

糞抽出DNA分析による個体識別法の道路環境 アセスメントへの適用可能性

園田 陽一¹・中村 匡聡²・松江 正彦³・久保 満佐子⁴
・上野 裕介⁵・栗原 正夫⁵

¹非会員 元国土技術政策総合研究所 環境研究部 緑化生態研究室
株式会社地域環境計画 生物多様性推進室 (〒154-0015 東京都世田谷区桜新町2-22-3)

E-mail:sonoda@chiikan.co.jp

²非会員 いであ株式会社 環境創造研究所 (〒421-0212 静岡県焼津市利右衛門1334-5)

³非会員 元国土技術政策総合研究所 環境研究部 緑化生態研究室
神奈川県 県土整備局都市部 (〒231-8588 神奈川県横浜市中区日本大通1)

⁴非会員 元国土技術政策総合研究所 環境研究部 緑化生態研究室
島根大学 生物資源科学部 (〒690-8504 島根県松江市西川津町1060)

⁵非会員 国土技術政策総合研究所 国土防災・メンテナンス基盤研究センター
緑化生態研究室 (305-0804 茨城県つくば市旭1)

本研究では道路環境アセスメントにおける事後調査の技術手法として、糞抽出DNA分析を利用した道路横断施設のモニタリング技術の適用可能性と野生哺乳類に対する道路の生態学的影響について検討することを目的とした。文献調査の結果から、糞抽出DNAによる個体識別率の高い種であるニホンノウサギ *Lepus brachyurus* を選定し、一般国道289号線甲子道路の福島県南会津郡下郷町において糞の採取を行った。ノウサギの糞からDNAを抽出し、マイクロサテライトマーカー7種によるPCRを行い、フラグメント解析を行った。また、糞から抽出したDNAについて、ZFX/ZFY遺伝子により雌雄判別を行った。糞344サンプルから36個体(オス28, メス8)が確認され、個体数密度は、1.11個体/haであった。また、道路両側において4個体の横断が確認された。本研究の結果から、糞抽出DNAによる野生動物のバリアー効果や道路横断評価へ適用可能性が示された。

Key Words : environmental impact assesment, microsattelite marker, individual identification, sex determination, *Lepus brachyurus*

1. はじめに

道路事業における環境アセスメントでは、野生哺乳類については文献調査や目視、痕跡調査、捕獲調査によって、事業エリアの周辺部に生息する動物種がリストアップされる。その結果、道路敷地内への野生哺乳類の侵入が懸念される場合には、道路横断施設と侵入防止柵の設置が検討されてきた。

野生哺乳類に対する道路の生態学的影響には、大きく分けると①ロードキル(轢死)、②バリアー効果(移動障害)、③生息地の分断・孤立化があるが、わが国の研究は主にニホンジカ *Cervus nippon* やタヌキ *Procyonoides viverrinus* のロードキルに関する研究事例とその対策に限られている¹⁾。海外では、ロードキルやバリアー効果に関する研究も数多く、野生動物(例えば、アメリカクロクマ *Ursus americanus*²⁾、ボブキャット *Lynx rufus*³⁾)に電波

発信機を装着し、行動追跡からバリアー効果を明らかにする研究や道路の遺伝学的影響についての研究事例も増加している⁴⁾。

近年では、非侵襲的な調査方法として、野生動物の糞や獣毛から微量なDNAを抽出し、PCR(Polymerase Chain Reaction)法によって増幅する技術が開発され⁵⁾、これらの試料を用いて個体識別し、生息数を推定するといった手法が確立されつつある。松木ら⁶⁾は、ニホンノウサギの糞に含まれる排泄個体の微量の腸管細胞から細胞内のDNAを抽出し、さらにPCR法によって増幅し、マイクロサテライトマーカーによって個体識別を行い、さらに雌雄判定マーカーにより雌雄判別を行った。従来の首輪や足輪などの標識やラジオテレメトリーのような機器は、捕獲した個体へ装着する際の生体の取り扱いが困難であることや、その後の追跡に多大なコストがかかること、さらには標識の脱落、電池切れや故障により追跡不

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) ⁸⁾
		糞	不明	2004年6月～9月	8座位	不明	山内ら(2004) ⁹⁾
		唾液	被害殺物(トウモロコシ)	2004年夏	6座位	30%	Saito et al.(2008) ¹⁰⁾
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) ¹¹⁾
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) ¹²⁾
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) ¹³⁾
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) ¹⁴⁾
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) ¹⁵⁾
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) ⁷⁾
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	2006年10月	7座位	49%	中村ら(2012) ¹⁷⁾

可能になることが問題であった。一方で、糞抽出DNAによる個体識別法ではDNAを標識とするため、従来の方法と比べると標識の脱落がなく、長期間個体を追跡することが可能である。しかし、糞抽出DNAによる個体識別率は積雪期に高く、夏期は高温により腐敗しDNAの分解が早く進行すること、降雨によりDNAが流出などにより個体識別率が低いといった課題もある。

本研究では糞抽出DNAによる個体識別法の開発状況、糞の採取しやすさ、糞抽出DNAによる個体識別法を用いた道路周辺の生息地利用と道路の環境影響、従来の方法との調査コスト比較から道路環境アセスメントに対して糞抽出DNAによる個体識別法の適用可能性を探ることを目的とした。第1に国内の在来種を対象に、個体識別を目的としたマイクロサテライトマーカーの開発状況と個体識別率について文献を基に整理し、道路環境アセスメントにおける糞抽出DNA分析の適用可能な種を検討した。第2に文献整理を基に調査対象種を選定し、調査対象種の糞抽出DNAによる個体識別、雌雄判別を行った。その結果から、道路周辺における個体の分布、行動パターンを明らかにし、道路の影響を評価した。第3に糞抽出DNAによる個体識別法による行動追跡にかか

