

電力中央研究所報告

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—

研究報告：V08043

平成21年6月

財団法人 電力中央研究所

R **CRIEPI**

The image shows a stylized logo in a light gray color. It features a large, bold, serif letter 'R' on the left. To its right, the word 'CRIEPI' is written in a smaller, bold, sans-serif font. Two thick, curved lines, resembling a stylized 'S' or a swoosh, are positioned above and below the text, framing it. The top curve starts above the 'R' and ends above the 'I' of 'CRIEPI'. The bottom curve starts below the 'R' and ends below the 'I' of 'CRIEPI'.

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—

松木 吏弓*1 竹内 亨*2 阿部 聖哉*2
梨本 真*3 平田 智隆*4 上野 智利*5
田崎 耕一*5

キーワード：環境アセスメント

個体識別

個体数推定

糞

マイクロサテライト DNA

Key Words : Environmental impact assessment

Individual identification

Population size estimation

Feces

Microsatellite DNA

**Development of ecosystem impact assessment methods for middle-sized mammals
as the representative species
- Population size estimation of raccoon dog and badger by fecal DNA typing -**

**Rikyu Matsuki, Toru Takeuchi, Seiya Abe, Makoto Nashimoto
Tomotaka Hirata, Chitoshi Ueno and Kouichi Tasaki**

Abstract

Raccoon dog and badger distribute widely in Japan, and inhabit mainly country-side forest. They are considered to be chosen as representative species for ecosystem impact assessments. In this study, we performed field research to estimate population size, distribution and the social structure of these animals based on the genetic information obtained from fecal DNA analysis. We collected raccoon dog feces regularly for 12 weeks from the study area in Abiko, Chiba prefecture to estimate the number and genetic relationship of individuals using their latrines. Seven raccoon dogs were identified and 6 of them constructed same family relationship. Badger feces were collected from the 165 ha study area in Satsumasendai, Kagoshima prefecture to examine population size and distribution of individuals. Total 68 feces were successfully genotyped and 30 badgers were identified. Population size in this study area estimated by the rarefaction method using genotyped data, was 38 individuals (95%CI= 31-69). These results indicated that the research method using fecal DNA analysis is effective to estimate population size, behavioral and population genetics for raccoon dog and badger.

(Environmental Science Research Laboratory Rep.No.V08043)

(平成 21 年 3 月 12 日 承認)

- *1 環境科学研究所 生物環境領域 上席研究員
*2 環境科学研究所 生物環境領域 主任研究員
*3 環境科学研究所 上席研究員・スタッフ
*4 西日本技術開発株式会社 環境部
*5 九州電力株式会社 環境部

背 景

発電所の環境影響評価では、事業が生態系に及ぼす影響を予測評価することが求められている。予測評価に際しては、地域の生態系を特徴づける種を上位性、典型性、特殊性の視点から注目種として選定し、行動圏や生息環境、餌生物などを調査することによって、生態系への影響を可能な限り定量的に把握することとされている。タヌキやアナグマなどの中型哺乳類は、火力・原子力発電所が立地する里山環境の代表的な典型性注目種の候補であるが、夜行性で森林や藪などを主な生息場所としているため、個体数や分布状況を把握することは困難な場合も多い。近年、野生動物の糞や体毛の DNA から個体情報が取得できるようになり¹⁾、この技術を利用した個体数推定法の開発や生態系アセスメントへの適用が期待されている。

目 的

タヌキおよびアナグマを対象として野外に排泄された糞から DNA 情報を収集し、個体の識別および個体数の推定を行い、生態系アセスメントへの適用性について評価する。

主な成果

1. タヌキのため糞場利用個体の推定と血縁関係

タヌキには決まった場所に集中的に糞をする「ため糞」という習性があり、複数の個体が共同で利用する。ため糞場を利用している個体数やその個体間の関係を明らかにすることを目的に、千葉県我孫子市で確認したため糞場を利用するタヌキを対象として調査を行った。2005年11月から翌年2月にかけて毎週定期的のため糞場を調査し、新規に追加された糞を採取した。糞から DNA を抽出し、個体識別した結果、7個体のタヌキがため糞場を利用していたことが明らかになった。このうち6個体が、血縁関係の解析から家族集団（父，母，仔4）を構成することが判明し、この家族集団が共有してため糞場を利用していると考えられた。

2. アナグマの生息分布と個体数推定

鹿児島県薩摩川内市において、クロマツ植林が大部分の低地（S1区：84.8ha）および常緑広葉樹林とスギ・ヒノキ植林が混在する山地（S2区：80.8ha）の2つの隣接する調査区を設定し、糞 DNA による個体識別結果からアナグマの生息個体数を推定することを目的に、2006年11月に網羅的な踏査による糞場確認調査を行った。採取した糞から個体識別した結果、S1区で12個体、S2区で18個体が確認できた。

この調査では各調査区を利用する全ての個体の糞を特定できていないと推測されるため、累積曲線を用いた個体数の推定^(注1)を試みた。その結果、S1区では15個体(95%信頼区間：12-45)、S2区は24個体(95%信頼区間：18-49)と推定され、個体数密度はそれぞれ0.18個体/ha、0.30個体/haと推定された。本調査地で並行して実施したアナグマの餌資源²⁾や巣穴³⁾の好適性評価においても、常緑広葉樹林の多い山地のS2区が高い評価であり、S2区での個体数密度の高さはアナグマにとって好適な生息環境を反映していることが示唆された。

3. 生態系アセスメント調査への適用性の評価

本研究で示した糞DNA解析に基づく調査手法は、個体数推定や社会構造の解析だけでなく、糞の分布から各個体の行動範囲も推測できる。本手法を用いれば、開発により生息地の改変がある場合に、その影響を直接受ける個体の数や行動範囲も把握可能であり、生態系アセスメントにおいて事業の影響を評価する上で有効な調査手法であると考えられた。

今後の展開

糞DNA解析を用いて野生動物の遺伝的多様性を評価する手法について検討し、環境アセスメント調査や野生動物の保全管理等に活用を図る。

(注1)：一定の範囲内で糞の排泄個体を特定する調査を続けた場合、最終的にはすべての個体の糞が確認できると予想される。このとき、調査試料数に対する新規確認個体数の累積曲線は漸近線に収束するが、その漸近値は全個体数と一致する。この漸近線を推測し、個体数の推定を行った。

関連報告書・論文

- 1) 「DNA 情報を利用した新しい野生動物調査法の開発 ―タヌキの個体識別と未知生物試料からの種同定―」 V05017.
- 2) 「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 ―タヌキ・アナグマの餌資源分布の評価―」 V08044.
- 3) 「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 ―影響予測・評価のための生息好適性解析―」 V08045.

目 次

1. はじめに	1
2. 材料と方法	1
2.1 試料	1
2.1.1 我孫子調査地でのサンプリング	1
2.1.2 川内調査地でのサンプリング	2
2.2 DNA 抽出	3
2.3 種判定	3
2.4 個体識別	3
2.5 雌雄判定	4
2.6 生息数推定	4
3. 結果	4
3.1 我孫子調査地におけるタヌキため糞場の定点調査	4
3.2 川内調査地におけるアナグマ・タヌキの生息分布調査	6
4. 考察	9
4.1 タヌキの糞場利用個体数	9
4.2 タヌキの糞場利用と活動記録との比較	9
4.3 タヌキの家族集団の糞場利用	9
4.4 川内調査地におけるアナグマの生息環境と個体数密度	11
4.5 DNA 解析の環境アセスメント調査への活用	11
謝辞	13
参考文献	13

1. はじめに

1999年に施行された環境影響評価法では、新たに「生態系」が評価項目として取り上げられた。上位性（生態系の食物連鎖の上位に位置する性質）、典型性（地域の生態系の特徴を典型的に表す性質）、特殊性（特殊な環境の指標となる性質）の視点から注目種・群集を選定し、科学的かつ定量的に影響予測・評価することが求められているが（環境庁企画調整局 2000）、具体的な調査解析手法は確立していない。このため、これまでに実施された生態系アセスメントにおいて、必ずしも十分な影響評価がなされていないのが現状である。2005年には本法の基本的事項に関して点検が行われたが（環境影響評価の基本的事項に関する技術検討委員会 2005）、特に「生態系」の分野については、より一層の技術手法の開発が求められており、適切な環境影響評価を行う上で有効な技術手法の開発が強く望まれている。

