守れ！ ふるさとのカスミサンショウウオ
～保護活動と遺伝的多様性の解析～

岐阜県立岐阜高等学校　自然科学部　生物班

第1章　序章

カスミサンショウウオは主に西日本に生息する小型の止水性サンショウウオで、環境省のレッドデータリストでは絶滅危惧II類、岐阜県版レッドデータブックでは絶滅危惧I類に指定されている希少な両生類である。

2006年、岐阜市の生息地において、それまで確認されていた幼生が全く見られなくなるという出来事が発生した。この事をきっかけに、私たちは岐阜市生息地の詳細な調査とカスミサンショウウオの保護活動を開始した。また、揖斐川町生息地においては、産卵場所となっている旧河川で度々水涸れが起きていることが判明し、こちらでも調査と保護活動を開始した。本論文では、岐阜高校自然科学部で2007年より7年間に渡って行ってきた岐阜県のカスミサンショウウオの保護活動、遺伝的多様性の分析の結果を報告する。

第2章　研究対象

第1節　カスミサンショウウオについて

カスミサンショウウオは体長60～130mm程度の小型サンショウウオである。主に丘陵地や平野部を中心に水田地帯にも生息し、人家に隣接した場所でも見られ、日本産サンショウウオの中で最も人間生活の影響を受けやすい両生類である。カスミサンショウウオは、卵から幼生の時期には水中で生活し、変態上陸後は陸上で生活する。そのため、健全な水域と陸域に加えて、それらを繋ぐ水辺エコトーン（移行帯）が整った環境が必要な種である。

図1　カスミサンショウウオの成体と卵のう

第2節　岐阜県での分布

これまで、岐阜県内でカスミサンショウウオの分布が確認された地点は、3か所（そのうち1か所では絶滅が確認された）である。分布の状況から、以前は、西濃地区から岐阜地区にかけては連続的に分布していたと考えられる。しかし、生息地が分断されて、現在でも生息が確認できるのは、岐阜市と揖斐川町の2か所になってしまった。

県内の多くの場所でカスミサンショウウオの生息が確認される前に、開発や外来種の侵入による影響に加え、産卵場所の水涸れ、農薬の流入、U字溝を使った水路の整備、産業廃棄物による埋め立てなど様々な人為的な圧力を受けた。その影響により、カスミサンショウウオの生息に必要な水域、水辺エコトーン、陸域の荒廃や分断が起こり、今日のような状況になってしまったのではないかと考えられる。

第3章　保護活動

第1節　揖斐川町について

①　産卵場の整備

揖斐川町の生息地では、産卵の行われる旧河川（以前は河川であったが現在は流れがなくなった湿地）に度々水涸れが発生することが判明した。対策として当初プラスチック製の仮の産卵池を設置したが効果が小さかったため、その後遮水シートを使って十分な広さの産卵池を設置した。

2005年:　産卵期に水涸れが発生し、産卵が確認されなかった。

2006年:　水涸れが発生せず、良好な環境で産卵・繁殖が行われた。

2007年:　水涸れが発生したため、産卵直前の2匹の雌を持ち帰り岐阜高校にて産卵させた。孵化した幼生120匹を変態期まで飼育し元の生息地に放流した。

2008年:　空き缶などのゴミと共に一部放棄された産業廃棄物までもが散乱していた生息地の整備を行った。地元住民の方々の協力を得ながら清掃活動を実施したところ、量にしてゴミ袋40袋分のゴミが集まった。

その後プラスチック製の仮の産卵池を、生息地付近の地表に埋め込んだ。アライグマの食害対策のため、産卵池の上部に網を張り、工事用の点滅ライトを設置した。この仮の産卵池で雌6匹が産卵したと思われる卵のうを発見したが、2つの卵のうはアカハライモリの食害を受け、1匹分の卵のうは完全なものであったが未受精卵であった。

2009年:　アカハライモリとアライグマによる卵のうの食害や頻繁に起こる水涸れを回避するため、遮水シートによる3つの産卵池を設置した。産卵池が完成した後の4月中旬に生息地では水涸れが発生したが、その時産卵池が幼生の避難場所となった。

