

神戸市立相楽園におけるニホンイシガメの域外飼育と環境 DNA の研究

阿部慧琉・清水まどか・近藤かりん・清水 茉・清水礼花・金島姫依・小松原奏穂・内田るみか・中谷卓司

650-0006 神戸市中央区諒訪山町 6-1 神戸山手グローバル中学校高等学校 (2025 年度より校名変更) (仮) カメラ部

Conservation activities for Japanese pond turtles in Japanese garden "Sorakuen" and Seasonal variation of environmental DNA

By Keina ABE, Madoka SHIMIZU, Karin KONDO, Marika SHIMIZU, Reika SHIMIZU, Hiyori KANESHIMA, Kanaho KOMATSUBARA, Rumika UCHIDA, and Takuji NAKATANI
Kobe Yamate Global Junior & Senior High School, 6-1, Suwayama-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0006, Japan

目的

2011 年から神戸山手女子高等学校 (2025 年度より神戸山手グローバル中学校高等学校へ校名変更) は神戸市立相楽園の池をフィールドにして、ニホンイシガメの域外飼育を試行・調査している。また、環境 DNA の分析によってニホンイシガメの生存の有無を確認できる(河田他, 2018)ことから、その手法を習得し、さらに応用を検討している。

ニホンイシガメの域外飼育

(1) 概要と調査方法

閉鎖された比較的広い空間で繁殖の可否を調べるために、相楽園で捕獲した 1 匹に加え、神戸市立須磨海浜水族園に協力を得て、兵庫県産のニホンイシガメ 22 匹を譲り受けた。各個体はナンバリングし身体計測を行った上で、2011 年 11 月に 3 匹、2012 年 9 月に 20 匹、相楽園の日本庭園の池に放流した。これを不定期に、池外周から目

表 1. 各個体の動向(●は捕獲確認、○は目視確認、×は死亡を示す)

No.	性別	2012年月				2013年月				2023年月				2024年月																				
		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
4001	♀					●																												
4002	♀	●				●																												
4003	♀						●								●	●										○	○							
4004	♀			●		●																												
4005	♀	○		●	●																													
4006	♀			●																														
4007	♀																																	
4008	♀							●	●																									
4009	♀							○	●	●																								
4010	♀	●						●	●	●																								
4011	♂	●																																
4012	♂	●	●	●			●																											
4013	♂	●	●					●																										
4014	♂	●	●			●			●	●	●																							
4015	♂	●	●	○			○	○	○	○	○																							
4017	♂	●	●	●			●		●	●	●																							
4018	♂	●	●			●			●	●	●																							
4019	♂	●				●			●																									
4020	♂	●				●		●	●	●	●																							
4021	♂						●	●	●	●	●																							
ジュリア	♀	●	●	●			●	●	●			×																						
ベリー	♀																																	
マイケル	♂																																	
幼体確保							●	●																										

※1 卵確認後、人工孵化にて 4 個体確保 (図 1A) ※2 幼体 5 個体捕獲 (うち 1 個体は後に死亡)

視観察と網による捕獲を行って、各個体の追跡調査を実施している。

(2)導入個体の動向

捕獲または目視による確認が行われた各個体とその時期について、2012年から2013年と、2022年以降のものを表1に示す。●は捕獲による確認、○は目視による確認を表す。当初の23個体のうち、しばらく個体番号が確認できている個体は2個体であったが、2023年6月、神戸市中央区にお住まいの方から飼育していたニホンイシガメを譲り受けた。数年前に路上を歩行していた個体とのことであったが、4014番のオスであった。その影響か、2022年と2023年に幼体の捕獲が途絶えていたが、2024年には2回の産卵行動を確認することができた。

(3)2024年の産卵と孵化

5月18日産卵行動(4003番)の連絡を受け、5月21日に7個の受精卵を確認した。そのうち1個は破損していたが、残り6個について人工孵化へ移行した(図1A)。そして8月16日に4個体の孵化を確認した(図1AB)。