生態系アセスメントにおいては、選定した注目種の行動圏や生息環境、餌生物を調査することが基本であり、これらに関してできるだけ詳細な情報を得ることが望ましい。一方で、現実のアセスメント調査を考えた場合、調査期間や調査コストといった視点も重要である。また、調査自体が対象地域の生態系におよぼす影響も考慮する必要がある。このような観点から我々はより効率的で精度の高い生態系調査手法を提案することを目指し、DNA情報を活用した調査手法の開発・研究を進めている。

雑食性の中型哺乳類であるタヌキやアナグマは、国内に広く分布しており、人間の生活圏に近い里地、里山に生息している（芝田 1996、金子 1996）。様々な環境を利用し、雑食性であるため、森林の伐採や土地利用の変化、構造物の設置などの複合的な影響を予測するのに適していることから、生態系アセスメントにおいて典

型性の視点から選定されうる代表的な注目種であるといえる。

事業が注目種におよぼす影響を評価する上で、その対象動物が調査地にどのくらい生息しているのかを把握することは、最も基本的かつ重要なことである。しかし、タヌキやアナグマは夜行性であり、森林や藪などを主な生息場所としているため、観察による個体数推定は非常に困難である。タヌキとアナグマはどちらも「ため糞」と呼ばれる決まった場所に集中的に糞をする習性があり、行動範囲内に複数ヶ所のため糞場を利用する（芝田 1996、金子 1996）。そこで本研究では、タヌキとアナグマの糞に着目し、糞に含まれる DNA 情報を利用して、排泄個体の識別および個体数の推定を試みた。

本研究は2ヶ所の調査地で実施した。我孫子調査地においては、タヌキのため糞場を約80日にわたって定点調査し、ため糞場の利用状況と個体数さらに利用個体の血縁関係を糞 DNA から明らかにした。川内調査地では、タヌキとアナグマが同所的に生息する調査地において、網羅的な糞場確認調査を実施し、採取した糞の個体識別結果から調査地の生息数を推定した。なお、川内調査地における調査・解析は、九州電力株式会社川内原子力発電所3号機増設計画に伴う環境影響評価の一環として行われたものである。

2. 材料と方法

2.1 試料

2.1.1 我孫子調査地でのサンプリング

自動撮影カメラを用いた予備調査から、千葉県我孫子市にある電力中央研究所構内の林内でタヌキの活動が確認されていたことから、電力中央研究所構内およびその周辺に生息するタヌキを調査の対象とした。2005年11月に電力中

央研究所構内およびその周辺において、タヌキのため糞場を探索し、利用が認められる3ヶ所のため糞場を確認した(図1)。これらのため糞場について、週に1回の頻度で調査を行い、糞の採取を行った。調査は11月15日、25日、12月1日、8日、15日、22日、27日、2006年1月6日、13日、19日、27日、2月3日の計12回実施し、糞を繰り返し採取した。糞は前週以降に排泄された新しいものだけを採取し、新しい糞が確認できない場合には採取しなかった。採取した糞は保冷材入りのクーラーボックスに移した後、速やかに実験室に持ち帰り、DNA抽出まで冷凍庫(-20℃)で保存した。

2.1.2 川内調査地でのサンプリング

鹿児島県薩摩川内市のアナグマおよびタヌキが生息する地域に、クロマツ植林が大部分である海岸沿いの低地(S1調査区:84.8ha)とスダジイが優占する常緑広葉樹林とスギ・ヒノキ植林が混在する山地(S2調査区:80.8ha)の2つ

の隣接する調査区を設定した(図3)。2006年11月13日~16日に各調査区において、タヌキおよびアナグマのため糞や巣穴等を確認するフィールドサイン調査を実施した。事前に調査区全域を網羅するように約50m間隔に調査ルートを設定し、このルートを基準に安全性に配慮しながらフィールドサインの探索を行った。実際に踏査したルートおよび確認したフィールドサイン地点の位置は、携帯型GPS機を用いて記録した。発見した糞のうち、新鮮な糞のみを採取した。新鮮な糞が複数あった場合には糞塊ごとに別々に採取した。また5m以内の近接した糞については、まとめて1ヶ所の糞場位置として記録した。新鮮な糞が確認された糞場や規模の大きい糞場については、11月17日および11月20日~22日に2回以上調査し、新規に追加された糞を採取した。採取した糞は、調査中には保冷材入りのクーラーボックスで一時保管し、調査終了後速やかに-20℃で冷凍保存した。

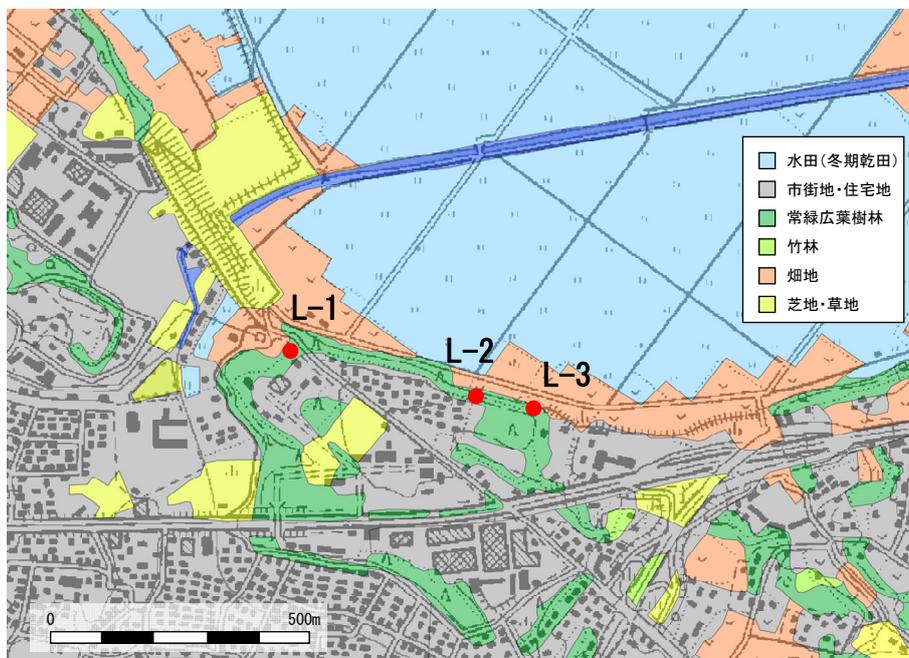


図1 我孫子調査地の現存植生図とタヌキため糞場位置

赤丸はため糞場の位置を示す。

2.2 DNA 抽出

タヌキあるいはアナグマの糞は約 1~2g をチャック付きポリ袋にとり、QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN)の抽出バッファー (ASL buffer) 5 ml を加え、ポリ袋の外から糞をこすり懸濁させた。ポリ袋を 65°C の恒温器で 3 時間インキュベートし、途中約 1 時間に 1 回ポリ袋の外から糞を摩擦し、よく懸濁させた。ポリ袋から抽出液 2ml を取り、その後はキット添付のマニュアルにしたがって DNA 抽出を行った。抽出後さらに、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて DNA を精製した。

