

6 研究活動報告

環境科学国際センターでは様々な調査研究活動を実施している。それらの成果については、積極的に発表し、行政、県民、学会等での活用に供している。学術的な価値のあるものについては論文にまとめて投稿、発表しているが、それ以外にも比較的まとまった成果は多い。ここではこれらの調査研究成果のうち、論文や種々の報告書に掲載されていないものを紹介する。今号では、当センターの自主的な研究課題として設定し、研究活動を実施しているもののうち、平成22年度に終期を迎えた課題を中心に報告する。

6.1 資料

埼玉県におけるサギ類の生息実態と生息モデルの検討	嶋田知英
堂平山観測所における二酸化炭素高濃度事例解析について	武藤洋介
大気中のガス状および粒子状水溶性無機成分濃度の夏期調査	松本利恵 米持真一 梅沢夏実
絶滅危惧魚類ムサシトミヨのミトコンドリアDNAマーカーの作製とその生息地への適用	三輪誠 金澤光

[資 料]

埼玉県におけるサギ類の生息実態と生息モデルの検討

嶋田知英

1 はじめに

比較的大型の鳥類であるサギ類は、湿地を主なすみかとし、そこに生息するカエルやドジョウなど水生生物を主食として暮らしている。サギ類の本来の生息地は水深の浅い池沼や河川、湿地であるが、日本では国土の約6.5%を占め、人工的な湿地とも言える「水田」¹⁾が、サギ類の主要な生息地となっている。

埼玉県も県土の約11.5%が水田であり¹⁾、特に県東部の低地には水田が多く、本来サギ類にとって良好な生息地である。都市化が進んだ県東南部に見沼田圃と呼ばれる緑地空間が今も残されているが、かつて、この見沼田圃に隣接するさいたま市緑区上野田地区には、大規模なサギ類の集団繁殖地(コロニー)「野田の鷺山」が存在した。野田の鷺山は江戸時代中期に形成され、最も多い時には5,000巣、20,000~40,000羽のサギ類が生息していたとされ、国内有数のコロニーであり、1938年には「野田のサギおよびその繁殖地」が国の特別天然記念物に指定され保護活動も行われていた²⁾。しかし、1972年に集団繁殖地は消失し、その後、4kmほど離れたさいたま市緑区三室に新たな集団繁殖地が形成されたが、ここも1978年には消失し、見沼田圃周辺から大規模なサギコロニーは完全に失われた³⁾。

このサギコロニーの消失は、営巣していた竹林が1965年に一斉に枯れたことや、農薬等の化学物質の影響、観光客による攪乱などにより引き起こされたとされている³⁾。しかし、その他の要因として土地利用の変遷、すなわち、サギの餌場である水田が、水田転作等により畑地に転換され失われたことも消失要因の一つであるとも指摘されている⁴⁾。また、野田の鷺山だけではなく、県内に存在していた他の多くのコロニーも、近年、消失または移動した。この様に埼玉県におけるサギ類の生息状況は大きく変化してきた⁵⁾。

そこで、サギ類の生息状況が変化した要因を探るとともに、保全のための基礎的な情報を得るため、現在埼玉県内で確認されているサギ類コロニーのうち、最も大規模なコロニーである久喜市に形成されたコロニー⁵⁾の周辺地域を対象にサギ類の分布調査を行い、埼玉県におけるサギ類の分布実態や分布様式を把握した。

また、近年、特定の環境条件やその変化が生物種の分

布にどのような影響を与えるのかを定量的に評価するための手法として、野生生物の分布と環境との関係を数学的なモデルとして表現する生息モデルが数多く開発されている⁶⁻⁸⁾。そこで、今回得られたサギ類分布調査の結果を用い新たにサギ類の生息確率予測モデルの構築を試みた。

2 方法

2.1 コロニー周辺のサギ類分布調査

鳥類群集の調査手法としては、あらかじめ設定したルートで一定の速度で移動し、出現した鳥類を記録するルートセンサ法や、設定した定点で観察した鳥類を記録する定点観察法がよく用いられる。本調査ではサギ類の面的な分布実態や様式を明らかにするため、久喜市に形成されているサギ類コロニー周辺地域を対象に自動車を用いたルートセンサ法を実施した。

調査は、久喜市本町にある寺院(甘棠院)の竹林に形成されたサギ類コロニー(図1、図2)を中心に、南北約10km、東西約20kmの範囲に総延長約120kmの調査ルートを設定した(図3:以後、本調査域)。この調査ルートを計12回(2004年5月、9月、12月、2005年5月、7月、12月、2006年5月、7月、9月、12月、2009年9月、12月)自動車で行き、目視によりサギ類を探索した。サギ類を確認したときは、GPSを接続したパーソナルコンピューターと地図ソフト(カシミール3D)を用い、サギ類の確認位置を地図上にプロットした。また、同時に確認したサギ類の種名、個体数、確認した場所の土地利用等も別途記録した。

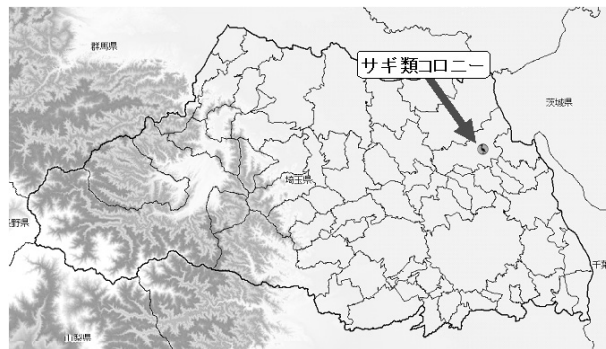


図1 調査対象としたサギ類コロニーの形成地点



図2 久喜市に形成されているサギ類コロニー

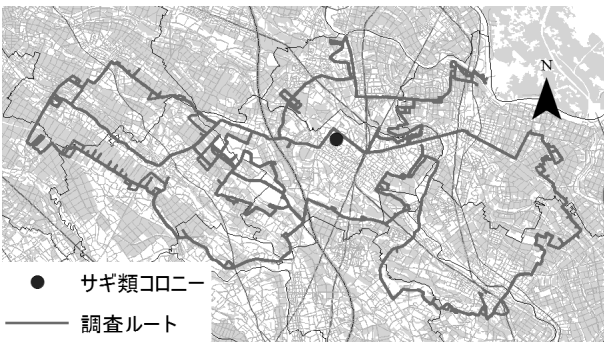


図3 サギ類ルートセンサスの調査ルート

2.2 サギ類生息モデルの検討

サギ類の在・不在を予測する生息確率予測モデルの構築を目指し検討を行った。生息確率予測モデルとしては生物の在・不在を説明する統計モデルとしてロジスティック回帰分析を用いた。

サギ類の確認地点とその周辺環境を定量的に解析するため、電子化した地図の解析が可能な、地理情報システム(GIS)により解析を行った。

まず、本調査域のサギ類の分布調査により得られたサギ類の確認地点の緯度・経度情報を、GISソフト(ArcGIS 9.3)で利用するため、GISデータフォーマット(Shapeファイル)に変換し、サギ類確認地点の地図データを作成した。

次に、サギ類確認地点の周辺環境情報として、表1に示したGISデータをサギ類の在・不在を予測するための説明変数として用意した。

次に、GISを用い、サギ類確認地点を中心に半径100mの円を作成し、その円内に含まれる周辺環境情報をGISデータより抽出しサギ類が存在した場所の環境情報(以後、在データ)とした。また、ロジスティック回帰分析を行うには、対象となる生物が存在しない場所の情報(以後、不在データ)も必要のため、サギ類の不在データを得るため、調査ルートを中心に片側150m以内の範囲に無作為に点を発生させ、そこからさらに半径100mの円を作成し、

表1 検討に使用した環境情報

分類	データソース	説明変数
河川	数値地図25000空間データ基盤	河川長(km)
土地利用	環境省植生図(第6・7回調査)	水田雑草群落
土地利用	環境省植生図(第6・7回調査)	畑雑草群落
土地利用	環境省植生図(第6・7回調査)	開放水域
土地利用	環境省植生図(第6・7回調査)	市街地
土地利用	環境省植生図(第6・7回調査)	緑の多い住宅地
土地利用	環境省植生図(第6・7回調査)	工場地帯

サギ類在データの円と重ならないものをサギ類の不在データとして解析を行った。目的変数はサギ類の在・不在とした。説明変数の選定には、変数相互の干渉を避けるため、説明変数間の相関係数が0.5以上の変数は同じモデルに入らないように変数を選んだ。さらに尤度比検定で $p=0.01$ を変数取捨の基準とする段階的変数減少法により変数選択を行い、あてはまりのよいモデルを求めた。

3 結果と考察

3.1 コロニー周辺のサギ類分布調査

ルートセンサスの結果、合計2,182個体のサギ類を確認した。確認したサギ類の種は、ダイサギ(*Ardea alba*)、チュウサギ(*Ardea intermedia*)、コサギ(*Egretta garzetta*)、アマサギ(*Bubulcus ibis*)、アオサギ(*Ardea cinerea*)、ゴイサギ(*Nycticorax nycticorax*)の6種であり(図4)、いずれも対象とした久喜市のコロニーで繁殖が確認されている種であった。

全確認個体の構成比を図5に示した。チュウサギが最も多く、ついでアマサギ、コサギ、ゴイサギ、ダイサギ、アオサギの順となった。このうち、チュウサギ、アマサギは本州では夏鳥であることが知られており、主に繁殖のために東南アジアやオセアニアから日本に渡来する種である。したがって、本調査域に生息するサギ類のうち、個体数では72.2%を渡り鳥である夏鳥が占めることが明らかとなった。また、チュウサギは環境省のレッドデータブックで準絶滅危惧(NT)に分類され、埼玉県のレッドデータブックではさらに絶滅が懸念されるカテゴリーである絶滅危惧II類(VU)に分類されているが、本調査域では最も主要な種であり、個体数も多いことが分かった。