さらに6月10日にも産卵行動(4003番)の連絡を受け、6月14日9個の受精卵を確認した(図1C)。この卵は埋め戻し、上部を金属製の笊で覆って固定した。9月11日に幼体発見の報告を受け、産卵場所を確認したが孵化後の殻のみの状態であった。周囲を隈無く探索した結果、5個体(うち1個体は後に死亡)を捕獲した。

環境DNAに関する研究

(1)概要

環境DNAとは水中や土壤中、空气中などの環境中に存在する、生体内や生体外の動植物の排泄物・組織片などに由来するDNAのことである。その環境DNAを採取し分析することで、生物の在不在や個体数、さらには遺伝情報などの膨大な

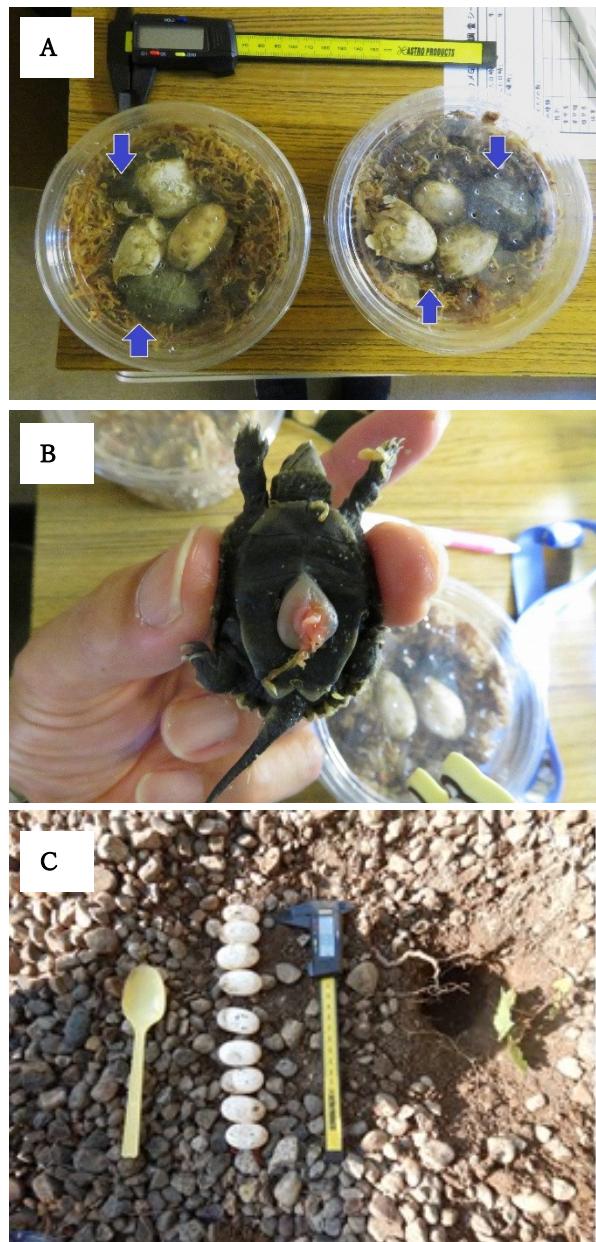


図1. A:孵化の様子(矢印は孵化幼体を示す),
B:孵化後の幼体,C:2024年6月14日の
産卵確認

データを得ることが可能となってきた(源, 2019)。

神戸大学の源利文先生にご協力いただき、ニホンイシガメを導入している相楽園内池の環境DNAを調査している。カメ類の環境DNAを調査するためのプライマーは決定されているが、冬期は活動が鈍り、環境DNAの検出が困難であることが問題点としてあげられる(河田他, 2018)。そこで、生活環境と生存数がある程度把握できて

