

IV. 糞の DNA サンプルによるカモシカとシカの種判別

1. 調査の概要

北アルプスカモシカ保護地域では、近年、シカの分布域が拡大し、カモシカの分布域との重複が認められるようになってきた。カモシカとシカが同所的に生息する地域において糞塊法調査を行う際は、糞塊の誤同定が生息密度の過小評価や過大評価につながるため、カモシカとシカの糞塊の識別が重要である。過去3回実施された特別調査では、保護地域内でシカの分布情報はほとんど得られておらず（新潟県教育委員会ほか、2006）、糞塊法調査の際に発見した糞塊について、糞粒数を問わず、すべてカモシカのものとして生息密度を算出した。

近年、糞から抽出した DNA を用いて、カモシカとシカを判別する手法が開発された（Yamashiro et al., 2010）。第4回調査では、現在のシカの分布状況を考慮し、糞塊法調査の際に糞サンプルを採取し、糞の DNA に基づくカモシカとシカの種判別を行った。

DNA 分析および結果報告は徳島大学ソシオテクノサイエンス研究部の山城明日香氏に依頼した。以下の各項目について、山城氏から提出された報告を引用する。

2. 材料と方法

糞の DNA に基づく種の判定は、2013 年度に実施した糞塊法調査および岐阜県と富山県が別途実施した糞試料採取業務（自然環境研究センター、2013a、自然環境研究センター、2013b）の実施地点（五輪高原、越道峠、梅池、三股、乗鞍岳（長野）、野麦峠（岐阜）、長峰峠（岐阜））で得られた糞サンプルを使用した。各調査地点に出現した全ての糞塊について、糞塊の写真を撮影した後、糞塊の状況（新旧の程度）の記録を行った。次に、割り箸を用いて各糞塊から10個程度の糞粒を99%のエタノールが入った15ml チューブに保存し、DNA 分析用のサンプルとした。残りの糞粒は現地で糞粒数のカウントを行った。

糞サンプルからの DNA 抽出は、Zhang et al. (2006) の方法に基づいて行った。抽出した DNA から PCR 法によりミトコンドリア DNA シトクロム *b* 遺伝子を部分的に増幅した。種の判定法は、Yamashiro et al. (2010) の方法により以下の方法で行った。PCR による遺伝子増幅は Cb-GS1 (5' -ATT CAT ACA CGT AGG ACG AGG C-3') と Cb-GSR1 (5' -TGT CCT CCA ATT CAT GTG AG T-3') のプライマー対を用い、94°C で2分間の熱変成後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 2 分を35 サイクル行い、さらに72°C で10分の伸長反応を行った。1回目の PCR において増幅が見られない場合には、内側に設定されたプライマー対、Cb-GS2 (5' -TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG-3') と Cb-GSR2 (5' -ATT GAT CGT AGG ATT GCG TAT GC-3') を用いて nested PCR を行った。これらの増幅産物に制限酵素 *Bsm*AI を加えて切断

させ、37°Cで1時間インキュベートした後、1.5%アガロースゲルを使用し電気泳動を行い、バンドパターンから2種を判定した。

カモシカとシカの糞塊の判断基準として密着率が有効であるとされているため (Yamashiro et al. 2013)、本調査では、写真をもとに各サンプルの密着率 (密着した糞粒の最大数÷全糞粒数) を算出した。

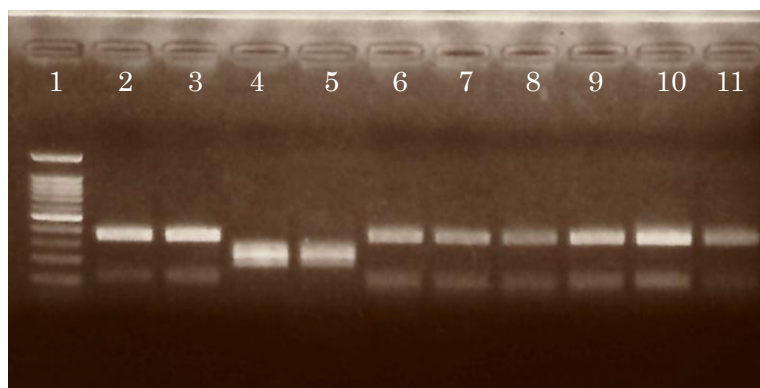
3. 結果

7調査地点で34糞塊が出現した (表IV-1)。そのうち、梅池で出現した2糞塊は分解が進んでおり、DNA解析用のサンプルを回収することはできなかった。そのため、これらの2糞塊を除く32糞塊について解析を行った。