2.3 種判定

川内調査地ではアナグマとタヌキが同所的に生息するが、両者の糞は判別しにくいいため、採取した糞はすべて DNA 分析による種判定を実施した。

種判定には、mtDNA の D-loop 領域の配列を利用し、プライマーとして tanaD-F(5'-ACCATCAGC ACCCAAAGCTG-3')および tanaD-R(5'-GGGCTGATT AGTCATTAGTCCATC-3')を使用した (松木ら 2008)。PCR 反応は、テンプレートとして 2 μ l の DNA 溶液を使用し、1 μ g BSA, 4% DMSO, 0.5 unit ExTaq Hot Start Version を含む 10 μ l の反応液で行い、98°C 60 秒の予備加熱後、98°C 10 秒、60°C 1 分 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 10 回繰り返す、続いて 90°C 10 秒、60°C 1 分 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 60°C 30 分の最終伸長させる温度条件で行った。PCR 増幅後、PCR と同じプライマーでダイレクトシーケンシングを行い、Genetic Analyzer (PE Biosystems)で塩基配列を決定した。

2.4 個体識別

タヌキの個体識別には種判定で使用した D-loop 領域のハプロタイプと 8 種のマイクロサテライト DNA (Npr02, Npr04, Npr05, Npr06, Npr07, Npr09, Npr11, Npr14 : 松木ら 2006) を利用した。

アナグマの個体識別には、タヌキと同様に種判定で使用した D-loop 領域のハプロタイプと Frantz らのマイクロサテライト DNA (Frantz et al. 2003) のうち、日本産アナグマで多型を検出した 6 種のマイクロサテライト DNA (Mel-102, Mel-105, Mel-106, Mel-109, Mel-111, Mel-117 : 松木ら 2008) を利用した。

PCR 反応はタヌキおよびアナグマのマイクロサテライト DNA とともに、種判定の D-loop と同様の条件で行い、反応後、Genetic Analyzer によって分離・検出し、Gene Mapper ソフトウェア v.3.0 (PE Biosystems)によって解析した。

型判定では、まず全ての座位について 2 回 PCR 増幅および解析を実施した。ヘテロの場合、2 回とも同一の DNA 型を示すものをその座位の DNA 型とした。ホモの可能性がある場合には、さらに実験を実施し、3 回以上 1 種類の対立遺伝子のみを検出した場合にホモとした。Allelic dropout や False allele などにより 2 回の実験では判定できなかったものは、さらに実験を繰り返し (最高 9 回)、少なくとも 2 回同一対立遺伝子の検出が認められたものについてのみ DNA 型の判定を行った。ヘテロの可能性のあるものの Allelic dropout のため、一方の対立遺伝子しか 2 回以上検出できなかった場合には、片方の対立遺伝子のみ DNA 型を決定した。以上のような型判定をした結果、タヌキでは 6 座位以上、アナグマでは 5 座位以上 DNA 型が決定できたものについてのみ、個体識別用の試料とした。これらマイクロサテライト DNA の判定結果と D-loop 領域の配列から決定したハプロ

タイプとを各試料間で比較し、DNA 型が一致した試料あるいは Allelic dropout を考慮して矛盾が認められない試料を同一個体が排泄した糞と判定した。

2.5 雌雄判定

タヌキおよびアナグマの雌雄判定には ZFX/ZFY 遺伝子の P1-5EZ:ATAATCACATGGA-GAGCCACAAGCT / P2-3EZ5:GCACTTCTTTG-GTATCTGAGAAAGT (Aasen and Medrano 1990) プライマーセットを用いて PCR を行い、タヌキでは ZFX 中に存在する *ScaI* サイト (松木ら 2006)、アナグマでは ZFY 中に存在する *BcnI* サイト (松木ら 2008) を利用して雌雄の判定を行った。

2.6 生息数推定

ある範囲内の個体群について、糞を排泄した個体を特定する調査を続けた場合、最終的には生息するすべての個体の糞を確認し、生息個体数を把握できると予想される。このとき、調査試料数に対する新規確認個体数の累積曲線は漸近線に収束するが、その漸近値は個体群の全個体数と一致する。この漸近線を推測し個体数を推定する方法は、糞や体毛などの DNA 個体識別を利用した個体数推定に用いられている (Kohn et al. 1999, Eggert et al. 2003, Frantz et al. 2004)。

川内調査地のアナグマについて、各調査地区で個体識別した結果から個体数を推定した。データは DNA 多型解析ソフト Gimlet v1.3.3 (Valière 2002) により解析した後、統計解析ソフト R を用い、累積曲線として Eggert et al. (2003) が用いている数式 $y=a(1-e^{-bx})$ に当てはめ、漸近値 a を推定した。累積曲線は型判定した調査試料の順番に影響を受けるため、調査試料の順番を

無作為に変更した累積曲線の作成を 1000 回反復し、推定された漸近値の中央値より推定個体数を求めた。なお、推定された漸近値の 2.5% から 97.5% の範囲を 95% 信頼区間とした。

3. 結果

3.1 我孫子調査地におけるタヌキため糞場の定点調査

タヌキの利用が確認できた 3ヶ所のため糞場 (図 1) について、2005 年 11 月から 2006 年 2 月まで毎週定期的に調査し、新規に追加した糞の採取を行った。この期間中に 12 回の調査を実施し、合計 51ヶ (L-1: 18ヶ, L-2: 19ヶ, L-3: 14ヶ) のタヌキ糞が採取できた。これらの糞について DNA を抽出し、8種のマイクロサテライト DNA について分析したところ、45 サンプル (88%) で個体を識別することができ、DNA 型から 7 個体 (A~G) のタヌキがため糞場を利用していたことが示された (表 1)。

識別した個体のため糞場の利用を調査日毎にみてみると (図 2)、個体 B を除きいずれも異なる調査日で 4 回以上確認され、これらのため糞場を頻繁に利用していることが示された。また個体毎のため糞場の利用については、B, C, D では 1ヶ所でしか確認できなかったが、F はため糞場 L-2 と L-3 で、A, E, G ではすべてのため糞場で確認され、複数のため糞場を同時期に利用していることが示された (図 2)。

確認された 7 個体のミトコンドリア DNA のハプロタイプは、D-loop 領域の配列から 2 種類に分けられ、個体 C と E はハプロタイプ B 型、A, B, D, F, G はハプロタイプ D 型であった (表 1)。また、ZFX/Y 遺伝子を用いた雌雄判定から、B, D, E, F が雄、A, C, G は雌であることが示された (表 1)。これら 7 個体について、ハプロタイプ、雌雄判定および 8 種のマイクロ

表1 タヌキ糞からのDNA解析結果

各座位の列の値は対立遺伝子サイズ(bp)、ハイフンは型判定できなかったことを示す。なお、片一方の数値のみ記載されている座位は、少なくとも一方の対立遺伝子が決定できたことを示す。

個体 ID	Npr05	Npr06	Npr09	Npr11	Npr02	Npr04	Npr07	Npr14	性別	ハプロタイプ型	推定血縁関係
A	182/182	118/122	154/162	211/223	232/244	272/278	146/154	159/159	♀	D	仔
B	174/	118/122	-	219/	228/	286/286	146/154	159/159	♂	D	仔
C	174/182	118/118	154/162	219/223	232/236	278/282	146/150	159/163	♀	B	Eの母・姉妹
D	166/174	118/122	162/166	211/223	228/244	272/286	146/150	159/159	♂	D	仔
E	174/182	118/118	154/166	211/219	228/232	278/286	150/154	159/159	♂	B	父
F	182/182	118/122	162/166	219/223	228/244	272/286	146/150	159/159	♂	D	仔
G	166/182	122/122	162/166	223/223	240/244	272/286	146/146	159/163	♀	D	母