ルートセンサスによるサギ類探索の際に記録したサギ類確認地点の土地利用の構成比を図6に示した。水田で確認した個体が最も多く50%以上を占め、ついで水路・河川、池沼、道、その他、畑地、樹上の順となった。水辺環境といえる水田、水路・河川、池沼に分布していた個体は全体の85.9%を占め、サギ類が水辺環境に依存した鳥類であることがあらためて確認された。また、水路・河川



図4 調査対象とした主なサギ類

や池沼の多くは、農業用水や農業用の溜池であり、水田も含めるとサギ類の多くは水田農業に関連する施設に強く依存し暮らしていることが明らかとなった。

確認したサギ類個体数の経時的な推移を図7に示した。各調査時期により確認個体数は大きく変動していた。最も確認個体数が多かったのは2006年9月の調査で全サギ種を合計すると673個体となった。一方、最も少なかったのは2006年12月の調査で、全確認個体数は14個体となり、両者には約50倍の開きがあった。また、同じ調査月でも年により確認個体数に大きな差があり、2006年9月の調査では合計673個体を確認したが、2009年9月の調査では431個体となり約1.5倍の差が認められた。季節による変動を見ると、各調査年とも、12月の確認個体数が最も少なく、9月あるいは7月の個体数が最も多かった。12月の個体数が少なかった要因としては、優占するチュウサギ、アマサギが夏鳥であり、冬季は越冬地である東南アジアやオセアニアに移動してしまったためだと考えられた。また、特に9月の個体数が多かったのは、9月には繁殖がほぼ終了し、その年に生まれた新たな個体が巣立ち、採餌等のためにコロニー周辺の水田などに飛来することによるのではないかと考えられた。

3.2 サギ類生息確率予測モデルの構築

サギ類の確認地点データを基に、自然環境保全基礎調査植生調査(第6・7回調査)による土地利用データ等を環境情報として用いロジスティック回帰分析を行った。

その結果、サギ類の生息確率を予測するロジスティック回帰モデルとして式(1)を得た。

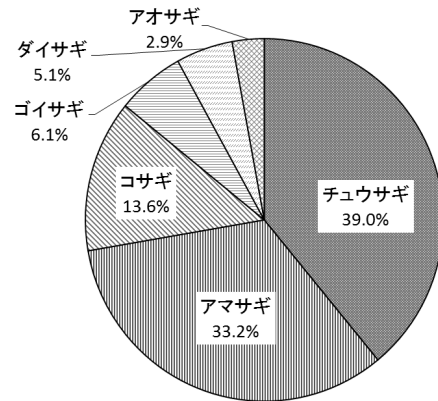


図5 確認したサギ類の種構成

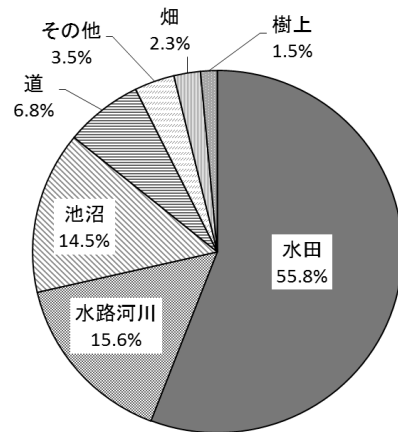


図6 サギ類確認地点の土地利用

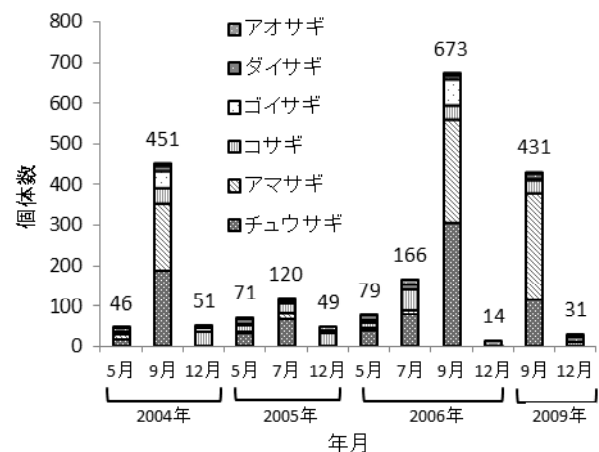


図7 確認したサギ類個体数の推移

$$p = \frac{e^{(10.729 X_1 + 5.240 X_2 - 2.851)}}{1 + e^{(10.729 X_1 + 5.240 X_2 - 2.851)}} \quad (1)$$

p : サギ類の生息確率
 X_1 : 解放水域率
 X_2 : 水田雑草群落率

表2 モデルの予測正答率

		予測値		正答率
		不在	在	
観測値	不在	319	132	70.7%
	在	74	734	90.8%
		全体		83.6%

このモデルでは、説明変数として、解放水域率と水田雑草群落率が選択され、サギ類の在・不在を有意(有意水準0.1%)な正確さで予測できた。選択された説明変数の偏回帰係数(X_1 の偏回帰係数:10.729、 X_2 の偏回帰係数:5.240)はいずれも正の値であり、解放水域率、水田雑草群落率が高いほど、すなわち水域や水田が多いほどサギの生息に適していると解釈することができた。また、得られたモデルにモデル作成に使用した観測データ及び不在データを代入し、 $p=0.5$ を境に在・不在を予測し実際の観測値と比較したところ、モデルの正答率は全体で83.6%と比較的高かった(表2)。

環境省植生図を半径100mの円内とほぼ同等の面積となるよう一辺180mの正方形に分割し算出した解放水域率及び水田雑草群落率を、式(1)のモデルに適用し、埼玉県東部地域におけるサギ類の生息確率を面的に示す地図を作成した(図8)。

4 おわりに

埼玉県は都市近郊に位置し市街化も進んだ地域であるが、現在も東部の低地を中心に多くの水田が広がっている。このような水田は単に食糧である米を生産する場としてだけでなく、様々な生物を育む場としての機能も有している⁹⁾。鳥類の中には水田やその周辺を採餌や繁殖の場として利用するものも多いが、特にサギ類は水田に強く依存していることが今回の調査からもあらためて明らかになった。また、分布と土地利用との関係を解析した結果、土地利用からサギ類の生息確率を予測する生息モデルが得られたが、得られたモデルもサギ類の生息環境として、水域や水田の存在がプラスの要因として極めて重要であるということを示していた。

このようにサギ類は水田農業に強く依存するいわば里地の代表的な鳥類ということが出来るが、必ずしも埼玉県

における生息環境は安泰とは言えない。水田の減少だけではなく、集団繁殖地が市街地に形成されることも多いことから、糞や鳴き声などにより周辺住民との間に軋轢が生じることもある。その様な困難な状況もあるが、今後も、サギ類だけに限らず、野生生物に関する様々な知見を蓄積し、人と野生生物が共存する道を探ることが求められている。

また、本稿で報告した生息モデルは、生息地の質や量の変化の把握や、開発や保全行為の影響予測の手段として利用できると考えられ、環境アセスメント等に寄与することが期待できる。

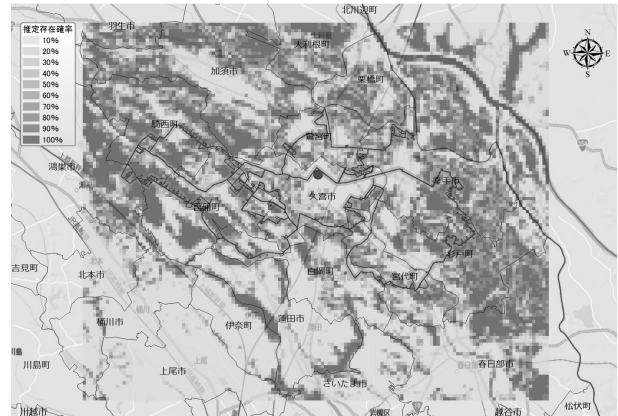


図8 埼玉県東部地域におけるサギ類生息確率の推定

文献

- 1) 農林水産省(2012)平成23年耕地及び作付面積統計, <http://www.maff.go.jp/j/tokei/>
- 2) 中西悟堂(1965)定本・野鳥記第7巻 平野と島の鳥, 春秋社.
- 3) 成末雅恵(1992)埼玉県におけるサギ類の集団繁殖地の変遷, *Strix*, 11, 189-209.
- 4) 埼玉県土地水政策課(2005)サギ類等生息条件調査報告書, <http://www.pref.saitama.lg.jp/uploaded/attachment/14735.pdf>
- 5) 嶋田知英(2004)埼玉県におけるサギ類コロニーの動向, *日本野鳥の会埼玉県支部報*しらこぼと, 237, 2-4.
- 6) 土光智子ら(2009)ロジスティック回帰モデルを用いた環境指標によるツキノワグマの生息確率予測モデル, *環境情報科学論文集*, 23, 107-112.
- 7) 橋本啓史ら(2004)京都市街地都市林におけるアオバズクの生息環境適合モデル, *ランドスケープ研究*, 67(5), 483-486.
- 8) 金井猛徳ら(2008)2種類の土地利用データにもとづく一般化線形モデルとGISによる野生生物の生息可能域の推定—大阪府域におけるアライグマの分布を比較して—, *農業情報研究*, 17(2), 77-85.
- 9) 日本学術会議(2001)地球環境・人間生活にかかわる農業及び森林の多面的な機能の評価について(答申), <http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/shimon-18-1.pdf>

[資料]

堂平山観測所における二酸化炭素高濃度事例解析について

武藤洋介

1 はじめに

埼玉県では、世界的に精度の統一されたWMO標準ガス¹⁾を基準として、堂平山(堂平山観測所)及び騎西(騎西観測所)の2地点でCO₂濃度の観測を継続している²⁾。堂平山は埼玉県西部の外秩父山地に位置し標高840m、周辺に主要なCO₂の発生源は無く、水平距離で約35km離れた騎西よりも年平均値で14ppm程度濃度が低い。ところが堂平山においても、移流によると思われるCO₂濃度の増加がしばしば観測されてきた。一方、堂平山におけるCO₂濃度は、毎年2ppm程度の割合で増加し、年間9ppm程度の振幅の季節変動を伴っている。そのため長期間の観測データを解析する場合は、一定の数値以上を高濃度とすることはできない。そこで、堂平山と騎西におけるCO₂濃度の差に着目し、堂平山における濃度が騎西よりも高くなった事例を中心に解析を行った。