るコストを計算し、従来のラジオテレメトリー法による個体追跡コストと比較することによって、調査手法の適用性を検証した。

なお、本論文で用いる「道路横断施設」とは、道路下を人、車、野生動物を横断させるためのコンクリート製のボックスカルバート(天井がアーチ状になったものをアーチカルバートという)や河川の流路あるいは谷部への道路の敷設のために設置される橋梁、排水と動物横断の兼用としてのパイプカルバートのことをいう。

2. 材料および方法

(1) 調査対象種の選定

道路による分断化の影響を受けやすいと考えられる地上、樹上移動性の野生哺乳類のうち、ツキノワグマ *Ursus thibetanus* (以下クマ)、ニホンカモシカ *Capricornis crispus* (以下カモシカ)、ニホンジカ *Cervus nippon* (以下シカ)、ニホンイノシシ *Sus scrofa* (以下イノシシ)、ニホンアナグマ *Meles meles anakuma* (以下アナグマ)、ホンドタヌキ *Nyctereutes procyonoides viverrinus* (以下タヌキ)、ニホンノウサギ、ホンドテン *Martes melampus* (以下テ

ン), ニホンザル*Macaca fuscata* (以下サル), ニホンリス*Sciurus lis* (以下リス), ニホンイタチ*Mustela itatsi* (以下イタチ) の11種についてマイクロサテライトマーカーを用いた個体識別に関する先行研究を探索したところ, クマ^{8) 9) 10)}, カモシカ¹¹⁾, シカ¹²⁾, イノシシ¹³⁾, アナグマ^{14) 15)}, タヌキ^{14) 15) 16)}, ノウサギ⁷⁾, テン¹⁷⁾ の8種について個体識別に関する先行研究が確認された(表-1). それぞれの種について調査・分析内容(①個体識別, ②雌雄判別の有無), DNA抽出使用部位, 試料のサンプリング方法, 試料のサンプリング時期, 使用マーカー数, 個体識別率について整理した. これら既往研究の検索には, GeNii(国立情報学研究所)およびJ-STAGE(科学技術振興機構)の2つの検索エンジンを用いた. 検索キーワードは, 糞, DNA, 個体識別とし, 検索結果の中から日本在来の哺乳類に関する論文を抽出した.

タヌキはため糞により, 集中分布するため効率よく糞を採取できるが, 多くは林床は藪に覆われるため¹⁸⁾,



図-1 一般国道289号線甲子道路の位置

糞の発見に労力がかかり, 糞の採取効率は良くないと考えられる. 一方, ノウサギの糞粒数は282.6/日¹⁹⁾であり, 足跡上では等間隔に糞粒が確認されることから, 広く散在し, 効率良く多くの糞粒が採取できる. ノウサギは, 全国の高速道路においてタヌキに次いでロードキル数が多いことから²⁰⁾, 本研究における現地調査の対象種として選定した.

(2) ノウサギの糞の採取

現地調査は, 一般国道289号線甲子道路(図-1)の福島県南会津郡下郷町において起点(標高752m, 緯度経度N37.212 E139.909)から終点(標高1015m, 緯度経度N37.202 E139.948)までのおよそ6kmの区間において行った. 甲子道路の道路幅は9.5mであり, 平成20年9月21日に開通した後, 一ヶ月間の交通量は合計137,700台である²¹⁾. 調査区間の植生は, 主にミズナラ*Quercus crispula*が優占しており, 一部アカマツ*Pinus densiflora*, スギ*Cryptomeria japonica*・ヒノキ*Chamaecyparis obtusa*が生育する. 調査区間において, サンプルの採取地点として道路構造の違いにより, SiteA(10.2ha), SiteB(15.9ha), SiteC(13.2ha), SiteD(7.4ha)の4カ所を設定した(図-2). SiteAの道路構造は平坦地であり, 道路横断施設が充実している. また, SiteB, SiteCの道路構造は, 切土から盛土区間であり, 道路横断施設の密度は低い. SiteDの道路構造は平坦地であり, 低木林が優占しており, 旧道のため道路横断施設や侵入防止柵等の環境保全措置はとられていない.

松木らの研究⁹⁾によれば, ノウサギの糞から抽出したDNAによる個体識別率は, 積雪期に96~100%とDNAの劣化が極めて少なく, 夏期に7~35%とDNAの劣化が大