図2　近隣住民の方々と清掃活動を行う

図3　産卵池の完成

2010年:　水涸れが発生せず、良好な環境で産卵・繁殖が行われた。

以降、現在まで継続して生息地の整備や保護活動を行っており、安定した状態を維持している。

②　個体識別による個体群の解析

カスミサンショウウオの調査にあたり、私たちはマイクロチップを用いて個体識別を行った。生息地にてカスミサンショウウオを捕獲し、十分な大きさの個体に麻酔下にてマイクロチップを埋入した。記録した捕獲数から標識再捕法により揖斐川個体群の個体数を推定したところ、個体群内の推定個体数は2008年で1740匹、2009年で2331匹となり、安定していることが分かる。

③　保護活動の成果

2009年に設置した遮水シートによる広域な産卵池では、その後の調査で幼生が順調に生育していることが確認された。このことは、産卵池を設置したことによるカスミサンショウウオやアカハライモリの行動範囲の拡大が、生育密度の低下を引き起こし、食害を減らしたと考えられる。アライグマの食害についても、一定の水位を維持することで減少したためであると考えられる。また、標識採捕法によって個体数を推定したところ、個体数が比較的安定していることが確認された。

表1　年ごとの捕獲数と再捕獲数

	捕獲数		標識数		再捕獲数	
年	♂	♀	♂	♀	♂	♀
2007	2	12	2	8	–	–
2008	177	43	171	13	1	0
2009	31	11	28	10	3	0

第2節　岐阜市について

①　卵のうと幼生の保護と放流

岐阜市生息地では2008年、大型の老齢個体4匹のみしか見つかっておらず、個体群は危機的状況にあった。そこで、2007年から発見した全ての卵のうおよび幼生を持ち帰り、岐阜高校と岐阜県世界淡水魚園水族館アクア・トトぎふにて保護した後、変態上陸直前に放流する試みを始めた。

その結果、保護活動の開始から3年目にあたる2010年以降、頭胴長が50㎜以下の若齢個体が発見されるようになった。また、2013年は過去最高の個体数が産卵場に現れており、個体数は年々増加しているといえる。

表2　保護した卵のう数、幼生数、放流数

年	保護 卵のう数	保護 幼生数	放流数 岐阜高校	アクアトト	合計
2007	6 対	118	391	107	498
2008	10 対	137	831	294	1,125
2009	9 対	290	713	263	976
2010	15.5対	553	803	544	1,347
2011	37 対	0	2,508	945	3,453
2012	33.5対	0	2,184	248	2,432
2013	40 対	0	1,669	0	1,669

7年間の合計11,500匹

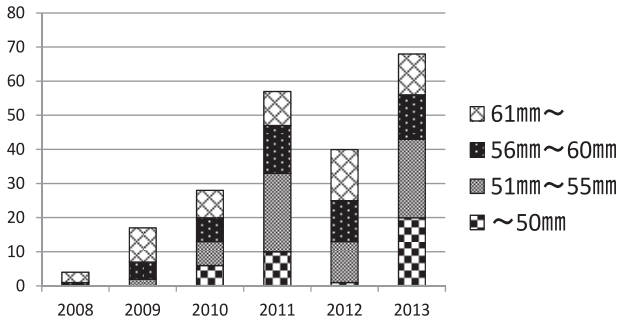

図4　産卵場に現れた成体の個体数および頭胴長

② 個体識別による個体群の解析

2008年から2012年にかけて岐阜市の産卵場で捕獲された105個体について、マイクロチップを用いた個体識別を行い、それぞれが出現した年を調べ、再捕獲率を算出した。2010年に再捕獲率の急激な低下が見られることから、世代交代が起きていると考えられる。また、標識再捕法より推定される個体数は2013年時点で300匹ほどになり増加していると考えられる。しかし、揖斐川町個体群の個体数の約1/8しかおらず、依然として保護活動が必要であるといえる。

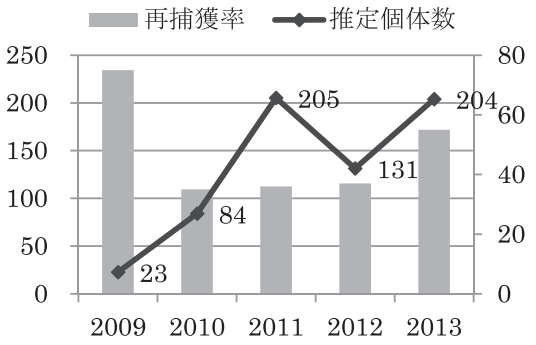

図5　岐阜市生息地での再捕獲率と推定個体数

③ 行動パターンの解析

2008年と2009年の産卵期に岐阜市の産卵場に出現した成体の個体数と産卵日（卵のうの発見日）を調査し、産卵場への出現と産卵のパターンを調べ、保護活動の基礎資料とした。調査の結果、降雨後の出現が目立ち、共に多く卵のうが観察された。また、2009年には2008年よりも1ヶ月早い時期に産卵が行われた。