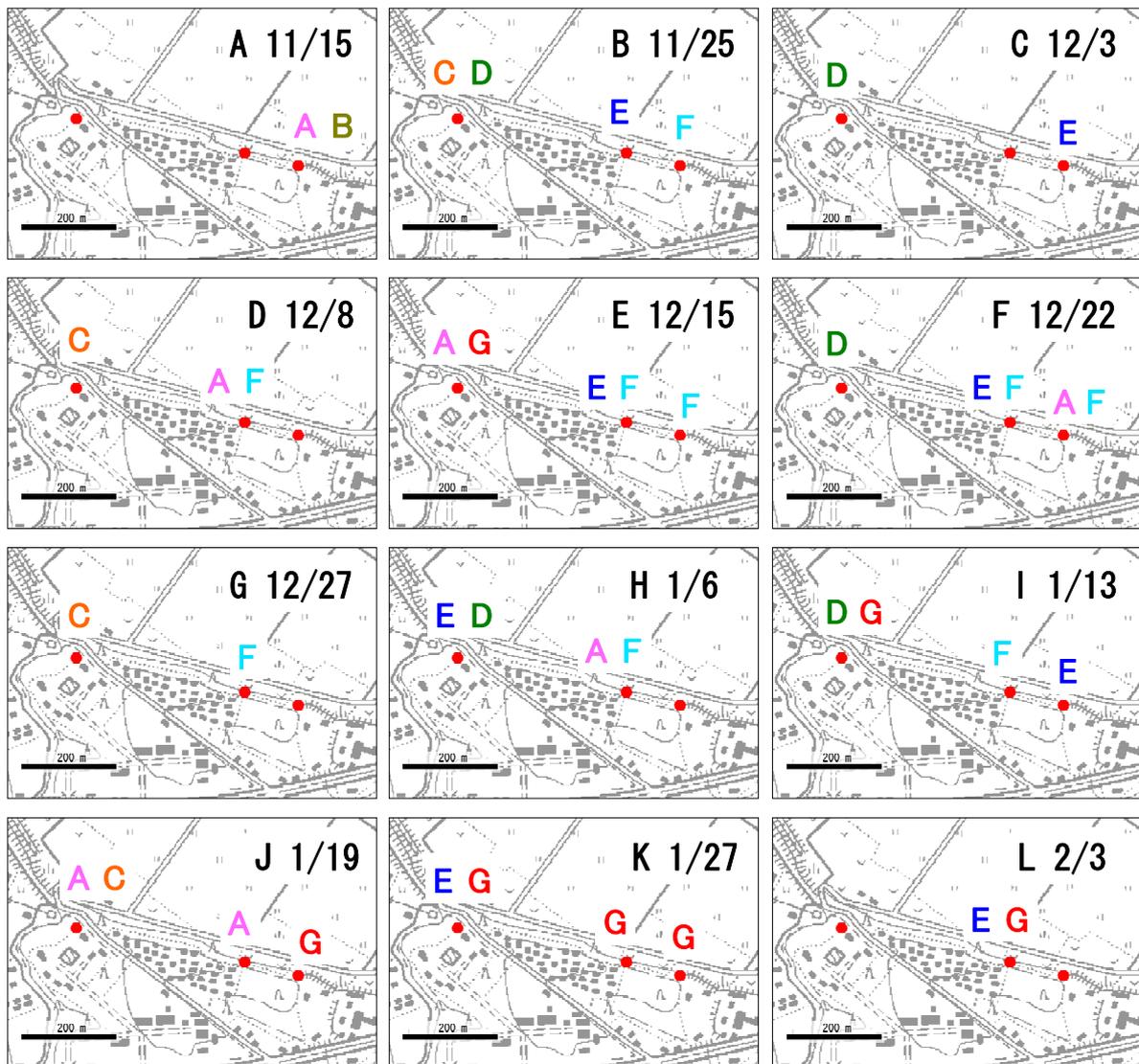


図2 糞DNAより識別したタヌキ個体の調査期間におけるため糞場利用
赤丸はため糞場の位置を示す。

サテライト DNA の DNA 型から、血縁関係の解析を行った。その結果、E と G が両親で A, B, D, F が仔の関係であることに矛盾がなく、これら 6 個体が親子関係にあることが推測された。また、C は G とハプロタイプが異なることから、G の仔でも G と共通の母系でもなかった。しかし、E とはハプロタイプが同じであり、DNA 型の比較から E の母あるいは姉妹の可能性が確認できた。このように、今回調査した近接した 3 ヶ所のため糞場は、一つの家族もしくは非常に血縁の高い集団が共有して利用していることが示唆された。

3.2 川内調査地におけるアナグマ・タヌキの生息分布調査

2006 年 11 月に S1 調査区および S2 調査区においてアナグマ・タヌキの糞のサンプリングを行った (図 3)。10 日間の調査期間中に 91 ヶ所

の新しい糞が見られる糞場を発見し、それらの糞場より合計 192 ヶの糞を採取した (図 4, 表 2)。確認された糞場は、常緑広葉樹林内および林縁に多い傾向があり、スギ・ヒノキ植林にはほとんど認められなかった。

アナグマとタヌキは体格や食性が近く、またどちらもため糞をする習性があるため、同所的に生息している場合、糞の種判定は困難である (松木ら 2007)。そこで、採取したすべての糞について、mtDNA の D-loop 領域を利用した種判定を行った。採取した 192 サンプルのうち 177 サンプル (92.2%) で種を判定することができ、このうち 152 サンプルがアナグマ、25 サンプルがタヌキの糞であった (図 4, 表 2)。興味深いことに 9 ヶ所の糞場地点でアナグマとタヌキ両方の糞が確認された。これは一つの糞場もしくはごく近傍でアナグマとタヌキがそれぞれ糞を排泄したことを示しており、同じ時期に非常に近接した場所をアナグマとタヌキが糞場として

