

課題番号：4-2002（体系的番号：JPMEERF20204002）

研究代表者：戸田守 研究代表機関：琉球大学 研究実施期間：令和2年～4年

両生爬虫類をモデルとした希少種選定の基礎資料整備と保全対象種の 簡易同定法の確立およびそれらのワークフローの提案

<重点課題13>

「生物多様性の保全に資する科学的知見の充実や対策手法の技術開発に向けた研究」

<行政ニーズ（4-3）>

「絶滅危惧種の新種記載及び国内希少野生動植物種の同定の簡便化に対応するDNA
バーコード・ライブラリの充実促進に向けた研究」

研究実施体制

サブテーマ1	未整理な点が残る絶滅危惧種の分類の整理	(栗田隆気 / 千葉中央博物館)
サブテーマ2	国内希少種およびその予備群の脆弱性評価	(佐藤行人 / 琉球大学)
サブテーマ3	DNAバーコーディング・ライブラリの構築	(戸田守 / 琉球大学)
サブテーマ4	LAMP法など、簡便法による希少種の同定法の確立	(西川完途 / 京都大学)
サブテーマ5	AIを使った画像認証に基づく同定ツールの開発	(鈴木大 / 東海大学)

1. はじめに

＊ 生物多様性の低下は、今や最も深刻な地球環境問題のひとつ

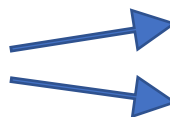


生物多様性条約

生物多様性国家戦略

絶滅リスクの高い種を認識し、その保全をはかる

❖ レッドリスト

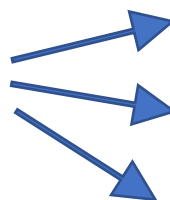


環境アセスメント

社会的認識の向上

取り組みが実を結んでいる

❖ 国内希少種（種の保存法）



違法採集・商取引の抑制

生息地の保全

絶滅回避（生息域外保全）

1. はじめに

＊ でも、課題も．．．

❖ レッドリスト

✓ 分類が未解決

✓ 絶滅リスク評価の科学的根拠が不十分

❖ 国内希少種

✓ 同定が容易でない



指定の見送り

運用が困難



法的拘束力を持つため、
対象は同定できる種に限る

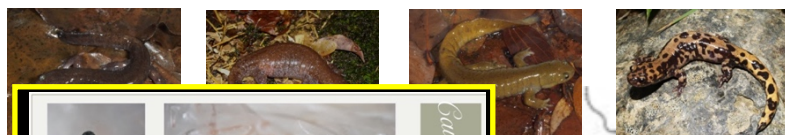
確実に同定できず、検挙できない

同定がネックになり、通報まで至らない

1. はじめに

＊ 両生爬虫類は違法採集・違法取引の対象になっている

小型サンショウウオ類 *Hynobius*属



▲輸出されたマイクロサップ

▲売としたハクハクサンショウウオ

2010年10月、サンショウウオ類（*Hynobius*属）の違法取引が明らかになった。この取引は、主に中国と台湾の間で行われており、違法採集と違法取引が問題となっている。この取引は、主に中国と台湾の間で行われており、違法採集と違法取引が問題となっている。

有尾類ニュース
（第二回）

産地を偽った
違法採集・販売

セマルハコガメ類

など、など



ヤエヤマセマルハコガメ（国産亜種）

しばしば不法所持の
疑いで問い合わせ



セマルハコガメ（台湾・中国）

国産亜種は文化財保護法
双方、CITES付属書II

1. はじめに

❖ レッドリスト

- ✓ 分類が未解決
- ✓ 科学的根拠が不十分

❖ 国内希少種

- ✓ 同定が容易でない
指定の見送り
運用が困難

とにかく同定をしやすいことが大切



DNAバーコーディング	——	鑑定者・研究者向け
より簡便な同定ツール	——	警察・税関向け
さらに簡易な同定ツール	——	市民の目, 市民活動

2. 研究開発目的

✓ レッドリストの見直し



1. 保全単位の認識 (分類の見直し)