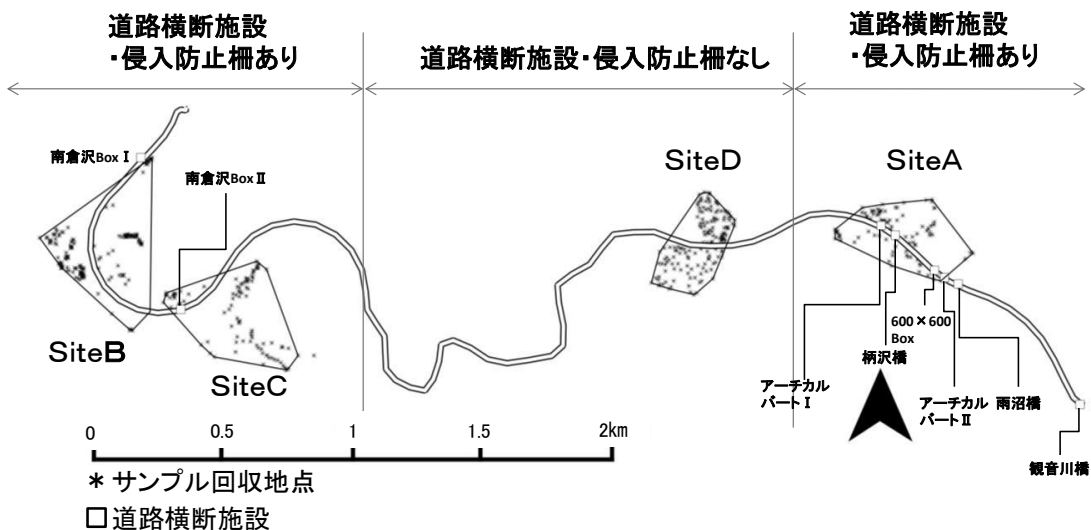


図-2 ノウサギの糞を採取したサンプリングエリアと地点

表-2 糞のサンプル採取日と推定最大糞蓄積期間

調査地	サンプル回収日	推定最大糞蓄積期間	道路構造
SiteA	2009/1/8	5日	盛土区間
SiteB	2009/2/25	4日	切土～盛土区間
SiteC	2009/2/26	5日	盛土区間～切土区間
SiteD	2010/2/25, 26	14～15日	平坦区間

表-3 ノウサギの個体識別用マイクロサテライトマーカー7種各マーカー座の Forward 側プライマーには、アデノシン付加効果の促進のため、5'末端に「GTTT」の4塩基を付加した。Sat13は5'末端の塩基がTであるため、「GTT」の3塩基を付加した。また、Reverse 側プライマーには、蛍光標識を付加した。

プライマー名	塩基配列
sol08	F 5'-GTTT GGATTGGGCCCTTTGCTCACACTTG-3'
	R 5'-ATCGACGCCATATCTGAGAGAACTC-3'
sol30	F 5'-GTTT CCCGAGCCCAGATATTGTTACCA-3'
	R 5'-TGCGACACTTCATAGTCTCAGGTC-3'
sol33	F 5'-GTTT GAAGGCTCTGAGATCTAGAT-3'
	R 5'-GGGCCAATAGGTACTGATCCATGT-3'
sat5	F 5'-GTTT GCTTCTGGCTTCAACCTGAC-3'
	R 5'-CTTAGGGTGCAGAATTATAAGAG-3'
sat12	F 5'-GTTT CTTGAGTTTTAAATTCGGGC-3'
	R 5'-GTTTGGATGCTATCTCAGTCC-3'
sol44	F 5'-GTTT ATTCACCAGATGACCCCTA-3'
	R 5'-GGTGGGGCGGGCTGCTGAAAC-3'
sat13	F 5'-GTT TGCAGGACATGGAATGGAT-3'
	R 5'-GCCTCTACCTTTGTGGGG-3'

きいことから、積雪期にサンプリングを行った。SiteAは2009年1月8日、SiteBは2009年2月25日、SiteCは2009年2月26日、SiteDは2010年2月25日、26日に糞を採取した。なるべく新鮮な糞を採取するため、足跡を追跡し、雪表面に残っている新鮮な糞を採取し、見つからない場合には、雪の中に埋没したやや古い糞を採取した。糞を採取する際に位置情報をハンディGPS (Garmin社製Colorado) により記録した。

調査地からおよそ10km離れた会津田島 (標高544m, 緯度経度N37.021 E139.795) の気象データ (気象庁) によると、2009年1月8日に採取したノウサギの糞は、2009年1月3日の日の午前ころまで降雪があったことから、3日午後から7日早朝に排泄された糞であることが推測される (表-2)。また、2009年2月25日、2月26日に採取した糞は、2月21日の8時まで連続的な降雪があったことから、2月21日の午後から2月25日の早朝に排泄された糞であることが推測される (表-2)。2010年2月25日、26日に採

取したノウサギの糞は、連続的な降雪があったのは2月11日の夜中までであり、その後は2010年2月22日まで少量の降雪があったものの、23日から気温が10℃を超えて表面の雪が解けたため、2月11日の夜中以降に排泄された糞であると推測される (表-2)。

(3) 糞抽出DNA分析

a) 糞からのDNA抽出

2009年1月8日に採取した糞96サンプル (SiteA)、2009年2月25日～26日に採取した糞156サンプル (SiteB, C)、2010年2月25日～26日に採取した92サンプル (SiteD) の全344からDNAを抽出した。DNA抽出はQIAamp DNA Stool mini kit (QIAGEN) により抽出した。糞1粒を耐熱性チャック付ポリ袋に入れ、ASL抽出Buffer5mlを加えて、65℃の恒温器で30分間インキュベートし、ポリ袋の外から塊がなくなるまで押しつぶした。さらに、65℃で2時間インキュベートした後、抽出Buffer2mlを取り、その後は抽出キットに添付されたマニュアルに従ってDNAを抽出した。抽出したDNA溶液は-80℃で凍凍保存した。

b) 個体識別

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とマイクロサテライトの2種類のDNAマーカーを用いたのは、マイクロサテライトマーカーにより個体識別できない糞サンプルについて、mtDNAでハプロタイプが決定でき、識別できた個体以外のハプロタイプを持つ場合は異なる個体と判断する指標として用いた。

mtDNAの分析には、松木ら⁷⁾の解析領域を含む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 (F : 5'-TGTAACCCAGAAACCGGAGAT-3' / R : 5'-TGGGCTGATTAGTCATTAG-3') を用いた。D-loop領域の解析におけるPCRは、糞から抽出されたゲノムDNA13-24ngをテンプレートに、最終濃度を0.625units TaKaRa Ex Taq Hot start version (タカラバイオ) (0.05μl)、10×PCR Buffer (2.5μl)、0.2mM dNTPs (2.0μl)、0.5μM primer (各0.25μl) に調整した25μl中の反応液で行った。PCR反応は95℃2分の予備加熱後、95℃30秒・60℃20秒・72℃30秒を30サイクル行い、時間短縮のため最終伸長は行わなかった。事前に最終伸長を行った場合と行わなかった場合で相違がないことを確認している。