雌は、産卵後すぐに上陸して姿を消すため、2009年の1匹しか確認できなかった。雄については、2009年の調査結果から産卵後も繁殖場所にとどまる傾向が確認された。

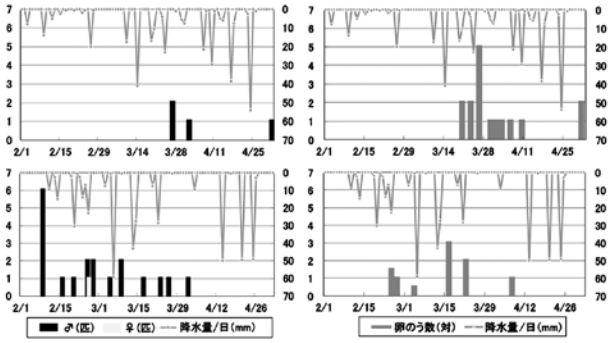

図6　成体と卵のうの出現パターン（上2008年、下2009年）

④ 生息場所の整備

2006年、岐阜市生息地においては、それまで確認されていた幼生が全く見られなくなるという出来事が発生した。近隣住民の方が害虫対策に撒いた殺虫剤の流入が原因であると考えられたが、近隣住民の方からは、「ムカデなどの不快昆虫を放置しておく訳にはいかない。ある程度の殺虫剤は撒きたい。」という意見も聞かれた。2007年にも同様に殺虫剤が散布された。そこで私たちは岐阜市自然環境課と協議し、2008年の繁殖期に間に合うように、生息地と住宅地とを隔てるL字型の堰を作り、産卵が行われる水域への殺虫剤の流入を防いだ。

⑤ 生息域外保全

2011年から個体群の存続を目的とした生息域外保全の一環として、本来の生息地から近隣かつカスミサンショウウオの生息に適した環境のある岐阜市市有地と岐阜大学構内に設置した域外飼育場へ、幼生の放流を行っている。水辺に放流した個体は、手を加えず自然な状態で生育している。

2013年7月1日に、岐阜大学構内域外飼育場にてカスミサンショウウオの成体が初めて発見され、その後

の調査で、放流経過後、推定3年目、2年目、1年目の個体の生息が観察された。これらの個体の発見により、これまでに放流してきた個体が、域外飼育場内で生存し、成長していることが確認された。今後、域外飼育場内での産卵も期待できる。

⑥　保護活動の成果

7年間に渡り行ってきた放流活動によって、岐阜市個体群の個体数は順調に増加している。また、L字型の堰の設置により、過去のように殺虫剤の流入で幼生が絶滅してしまうことは起こらなくなった。しかし、標識採捕方式によって個体数を推定すると、揖斐川個体群の個体数には遠くおよばず、これからも継続して保護活動を行うべきであるといえる。

図7　岐阜市有地

図8　岐阜大学域外飼育場

表3　場所ごとの放流数

年	放流した場所			合計
	野外生息地	域外飼育場	市有地	
2011	632	100	2,721	3,453
2012	424	979	1,029	2,432
2013	556	308	805	1,669

第4章　遺伝子解析

集団内の遺伝的多様性の低下すなわち個体間の遺伝子の均一化は、近交弱勢など個体数減少の大きな要因になりかねない。真の個体群の保全のためには、遺伝的多様性の解析が必要であると判断した私たちは、ミトコンドリアDNA（mtDNA）のシトクロームb（Cyt b）遺伝子の解析から、岐阜市の個体群内のハプロタイプ頻度の年変化を調べた。

また、岐阜県外の個体群との遺伝的系統関係を調査し、東海地方におけるカスミサンショウウオの分布の変化についても検証した。

第1節　材料と方法

99.5%エタノールに保存した各個体の尾部から採取した微量の組織片よりDNAを抽出した。PCR法により、以下のプライマーを利用して、mtDNAのCyt b遺伝子の各領域（864塩基対）を増幅した。ダイターミネーター法によりシークエンスを行い、得られた塩基配列を用いて、年ごとのハプロタイプ頻度、また系統解析を行った。