サブテーマ1
千葉中央博/栗田隆気

✓ 希少野生動植物種の選定



2. DNA解析による絶滅に対する脆弱性の評価

- ・ 分析に基づく評価法の確立
- ・ ゲノム・データベース

サブテーマ2
琉球大/佐藤行人

✓ 違法採集からeDNAに至る
様々な用途での種同定支援



3. DNAバーコード参照情報

- ・ ライブラリの構築
- ・ 同定結果を返す解析パイプライン

サブテーマ3
琉球大/戸田守

✓ 取り締まり現場での同定



4. 簡便なDNA鑑別による同定法

サブテーマ4
京都大/西川完途

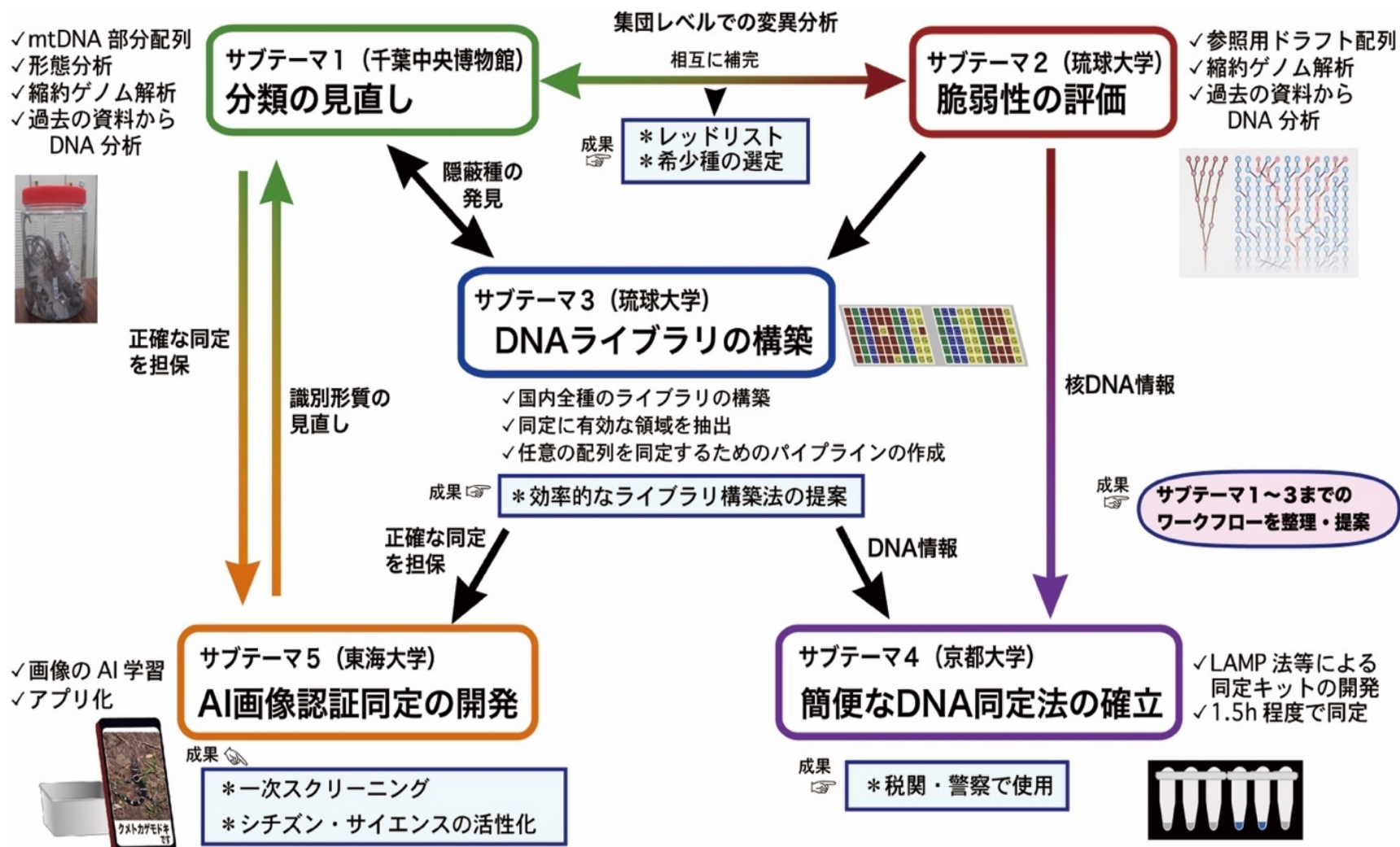
✓ 社会実装



5. AI学習による画像に基づく同定法

サブテーマ5
東海大/鈴木大

2. 研究開発目的



2. 研究開発目的

1) 希少種選定の基礎となる種分類の見直しと絶滅リスク評価を行う

サブテーマ1

サブテーマ2

2) DNAによる同定の基盤となるデータベースを整備する / そのワークフローを提示する

サブテーマ3

3) 取り締まりで使える簡便な同定ツールを開発する

サブテーマ4
(簡便DNA)

サブテーマ5
(画像認証)

各サブテーマの目標

サブテーマ	研究目標
1	・絶滅リスクのある10の種群を対象・・・記載 / 保全単位の認識 (・博物館標本からDNA配列を取得する方法の確立)
2	・国産60属を代表する種の全ゲノムを決定し、リファレンスを構築する ・希少種を含む種群について、ゲノム解析により脆弱性を評価する =>遺伝的多様性と継時的変動の推定
3	・国内の全200種あまりのmtDNA全長配列を決定し、リファレンスを構築 ・相同性検索の解析パイプラインを構築 ・効率性を重視、確立し、その作業ワークフロー/コストを提示する
4	・トカゲモドキ類、セマルハコガメ類、ミナミイシガメ類、小型サンショウウオ類、オオサンショウウオ類 で塩基配列決定によらない簡便なDNA同定ツールを開発 ・キット化する
5	・商取引で問題になる少なくともセマルハコガメ類、トカゲモドキ類、オオサンショウウオ、ダルマガエル類、カナヘビ類の5群で画像認証ツールを開発 ・その一部を現場に実装