図1 観測地点

2 解析方法

堂平山と騎西における2001年1月から2010年12月までのCO₂濃度の1時間平均値に対して、両地点の濃度を比較し特徴を調べた。ただし、両地点において1時間平均値を算出する際に用いた30秒平均値のデータ数が60個以上得られた場合をその時間の有効データとした。

3 結果

3.1 堂平山と騎西におけるCO₂濃度の関係

堂平山のCO₂濃度から騎西のCO₂濃度を差し引いた濃度差の頻度分布を図2に示した。堂平山のCO₂濃度が騎西よりも高くなった(濃度差が正となった)時間数は、全体の15.5%であった。

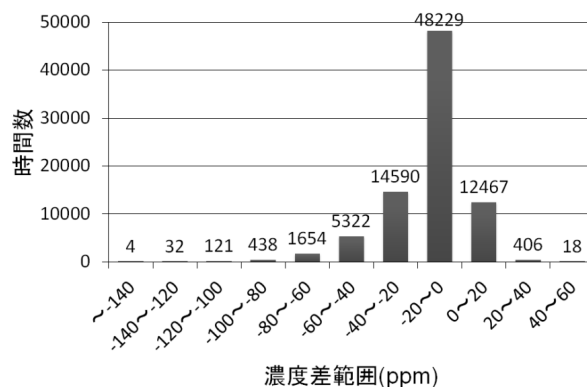


図2 堂平山と騎西のCO₂濃度差の頻度分布

3.2 堂平山が高濃度となった事例の解析結果

3.2.1 月別、時間帯別の時間数

堂平山が高濃度となった時間数を月別にまとめた結果を図3に示した。5月から9月の時間数は全体の67.3%であり、初夏から夏季にかけて時間数が増える傾向がみられた。次に時刻別にまとめた結果を図4に示した。12時から19時の時

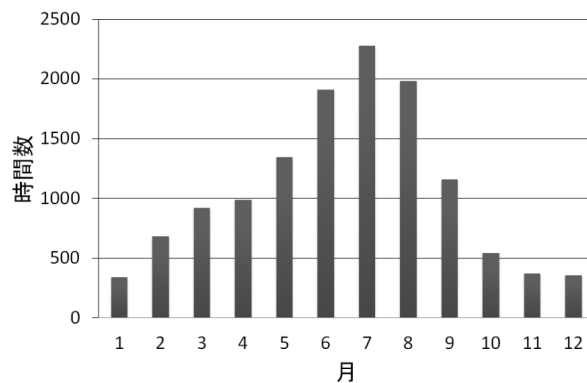


図3 堂平山が高濃度となった時間数(月別)

間数は全体の50.6%であり、午後の時間帯にかけて時間数が増える傾向がみられた。

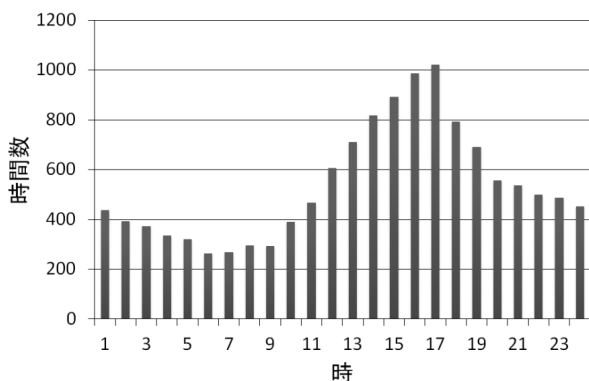


図4 堂平山が高濃度となった時間数(時刻別)

3.2.2 高濃度時の風向頻度

堂平山における高濃度時の風向頻度を図5に示した。風向別にみると東から東南東が62.0%、西から北西が21.6%、微風が9.9%、欠測が2.7%であった。観測所が南北方向の山の尾根に位置するため東または西からの風向が支配的になるが、CO₂排出源が多く存在する関東平野の方向から回りこむ風向頻度が多くなる傾向がみられた。

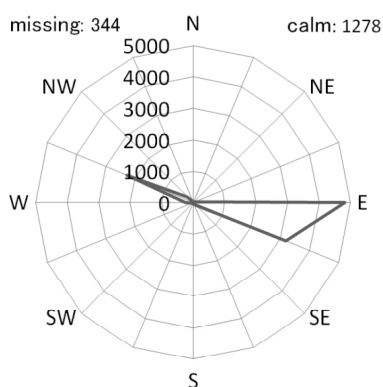


図5 堂平山における高濃度時の風向頻度

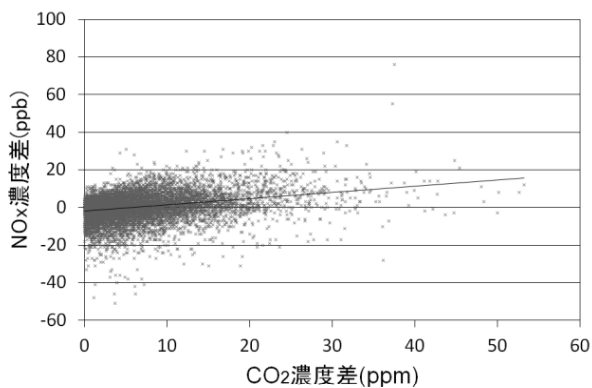


図6 CO₂の濃度差とNO_xの濃度差との関係

3.2.3 CO₂の濃度差とNO_xの濃度差との関係

堂平山と騎西のCO₂の濃度差とNO_xの濃度差との関係を図6に示した。CO₂の濃度差が大きくなるとNO_xの濃度差も同様に大きくなる傾向がみられた。

3.2.4 濃度差が大きくなった事例について

堂平山と騎西の濃度差が40ppm以上と比較的大きくなった全事例を表1に示した。特に、40ppm以上の濃度差が2時間以上継続した事例については、太字で記した。月別にみると、ほぼ7月と8月に集中していることが分かった。

表1 濃度差が40ppmを超えた事例(単位:ppm)

年	月	日	時	堂平山	騎西	濃度差
2002	07	03	11	428.41	388.25	40.16
2002	07	03	13	428.49	383.69	44.80
2002	07	06	09	427.70	382.95	44.75
2002	07	06	10	426.38	378.06	48.32
2002	07	06	11	424.92	374.81	50.11
2003	06	15	15	423.68	381.90	41.78
2003	08	08	09	420.75	377.04	43.71
2003	08	08	10	412.57	371.34	41.23
2005	09	01	19	432.93	380.34	52.59
2005	09	01	20	439.02	388.99	50.03
2006	07	08	18	430.99	382.97	48.02
2006	07	08	19	437.82	384.61	53.21
2006	07	25	08	441.72	398.92	42.80
2006	08	11	19	422.33	381.20	41.13
2009	08	14	19	430.36	384.95	45.41
2009	09	07	23	431.34	388.67	42.67
2010	08	03	05	438.07	395.89	42.18
2010	08	31	17	438.39	398.00	40.39

※太字は、2時間以上継続した事例

3.2.5 地上風向と流跡線の関係

表1に示した40ppm以上の濃度差が2時間以上継続した事例についてCO₂の排出源を推定するため、気象台や大気汚染常時監視測定局の風向・風速データを地図上に表示したものと、国立環境研究所のWeb METEX³⁾を利用して堂平山における流跡線の計算を行った結果から考察を行った。なお、Web METEXの計算には表2に示した条件を用いたが、堂平山の観測装置は地上20mの高さに試料空気採取口があるため、計算条件として860mの標高を用いた。

2002年7月6日(図7、図8)と2003年8月8日(図9、図10)の例では、地上風向と流跡線の両方で南から気塊が流入している様子が見られた。一方、2005年9月1日(図11、図12)と2006年7月8日(図13、図14)の例では、地上風向は南から南東であったが、流跡線は西から気塊が流入していることを示していた。地上風向と流跡線が一致しない理由としては、地上と上空で風向が異なっていることが考えられるが、この場合は、汚染がどの方角から移流したのか判断するのは困難であると考えられた。

表2 Web METEXの計算条件

経度	139.11°
緯度	36.00°
標高	860m
起点高度の参照点	海平面
トラジェクトリーの長さ	72時間
モデル	等温位法
モード	バックワード
データセット	NCEP Reanalysis