CBL181　：5’ -ACACTATACAGCCGACACAT- 3’
CBH759　：5’ -GGGGTAAAATTATCTGGGTC- 3’
CBL656　：5’ -TTCCGTTCCAYCCATACTTC- 3’
CBH1070：5’ -GTRGATGCGGCTTGTCCAAT- 3’

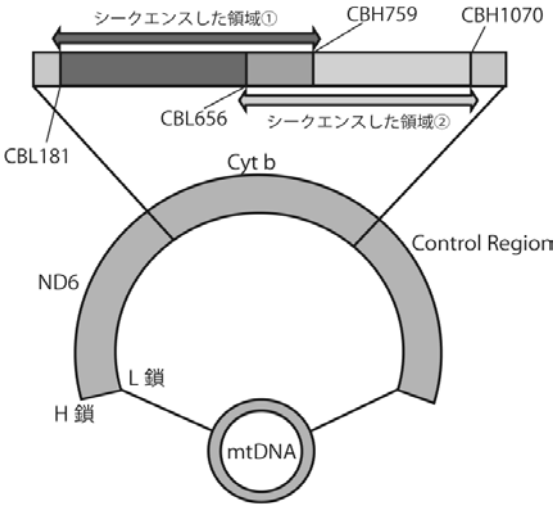

図9　mtDNAの遺伝子マップ

第2節　ハプロタイプ頻度の解析

上記の領域を解析し、岐阜市個体群内の個体ごとのハプロタイプを調べた。グラフ内の数字はハプロタイプごとの個体数を示している。また、2012年について

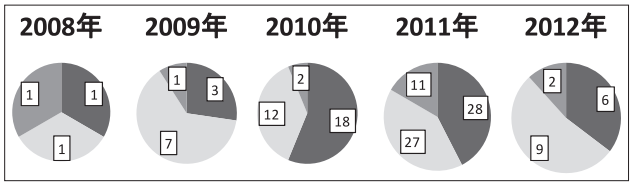

図10　岐阜市個体群のハプロタイプ頻度の変化

は再捕獲された個体のみについて検討した。その結果、岐阜市個体群の成体には、3つの特異的なハプロタイプが検出された。また、ハプロタイプ頻度は、年を経ても大きく変動していなかった。

第3節　東海地方における生物地理学的解析

岐阜県内および近隣地域で採集を行い、カスミサンショウウオの系統解析を行った。第1節と同様の方法で配列解析を行い、mtDNAのCyt b遺伝子の各領域（864塩基対）を決定した。得られた64個体の配列、およびDDBJ上の6個体の配列、提供していただいた滋賀県および愛知県の40個体の配列をもとにMEGA5を用いた近隣結合法により分子系統樹を作成し、カスミサンショウウオの個体群間の遺伝的系統関係を解析した。

東海地方および滋賀県のカスミサンショウウオは4グループ（東海集団、甲賀集団、長浜・米原集団、名古屋・知多集団）の遺伝子集団に分けられた。岐阜県の個体群は田原市、津市、松阪市と比較的近縁で東海集団を形成していた。名古屋市の個体群の大部分は知多半島および豊田市、瀬戸市の個体群と近縁で独自の集団を形成しており、岐阜県の個体群とは異なる集団に属していた。南知多町には、田原市と遺伝的に非常に近い個体が発見された。