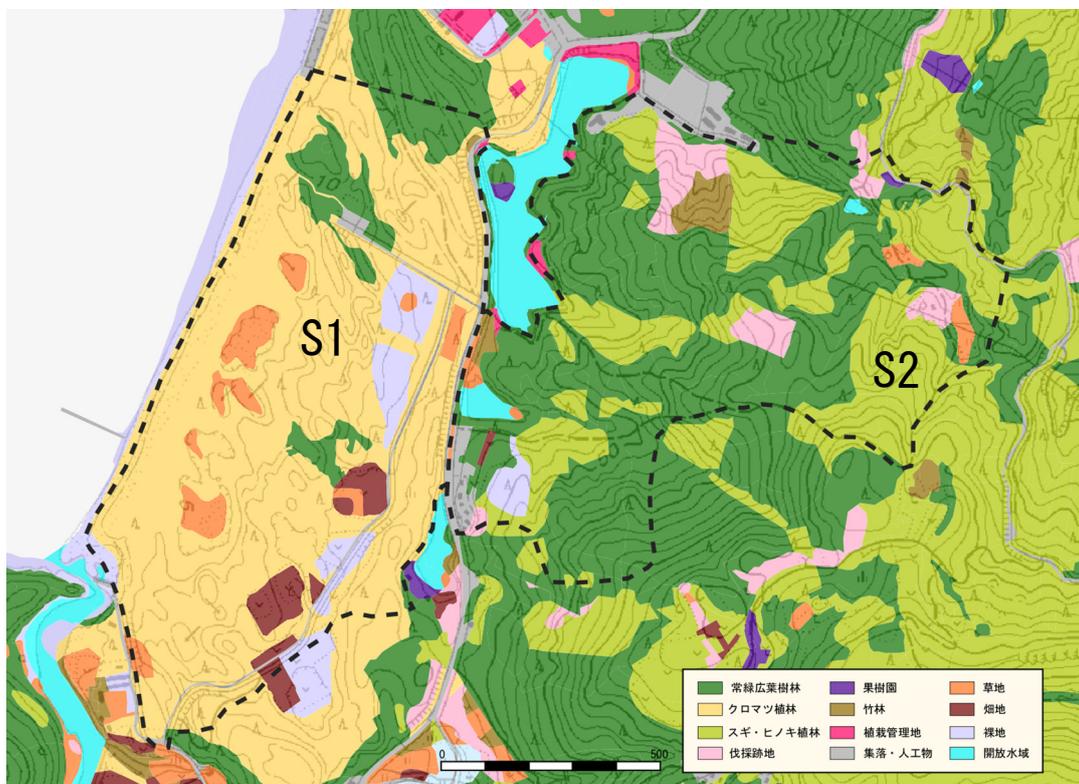


図 3 川内調査地の現存植生図

破線は各調査区 (S1 調査区, S2 調査区) の範囲を示す。

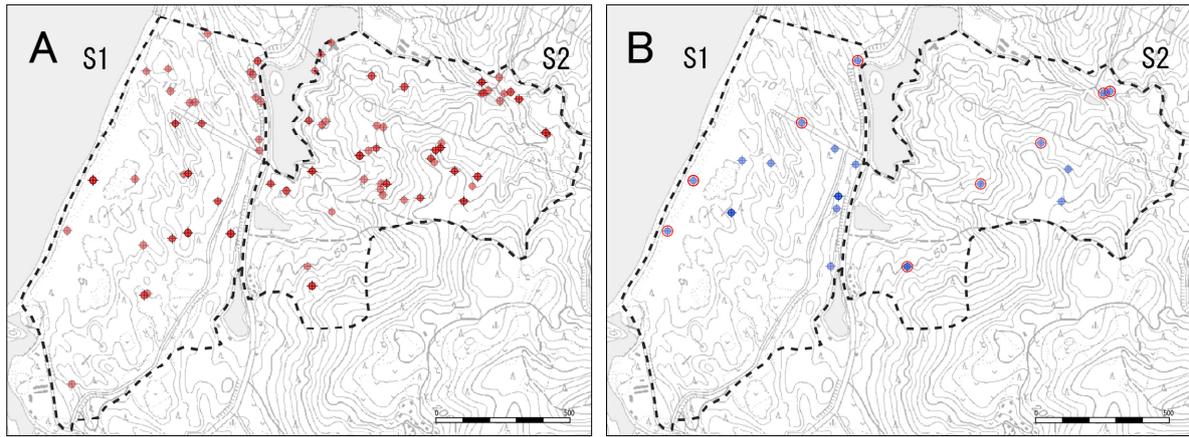


図4 糞DNAから種判定したアナグマとタヌキの糞場の位置

A:アナグマの糞場位置, B:タヌキの糞場位置。赤丸線でかこった地点は近接してアナグマとタヌキ両方の糞が確認された糞場。

表2 川内調査地の各調査区における種判定, 個体識別結果

調査区	面積 (ha)	糞場数	採取糞数	種判定			アナグマ個体識別		タヌキ個体識別	
				アナグマ	タヌキ	不明	識別糞数	個体数	識別糞数	個体数
S1	84.8	39	75	50	17	8	34	12	15	7
S2	80.8	52	117	102	8	7	34	18	4	3*
計	165.6	91	192	152	25	15	68	30	19	10

* ハプロタイプの違いにより識別した1個体を含む

利用していたと考えられる。

種判定できたサンプルについて、アナグマ、タヌキそれぞれのマイクロサテライトDNAマーカーを用いて個体識別を行った。アナグマでは、DNA型の比較からS1調査区で12個体、S2調査区で18個体の計30個体を確認できた(表2, 図5A)。複数地点の糞場を利用していた個体は10個体であったが、同一個体が利用した糞場間の最長距離は486m(個体22)であり、糞場の最外殻面積が最大だったのは個体02の7.6haであった。一方、タヌキはS1調査区で7個体、S2調査区で2個体の計9個体がDNA型から識別できた(表2, 図5B)。S2調査区ではマイクロサテライトDNAで識別した2個体とは異なるハプロタイプをもつ個体(T10)が北東部に確認されているため、少なくとも3個体はS2

調査区を利用していると考えられる。タヌキについては4個体が複数の糞場を利用していたが、個体T08の684mが最も糞場が離れており、糞場の最外殻面積の最大はT01の6.4haだった。

多数の糞サンプルから個体識別できたアナグマについて、累積曲線を用いた個体数の推定を試みた(表3)。S1調査区では、推定個体数が15個体(95%信頼区間:12-45個体)であり、S2調査区は24個体(95%信頼区間:18-49個体)の生息が推定された。各調査区の個体数密度はS1調査区で0.18個体/ha、S2調査区で0.30個体/haと推定され、クロマツ植林が大部分の低地より、常緑広葉樹林が多い山地にアナグマが多く生息することが示唆された。

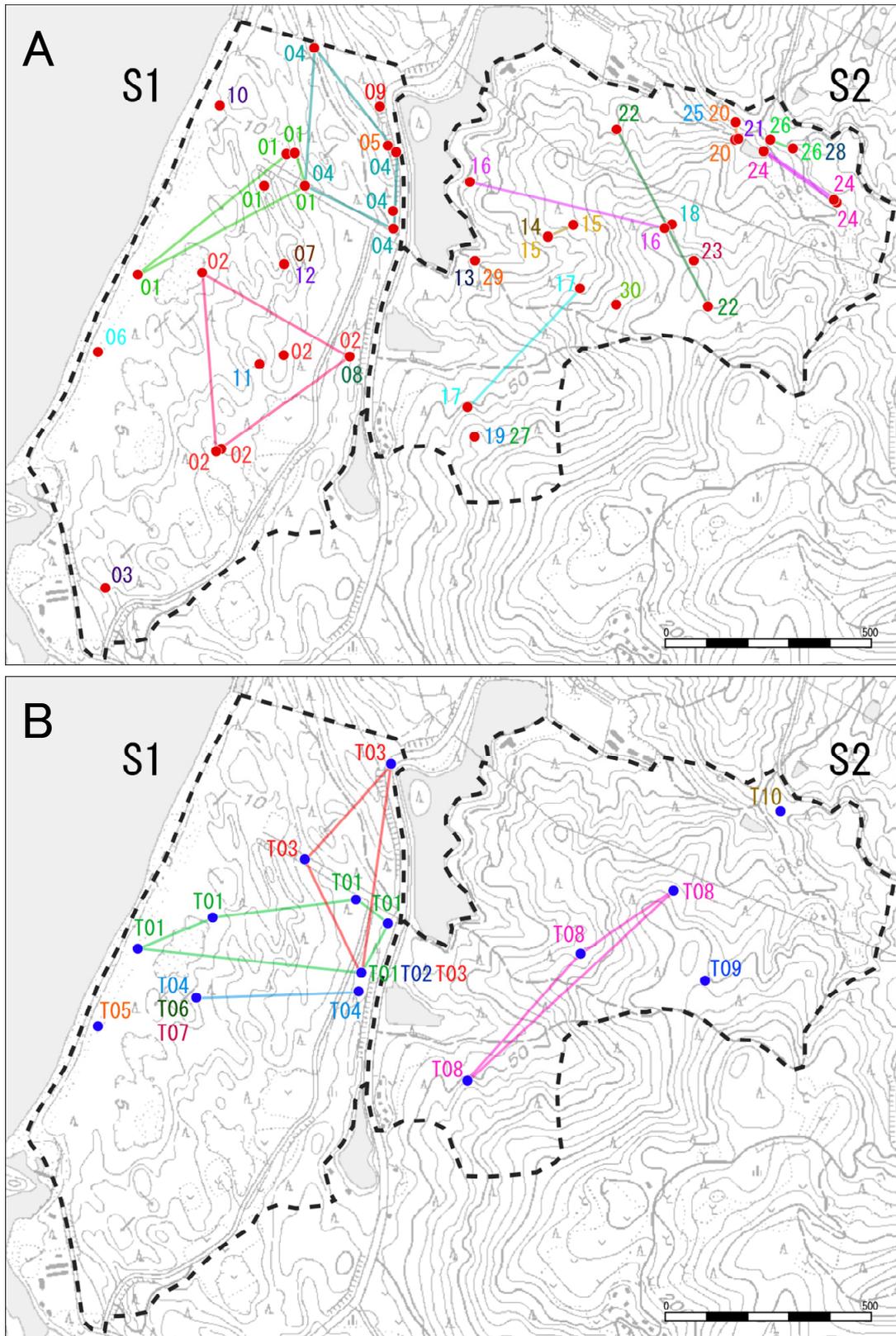


図5 糞DNAから識別したアナグマとタヌキの個体の分布

A:アナグマ, B:タヌキ。数字は個体番号, 実線は同一個体の最外殻を示す。

表 3 調査区ごとのアナグマの推定個体数

調査区	面積 (ha)	確認個体数	推定個体数	推定個体数の 95%信頼区間	推定個体数密度 (個体/ha)
S1	84.8	12	15	12 ~ 45	0.18
S2	80.8	18	24	18 ~ 49	0.30
計	165.6	30	38	31 ~ 69	0.23