いる相楽園の日本庭園の池で、ニホンイシガメの環境DNAの季節変化を調査した。

池の水500mLからDNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、神戸大学大学院人間発達環境学研究科の源研究室にrPCRでの増幅を依頼した。結果は、7月から10月の間に、相楽園でニホンイシガメの環境DNAが確認できたが、十分とはいえない結果であった(樽井他, 2021)。そこでカメ類の環境DNAは、排出物に多く含まれ、池の底に沈殿していると考え、並行して土壤中の環境DNA抽出を試みた。2020年10月から2021年2月にかけて、池の縁の土壌を採取し、Powersoil KitでDNAを抽出、rPCRで増幅したが、いずれも測定限界値以下であった。

(2) 調査方法

試料採取は、池の縁の土から、池の底の泥に変更し、スクリューキャップ付きプラスチック試験管におもりをつけ、池に投げて回収する方法を採用した(図2A)。抽出キットは、前回のDNeasy Powersoil KitからDNeasy PowerLyzer Powersoil Kitに変更した(図2B)。DNAを吸着するPowerBeadチューブのビーズが、黒い粒々より、より細かい白い粒になっている。0.25gの泥から、環境DNAを含む100μLの試料を得た。

(3) 環境DNAの抽出結果

池の水からの環境DNA検出だけでなく、池の泥からも環境DNAを検出できることが分かった。現在、この季節変化を追跡している。

今後の展望と課題

ニホンイシガメを相楽園内に導入することによって、繁殖が確認できている。現在、保護した幼体の導入先を探している。環境DNAについては、水、池の底の泥、共に検出できることが確認できた。今後、その季節変化と検出量の変化を追跡する。

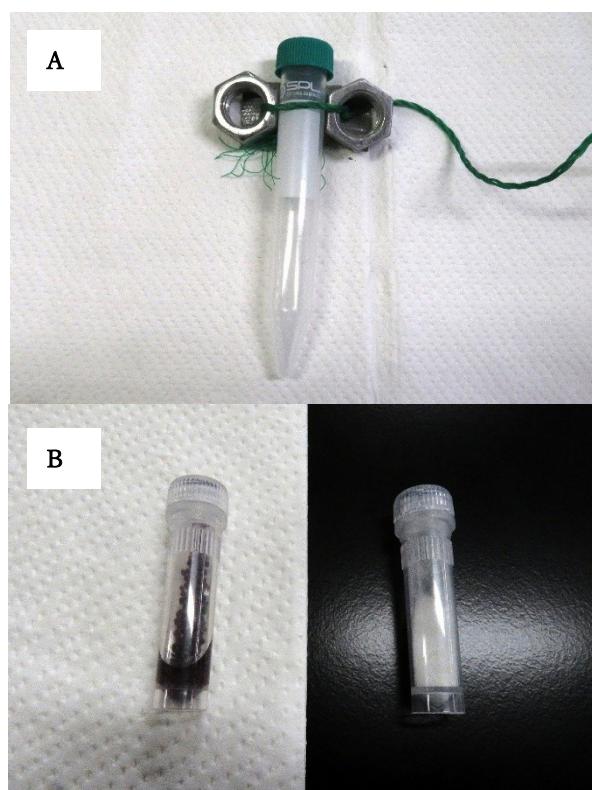


図2. 採用用プラスチック試験管(A), PowerBeadチューブ(B)

謝辞

この調査研究に当たって、調査地を提供して頂いている神戸市立相楽園、ニホンイシガメの提供と助言を頂いている岡山理科大学生物地球学部亀崎直樹先生、(株)自然回復、そして環境DNAに関してご指導頂き分析をお願いしている神戸大学大学院人間発達環境学研究科源利文先生に深くお礼申し上げます。

引用文献

- 河田萌音・上野真太郎・藤林 真・亀崎直樹・源利文. 2018. 環境DNA分析手法を用いた淡水ガメの検出. 亀楽 15: 7.
- 源 利文. 2019. 環境DNA分析の概要と希少種の検出. 化学と生物 57(3): 181-186.
- 樽井優華・佐藤 瞭・浅野裕唯・山口翠月・福岡 希心・中谷卓司. 2021. 神戸市立相楽園におけるニホンイシガメ保護の試み(続報)と環境DNAの季節変動(中間報告). 亀楽 21:35-39.