空気採取口と同じ地上20m高を起点とした流跡線の計算が可能になれば、さらに精度良く排出源を推定できると考えられた。

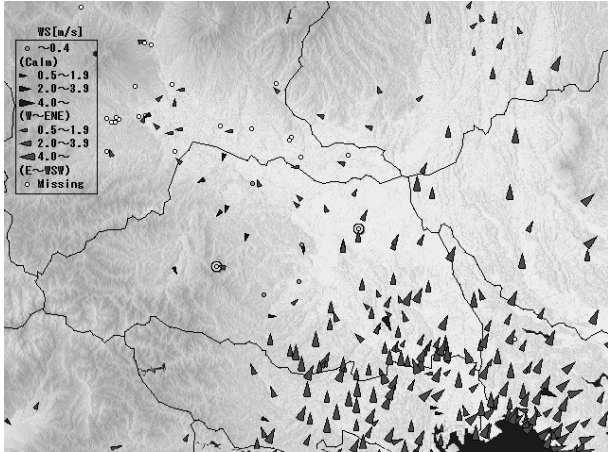


図7 2002年7月6日9時の地上風向

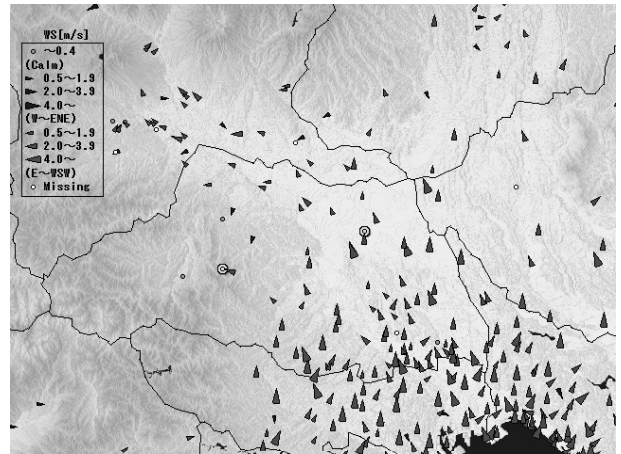


図9 2003年8月8日9時の地上風向



図8 2002年7月6日9時の後方流跡線



図10 2003年8月8日9時の後方流跡線

4 まとめ

堂平山と騎西のCO₂濃度の差を比較したところ、海陸風の影響により東京湾周辺からの地上風が卓越する夏季の午後の時間帯に、堂平山が高濃度となる事例が多くなる傾向がみられた。また、堂平山におけるCO₂高濃度事例から排出源を推定する解析を試みたが、山岳地域に測定局が少ないため十分な風向データが得られず、また地上風向と流跡線が一致しない場合もあり、この方法で排出源を推定することは困難であった。今後、平野部においても、観測装置の試料

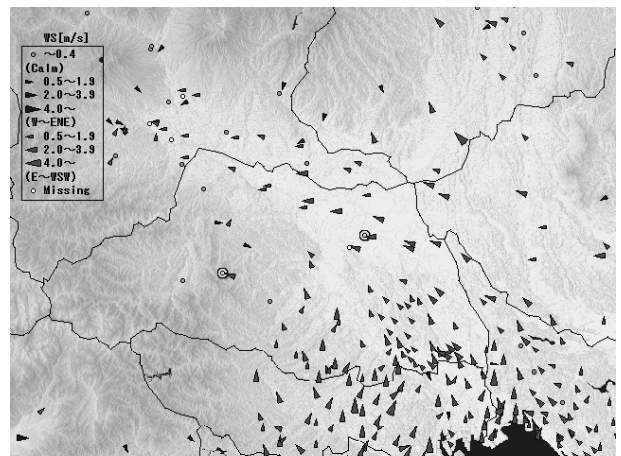


図11 2005年9月1日19時の地上風向

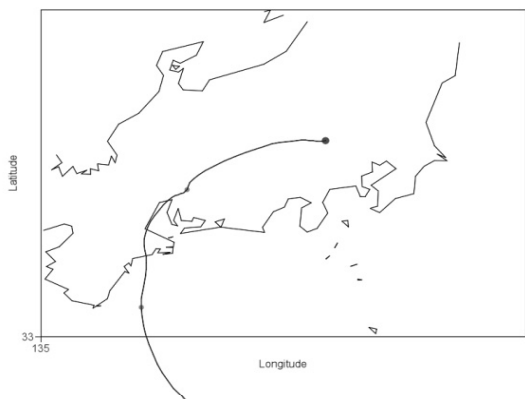


図12 2005年9月1日19時の後方流跡線

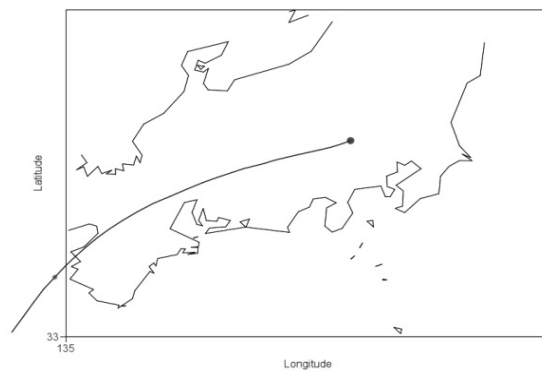


図14 2006年7月8日18時の後方流跡線

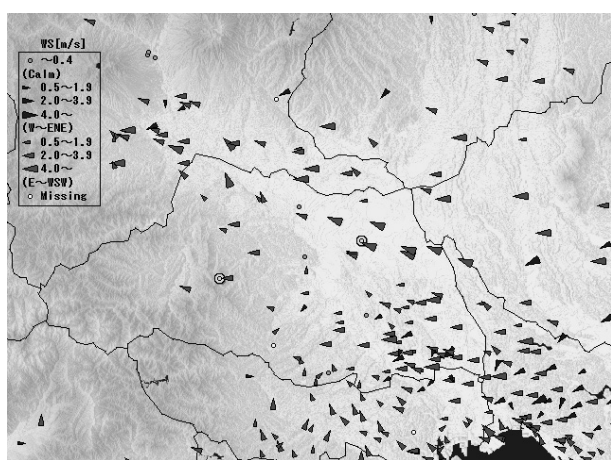


図13 2006年7月8日18時の地上風向

文 献

- 1) WMO(2007)WMO全球大気監視(GAW)戦略計画:2008-2015, GAW報告書, No.172.
- 2) 武藤洋介, 梅沢夏実(2003)埼玉県における二酸化炭素濃度の推移, 埼玉県環境科学国際センター報, 3, 124-129.
- 3) Web METEX.
(<http://db.cger.nies.go.jp/metex/web-metex.jp.html>)

[資料]

大気中のガス状および粒子状水溶性無機成分濃度の夏期調査

松本利恵 米持真一 梅沢夏実

1 はじめに

埼玉県では、近年、大気中のHNO₃ガス、NO₃⁻粒子が全国平均に比べ高濃度で観測されている(以下、ガス状物質は(g)、粒子状物質は(p)を添えて示す。)。たとえば、全国環境研協議会酸性雨部会の調査¹⁾によれば、埼玉県環境科学国際センター(現加須市。本報告では、調査当時の地名を用いて、騎西という。)における大気中HNO₃(g)の2003～2005年度3年間の平均濃度が全国最高である51.8(全国平均値20.8)nmol/m³、NO₃⁻(p)濃度が二番目に高い64.7(同31.0)nmol/m³と高濃度で観測された。特にHNO₃(g)は、3年とも騎西で年平均濃度の全国最高値が記録された。

埼玉県は光化学オキシダント(Ox)の環境基準非達成状況が長く継続しており、県別に見た光化学スモッグ注意報の発令日数は全国でも常に上位となっている。このことから、埼玉県は、光化学反応の影響が大きい地域であると考えられる。

光化学オキシダントや二次生成物質の濃度は、直接的な原因物質であるNO_xや炭化水素類等の排出量に寄るだけでなく、大気中で生じる光化学反応過程の影響を受ける。そのため、本研究では二次生成物質でもあるHNO₃(g)等の濃度上昇に着目した。二次生成を検討する際に、その要素となる物質の挙動を把握し、高濃度を生じる原因や埼玉県の地域特性を明らかにするために、光化学反応の盛んな夏期に粒子状及びガス状の水溶性無機成分濃度を調査した。

2 調査方法

水溶性無機成分濃度の測定は、フィルターパック法(FP法)²⁾により騎西(図1)において実施した。調査は、表1の期間に、0:00、6:00、12:00、18:00を区切りとする6時間単位で試料採取して実施した。

FP法の捕集用フィルターとして、1段目(F0)にPTFE(polytetrafluoroethylene)ろ紙(ADVANTEC社製、T080A047A、孔径0.8μm、直径47mmφ)、2段目(F1)にポリアミドろ紙(PALL社製、Nylasorb、孔径0.45μm、直径47mmφ)、3段目(F2)と4段目(F3)にセルロース製ろ紙(ADVANTEC社

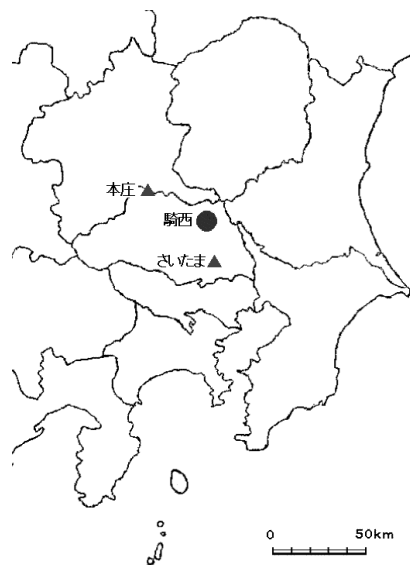


図1 調査地点

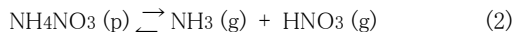
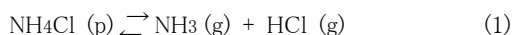
表1 調査実施期間

年	日時
2004年	7月26日12:00～7月30日18:00
	8月2日12:00～8月6日18:00
2005年	7月20日18:00～7月23日12:00
	7月28日18:00～7月30日12:00
	8月3日18:00～8月5日12:00
2006年	7月31日12:00～8月5日18:00
	8月7日12:00～8月9日12:00

製、No.51A、直径47mmφ)を6%K₂CO₃+2%グリセリン混合水溶液、5%H₃PO₄+2%グリセリン混合水溶液にそれぞれ含浸させたのち、ろ紙(ADVANTEC社製、No.590)にはさんで余分な水分を取り除いたものを用いた。F0で粒子状物質(SO₄²⁻(p)、NO₃⁻(p)、Cl⁻(p)、NH₄⁺(p)、Na⁺(p)、K⁺(p)、Ca²⁺(p)、Mg²⁺(p))を、F1からF3でガス状物質(SO₂(g)、HNO₃(g)、HCl(g)、NH₃(g))を捕集した。これら捕集物について、F0、F1、F3ろ紙は純水、F2ろ紙は0.3%(v/v)H₂O₂水溶液で20分間超音波処理により抽出を行い、イオンクロマトグラフ法によ