<糞のDNA増幅と種の判定結果>

多くの糞塊は古く、全ての糞サンプルにおいて1回目のPCRでは増幅は確認できなかった。そこで、nested PCR法を行った結果、32糞塊のうち30糞塊 (93.8%) についてシトクロム*b*遺伝子の増幅に成功した。多くの糞が古かったにもかかわらず93.8%という高い増幅成功率は、カモシカのモニタリング調査に糞DNAを用いた種判定法を適用することが可能であることを示している。

図IV-1は、一部の糞サンプルについてシトクロム*b*遺伝子を制限酵素で切断し電気泳動した結果を示している。全ての糞サンプルは、カモシカの位置にバンドが出現したことより、30糞塊すべてがカモシカのものであることが明らかになった。



図IV-1 制限酵素処理後の電気泳動図

(1はサイズマーカー、2と3はカモシカの組織サンプル、4と5はニホンジカの組織サンプルから抽出したDNAの電気泳動パターン、6~11は本研究で得られた糞から抽出したDNAの電気泳動パターンを示す)

表IV-1 採取した糞サンプルの情報と密着率およびDNA分析の結果

番号	地点名(県名)	糞塊No	粒数	状態	密着率	DNAの判定
1	五輪高原(新潟)	B-9-1	124	古い	32.3%	カモシカ
2		C-7-1	300	比較的新しい	-	カモシカ
3		C-7-2	400	比較的新しい	-	カモシカ
4		C-7-3	200	比較的新しい	-	カモシカ
5		C-7-4	400	比較的新しい	-	カモシカ
6		C-11-1	50	比較的新しい	91.7%	カモシカ
7	越道峠(富山)	越道峠1	78	比較的新しい	77.0%	カモシカ
8		越道峠2	150以上	古く、粒の形状をとどめていない	100.0%	カモシカ
9	柵池(長野)	D-6-1	50~100	かなり古く分解し、サンプル採取できず	-	-
10		D-6-2	80	かなり古く分解し、サンプル採取できず	-	-
11		D-8-1	19	古い	89.5%	カモシカ
12		D-8-2	21	古い	-	×
13	三股(長野)	A-9-1	250	古い	-	カモシカ
14		A-9-2	500	古い	-	カモシカ
15		A-9-3	300	古い	-	カモシカ
16		A-9-4	330	古い	-	カモシカ
17		A-9-5	600	古い	-	カモシカ
18		A-9-6	300	古い 崩れ	-	カモシカ
19		D-9-1	193	やや古い 崩れ	8.6%	カモシカ
20	乗鞍岳(長野)	D-6-1	38	比較的新しい	10.5%	カモシカ
21		D-6-2	368	やや古い	-	カモシカ
22		D-6-3	145	やや古い	7.9%	カモシカ
23		D-6-4	188	やや古い	71.3%	カモシカ
24		D-6-5	31	やや古い	13.3%	カモシカ
25		D-9-1	473	比較的新しい	-	カモシカ
26	野麦峠(岐阜)	野麦峠1	190	やや古い	60.5%	カモシカ
27		野麦峠2	23	比較的新しい	43.5%	カモシカ
28		野麦峠3	430	古い	-	カモシカ
29	長峰峠(岐阜)	長峰峠1	440	比較的新しい	-	カモシカ
30		長峰峠2	160	比較的新しい	-	×
31		長峰峠3	650	比較的新しい	-	カモシカ
32		長峰峠4	455	比較的新しい	-	カモシカ
33		長峰峠5	350	比較的新しい	-	カモシカ
34		長峰峠6	190	やや古い	50.3%	カモシカ

