	個体数	全長の平均値 (mm) ±2SE	体長の平均値 (mm) ±2SE	尾長の平均値 (mm) ±2SE
雄	39	125.6 ± 3.16	64.3 ± 0.76	61.3 ± 2.91
雌	6	118.7 ± 6.45	66.3 ± 1.67	52.4 ± 5.42