り測定した。NH₃(g)の捕集量は、F1とF3の合計とした。なお、F0で採取した粒子は、粒径による分級を行なわなかった。

NH₄ClとNH₄NO₃については、気温に依存した次の平衡反応がよく知られている^{3,4)}。



FP法においては夏季の高温・低湿時にはフィルター上に捕集された粒子中のNH₄Cl(p)とNH₄NO₃(p)が揮発し、後段のろ紙にガス状物質として捕集されるため、粒子状・ガス状物質の総和は変わらないが、ガス状物質の比率が実際より大きく測定されるといわれている。しかし、本報告では上記反応を考慮した補正は行わずに、粒子状・ガス状物質濃度は測定値をそのまま解析に用いた。

Ox、浮遊状粒子状物質(SPM)、二酸化窒素(NO₂)、一酸化窒素(NO)濃度、風向、風速、温度、湿度、全日射量は、騎西と同じ敷地内に存在する環境科学国際C大気汚染常時監視測定局、非メタン炭化水素(NMHC)濃度は、騎西から南西方向約4kmに位置する鴻巣測定局の測定結果を用いた。また、考察には、さいたま市(さいたま)の衛生研究所測定局(Ox, NO₂)及びさいたま市役所測定局(NMHC)、本庄市(本庄)の本庄測定局の測定結果⁵⁾も用いた(図1)。

3 結果および考察

3.1 Ox濃度とTNO₃濃度の関係

HNO₃(g)とNO₃⁻(p)の合計を総硝酸(TNO₃)とし、TNO₃濃度とFP法の採取時間に対応する6時間の平均Ox濃度の推移を図2に示す。TNO₃濃度は、粒子状物質も含むが、すべてガス状と仮定して、ppb単位に換算した。結果は、測定を行った6時間の中央の時刻にプロットした。Ox濃度はおおむね2004年は低濃度、2005年、2006年は高濃度となる日が多かった。Ox濃度が80ppbを超えた高濃度日の日最高1時間値はすべて12:00-18:00の時間帯で観測された。TNO₃とOxはピークの時刻がずれることはあるものの、おおむねよく似た推移を示し、光化学反応により生成していると考えられた。

3.2 排出量削減に対するOx濃度の感度の推定

NO_x、VOC排出削減に対する大気中Ox濃度の感度を、井上ら⁶⁾はOx/TNO₃実測濃度比を用いて推定している。そして、Ox濃度80ppb以上のデータを対象とし、VOC排出量の削減で減少するが、NO_x排出量の削減ではほとんど減少しない、または、逆に増加する状態(VOC-sensitive)、NO_x排出量の削減で減少するが、VOC排出量の削減ではほとんど減少しない状態(NO_x-sensitive)を推定する閾値をそれぞれ8.6(以下)、9.0(以上)としている。

そこで、最も光化学反応が盛んになると考えられる昼間午後後に相当する12:00-18:00のデータについて、Ox平均濃度と

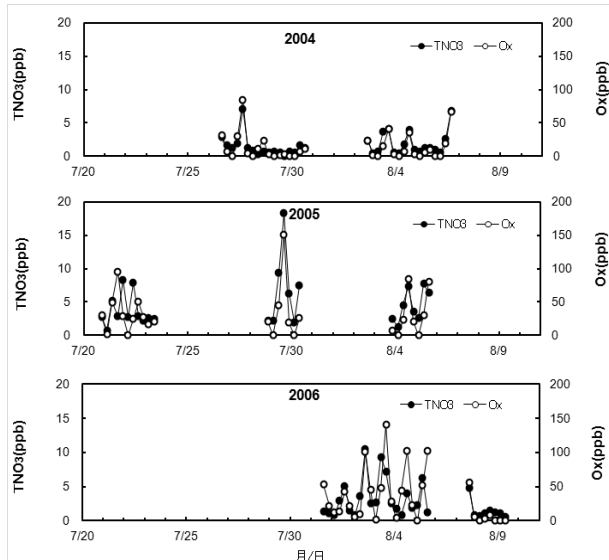


図2 TNO₃濃度とOx濃度の推移

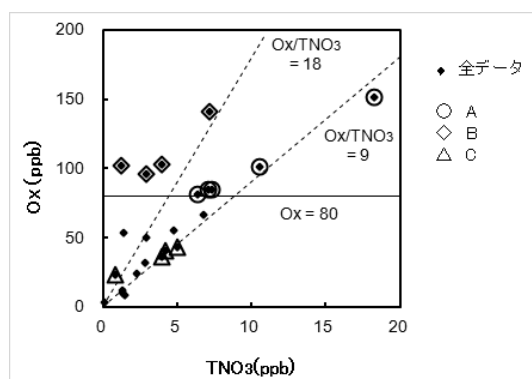


図3 TNO₃濃度とOx濃度の関係 (12:00-18:00)

TNO₃濃度の関係を図3に示す。TNO₃濃度は、粒子状物質も含むが、すべてガス状と仮定して、ppb単位に換算した。

Ox濃度80ppb以上で、VOC-sensitiveと推定されたのは、Ox/TNO₃が8.3となった2005/7/29のみであり、他の日はすべてNO_x-sensitiveと推定された。

3.3 昼間午後のOx/TNO₃濃度比の違いによる検討

3.3.1 区分分け

図3をみると、Ox濃度80ppb以上では、Ox/TNO₃がNO_x-sensitiveの閾値(9.0)のラインに近いグループと、同程度のOx濃度時にTNO₃濃度が低く、Ox/TNO₃が閾値の2倍である18を超えるグループに大別される。そこで、それぞれを区分A、区分Bとし、さらに、Ox濃度80ppb未満の日から、6:00-12:00(午前)、12:00-18:00(午後)のFP法による測定データが揃っている数日を区分Cとして抽出し比較を行った。対象とした日は、

区分A: 2004/7/27, 2005/7/29, 2005/8/4, 2005/8/5, 2005/8/2

区分B:2005/7/21、2006/8/3、2006/8/4、
2006/8/5

区分C:2004/7/28、2004/8/3、2004/8/4、
2006/8/1

である。2005/7/29は、VOC-sensitiveの閾値をOx/TNO₃が下回っていたが、数値が近いため区分Aに加えた。

A、B、C各区分の成分濃度等の平均値を、午前、午後の2つの採取時間別に求めて表2に示す。

Ox濃度は区分Aが28から100ppb、区分Bは48から110ppbとともに午後に上昇したが、光化学反応による二次生成物質と考えられるHNO₃(g)、NO₃⁻(p)、SO₄²⁻(p)、NH₄⁺(p)は、区分Aではそれぞれ160から340、59から66、80から140、130から240nmol/m³と濃度が午後に上昇したのに対し、区分Bではそれぞれ170から130、50から29、66から58、120から97nmol/m³と低下した。このため、区分BではOx濃度とTNO₃濃度のピーク時刻のずれが生じている。

SPM濃度は区分Aが43から62μg/m³、区分Bは63から61μg/m³となり、区分Bは午前から高濃度となっていた。区分Cは、これらの項目について区分A、Bに比べて低濃度であったが、SO₄²⁻(p)を除いて午後に濃度が上昇した。

SO₂(g)濃度は、区分A<区分Bであり、ともに午後に上昇した。区分Cは午前中に170nmol/m³と最も高い濃度となり、午後に低下した。NH₃(p)濃度は、区分A<区分Bであり、ともに午後に低下した。区分Cは、区分A、Bに比べて低濃度であり、午後に濃度が低下した。

風速、温度、湿度、全日射量は、区分A、Bで大きな差はみられず、風速、温度は午後に上昇した。区分Cは、区分A、Bに比べて風速が大きく、全日射量がやや少なかった。

3.3.2 海風の影響

騎西における昼間6:00-18:00の風向出現率を、各区分ごとに図4に示す。区分Aは東よりの風、区分Bは南よりの風の出現頻度が高く、区分Cは東から南よりの風であった。風向をみると、夏季の海風による汚染物質の内陸部への輸送が推察できる。

しかし、海塩の指標であるNa⁺(p)の濃度は、区分A、Cに比べて区分Bは低く、特に午後に低濃度となった。したがって、午前午後ともに高濃度となった区分A、Cは海風の流入があったが、区分Bは南よりの風ではあるものの海からの流入は少ないと推察された。

Na⁺(p)とCl⁻(p)の関係をみると、Na⁺(p)を100%海塩由来と仮定した場合、海水1kg中のイオン量の文献値⁷⁾ Cl⁻ 535mmol、Na⁺ 455mmolから求めたCl⁻(p)/Na⁺(p)濃度比1.18と比べて、Cl⁻(p)濃度が少なくなる場合が多かった。

表2 各区分ごとの採取時間別平均値

		A		B		C	
		6:00	12:00	6:00	12:00	6:00	12:00
		-12:00	-18:00	-12:00	-18:00	-12:00	-18:00
HNO ₃ (g)	(nmol/m ³)	160	340	170	130	49	82
HCl(g)	(nmol/m ³)	110	110	95	65	120	96
SO ₂ (g)	(nmol/m ³)	110	130	130	160	170	69
NH ₃ (g)	(nmol/m ³)	440	380	640	440	260	180
SO ₄ ²⁻ (p)	(nmol/m ³)	80	140	66	58	39	38
NO ₃ ⁻ (p)	(nmol/m ³)	59	66	50	29	42	60
Cl ⁻ (p)	(nmol/m ³)	8	11	12	5	29	20
Na ⁺ (p)	(nmol/m ³)	38	34	19	9	50	48
NH ₄ ⁺ (p)	(nmol/m ³)	130	240	120	97	59	64
K ⁺ (p)	(nmol/m ³)	9	8	15	3	6	6
Mg ²⁺ (p)	(nmol/m ³)	8	9	9	5	12	11
Ca ²⁺ (p)	(nmol/m ³)	14	17	18	12	6	7
Ox	(ppb)	28	100	48	110	12	36
SPM	(μg/m ³)	43	62	63	61	23	29
NO	(ppb)	10	0	7	0	9	0
NO ₂	(ppb)	21	14	27	13	16	10
NMHC	(ppmC)	0.31	0.30	0.34	0.33	0.41	0.39
風速	(m/s)	1.2	2.7	1.3	3.0	1.8	3.9
温度	(°C)	28	31	28	32	26	29
湿度	(%)	67	53	65	48	64	55
全日射量	(MJ/m ²)	1.9	1.9	2.0	1.8	1.6	1.5