4. 考察

4.1 タヌキの糞場利用個体数

我孫子調査地のタヌキため糞場において、約 80 日間の定点調査で得られた糞サンプルから、DNA 個体識別により、ため糞場の利用個体を把握することが可能であった。確認された 7 個体のうち 6 個体は頻繁にため糞場を利用していた (図 2)。累積曲線による個体数推定を行ったが、漸近値がほぼ 7 個体となることから、ため糞場の利用個体は全て確認できたと考えられる。

今回の調査では、2 回目 (11 月 25 日) で 6 個体、5 回目 (12 月 15 日) で全 7 個体が確認できた。また、1 回しか確認できなかった個体 B を除けば、調査期間中のどの連続した 5 回の調査においても、残り 6 個体すべてを確認することが可能であった。個体識別に用いる糞は新鮮なものに限られるため、1 回のサンプリングで全ての個体を特定することは難しい。ため糞場を利用している主な個体を把握するためには、5 回程度反復してサンプリングする必要があると思われる。

4.2 タヌキの糞場利用と活動記録との比較

本研究と同時期に捕獲調査も実施しており、3 個体のタヌキを捕獲している (竹内ら 2009A)。これらの個体の血液より DNA を抽出し、個体

識別を行った結果、D, F, G と同一の個体であることが判明した。3 個体については、携帯網を利用した GPS 首輪を装着し、放逐後数日間の詳細な位置情報を記録している (図 6)。個体 G は 3 ヶ所のため糞場を利用していたが、GPS 位置情報に基づく行動範囲も 3 ヶ所のため糞場を含んでおり、3 ヶ所のため糞場を行き来していることが示唆された。同様に個体 D は L-1 のみ、個体 F は L-2 と L-3 のため糞場の利用が確認されていたが、各個体の行動範囲はそれぞれ利用していたため糞場を含む範囲にあった。しかし、その行動範囲は個体 D はため糞場より南西方向、個体 F は北東方向に広がっており、利用が認められなかったため糞場は行動範囲に含まれておらず、またお互いの行動範囲も重なっていなかった。このように糞 DNA を用いたため糞場の利用状況の結果は、GPS 位置情報による捕獲個体の行動範囲と矛盾はしていなかった。今回の調査では比較的規模の大きい 3 ヶ所のため糞場を対象としたが、調査範囲を拡大し、小さな糞場も含め多数地点より糞をサンプリングできれば、個体毎の主な行動範囲を把握できるものと思われる。

4.3 タヌキの家族集団の糞場利用

タヌキは春に繁殖し、仔が成長する初秋くらいまでは親子で行動をともにするが、その後親の行動圏を出て分散を始める仔がでてくる (Ikeda 1983)。分散がはじまるころから、親と

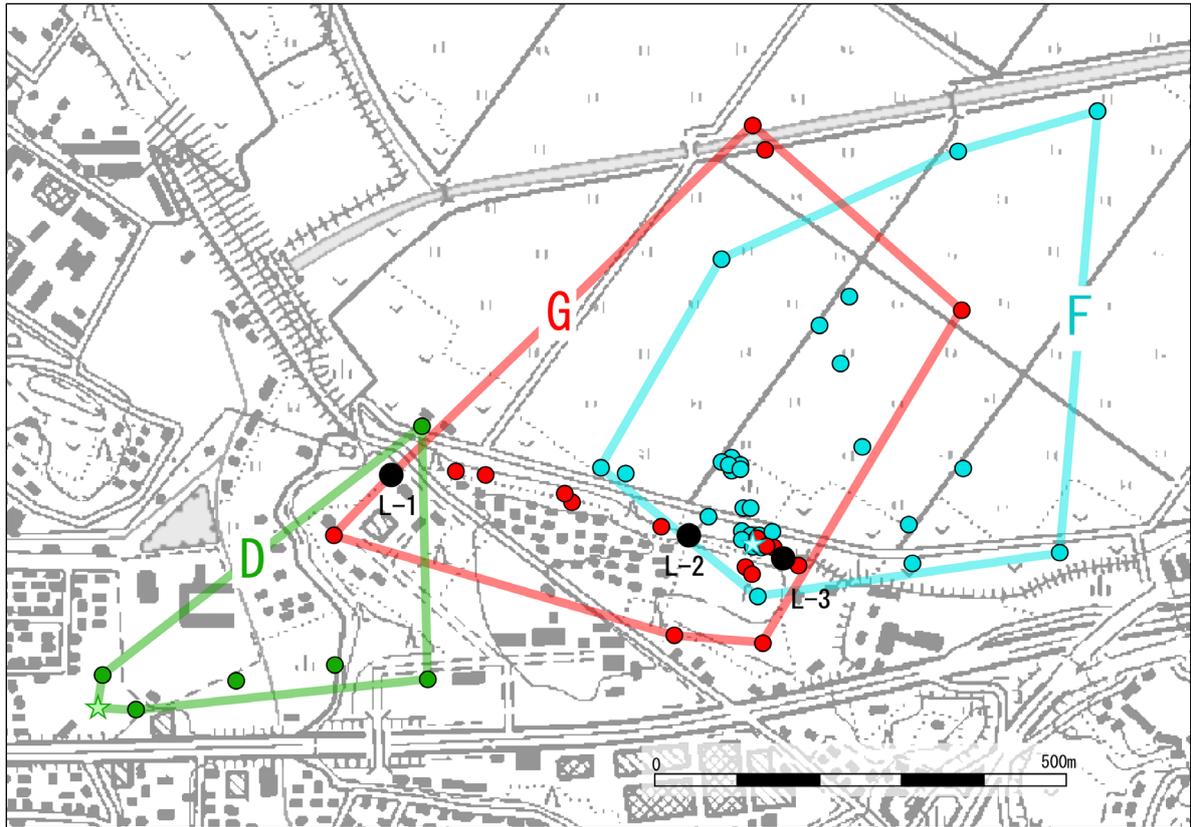


図6 捕獲個体の行動範囲と利用したため糞場

緑、青、赤の丸印はそれぞれ個体 D, F, G に装着した GPS 首輪による計測位置、星印はねぐらの位置、実線は各個体の確認位置の最外殻を示す。

仔の関係は次第に弱くなり、冬には仔同士の関係も弱まり、互いに独立して行動するようになる (Ikeda 1983)。分散期を過ぎても、単独行動をとりながら、親の近辺に残ったり、時々餌場などに帰ってきたりする仔もいるようである (野柴木 1987, Saeki 2001)。一方、子育てを終えたペアは、仔の分散後も行動を共にし、翌春にはまた同じペアで繁殖を行う (谷地森 1997, Saeki 2001)。このようなタヌキの年周行動・社会構造をふまえ、本調査で確認されたタヌキの家族集団の活動 (図 2, 6) をみてる。調査期間の 11 月 15 日から 2 月 3 日は分散期の後期から繁殖期前に相当する。この家族集団の親ペアは父 E と母 G であり、この 2 個体は調査した 3ヶ所すべてのため糞場を頻繁に利用していることから、基本的にこの親ペア集団のため糞場であると考えられる。11 月 15 日に確認された仔 B

(雄) はそれ以降出現することがなく、11 月 15 日以降は他地域への分散あるいは死亡したものと推測される。雄の仔 D および F は 11 月 25 日から 1 月 13 日まで確認されたが、それぞれため糞場の利用が重なることはなく、仔同士のつながりが弱まっているものと考えられた。仔 D の休息場はため糞場より離れた場所で確認されたが、仔 F はため糞場のすぐそばを休息場としており、この時期には完全に親ペアの行動圏から離れていったわけではなかった (図 6)。一方、雌の仔 A は、11 月 15 日から 1 月 19 日までの間で 3ヶ所のため糞場を利用していた。また、父親の E は調査期間を通して確認されているが、母親の G は後半に集中していた。1 月 27 日と 2 月 3 日には E と G の同一の糞場利用が確認されており、繁殖期を前に親ペアの結びつきが強くなっていることが推測された。