サブテーマ1

分類の見直し

未整理な点が残る絶滅危惧種の分類の整理

＜研究開発内容＞

1) 保全上重要な種，あるいは潜在的に重要な種 18群に対して分類の見直しを実施

- ＊ 一塩基多型， mtDNA配列， 形態形質の分析
- ＊ 新種記載など

2) 博物館標本の遺伝的解析手法の確立

- ＊ 様々な抽出法を比較検討
- ＊ 複数のNGS解析用ライブラリ作成法を検討



分類の見直しをした対象種群

一塩基多型(SNP) mtDNA 形態分析

既に絶滅のリスクが高い種を含むもの

ツシマサンショウウオ類



イシヅチサンショウウオ類



イボイモリ属



トカゲモドキ属



局所分布する種を含む可能性があるもの

ヤモリ属



ヒバカリ属



由来不明/不確実な集団を含むもの

ハロウエルアマガエル



ヤエヤマイシガメ



セマルハコガメ



リュウキュウヤマガメ



タシロヤモリ



情報不足なもの

アカハライモリ



ヌマガエル



シロマダラ



ミナミトリシマヤモリ



尖閣諸島のシュウダ



尖閣諸島のアカマダラ



ダンジョヒバカリ



分類の見直しをした対象種群

	一塩基多型(SNP)	mtDNA	形態分析	隠蔽種/ 孤立集団	保全の提言
既に絶滅のリスクが高い種を含むもの					
ツシマサンショウウオ類	●		●	●	●
イシヅチサンショウウオ類	●	●	●	●	●
イボイモリ属			●		●
トカゲモドキ属	●		●	●	●
局所分布する種を含む可能性があるもの					
ヤモリ属	●	●	●	●	
ヒバカリ属	●			●	▲
由来不明/不確実な集団を含むもの					
ハコウエルアマガエル	●			?	
ヤエヤマイシガメ		●			
セマルハコガメ		●			
リュウキュウヤマガメ	●			●	●
タシロヤモリ	●				●
情報不足なもの					
アカハライモリ	●			●	
ヌマガエル	●			●	
シロマダラ	●	●		●	
ミナミトリシマヤモリ	●			●	
尖閣諸島のシュウダ		●		}	分類/系統的 位置を確認
尖閣諸島のアカマダラ		●			
ダンジョヒバカリ		●			