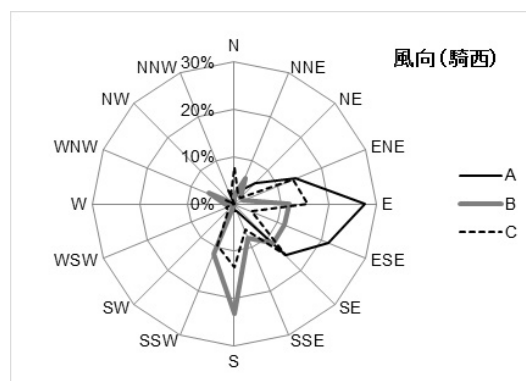


図4 風向出現率(騎西、6:00-18:00)

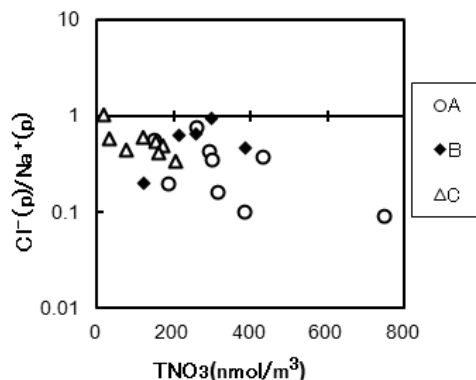
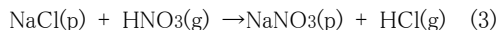


図5 TNO₃濃度とCl⁻(p)/Na⁺(p)濃度比の関係

各区分の午前、午後の個々のデータについてTNO₃濃度とCl⁻(p)/Na⁺(p)濃度比の関係を図5に示す。TNO₃濃度が増加するほど、Cl⁻(p)/Na⁺(p)濃度比が低下する傾向がみられた。

HNO₃(g)が海塩と反応するクロリンロスといわれる次の反応が知られている⁴⁾。



したがってHNO₃(g)濃度上昇時は、反応式(3)のクロリンロスが生じていたと考えられる。

3.3.3 粒子状成分

各区分の粒子状成分の組成の特徴について検討した。各区分の午前、午後の個々のデータについて、当量濃度に換算し、粒子状総アニオン濃度と総カチオン濃度の関係を図6に、総アニオン濃度とSO₄²⁻(p)濃度の関係を図7に、SO₄²⁻(p)濃度とNH₄⁺(p)濃度の関係を図8に示す。

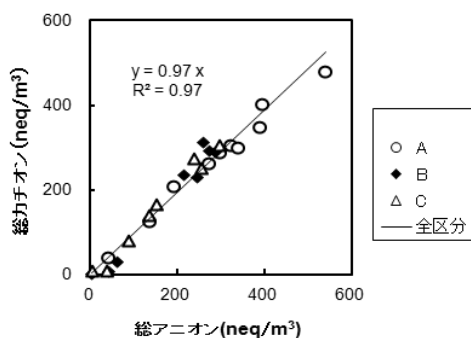


図6 粒子状総アニオン濃度と総カチオン濃度の関係

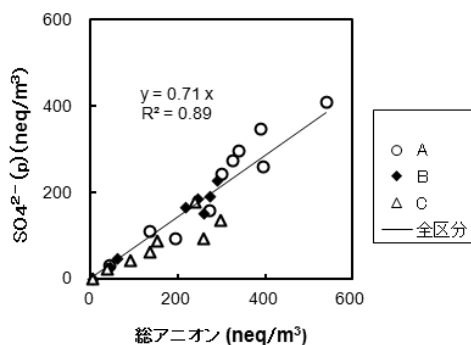


図7 粒子状総アニオン濃度とSO₄²⁻(p)濃度の関係

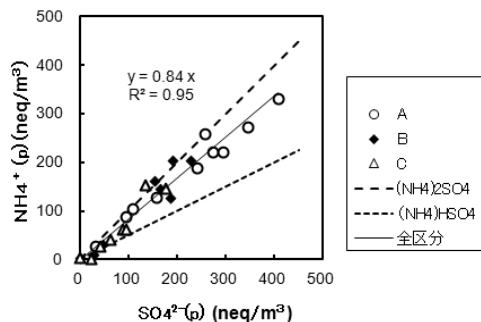


図8 SO₄²⁻(p)とNH₄⁺(p)の関係

粒子状総アニオン濃度と総カチオン濃度を比較すると、全区分の傾きは0.97となりおおむね1:1の関係となった。粒子状水溶性無機イオン成分濃度の総量は、おおむね区分A>区分B>区分Cとなり、区分BではHNO₃(g)濃度と同様、Ox濃度が上昇しても、粒子状水溶性無機イオン成分濃度は区分Aほど上昇しなかった。

粒子状総アニオン濃度に占めるSO₄²⁻(p)濃度の割合は約70%で、区分AはSO₄²⁻(p)濃度が高く、総アニオンに占める比率もやや高くなった。あまり光化学反応が生じていない区分Cはその逆の傾向となった。

SO₄²⁻(p)濃度とNH₄⁺(p)濃度の関係をみると、おおむね(NH₄)₂SO₄相当の比率(1:1)と(NH₄)HSO₄相当の比率(1:2)の間にあり、NH₄⁺(p)はSO₄²⁻(p)の中和相当量程度が存在していた。

3.3.4 Ox、NO₂、NMHC濃度の経時推移

騎西、県南部のさいたま、県北部の本庄のOx、NO₂、NMHC濃度について各区分ごとに時刻の平均値を求め、A、B、C各区分のOx高濃度日の経時推移を比較した(図9)。

Ox濃度は、騎西、本庄では区分Aと区分Bで最高濃度がほぼ同じレベルにおよんでいたが、さいたまでは区分Aは区分Bほど濃度が上昇しなかった。区分Aは、騎西では15:00、本庄では17:00に最高濃度になった。騎西の区分Bは、12:00-16:00に最高濃度に近いレベルで推移した。

NO₂濃度は、Ox濃度上昇前の夜間から朝方にかけて区分B>区分A>区分Cであり、特に騎西において、1:00-9:00は区分A、区分Bの濃度差が明確であった。その後、濃度差は小さくなり、さいたまは13:00-22:00に区分A>区分Bで推移した。騎西は、14:00-15:00にやや区分A>区分Bとなったが、それ以降はおおむね濃度差は小さかった。本庄は、5:00以降、区分Aと区分Bの濃度差は小さかった。区分Cは、全地点で区分A、区分Bより低濃度で推移したが、さいたまは13:00-14:00、騎西は11:00-15:00、本庄は12:00-13:00に区分Bと濃度差が小さくなった。

NMHC濃度は、さいたまでは区分Aと区分Bに大きな差はみられず、区分Cは区分Aと区分Bに比べて低濃度で推移した。騎西では、おおむね区分C>区分A>区分Bで推移した。他成分では低濃度であることの多い区分Cより低いことから、区分Aと区分Bは、光化学反応による消費のため低濃度となった可能性がある。区分Aと区分Bは、1:00-8:00は同様な推移をしていたが、9:00以降は区分A>区分Bとなり濃度差が生じた。本庄では、各区分ともに9:00-14:00頃に濃度が上昇した。

騎西においては、区分Bは区分Aに比べて、Ox濃度上昇前にNO₂が高濃度、Ox濃度上昇中はNMHCが低濃度となっていたことから、区分Aと比べてOx/TNO₃が大きい、よりNOx-sensitiveな状態になっていたと考えられる。

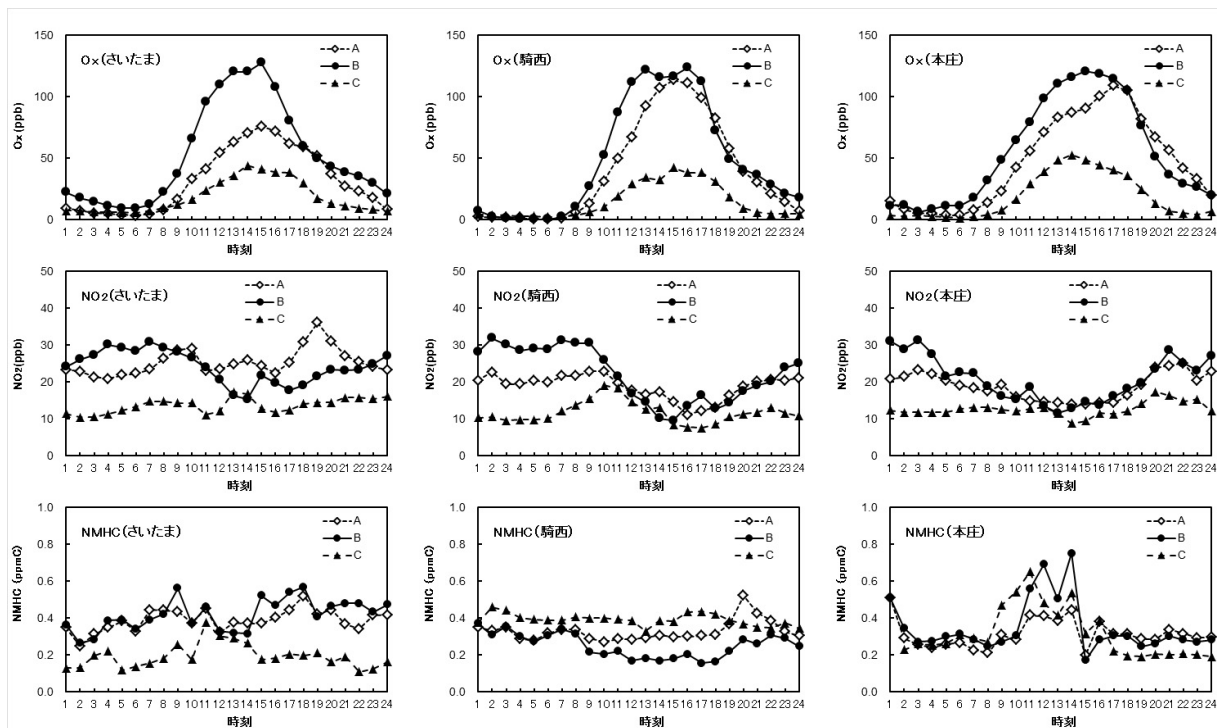


図9 さいたま、騎西、本庄における各区分のO_x、NO₂、NMHC濃度の経時推移

4 まとめ

二次生成を検討する際に、その要素となる物質の挙動を把握し、高濃度を生じる原因や埼玉県の地域特性を明らかにするために、光化学反応の盛んな夏期に粒子状及びガス状の水溶性無機成分濃度を調査した。