これまでのタヌキの社会行動の研究では、長時間にわたる観察や、標識を入れた餌を用いた餌場・糞場利用に基づいて分析されてきた (Ikeda 1982, 野柴木 1987, Saeki 2007)。しかし、これらの調査は労力が多大であり、また家族集団の関係も観察による推定の域を出ないのが現状である。糞 DNA を利用した直接的な血縁関係の推定と糞場利用の分布を把握する調査手法は、タヌキの社会行動を明らかにする上で極めて有効であると考えられる。

4.4 川内調査地におけるアナグマの生息環境と個体数密度

アナグマとタヌキが同所的に生息する川内調査地において、フィールドサイン調査で発見した糞場より回収した糞サンプルからアナグマ、タヌキ両方を個体識別することが可能であった。種判定できた糞のうち、約 85%がアナグマの糞であり、また個体数もアナグマはタヌキの 3 倍の 30 個体が識別されていることから (表 2)、この調査地ではタヌキと比べアナグマの個体数密度がかなり高いと思われる。興味深いことにタヌキの糞が確認された 19 ヶ所の糞場地点のうち、約半数の 9 ヶ所で非常に近接した場所にアナグマの糞が確認されている (図 4B)。このうち 6 ヶ所はけもの道あるいは尾根のそばにできた糞場であり、同じ移動環境も利用していると推測される。アナグマとタヌキは食性が似ており (阿部ら 2009)、餌資源からみると競合関係にあるが、この調査地においては排他的ではなく、共存しているようである。

アナグマについては個体識別データをもとに生息数を推定することができた。推定個体数密度は、クロマツ植林が大部分の低地である S1 調査区で 0.18 個体/ha、常緑広葉樹林とスギ・ヒノキ植林が混在する山地の S2 調査区で 0.30 個体/ha であった。本研究のフィールドサイン調査

では、同時に巣穴も探索しており、本調査地および周辺地域で発見した巣穴の分布について解析を行っている (竹内ら 2009B)。その結果、常緑広葉樹林が選好され、ある程度の傾斜度が好まれるが、スギ・ヒノキ植林や裸地・草地などオープンな環境は忌避される傾向にあった。また、アナグマの主要な餌資源であるミミズ類や甲虫類、サツマゴキブリなどの土壤動物について、本調査地および周辺地域で餌資源量調査も同時期に実施している (阿部ら 2009)。これらの餌資源は常緑広葉樹林およびスギ・ヒノキ植林に多く、クロマツ植林で少ない傾向にあった。これらの解析結果を総合すると、クロマツ植林が大部分を占め、草地、裸地、常緑広葉樹林がパッチ状に存在する S1 調査区と比べ、常緑広葉樹林の多い山地である S2 調査区はアナグマの生息環境としてより好適であるといえる。アナグマの推定個体数密度も S2 調査区で高かったが、このようなアナグマにとって好適な生息環境を反映しているためと思われる。

ヨーロッパのアナグマは地域によって生息密度が 0.001 個体/ha~0.38 個体/ha (Kowalczyk et al. 2000, Johnson et al. 2002) とかなり異なることが知られている。おおむね 0.15 個体/ha 以上が高密度個体群 (Johnson et al. 2002, Rogers et al. 1997) として低密度の個体群とは区別して研究がすすめられているが、この基準からすると本研究の調査地では S1 調査区、S2 調査区ともに高密度個体群といえる。S2 調査区と比較すると S1 調査区は生息環境は劣るが、高密度個体群として維持できるだけの餌資源や巣穴資源などが豊富に存在するものと思われる。

4.5 DNA 解析の環境アセスメント調査への活用

野生動物の調査・研究において、糞や足跡、食痕などのフィールドサイン確認調査は最も基

本的な調査である。このうち糞は、対象動物にもよるが比較的確認しやすく、また内容物から餌の推測もできるため、生息や生態を把握する上で重要なフィールドサインとなる。一般に糞の種判定では、形状やサイズ、内容物や排泄環境などから総合的に判断することになるが、図鑑や文献などの記載と異なることも多いため、経験にたよる部分が多い。また、最近では誤判定が課題として指摘されている（黒瀬 2006, 松木 2006）。本研究で実施したように DNA を用いた種判定は、調査者のスキルによらず、新鮮な糞であれば正確に種判定をすることが可能である。本研究で用いた哺乳類の種判定用 DNA マーカーは、実際のフィールドサイン調査のサンプルを利用することを想定し、種判定用の PCR プライマーは以下のポイントをもとに設計している（松木ら 2008）。まず、1) アナグマやタヌキなど中型哺乳類は明確に判別できるが、2) DNA 分析用サンプルに不慣れな調査者のコンタミを配慮して、ヒト DNA は増幅しないこと。また、3) 餌となる小動物（カエル、甲虫、鳥など）にもできるだけ反応しないようにし、さらに 4) mtDNA のハプロタイプ情報も同時に取得できるようにした。本研究においてこのような考えで設計した DNA マーカーを利用して糞から種判定した結果、ヒトや餌動物の増幅に悩まされることもなく、9 割以上の糞について種判定することが可能であった（表 2）。また、同時に取得したハプロタイプ情報は個体識別に活用できたが、母系集団の範囲の推定や遺伝的多様度の診断などにも利用可能と思われる。本 DNA マーカーはイタチ科やイヌ科動物だけでなく、ネコやハクビシン、イノシシ、ノウサギ、カイウサギでも種判定できることを確認している（松木ら 2008）。さらに、海外のサンプルであるが、パームシベット、マングース、ベンガルヤマネコ、コツメカワウソ、マレーグマ、ジムヌラ、ブタオザルなどの糞からも種判定が可

能であり（松木 未発表）、ヒトを除くかなり幅広い哺乳類で利用できると思われる。

環境アセスメントの動物相調査では、フィールドサイン調査は必須であるが、種が不明な糞や混同しやすい糞、特に希少種や重要種の可能性がある場合には、本 DNA マーカーを適用し、正確に種判定することが望ましい。たとえば、西日本では外来種であるチョウセンイタチがイタチを圧迫しており、地域によってはイタチはレッドリストに指定されている。しかし、イタチとチョウセンイタチは糞からの識別が極めて困難であるため、環境影響評価書では「イタチ属の一種」と記載されるケースが見受けられる。こうした場合、もし糞がイタチのものであったなら、適切な影響評価・対策をする機会が失われる恐れがあり、チョウセンイタチであった場合には、追加確認調査などに無駄な労力やコストをかけてしまうこととなる。このような懸念を払拭し、適切で効率的な影響評価を実施するために、糞 DNA による種判定は、今後不可欠な調査手法になると考える。

糞 DNA からの個体識別では、糞の新鮮さや保存状態が重要である。個体識別の成功率も排泄した個体の DNA ができるだけ分解されずに残っているかが鍵となる。川内調査地では、本研究と同様の調査を春期（5 月）および夏期（7、8 月）にも実施したが、mtDNA に基づく種判定は 9 割以上の糞について可能であったのに対し、個体識別はいずれも 1 割以下しかできなかった（データ示さず）。調査期間中の平均気温は、本研究の 11 月では 13.6℃であったが、5 月の調査期間は 18.0℃、7、8 月は 28.0℃であり（気温データは気象庁ホームページに基づく）、春期および夏期の成功率の低さは、11 月よりも高い気温の環境下で、腐敗などにより DNA の分解が早く進行してしまったためと考えられる。温暖な時期における糞からの個体識別には、糞のサンプリングや DNA 抽出・分析等についてさらな