分類の見直しをした対象種群

	一塩基多型(SNP)	mtDNA	形態分析	隠蔽種/ 孤立集団	保全の提言
既に絶滅のリスクが高い種を含むもの					
ツシマサンショウウオ類	●		●	●	●
イシヅチサンショウウオ類	●	●	●	●	●
イボイモリ属			●		●
トカゲモドキ属	●		●	●	●
局所分布する種を含む可能性があるもの					
ヤモリ属	●	●	●	●	
ヒバカリ属	●			●	▲
由来不明/不確実な集団を含むもの					
ハロウエルアマガエル	●			●	
ヤエヤマイシガメ					
セマルハコガメ					
リュウキュウヤマガメ	●				●
タシロヤモリ	●				●
情報不足なもの					
アカハライモリ	●			●	
ヌマガエル	●			●	
シロマダラ	●			●	
ミナミトリシマヤモリ	●	●		●	
尖閣諸島のシュウダ		●			
尖閣諸島のアカマダラ		●			
ダンジョヒバカリ		●			

直接的な提言はなくとも、
重要な情報。

} 分類/系統的
位置を確認

<研究開発内容>

1) 保全上重要な10種群に対して集団構造解析・脆弱性の評価を実施

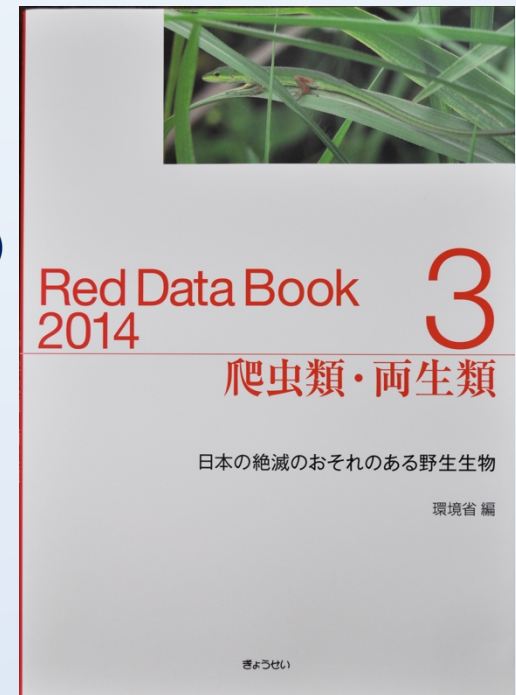
- * 全ゲノム一塩基多型, 縮約ゲノム一塩基多型
- * ヘテロ接合度/塩基多様度を指標とした評価

2) ドラフトゲノム参照情報の構築

- * 48種61個体を解析 (一部, 重要そうな種群に集中させた)