マイクロサテライトの分析には表-3のプライマーセットを用いた。個体識別のPCRは、ゲノムDNA13-24ngをテンプレートに、最終濃度を2×Ampdirect plus (島津製作所) (5μl)、1.0μM primer (各0.2μl)、0.625units TaKaRa Ex Taq Hot start version (0.05μl) に調整した10μlの反応液で行った。PCR反応は、98℃60秒の予備加熱後、98℃10秒・60℃90秒・72℃30秒を15サイクル、90℃10秒・60℃90

秒・72°C30秒を20サイクル、72°C30分を1サイクルの最終伸長を行った。Applied Biosystems社製3130ジェネティックアナライザにより塩基配列を決定し、CLUSTALW ver.1.83²²⁾によりアライメントを行った後、mtDNAハプロタイプを分類した。

蛍光標識が付加されたPCR産物は、Applied Biosystems社製3130ジェネティックアナライザを用いて検出し、対立遺伝子サイズについてフラグメント解析を行った。フラグメント分析では、すべての座位についてPCR増幅および解析を2回行い、2回の結果が同一のDNA型であった場合、そのDNA型を採用した。allelic dropoutやfalse alleleにより2回の結果が異なった場合には、最高5回までとして、2回以上同じDNA型が検出されるまで分析を繰り返した。得られたDNA型の結果から、Cervus ver.3.0²³⁾により個体識別を行った。

c) 雌雄判別

糞から抽出したDNAについて、ZFX/ZFY遺伝子²⁴⁾を用いてPCR増幅を行った。ZFX/ZFY遺伝子が増幅された検体について、さらにオスのみが持つSry遺伝子⁷⁾を用いてPCR増幅を行った。雌雄判別のPCRは、ゲノムDNA13-24ngをテンプレートに、最終濃度を2×Ampdirect plus (5μl)、1.0μM primer (各0.2μl)、0.625units TaKaRa Ex Taq Hot start version (0.05μl) に調整した10μlの反応液で行った。PCR反応は、初期変性96°C120秒の後、変性94°C30秒、アニーリング30秒、伸長70°C45秒3サイクルを、アニーリング温度を3°Cずつ下げながら、72、69、66、63、60°Cの5段階で行い、続いて変性90°C30秒、アニーリング60°C30秒、伸長70°C45秒を25サイクルし、70°C30分の最終伸長を行った。PCR増幅産物はアガロースゲル電気泳動により検出し、その結果から雌雄判別を行った。

(4) 甲子道路周辺の現存植生図の作成

甲子道路における調査対象区間6kmの周囲300m圏内について、Google map (<http://maps.google.co.jp/>) に公開されている航空写真をArcGIS9.0 (ESRI社) に取り込み、位置情報を与え、植生の境界をトレースし、1/5000の現存植生図を作成した。植生分類は、落葉広葉樹林、スギ・ヒノキ植林、アカマツ林、カラマツ林、低木林 (伐採跡地)、低木林 (その他)、草地、耕作地、人工構造物 (住宅地・道路)、裸地、開放水面の11タイプとした。調査サイト内における植生分類に対するサンプリングの偏りを検証するために、サンプリング地点 (n=512) と同数の地点 (n=512) を調査サイト内にランダムに発生させ、各植生タイプのサンプリング地点とランダム地点をMann-whitney U test (SPSS11.5J) により比較した。さらに、調査範囲を50m×50mのメッシュで区分し、メッシュ内に含れるノウサギの個体数と植生分類の面積率を算出

し、個体数と植生との関連性から環境選択性を解析した。ベクターデータによって作成した現存植生図は、ラスターデータに変換し50m×50mメッシュ内の各植生の面積率を算出した。植生分類の面積率を変数として、クラスター分析 (平方ユークリッド距離、Ward法) (SPSS11.5J) により分類し、クラスターごとの個体数をKruskal-wallis検定 (SPSS11.5J) により比較した。現存植生図の作成にはArcGIS9.0 (ESRI社) を使用し、調査区ごとの50m×50mのメッシュの作成、各メッシュ内の現存植生の面積率の計算には、ArcView3.2a (ESRI社) およびエクステンションのSpatial analystを使用した。

(5) 調査コストの評価

本研究では、野生動物の行動追跡により、道路によるバリアー効果の検証や道路横断施設を設置するための移動経路の探索することを目的として、野生哺乳類の個体の行動追跡を行うと仮定した。そのため、従来のVHFを用いたラジオテレメトリー法と本研究で行った糞抽出DNA法による個体あたりのコストについて人件費と消耗品費を基に評価した。人件費については、平成26年度設計業務委託等技術者単価²⁵⁾ を参考に技師A、B、Cの単価の平均値¥33,833から算出した。

ラジオテレメトリー調査における個体の捕獲には、2人1組で2回 (12時間に1回) /日、2週間の見回りを要し、1個体捕獲したと仮定した。個体の追跡には2人1組で1個体を24時間×1週間追跡したと仮定した。消耗品のVHF発信機は、ノウサギの体重を2kgと仮定し、VHF発信機として一般的に普及しているAdvanced Telemetry Systems製のもの (Nylon color, 重量60g) を使用するものとした。追跡の際に使用する八木アンテナおよび受信機は汎用性があることから、購入済みとした。また、捕獲の際の麻酔にはケタラール筋注用50mg (第一三共株式会社) 使用するものとした。ラジオテレメトリー調査は、捕獲に要する期間が長く、調査個体は複数個体となるため、本研究で仮定したコストよりも大幅に増加することが予想される。