る検討が必要であるが、調査地域における個体の数や分布をより正確に把握するためには、成功率が高い DNA 分析結果に基づいて個体識別することが望ましく、そのためにはできるだけ DNA 分解が少ない寒冷な時期に調査するべきだろう。特に、実際の生態系アセスメント調査では、限られた期間内に効率的に結果を得ることが求められるため、本手法を用いる場合には、対象動物の生態を考慮した上で（例えば冬眠など不活動の時期をはずすなど）、可能な限り寒冷な時期に集中的に調査することが現実的であると思われる。

生態系アセスメントの注目種として選定されることの多いタヌキなどの国内に生息する中型哺乳類は、一般に個体数を把握することが困難である。これまで種の生態や行動、生息環境をふまえて様々な個体数推定法が開発されてきたが、推定の精度や信頼性、頑健性などには長短があり、時代とともに進展する新しい技術や知見を導入した個体数推定法の開発が強く求められている（三浦・岡 2004）。本研究では、糞 DNA を利用して排泄個体を識別し、複数の糞の解析結果から個体数の推定を行った（表 3）。これまでの糞や足跡、断片的な確認情報の数や量など調査地の利用頻度に基づく個体数推定法と比べ、糞 DNA を利用した手法は調査地を利用した個体を特定していることから個体数推定の信頼性は高い。また、DNA 解析に用いた糞の分布から、各個体のおおまかな行動範囲も推測することが可能であった（図 5）。調査範囲内で地形の改変や構造物の設置などの開発がある場合、本手法を用いれば、実際に直接開発の影響を受ける個体の数や行動範囲との関連性を把握することも可能であり、開発の影響を評価する上で非常に有効な手法として期待できる。

糞からの DNA 解析では、さらに性別や血縁関係も明らかにすることが可能であった。また、個体識別に用いたマイクロサテライト DNA は

中立遺伝子であり、集団の遺伝的多様性の評価にも利用できる。従来このような解析は、捕獲個体を用いて行われてきたが、糞サンプルを利用することで、効率良くかつ対象動物にストレスを与えることなく解析することが可能となる。糞からの DNA 解析手法は、野生動物の研究や環境アセスメント調査、保全管理などさまざまな分野において、今後ますます活用されていくと考えている。

謝辞

本研究を実施するにあたり、現地調査でご協力いただいた九州電力株式会社川内調査所の皆さま、ならびに西日本技術開発株式会社の阪田和弘氏、金尾充浩氏をはじめ多くの方々に感謝いたします。また、調査の立案から結果の取りまとめにいたるまでご協力いただきました九州電力株式会社環境部の皆さまに厚く御礼申し上げます。

試料の収集にご協力いただいた株式会社セレスの矢竹一穂氏、秋田毅氏、古川淳氏に深謝の意を表するとともに、DNA 解析に多大なご協力をいただいた小島恭子氏ならびに石山知波氏に感謝いたします。

参考文献

- 阿部聖哉, 松木吏弓, 竹内 亨, 梨本 真, 平田 智隆, 上野智利, 田崎耕一 (2009) 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 —タヌキ・アナグマの餌資源分布の評価—. 電力中央研究所研究報告 V08044
- 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

- Eggert L.S., Eggert J.A., Woodruff D.S. (2003) Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology* 12:1389-1402
- Frantz A.C., Pope L.C., Carpenter P.J., Roper T.J., Wilson G.J., Delahay R.J., Burke T. (2003) Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology* 12:1649-1661
- Frantz A.C., Schaul M., Pope L.C., Fack F., Schley L., Muller C.P., Roper T.J. (2004) Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. *Journal of Applied Ecology* 41:985-995
- Ikeda H. (1982) Socio-ecological study on the raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides viverrinus*, with refernce to the habitat utilization pattern. Doctor Thesis, Kyushu University. 76 pp.
- Ikeda H. (1983) Development of young and parental care of raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides viverrinus*, TEMMINCK, in captivity. *Journal of the Mammalogical Society of Japan* 9:229-236
- Johnson D.D.P., Jetz W., Macdonald D.W. (2002) Environmental correlates of badger social spacing across Europe. *J Biogeography* 29:411-425
- 金子弥生 (1996) 日本動物大百科 第1巻 哺乳類 I ニホンアナグマ p.142-143. 平凡社
- 環境影響評価の基本的事項に関する技術検討委員会 (2005) 環境影響評価の基本的事項に関する技術検討委員会 報告. 環境省
- 環境庁企画調整局 (2000) 自然環境のアセスメント技術 (II) 生態系・自然とのふれあい分野の調査・予測の進め方. 大蔵省印刷局
- 気象庁 気象統計情報 気象観測(電子閲覧室) <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php> (参照 2008年2月5日)
- Kohn M.H., York E.C., Kamradt D.A., Haught G., Sauvajot R.M., Wayne R.K. (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *Proc Biol Sci.* 266:657-663
- Kowalczyk R., Bunevich A.N., Jędrzejewska B. (2000) Badger density and distribution of setts in Bialowieza Primeval Forest (Poland and Belarus) compared to other Eurasian populations. *Acta Theriologica* 45:395-408
- 黒瀬奈緒子, 佐々木 浩 (2006) 同所性食肉目イタチ3種の調査における分子遺伝学的アプローチ. *DNA 多型* 14:168-171
- 松木吏弓, 竹内 亨, 阿部聖哉, 梨本 真 (2006) 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* 14:188-192.
- 松木吏弓, 竹内 亨, 阿部聖哉, 梨本 真, 平田智隆, 金尾充浩, 阪田和弘 (2008) 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* 16:55-59
- 三浦慎悟, 岡 輝樹 (2004) 野生哺乳類の個体数推定法—到達点と課題—. *哺乳類科学* 44:75-76
- Rogers L.M., Cheeseman C.L., Mallinson P.J. (1997) The demography of a high-density badger (*Meles meles*) population in the west of England. *Journal of Zoology* 242:705-728
- Saeki M. (2001) Ecology and conservation of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Japan. Doctor Thesis, University of Oxford, 294 pp.
- Saeki M., Macdonald D.W. (2007) Movements and habitat selection of raccoon dog in a mosaic landscape. *Journal of Mammalogy* 88: 1098-1111
- 芝田史仁 (1996) 日本動物大百科 第1巻 哺乳類 I タヌキ p.116-119. 平凡社
- 竹内 亨, 松木吏弓, 阿部聖哉, 梨本 真 (2009A) GPS 携帯テレメトリと高解像度衛星データ

を活用したタヌキの行動および生息環境の調査・解析手法の提案. 電力中央研究所研究報告 V08063

竹内 亨, 松木吏弓, 阿部聖哉, 梨本 真, 平田智隆, 上野智利, 田崎耕一 (2009B) 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 —影響予測・評価のための生息好適性解析—. 電力中央研究所研究報告 V08045

Valière N. (2002) Gimlet: a computer program for

analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377–379.

谷地森秀二, 山本祐治, 高田豊行, 吉川欣亮, 今井清 (1997) 「休息場」利用状況および分子生物学的技術による野生ホンダヌキの家族関係の推定. *哺乳類科学* 36:153-164

野柴木 洋 (1987) 志賀高原におけるホンダヌキの生態について 信州大学教育学部附属志賀自然教育研究施設研究業績 24:43-53

R **CRIEPI**

The image shows a stylized logo in a light gray color. It features a large, bold, serif letter 'R' on the left. To its right, the word 'CRIEPI' is written in a smaller, bold, sans-serif font. Two thick, curved lines, resembling a stylized 'S' or a swoosh, are positioned above and below the text, framing it. The entire logo is centered horizontally on a plain white background.

電力中央研究所報告

[不許複製]

編集・発行人 財団法人 電力中央研究所
環境科学研究所
 千葉県我孫子市我孫子 1646
電話 04 (7182) 1181 (代)
e-mail esrl-rr-ml@criepi.denken.or.jp

発行所 財団法人 電力中央研究所
東京都千代田区大手町 1-6-1
電話 03 (3201) 6601 (代)

印刷所 株式会社 ユウワビジネス
東京都千代田区神田須田町 1-1
電話 03 (3258) 9380

ISBN978-4-86216-967-9