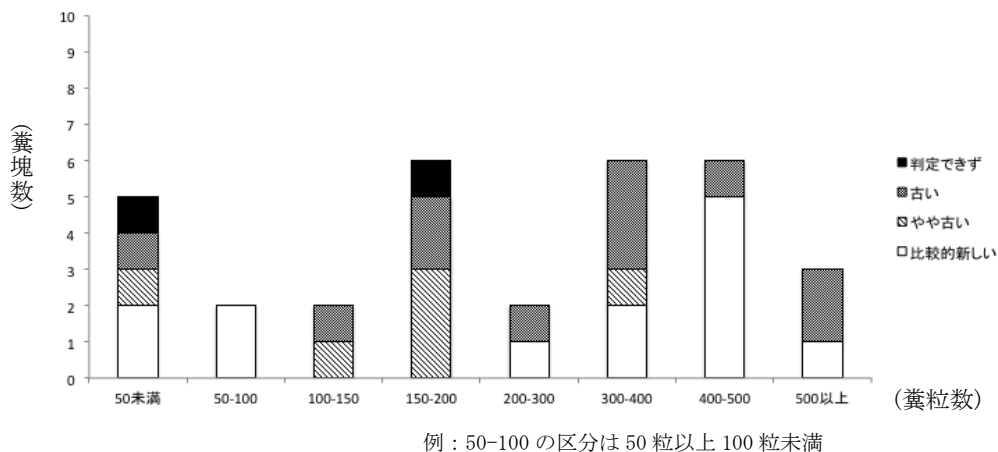
(×はDNAによる種の判定ができなかったことを示す)

＜糞塊あたりの糞粒数＞

糞塊あたりの糞粒数を図IV-2に示す。糞塊あたりの糞粒数は、分解の程度によっても変化することが予想される。特に、今回の調査では、古く分解した糞塊が多く見られたため、“比較的新しい”、“やや古い”、“古い（崩れている）”、の3つの項目に分けてグラフを作成した。“比較的新しい”糞塊に見られる糞粒数は、カモシカが排糞して間もない糞粒数を示しており、“やや古い”もしくは“古い（崩れている）”糞塊では、分解によって糞粒数が減少した結果を示している。

糞塊あたりの糞粒数は、最小で19粒、最大で650粒と幅広い値を示した。30糞塊のうち200粒未満の糞塊は13糞塊（43.3%）であった。そして、これら13糞塊のうち、“比較的新しい”が4糞塊、“やや古い”が5糞塊、“古い（崩れている）”が4糞塊であった。排糞後間もない“比較的新しい”糞塊の中に200粒を下回る糞塊が存在するという結果は、四国山地や九州山地のカモシカ特別調査で報告された結果（徳島県教育委員会ほか、2012、大分県教育委員会ほか、2013）と同様であった。200粒以上の糞塊をカモシカのものとするという基準を設けることで、シカの糞塊は除外することが可能であるが、カモシカの生息密度を過小評価してしまう可能性がある。カモシカとシカが混生する地域で正確な密度推定を行うためには糞DNA分析による種判別も検討すべきと考える。

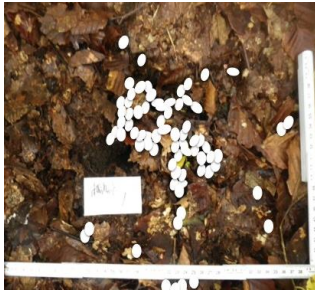
2012年度に実施した糞塊法調査では、DNA分析が実施できていないが、生息分布調査や生息密度調査で得られたシカの分布状況を鑑み、糞塊法調査における生息密度の算出は、第3回調査と同じく糞粒数を問わず、発見したすべての糞塊をカモシカのものとして密度を算出した。