糞抽出DNA分析には、今回使用した344サンプルを採取するのに2人で5日要した。344サンプルを個体識別、雌雄判別に要する日数は2ヶ月以上 (70日と仮定) とした。DNA分析に必要な試薬・消耗品の価格については本研究を実施するために実際にかかった金額を使用した。DNA分析機の購入コストについては、DNA分析機器を所有する企業や大学、研究機関を活用するため、含めないものとした。すべての価格は、下3桁を切り捨てた値を用いた。

3. 研究結果

(1) 糞抽出DNAによる個体識別法の現状

マイクロサテライトマーカーによる個体識別が確立されている種は、クマ、ニホンジカ、ニホンアナグマ、ホンダタヌキ、ニホンノウサギ、テンの6種であり、個体識別率の高い種は、タヌキとノウサギの2種であった(表-1)。

(2) 糞抽出DNAによるノウサギの個体識別と雌雄判別

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⁷⁾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344サンプルから11種類のハプロタイプが確認された(DBJ/EMBL/GenBankデータベースアクセッション番号: AB690392~AB690402)。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サンプルから36個体を識別した。344サンプルの個体識別率は100%であった。また、ZFX/ZFY遺伝子およびSry遺伝子のPCR産物を電気泳動した結果、36個体のうちオスは28個体、メスは8個体であった。雌雄判別率は344サンプル中1サンプルのみ判別不可能であったことから99.7%であった。SiteAが13個体(オス6, メス7)、SiteBが6個体(オス5, メス1)、SiteCが6個体(オス5, メス1)、SiteDが12個体(オス11, メス1)であり、それぞれの個体数密度は、SiteAが1.75個体/ha、SiteBが0.52個体/ha、SiteCが0.58個体/ha、SiteDが1.58個体/haであった。36個体内、サンプリングサイト間ではSiteBとSiteCにおいて共通する個体が1個体確認されたが、そ

れ以外では共通個体は確認されなかった。また、道路両側においてSiteA (n=13)、SiteD (n=6) で各2個体、合計4個体の横断が確認されたが、その他の個体の横断は確認されなかった(図-3)。

調査サイト内の植生は、落葉広葉樹林と低木林が優占しており、各植生タイプに含まれるサンプリング地点とランダム地点には有意な差は認められなかった(図-4)、耕作地と裸地を除く全てMann-whitney Utest $p > 0.05$ 。また、50m×50mメッシュ内の現存植生の面積率を変数にクラスター分析を行った結果、現存植生のタイプは落葉樹林優占メッシュ(CLU1)、アカマツ優占メッシュ(CLU2)、草地優占メッシュ(CLU3)に分類された(図-5)。現存植生タイプごとの個体数には有意な差は認められなかった(図-6、Kruskal-wallis検定 $p > 0.05$)。

(3) 行動追跡におけるコスト計算

本研究では、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(表-4)。ラジオテレメトリー法は¥2,869,000、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¥8,414,000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個体で除算した結果、1個体あたりおよそ¥233,000と計算された。