O_x濃度及びO_x/TNO₃濃度比の違いにより3区分に分け、光化学反応が盛んな昼間の状況について検討を行った。騎西における、各区分の状況は以下のとおりであった。

(1)区分A

O_x濃度は80ppb以上、午後に最高濃度観測。

O_x/TNO₃は、NO_x-sensitiveの閾値(9.0以上)に近い。

東寄りの風、海塩の影響有。

HNO₃(g)、NO₃⁻(p)、SO₄²⁻(p)、NH₄⁺(p)は、午後に濃度上昇、高濃度。

(2)区分B

O_x濃度は80ppb以上、午後に最高濃度観測。

O_x/TNO₃ > 18 (NO_x-sensitive)。

南よりの風、海塩の影響は少ない。

HNO₃(g)、NO₃⁻(p)、SO₄²⁻(p)、NH₄⁺(p)は、午後に濃度低下。

区分Aに比べて、O_x濃度上昇前にNO₂が高濃度、O_x濃度上昇中はNMHCが低濃度となっていた。

(3)区分C

O_xは80ppb未満、午後に最高濃度観測

東から南よりの風、海塩の影響有

HNO₃(g)、NO₃⁻(p)、SO₄²⁻(p)、NH₄⁺(p)は、低濃度。

本報告においては、VOCはNMHCを用いて解析を実施したが、今後、VOCの詳細な組成との関係についての検討が必要である。

文献

- 1) 全国環境研協議会(2007)第4次酸性雨全国調査報告書(平成17年度), 全国環境研会誌, 32, 78-152.
- 2) EANET(2003)Technical document for filter pack method in East Asia. (http://www.eanet.cc/product/techdoc_fp.pdf)
- 3) 環境庁大気保全局大気規制課監修, 浮遊粒子状物質対策検討会著(1997)浮遊粒子状物質汚染予測マニュアル, 東洋館出版社, 232-236.
- 4) Seinfeld, J. H. and Pandis, S. N.(1998)Atmospheric Chemistry and Physics. Wiley, New York, 491-544.
- 5) 埼玉県大気汚染常時監視システム(<http://www.taiki-kansi.pref.saitama.lg.jp/kankyo/main>)
- 6) 井上和也, 吉門洋, 東野晴行(2010)関東地方における夏季地表オゾン濃度のNO_x, VOC排出量に対する感度の地理分布 第II報 光化学指標の実測に基づく推定, 大気環境学会誌, 45, 195-204.
- 7) 環境庁大気保全局大気規制課監修, 酸性雨調査法研究会編(1993)酸性雨調査法, ぎょうせい, 267-268.

[資料]

絶滅危惧魚類ムサシトミヨのミトコンドリアDNAマーカの作製とその生息地への適用

三輪誠 金澤光

1 はじめに

ムサシトミヨ(図1)は、埼玉県が発行する「レッドデータブック」で、ごく近い将来において野生絶滅の危険性が極めて高い種(絶滅危惧IA類)としてリストアップされており、また環境省が発行するそれでも絶滅危惧IA類に指定されている絶滅危惧魚類である。現在、ムサシトミヨは、熊谷市にある元荒川源流域の約2km程度の限られた範囲でしか生息が確認されていない。



図1 絶滅危惧魚類ムサシトミヨ

埼玉県では、平成3年にムサシトミヨを「県の魚」として指定するとともに、熊谷市にあるムサシトミヨ生息地が世界唯一の生息地であることから、その一部を「県の天然記念物」として指定した(図2)。また、埼玉県は、平成12年に、「埼玉県希少野生動植物の種の保護に関する条例」に基づいて、ムサシトミヨを「県内希少野生動植物種」のひとつとして指定し、重点的に保護する方針を示した。最近では、平成23年に、ム



図2 県指定の天然記念物「元荒川ムサシトミヨ生息地」

サシトミヨが「熊谷市の魚」に選定され、その希少さと保護の大切さがさらに強調されるかたちとなった。

これらのことから、県は、ムサシトミヨに対して様々な保全策を講じてきた。そのための基礎的情報のひとつとして、生息地におけるムサシトミヨの遺伝的多様性の現状把握は不可欠である。しかしながら、現在まで、その把握手法に関する情報は少ない¹⁾。

そこで、本研究では、ムサシトミヨ生息地における母系統の多様性解析を目的とし、ミトコンドリアDNAマーカの作製を試みた。ミトコンドリアDNAは、母親の遺伝情報を受け継ぐことが知られており、そのマーカは、母系統の多様性解析に一般的に利用されている。ここでは、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法により増幅したミトコンドリアDNAを制限酵素で切断し、その断片の長さの個体間比較から多様性に関する知見を得るPCR-RFLP法 (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism法) に基づいて、ミトコンドリアDNAマーカを作製するとともに、それらを生息地における母系統の多様性解析に適用することを目指した。

2 材料と方法

2.1 ムサシトミヨのサンプル採取

ムサシトミヨのミトコンドリアDNAマーカを作製するために、熊谷市ムサシトミヨ保護センター内で人工飼育しているムサシトミヨ(数個体)からヒレ組織の一部を採取し、サンプルとした。

また、作製したミトコンドリアDNAマーカを生息地の個体に適用するために、平成18年1月から2月にかけて実施されたムサシトミヨ生息地における個体数調査の際、取り上げたムサシトミヨからヒレ組織の一部を採取し、サンプルとした。なお、この個体数調査において、ヒレ組織の一部を採取したムサシトミヨは、取り上げた生息地に再放流した。今回サンプルとしたヒレ組織は、図3に示した県指定天然記念物区域の水路(以降、A区)、埼玉中央漁協排水路(以降、B区)および久下橋付近の元荒川(以降、C区)の3区域で採取したもので、それぞれの区域から、9個体、6個体および4個体分のサ

ンプルを採取した。

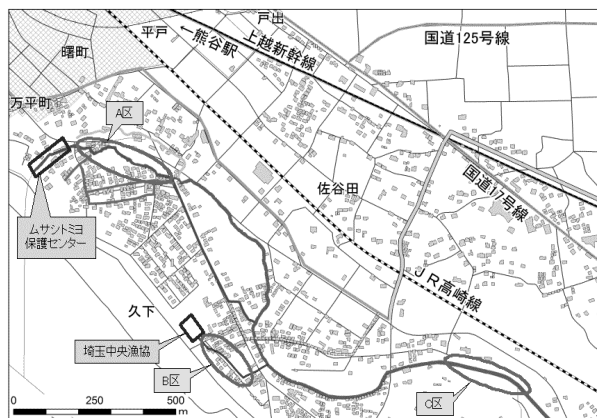


図3 ムサシトミヨのヒレ組織を採取した区域

採取したヒレ組織のサンプルは、1.5mL容のサンプリングチューブに入れ、保冷して研究室に持ち帰り、フリーザー(-30℃)で使用時まで保存した。

2.2 ヒレ組織からのDNA抽出

ムサシトミヨのヒレ組織が入った1.5mL容サンプリングチューブに、DNA抽出溶液(10mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA (pH8.0)、150mM NaCl、0.1% SDS; 300μL)を注入し、タンパク質分解酵素(プロテナーゼK)を約0.1μg/μLとなるように添加した。37℃で一晩インキュベートした後、チューブの底に沈殿する残渣を、専用破砕器(ベッスル)ですりつぶした。

DNA抽出溶液(400μL)をチューブに追加し、サンプル溶液と同量のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1, v/v)を加えて攪拌した。この溶液を、15000rpmで5分間遠心分離し、上清(抽出されたDNA溶液)を別の2.0mL容マイクロチューブに移した。なお、ここで行ったクロロホルム:イソアミルアルコール抽出をさらに2回繰り返した。

抽出されたDNA溶液に、その1/10倍量の3M酢酸ナトリウムを加え、さらにこの混合溶液と同量の2-プロパノールを加えるとともに、穏やかに攪拌し、10分間氷上に静置した。析出したDNAを回収するために、6000rpmで10分間遠心分離した。沈殿として回収されたDNAに70%エタノール(500μL)を加え、15000rpmで5分間遠心分離することにより、DNAを洗浄した。

洗浄したDNAを真空デシケーターで乾燥させた後、滅菌水(50μL)を加えてDNAを溶解させた。このDNA溶液の濃度を分光光度計で測定し、DNAサンプル溶液として、フリーザー(-30℃)で使用時まで保存した。

2.3 ミトコンドリアDNAの増幅

DNAをPCRで増幅するためには、対象となるDNA領域を挟むプライマー(核酸の断片)のペアを選定する必要がある。すなわち、PCR法では、ペアとなるプライマーで挟まれた