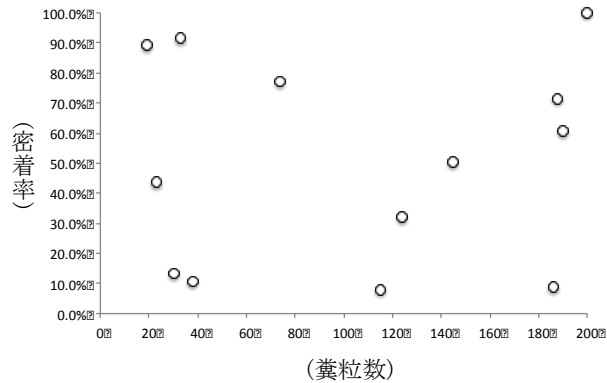
図IV-2 7調査地点でみられたカモシカの糞粒数の分布

<密着率>

糞の DNA からカモシカと同定された 200 粒未満の糞粒数を持つ 13 糞塊について、密着率を求めた (図IV-3)。密着率は、(密着した糞粒の最大数÷全糞粒数) ×100 によって得られ、50%以上の密着率をもつ糞塊のうちおよそ 6 割はカモシカのものと見分けることが可能と示されている (徳島県教育委員会ほか, 2012)。例えば図IV-3の糞塊の場合、全糞粒数は 78 粒 (現地調査の結果) であるが、写真をもとに確認できた糞粒が 74 粒であった。密着している糞粒は 57 粒であったため、密着率は $(57 \div 74) \times 100 = 77.0\%$ である。200 未満の糞粒数を持つ 12 糞塊について糞粒数と密着率の関係のグラフを作成したところ、密着率は 7.9%~100%と幅広い値を示していた (図IV-4)。今回の調査では古い糞塊が多く、糞粒が分解されたことなどにより、密着率が幅広い値となった可能性があると考えられた。



図IV-3 カモシカの糞塊と密着率
(糞粒は白色で着色している)



図IV-4 カモシカの糞の密着率と糞粒数の関係

次に、各調査地点の結果について、特に 200 粒未満の糞塊に着目して述べる。糞の DNA 分析によって種が判定できなかった 2 糞塊を除き、全てカモシカの糞塊である。

①五輪高原

6 糞塊が発見された。このうち 4 糞塊は 200 粒以上からなる糞塊であり、残りの 2 糞塊は 200 粒未満であった (図IV-5)。B-9-1 は 124 粒から構成される古い糞塊で、糞粒は広範囲に広がっていた。密着率は 32.3%と低かった。C-11-1 は 50 粒から構成され、密集した状態であった。写真では 33 粒が確認でき、91.7%と高い密着率を持っていた。



図IV-5 糞塊の写真 (左: B-9-1, 右: C-11-1)

②越道峠

2 糞塊が発見され、2 糞塊とも 200 粒未満であった（図IV-6）。越道峠1は78粒から構成され、密集した状態であった。写真では74粒が確認でき、密着率は77.0%と高かった。越道峠2は、古く分解しており、すべての糞粒が形状をとどめていなかったが150粒以上で構成されると判断された。



図IV-6 糞塊の写真（左：越道峠1, 右：越道峠2）

③柵池

4 糞塊が発見されたが、そのうち2糞塊はかなり古く分解しておりサンプル採集ができなかった。採集できた2糞塊も非常に古い状態であり、D-8-2はDNA解析による種判定ができなかった。D-8-1は19粒で構成され、密着率は89.5%であった（図IV-7）。



図IV-7 糞塊の写真（左：D-8-1, 右：D-8-2）

④三股

7 糞塊が発見された。そのうち6糞塊は200粒以上で構成されていた。残りの1糞塊は193粒で構成されているが、やや古く分解し崩れている糞粒もあった（図IV-8）。写真では186粒確認でき、密着率は8.6%と低かった。



図IV-8 糞塊の写真（D-9-1）

⑤乗鞍岳(長野)

6糞塊が発見された。そのうち2糞塊が200粒以上から構成されており、残りの4糞塊は200粒未満で構成されていた(図IV-9)。D-6-1は38粒であり、そのうち4粒が密着しており、密着率は10.5%であった。D-6-3は145粒で構成され、やや古く散在していた。写真では115粒が確認でき、密着率は7.9%と低かった。D-6-4は188粒で構成され、134粒が密着しており密着率は71.3%であった。D-6-5は31粒から構成され、散在していた。写真では30粒が確認でき、密着率は13.3%と低かった。



図IV-9 糞塊の写真(右上:D-6-1, 左下:D-6-3, 中央下:D-6-4, 右下:D-6-5)

⑥野麦峠(岐阜)

3糞塊が発見され、2糞塊が200粒以下の糞塊であった。野麦峠1は190粒から構成されていた(図IV-10)。そのうち86粒が密着しており、密着率は60.5%であった。野麦峠2は、23粒から構成され、密着率は43.5%であった。



図IV-10 糞塊の写真(左:野麦峠1, 右:野麦峠2)

⑦長峰峠(岐阜)

6糞塊が発見され、2糞塊が200粒未満の糞塊であった(図IV-11)。長峰峠2は160粒で構成されていたが、糞塊が古く、DNA解析による種の判定ができなかった。長峰峠6は190粒から構成されていた。写真では145粒が確認でき、密着率は50.3%であった。



図IV-11 糞塊の写真(左:長峰峠2, 右:長峰峠6)