4. 考察

(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種であり、手法が確立されている種は、クマ、シカ、アナ

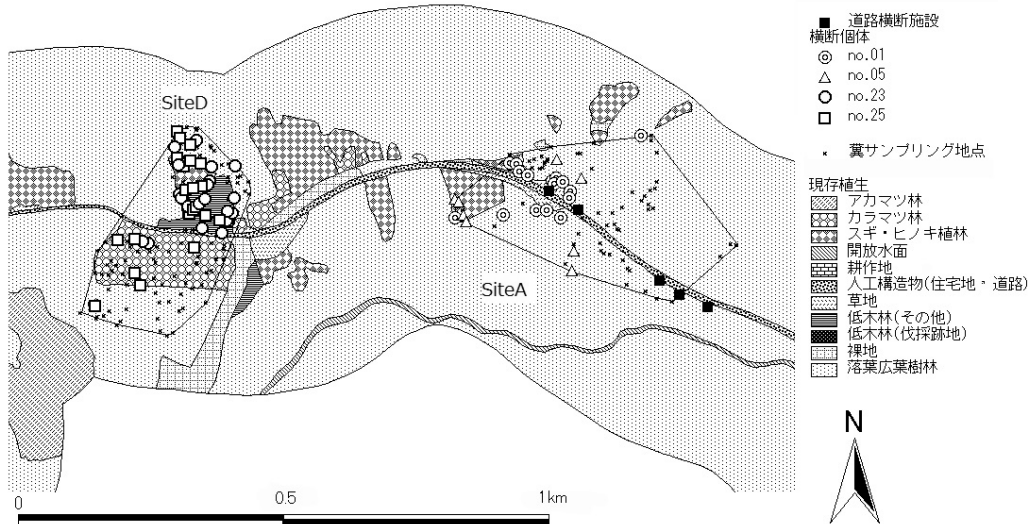


図-3 道路横断が確認された4個体の糞の分布

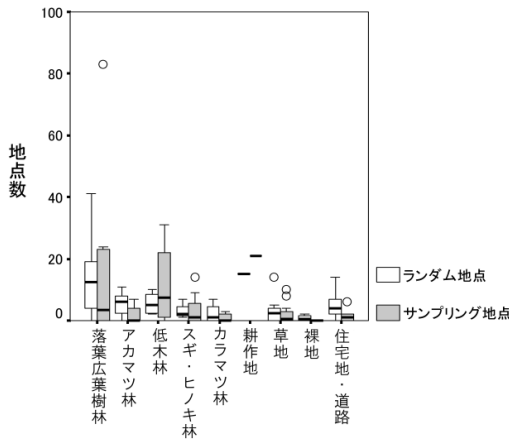


図-4 各植生分類の糞のサンプリング地点とランダム地点の箱ひげ図の比較。○は外値を示す。

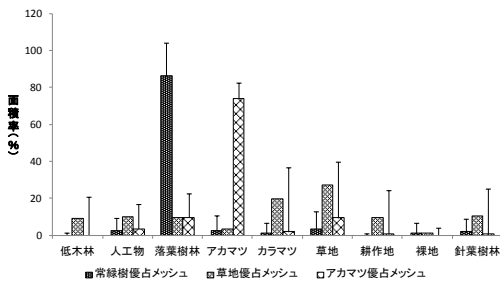


図-5 50m×50m メッシュ内の現存植生

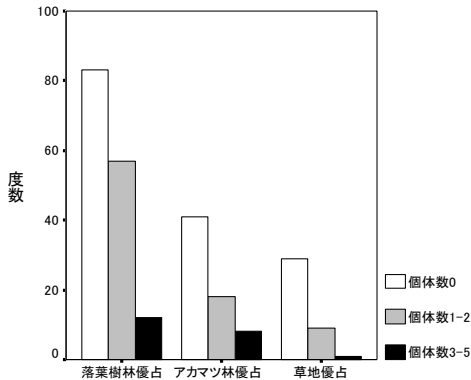


図-6 個体数と植生クラスターとの関連性

グマ、タヌキ、ノウサギ、テンの6種であった(表-1)。本研究で選定したノウサギは、積雪期に足跡を追跡することにより、数多くの糞を効率良くサンプリングすることが可能であった。また、個体識別による結果からノウサギの生息密度は全体で1.11頭/haであり、大型哺乳類の生息密度(例えば、ツキノワグマは700~800haに1頭²⁶⁾)

と比較すると少ない調査努力量で多くの個体を識別し、トレースできたと考えられる。このことから糞がランダムに分布し、比較的行動圏の狭い種について糞抽出DNA法を適用することにより、継続的な個体の追跡が可能であると考えられる。シカやカモシカは高い移動能力を持つ大型哺乳類であり、捕獲にかかる労力は非常に大きい。ニホンジカの糞粒数は880~1200粒/日、排泄回数は11~13回/日、カモシカは810~980粒/日、排泄回数は2.2~4.6回/日²⁷⁾と非常に多いため、数多くの糞を効率良く採取できる。ニホンジカは非積雪地域では定住型であり、積雪地域では季節移動型の行動パターンを示す²⁸⁾。一方、カモシカは、定住性が強く、行動圏もオス15ha、メス10ha程度であり、ため糞をする²⁹⁾。道路周辺に生息する草食性哺乳類の定住的な個体群に対して糞抽出DNA法の適用可能性は十分にある。また、雑食性のテンはマーキング糞を採取することで、個体識別を行い¹⁷⁾、個体の分布と個体数推定³⁰⁾が可能であるように、タヌキのようなため糞をする種など、道路周辺に定住的な個体の分布と移動を明らかにすることは可能である。

(2) ノウサギを事例とした道路の影響評価

甲子道路調査における個体識別の結果から、36個体の存在が明らかとなり、調査地全体で平均1.11個体/haであった。松木ら⁷⁾によれば、秋田県駒ヶ岳山麓では平均40.5頭/km²(0.4頭/ha)が確認されており、本研究の結果は2倍以上の結果となったことから、十分な評価個体数が得られたものと考えられる。また、36個体中で道路の両側で確認されたのは4個体であった(図-3)。その他の個体の分布は道路両側で分断されており、バリアー効果の可能性が示唆された。しかし、道路のバリアー効果について、どの程度の個体が移動・分散を制限されると個体群の存続可能性や遺伝的多様性に対して影響があるのかについては今後の課題である。各調査サイトの横断数はsiteAは2個体、siteBは0個体、siteCは0個体、siteDは2個体と道路横断施設が複数設置されたsiteAと侵入防止柵や道路横断施設が設置されていないsiteDにおいて横断が確認され、道路横断施設が1ヶ所ずつで、谷部を盛土した区間を多く含むsiteBとsiteCでは横断が確認されなかった。このことから、侵入防止対策を実施することにより、道路横断を防止し、ロードキルの低減に貢献できるが、道路横断施設を適量設置しないと浸透性が低下すると考えられる。道路横断施設を設置する際の数量や位置については、Bissonette & Adair³¹⁾はHR⁰⁵(ホームレンジサイズの0.5乗)を道路横断施設の配置の基準として提案しているが、わが国では未だ検討した事例はなく、今後の課題である。本調査地におけるノウサギの生息密度は、0.52~1.75個体/haであり、一方、秋田駒ヶ岳山麓におけるスギ林内の生息密度⁷⁾は、およそ0.41個体/haであった。

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		¥2,841,000	¥5,074,000
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	¥2,869,000	¥8,414,000
	1個体あたり	¥2,869,000	¥233,000

本研究の調査地は、ミズナラ林が優占し、人手の入った二次林が多いため、林床が明るい。また、道路の敷設によって林縁環境も多いため、ノウサギの選好する林縁性の食物資源量も多いと考えられる。そのため、松木ら⁷⁾のスギ林内の生息密度よりも本研究の生息密度のほうが高い結果になったと推測される。

野外において全てのノウサギの糞を採取することは不可能であり、調査地の全個体数を糞抽出DNAのみによって推定することはできない。そこで、野生動物個体群の推定に良く用いられる標識再捕獲法³²⁾を応用し、糞抽出DNAを標識とした標識再捕獲モデルを用いた推定法(例えばテン³⁰⁾；ブラックベアー³³⁾；グリズリーベアー³⁴⁾)を用いることで、より実数に近い値が求められると考えられる。