DNA領域が増幅されることになる。本研究では、表1に示した汎用として知られるユニバーサルプライマー¹⁻³⁾の3種類のペア(Primer Pair 1、Primer Pair 2およびPrimer Pair 3)を用いて、ミトコンドリアDNAのD-Loop領域(2ヶ所)およびチトクロームb遺伝子領域(1ヶ所)をPCRで増幅した。なお、D-Loop領域は、ミトコンドリアDNAの遺伝子をコードしない領域であるため、変異が長期にわたって蓄積・保存され、後代に伝わる可能性が高いことが知られている。一方、チトクロームb遺伝子領域は、タンパク質をコードする遺伝子であり、D-Loop領域ほど大きな変異は認められないものの、母系統解析には一般的に用いられる遺伝子領域である。また、ユニバーサルプライマーは、多くの動物種において塩基配列が保存されている領域で作製されたプライマーであるため、各種動物で共通して使用できることが知られている。

表1 ミトコンドリアDNAの3つの領域を増幅するために用いられたユニバーサルプライマーのペア

	領域	プライマー名	塩基配列(5'→3')
Primer Pair 1	D-Loop	L-CB3R ¹⁾	CATATTAACCCGAATGATATT
		H-125SAR ¹⁾	ATAGTGGGTATCTAATCCAGTT
Primer Pair 2	CytB	L-14724 ²⁾	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
		H-15149 ^{2),3)}	AAACTGCAGCCCTCAGAATGATATTTGCTCA
Primer Pair 3	D-Loop	L-15926 ^{2),3)}	TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAAACC
		H-16498 ²⁾	CCTGAAGTAGGAACCCAGATG

1, 梅沢 (2002); 2, Meyer *et al.* (1990); 3, Kocher *et al.* (1989)

ミトコンドリアDNAの3つの領域をPCRで増幅するにあたり、AmpliTaq Gold & 10×PCR Buffer with dNTP kit(アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いて、1×PCR Buffer、0.2mM dNTP Mixture、0.025U/μL AmpliTaq Gold、0.2μMの各プライマーおよびヒレ組織から抽出した1ng/μLの鋳型DNAを含むPCR反応液を調整した。このPCR反応液を、PCRサーマルサイクラー(タカラバイオ社製、TP400型)を用いて、表2に示したプライマーのペア毎に設定されたPCR反応サイクルで反応させた。PCR反応後の溶液は、アガロースゲルを用いて電気泳動し、バンドパターンを確認した。

表2 プライマーのペア毎に設定されたPCR反応サイクル

Primer Pair 1		Primer Pair 2		Primer Pair 3	
・94℃×8分	1サイクル	・94℃×8分	1サイクル	・94℃×8分	1サイクル
・94℃×1分	38サイクル	・94℃×1分	38サイクル	・94℃×1分	45サイクル
・44℃×1分		・50℃×1分		・53℃×1分	
・72℃×2分	1サイクル	・72℃×2分	1サイクル	・72℃×2分	1サイクル
・72℃×8分		・72℃×8分		・72℃×8分	

2.4 増幅されたミトコンドリアDNAの制限酵素処理

Primer Pair 1、Primer Pair 2およびPrimer Pair 3を用いてPCRで増幅させたミトコンドリアDNAを、8種類の制限酵素(Msp I、Hae III、Alu I、Afa I、Hha I、Hinf I、Ssp I、Taq I)(いずれもタカラバイオ社製)で処理した。なお、制限酵素とは、特定の塩基配列を認識してDNAを切断する酵素であ

る。制限酵素処理の反応液は、増幅されたミトコンドリアDNAが含まれるPCR反応液(5 μ L)と制限酵素(0.5 μ L)を用い、全量が10 μ Lとなるように、製品に添付されたマニュアルに従って調整した。この反応液を、Taq Iを用いる時は65 $^{\circ}$ Cで2時間、その他の制限酵素を用いる時は37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートし、ミトコンドリアDNAを切断した。反応後の溶液は、アガロースゲルを用いて電気泳動し、バンドパターンを確認した。

3 結果と考察

3.1 ミトコンドリアDNAマーカーの作製

人工飼育したムサシトミヨのヒレ組織から抽出したDNAを鋳型とし、3種類のプライマーのペアを用いて、PCRでミトコンドリアDNAを増幅させた。その結果、Primer Pair 1を用いることにより約2000塩基対(以降、bpと表記)、Primer Pair 2を用いることにより約500bp、Primer Pair 3を用いることにより約600bpのDNA断片が増幅された。

これらの増幅されたミトコンドリアDNAの断片を、8種類の制限酵素で処理した結果、Primer Pair 1で増幅されたDNA断片は7種類の制限酵素(Msp I、Hae III、Alu I、Afa I、Hha I、Hinf IおよびTaq I)で、Primer Pair 2で増幅されたDNA断片は少なくとも2種類の制限酵素(Hae IIIおよびHinf I)で、Primer Pair 3で増幅されたDNA断片は5種類の制限酵素(Hae III、Alu I、Afa I、Hinf IおよびSsp I)で、それぞれ切断されることがわかった(表3)。

表3 3種類のユニバーサルプライマーのペアと8種類の制限酵素の組み合わせによるミトコンドリアDNA断片の切断の可否

制限酵素	Primer Pair 1	Primer Pair 2	Primer Pair 3
Msp I	○	×	×
Hae III	○	○	○
Alu I	○	×	○
Afa I	○	△	○
Hha I	○	×	×
Hinf I	○	○	○
Ssp I	×	×	○
Taq I	○	×	×

○: 切断される、△: 切断される可能性あり、×: 切断されない

制限酵素による切断の結果得られたDNA断片の長さを、個体間で比較することにより、母系統の多様性に関する知見を得ることができる。このことから、ミトコンドリアDNAの切断が観察されたプライマーペアと制限酵素の組み合わせ(14種類、表3中の丸印)を、ミトコンドリアDNAマーカーとして用いれば、ムサシトミヨの母系統の多様性解析に利用できることが示唆された。一方、ミトコンドリアDNAの切断が観察されなかったプライマーペアと制限酵素の組み合わせについては、ミトコンドリアDNAマーカーとして利用することは困難であると

考えられた。

3.2 ミトコンドリアDNAマーカーの生息地への適用

本研究で作製した14種類のミトコンドリアDNAマーカーのうち、変異が長期にわたって蓄積・保存されやすいD-Loop領域のマーカーについて、Primer Pair 1と7種類の制限酵素(Msp I、Hae III、Alu I、Afa I、Hha I、Hinf IおよびTaq I)の組み合わせによるマーカー(表3)を、生息地における母系統の多様性解析に適用することを試みた。

生息地個体からのDNAは、平成18年1月から2月にかけて実施されたムサシトミヨ生息地における個体数調査の際、図1のA区、B区およびC区の各区域から捕獲した、それぞれ9個体、6個体および4個体のムサシトミヨのヒレ組織から抽出した。各個体のDNAを鋳型とし、Primer Pair 1を用いて、ミトコンドリアDNAのD-Loop領域をPCRで増幅した。増幅されたDNAを、7種類の制限酵素(Msp I、Hae III、Alu I、Afa I、Hha I、Hinf I、Taq I)で処理し、それらをアガロースゲル電気泳動にかけて個体間のバンドパターンを比較した。その結果、いずれのマーカーにおいても、全ての個体で同一のバンドパターンが観察された。なお、ここでは一例として、図4に、Primer Pair 1と制限酵素Hinf Iの組み合わせのマーカーについて、各個体のバンドパターンを示す。

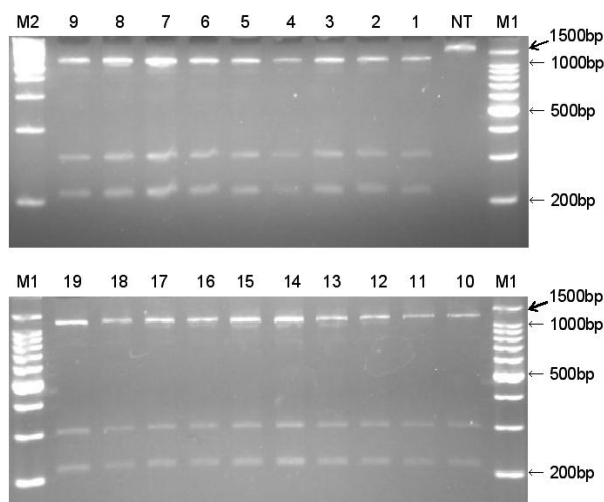


図4 Primer Pair 1を用いてPCR増幅したミトコンドリアDNAのD-Loop領域をHinf Iで切断したときの各ムサシトミヨ個体におけるバンドパターン。

M1: 100bpラダーマーカー; M2: 200bpラダーマーカー; NT: 制限酵素未処理; 1~9: A区の個体; 10~15: B区の個体; 16~19: C区の個体

これらのことから、ムサシトミヨ生息地では、元荒川源流域から約2km程度にわたる範囲で、同じ母系統の個体が生息している可能性があり、母系統の多様性はそれほど高くないことが示唆された。しかしながら、今後、母系統の多様性解析に関する精度をさらに高めるために、残る7種類のマーカー

一、すなわち、Primer Pair 2と2種類の制限酵素(Hae III およびHinf I)の組み合わせ、およびPrimer Pair 3と5種類の制限酵素(Hae III、Alu I、Afa I、Hinf IおよびSsp I)の組み合わせについても順次適用を進めていく必要があるであろう。

4 まとめ

本研究により、ムサシトミヨ生息地における母系統の多様性を解析するために利用可能な14種類のミトコンドリアDNAマーカーが作製できた。そのうち、D-Loop領域の7種類のマーカーを、元荒川源流域から約2km程度の生息地内の3地点から捕獲したムサシトミヨ(19個体)の母系統解析に適用した。その結果、いずれのマーカーにおいても、全ての個体で同一のバンドパターンが観察された。このことから、ムサシトミ

ヨ生息地では、母系統の多様性はそれほど高くないものと推察された。

文 献

- 1) 梅沢一弘(2002)RFLPによるムサシトミヨのミトコンドリアDNAの遺伝的変異について, 埼玉農総研研報, 2, 95-98.
- 2) Meyer, A., Kocher, T. D., Basasibwaki, P. and Wilson, A. C. (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences, *Nature*, 347, 550-553.
- 3) Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edward, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. and Wilson, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6196-6200.