図11　採集地点

第4節　考察

ハプロタイプ頻度を比較した結果、年ごとの変化はあまり見られず、個体群の遺伝的多様性が維持されていることが示された。

系統解析の結果、名古屋・知多集団は他の3集団と遺伝的に大きく離れており、独自の集団を形成していた。このことは、名古屋・知多集団が他の3集団と太古

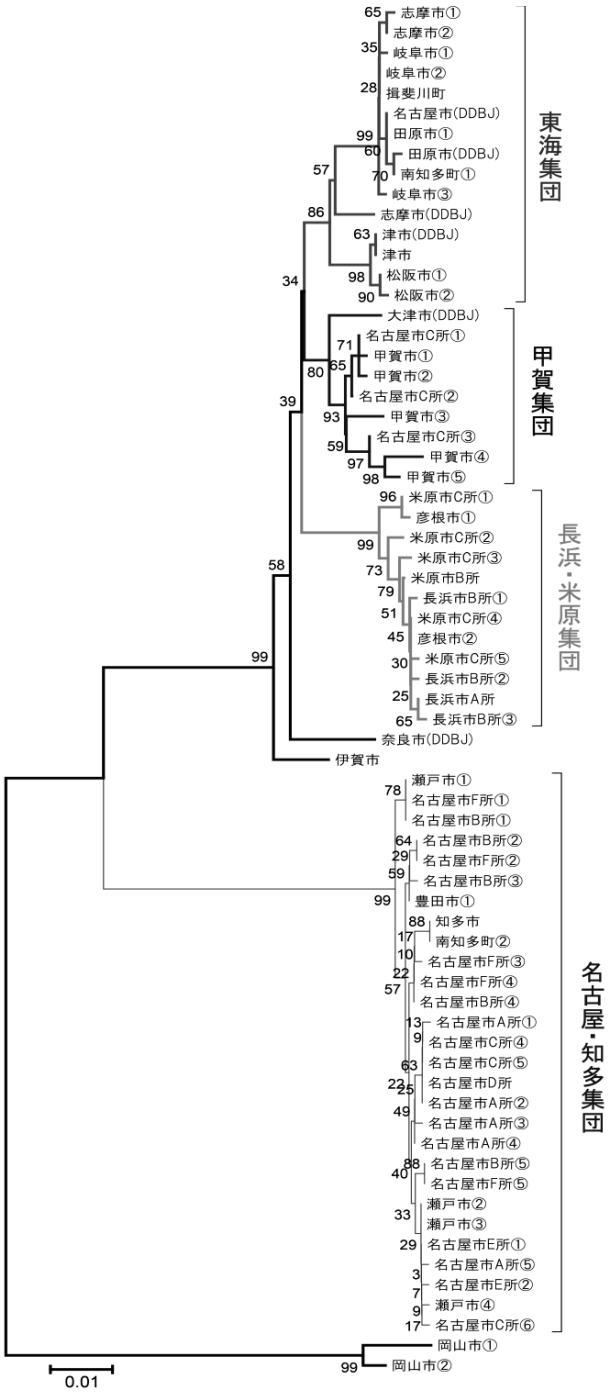

図12　東海地方のカスミサンショウウオの分子系統樹

に分化したことを示している。これらの結果を踏まえ、東海地方のカスミサンショウウオの分布拡大について、私たちは次のように考えた。

名古屋･知多集団に分かれる個体群が先に名古屋周辺に分布を広げ、その後別の集団が西日本から再び東進した。東進した集団のうち滋賀県方面に移動した個体は、甲賀集団と長浜･米原集団を形成したが、伊吹山地-鈴鹿山脈を越えることはなかった。さらに、伊吹山地-鈴鹿山脈を迂回し、分布を広げた個体が東海集団を形成した。その一部が北上し、岐阜県に分布を広げたと考える。また、田原市、南知多町方面へは氷河期に海水面が低下し、湿地化した伊勢湾を経由して分布を広げた可能性が高い。

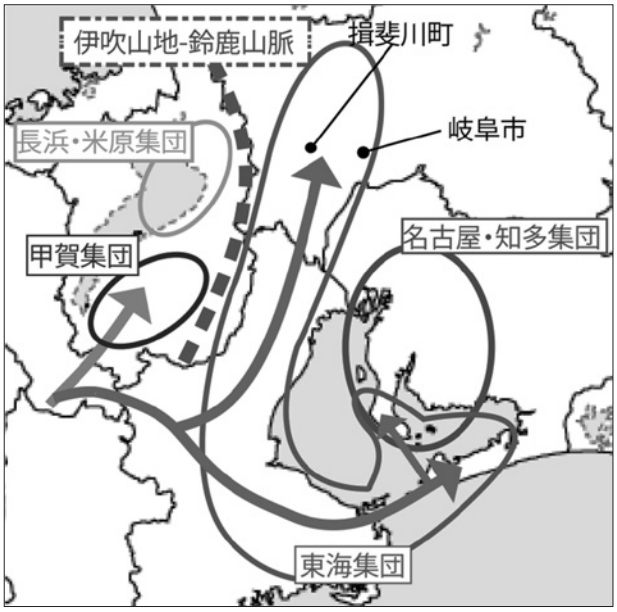

図13　カスミサンショウウオが分布を広げた過程

カスミサンショウウオが伊勢湾を渡ったとする理由については、東海地方に分布するウシモツゴやカワバタモロコといった淡水魚が、氷河期に海水面が低下して湿地化した伊勢湾を移動していた事例が存在することや（渡辺ら、2008）気候が冷涼である氷河期においては、高温に弱いカスミサンショウウオの活動が活発になることが挙げられる。