本研究では糞抽出DNA分析による個体識別の結果から、道路周辺における個体ごとの行動パターンを明らかにしたところ36個体中4個体の道路横断を確認し、他の個体は道路によって分断されていた。しかし、4個体の横断は、糞が堆積した期間内の移動を表す。そのため、複数回のサンプリングと解析によって冬期の移動・分散を評価する必要がある。また道路の環境影響を通年で評価するためには、夏季を含めた年間を通じた影響評価を実施することが必要である。一方、夏季は高気温のため、糞中のDNAの劣化が早く、夏季に採取した糞の個体識別率は30%程度である⁷⁾。したがって夏季には、新鮮な糞を採取するための調査計画やDNAの保存と抽出手法を検討する必要がある。

(3) 糞抽出DNAによる個体識別法のコスト

追跡調査におけるコスト比較の結果から、1個体あたりの糞抽出DNAによる個体識別法のコストはラジオテレメトリー法のおよそ1/10程度であった。DNA分析の課題として、分析機器を準備する際に非常に高い初期投資が必要とされ、DNA関連の業務を行う企業や研究機関、

大学以外で所有することは困難であることから、本研究において機器コストを含めることは適当ではないと考えた。機器コストの課題は、発注者、受注者とDNA分析が可能な大学、研究機関、企業と連携することによって解決できるものと考えられる。

道路の生態学的影響を明らかにする際のテレメトリー調査の長所は、個体あたりの行動圏や移動経路を明らかにできることである。本研究による試算(2週間の行動追跡)に基づき年間(例えば、2週間/月の行動追跡を3季実施した場合)の行動圏を明らかにするためには、1千万程度のコストがかかり、さらに調査個体数分のコストが加算される。一方、糞抽出DNA法は、行動圏を把握することは困難であるが、複数個体の糞抽出DNAによる個体識別結果と糞の位置関係から、複数個体の分布や移動を追跡することが可能である。ただし、事業実施前の道路用地による移動経路の分断箇所把握や道路用地内外の個体の分布、事業実施後の個体の分布の変化や移動状況、バリアー効果について年間を通して把握する場合には、単純でも3季実施することを考えると本研究で算出したコストの3倍が必要である。ダム事業地におけるテンの糞による個体識別は3季の調査で262個の糞から51個体を識別し、事業地に少なくとも10個体が定住している可能性を評価するために2~3千万のコストで分析している³⁵⁾。糞抽出DNAによる個体識別法により個体数推定や道路のバリアー効果を評価するためのコストは、事業地の面積によって異なるため、効果的・効率的な調査手法を検討し、コストの低下を図る必要がある。

以上のことから、糞抽出DNA法によるコスト・ベネフィットの高い種は、①捕獲が困難な種(大型種や捕獲率の悪い種)、②草食性哺乳類のような糞を採取しやすい種、③定住性の高い種あるいは個体であり、このような種・個体にとって糞抽出DNA分析法は適用可能性が高いと考えられる。

謝辞：ノウサギの糞抽出DNAによる個体識別および雌雄判別の分析を行うにあたり、財団法人電力中央研究所の松木吏弓博士には、分析に対するご指導と有益な助言をいただいた。現地調査にあたり国土交通省郡山国道事務所および福島県南会津建設事務所にご協力いただいた。また、ノウサギの糞をサンプリングするにあたり、元国土交通省国土技術政策総合研究所環境研究部緑化生態研究室の方々に協力いただいた。ここで、ご協力いただいたすべての方々にお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 園田陽一, 武田ゆうこ, 松江正彦: 野生動物におけるロードキル, バリアー効果とミティゲーション技術に関する研究の現状と課題, ランドスケープ研究, Vol.4, pp.7-16, 2011.
- 2) Brody, A. J. and M. R. Pelton: Effect of roads on black bear movement in western North Carolina, *Wildlife Society Bulletin*, Vol.17, pp.5-10, 1989.
- 3) Lovallo, M. J. and E. M. Anderson: Bobcat movements and home ranges relative to roads in Wisconsin, *Wildlife Society Bulletin*, Vol.24, pp.71-76, 1996.
- 4) Holderegger, R. and M. Di Giulio: The genetic effect of roads, A review of empirical evidence: Basic and Applied Ecology, Vol.11, pp.522-531, 2010.
- 5) Tarberlet, P., S. Griffon, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits and J. Bouvet: Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR, *Nucleic acids research*, Vol.24, No.16, pp.3189-3194, 1996.
- 6) 松木吏弓, 矢竹一穂, 梨本真: 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, (財)電力中央研究所, 2000.
- 7) 松木吏弓, 矢竹一穂, 竹内亨, 阿部聖哉, 石井孝, 梨本真: 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, (財)電力中央研究所, 2004.
- 8) 大西尚樹, 金澤文吾, 長久保義紀: 四国におけるツキノワグマの個体情報の収集—体毛をもちいた遺伝学的手法による個体識別—, 保全生態学研究, Vol.131, pp.129-135, 2008.
- 9) 山内貴義, 佐藤宗孝, 辻本恒徳, 青井俊樹: 岩手県のツキノワグマ保護管理に関わるモニタリング調査とその課題, 哺乳類科学, Vol.48, No.1, pp.83-89., 2008.
- 10) Saito, M., K. Yamauchi and T. Aoi: Individual identification of Asiatic black bears crows, *Ursus*, Vol.19, No.2, pp.162-167., 2008.
- 11) 西村貴志: ニホンカモシカのDNA解析による個体識別とその応用, 岩手大学21世紀COEプログラム平成17年度成果報告書, 2006.
- 12) 宮崎幸司, 山内貴義, 濱崎伸一郎, 菊水健史, 武内ゆかり, 森裕司: 糞中DNA解析によるニホンジカの個体識別, *日本野生動物医学学会誌*, Vol.6, No.1, pp.1-6, 2001.
- 13) 石川修司, 名矢結香, 岸本真弓, 森光由樹: ニホンイノシシのヘアートラップ—トラップの形状と季節変化に関する考察—, 第12回日本野生動物医学学会大会講演要旨集, pp.54, 2008.
- 14) 松木吏弓, 竹内亨, 阿部聖哉, 梨本真, 平田智隆, 上野智利, 田崎耕一: 中型哺乳類を典型性注目種とした生態系アセスメント手法の開発—DNA情報を利用したタヌキ・アナグマの個体数推定—, 電力中央研究所報告V08043, (財)電力中央研究所, 2009.
- 15) 松木吏弓, 竹内亨, 阿部聖哉, 梨本真, 平田智隆, 金尾充浩, 坂田和弘: アナグマ・タヌキのため糞からのDNA情報を利用した種判定および個体識別, *DNA多型*, Vol.16, pp.55-59, 2008.
- 16) 松木吏弓, 竹内亨, 阿部聖哉, 梨本真: タヌキにおけるマイクロサテライトDNAによる個体識別, *DNA多型*, Vol.14, pp.188-192, 2006.
- 17) 中村匡聡, 松村弘, 田悟和巳, 荒井秋晴: マイクロサテライトDNA多型解析によるテン*Martes melampus*の個体識別, *DNA多型*, Vol.20, pp.334-339, 2012.
- 18) Ikeda, H.: Socio-ecological study on the Raccoon dog with reference the habitat utilization pattern, *Kyusyu Univ. Doctor thesis*, 66pp., 1982.
- 19) 平岡誠志, 渡辺弘之, 寺崎康正: 糞粒数によるノウサギ生息密度の推定. *日本森林学会誌*, Vol.59, No.6, pp.200-206, 1977.
- 20) 橘敏雄: その他の野生動物による交通事故の現状, 「野生動物の交通事故対策—エコロード事始め—」(大泰司紀之・井部真理子・増田泰, 編), 北海道大学図書刊行会, 191 pp., 1998.
- 21) 国土交通省郡山国道事務所HP: 「国道289号甲子道路」開通後1ヶ月間の交通量(甲子トンネル付近)について, <http://warp.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/259973/www.thr.mlit.go.jp/kori-yama/new/press/08happyo/0810232.htm>
- 22) Thompson J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, Vol.22, pp.4673-4680, 1994.
- 23) Kalinowski, S. T., M. L. Taper and T. C. Marshall: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increase success in paternity assignment, *Molecular ecology*, Vol.6, pp.1099-1106, 2007.
- 24) Aasen E., Medrano J. F.: Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *BioTechnology*, 8, pp.1279-1281, 1990.
- 25) 国土交通省ホームページ: 平成26年度設計業務委託等技

- 術者単価, <http://www.mlit.go.jp/tec/sekisan/sekkei/tanka.html>.
- 26) 石田健：東京大学秩父演習林の国道140号線施設地域におけるツキノワグマ個体群の生息状況東京大学農学部演習林報告, 東京大学農学部演習林報告, Vol.105, pp.91-100, 2001.
- 27) 高槻成紀, 鹿股幸喜, 鈴木和男：ニホンジカとニホンカモシカの排糞量・回数, 日本生態学会誌, Vol.31, pp.435-439, 1981.
- 28) 丸山直樹：ニホンジカ *Cervus nippon* の季節的移動と集合様式に関する研究, 東京農工大学農学部学術報告, Vol.23, pp.1-85, 1981.
- 29) 岸本良輔：ニホンカモシカ（日高敏隆監修, 日本動物大百科：哺乳類II, 155pp）, pp.106-111, 1996.
- 30) 田悟和巳, 荒井秋晴, 松村弘, 中村匡聡, 足立高行, 桑原佳子：糞から抽出されたDNAを用いたテン *Martes melampus* の個体数推定, 哺乳類科学, Vol.53, No.2, pp.311-320, 2013.
- 31) Bissonette, J. A. and W. Adair: Restoring habitat permeability to roaded landscapes with isometrically-scaled wildlife crossings, *Biological conservation*, Vol.141, pp.482-488, 2008.
- 32) Krebs, C.J.: *Ecological methodology*. 2nd Ed. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA., pp.19-69, 1998.
- 33) Boersen, M. R., J. D. Clark and T. L. King: Estimating black bear population density and genetic diversity at Tensas River, Louisiana using microsatellite DNA markers, *Wildlife society bulletin*, Vol.31, No.1, pp.197-207, 2003.
- 34) Mowat, G: Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis, Vol.64, No.1, pp.183-193, 2000.
- 35) 井上幸治, 中村敏弥：DNA捜査—王者の痕跡を辿る—, 国土交通省国土技術研究会講演要旨, 2009. (2014. 7. 28受付)

Assessing the feasibility of identifying individual mammals by fecal DNA analysis to evaluate the environmental impacts of a road

Yoichi SONODA, Masatoshi NAKAMURA, Masahiko Matsue, Masako KUBO,
Yusuke UENO and Masao KURIHARA

This study aimed to verify whether the identification of individual mammals using fecal DNA could be used to assess the environmental impacts of a road. We selected the Japanese hare, *Lepus brachyurus*, as target species for the DNA analysis. A total of 36 hares (28 males and 8 females) were identified from 344 fecal samples, and 4 hares of them has crossed both sides of the road. I suggested that the individual identification method by fecal DNA would be applicable to difficult-to-capture mammals, herbivorous mammals and more sedentary mammals around the road.