この仮説を検証するため、私たちは東海集団に属する個体のみを用いたより詳細な分子系統樹を作成し、海水面変動との関係を調べた。

先行研究（松井ら、2006）を参考に、2%塩基置換／100万年の値を用いて塩基の置換年代を推定し、伊勢湾の海水面変動と比較した。その結果、伊勢湾の西側の集団から東側の集団へと別れた年代が、海水面の低下した時期と一致した。また、渥美半島の集団から知多半島の集団へと別れた年代も海水面の低下した時期と一致した。

従って、カスミサンショウウオは、海水面が低下して湿地化した伊勢湾を通って三重県から渥美半島に分布を広げた。その後、再び海水面が低下して湿地化した三河湾を通って渥美半島から知多半島に分布を広げたと考えられる。

なお、本研究はサンショウウオ類が海水面の低下時に分布を広げた事例の中で、東海地方初である。

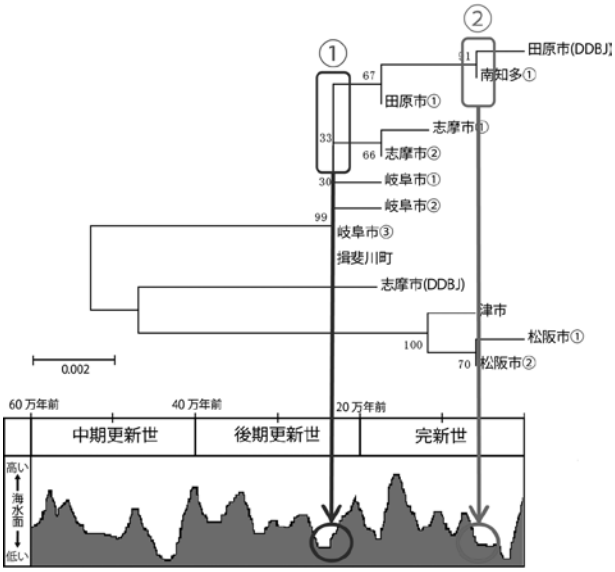

図14　東海集団の系統樹と海水面変動の関係

第5章　今後の展望

保護活動を通して、改めて私たち人間生活の様々な圧力が、自然環境に大きく影響し、様々な生物の生息地の荒廃や分断の原因になっていることを感じた。小さな活動ではあるが、これからも人知れず生息するカスミサンショウウオの保全をとおして、身近な自然を守っていきたい。また、保護活動を行うにあたり、地域の方々の理解と協力が必須であることを痛感している。継続的な保護活動を行うためには、地域の方々に私たちの活動を知ってもらうと同時に、生物多様性を保全することの重要性などを伝える啓発活動にも取り組んでいきたい。

さらに、学術的な研究を深めていきたい。具体的には、マイクロサテライトDNAを用いたゲノムDNAの解析を並行して行うことで個体群内の遺伝子多様性や血縁関係などを明らかにしたい。また、今回の遺伝的系

図15　カスミサンショウウオ幼生の世話

図16　サンショウウオのDNA抽出の様子

統解析によって得られた説と東海地方の地史との関わりを検証し、カスミサンショウウオの東海地方における分布の変化について生物地理学的に解析を進めていきたい。

そして今後も、カスミサンショウウオの保護活動を生物多様性の以下の3つの観点から継続していきたい。

① 生態系レベルの多様性の保全：揖斐川町、岐阜市生息地の定期的な調査および清掃活動

② 種レベルの多様性の保全：生息地の卵のう、幼生の保護と放流活動・生息域外保全

③ 遺伝子レベルの多様性の保全：ハプロタイプ頻度の調査

これらの活動をとおして、私たちの住む岐阜県の生物多様性を守っていきたいと思う。

岐阜県立岐阜高等学校　自然科学部　生物班