3) 少数サンプルに基づく脆弱性評価の検討

- * 多数の遺伝子座をみれば少数標本の分析でよいかを検討
- * 少数標本+ゲノムワイド解析を同所的ヘビ8種に適用



サブテーマ2

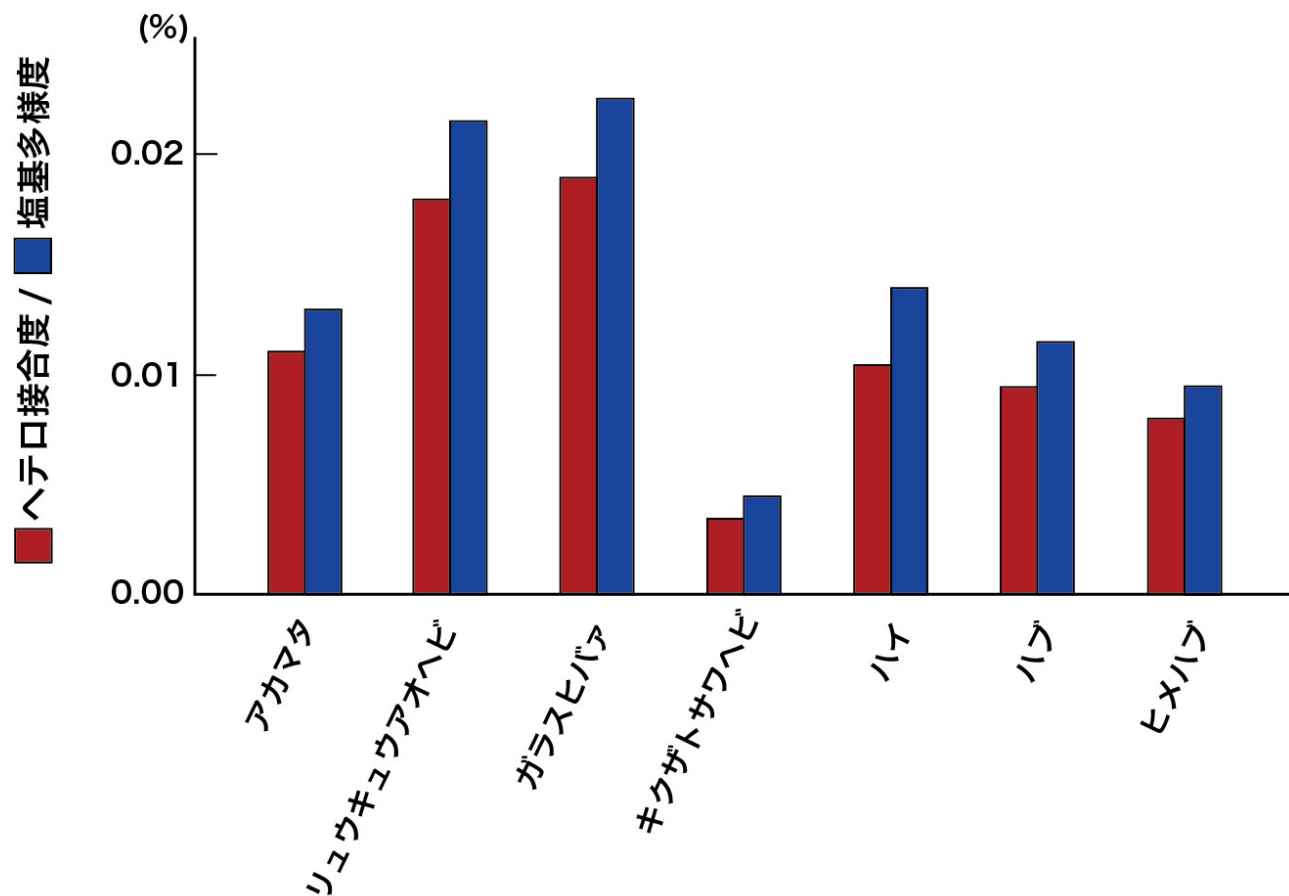
脆弱性評価

国内希少種およびその予備群の脆弱性評価

集団構造解析 / 脆弱性の評価を実施した種群

	脆弱な 集団を特定	グループ として脆弱	保全単位を 認識	交雑の進行	保全行政に 関連する意義
トガケモドキ類*	●				優先順位
ミヤコカナヘビ*	●		●		優先順位
ミヤコトカゲ		●	●		保全の必要性
キクザトサワヘビ*		●	●		保護区の意義づけ
ヒバァ類					RL評価に情報提供
ヤエヤマセマルハコガメ*			●		保全単位の認識
リュウキュウヤマガメ*	●		●		優先順位
キタサンショウウオ*			●		保全単位の認識
ヤクヤモリ				●	RL評価に情報提供
ニホンイシガメ				●	RL評価に情報提供

*現在、国内希少野生動植物種に指定されているもの



久米島に同所的に生息するヘビ7種の遺伝的多様性の比較

＜研究開発内容＞

1) 199種, 356個体のmtDNA配列を取得 / COIバーコード領域432個体

→ 次の研究の土台に

2) 有尾類全種を識別するDNAバーコーディング・プライマーを開発

(全長配列を揃えたので検討・作成できた)

3) リファレンス構築の作業フローと
コストの提示

＊ 検索パイプラインは既存のシステムで

→ ローカルデータベースとして使えるように
リリースすることで対応



サブテーマ3

ライブラリ構築

DNAバーコーディング・
ライブラリの構築

作業フロー

<配列取得までの実験の流れ>

サンプルの集約

ロング/セミロングPCR

サンプル調整キットで
断片化・タグ付け

Miseq解析

アセンブル

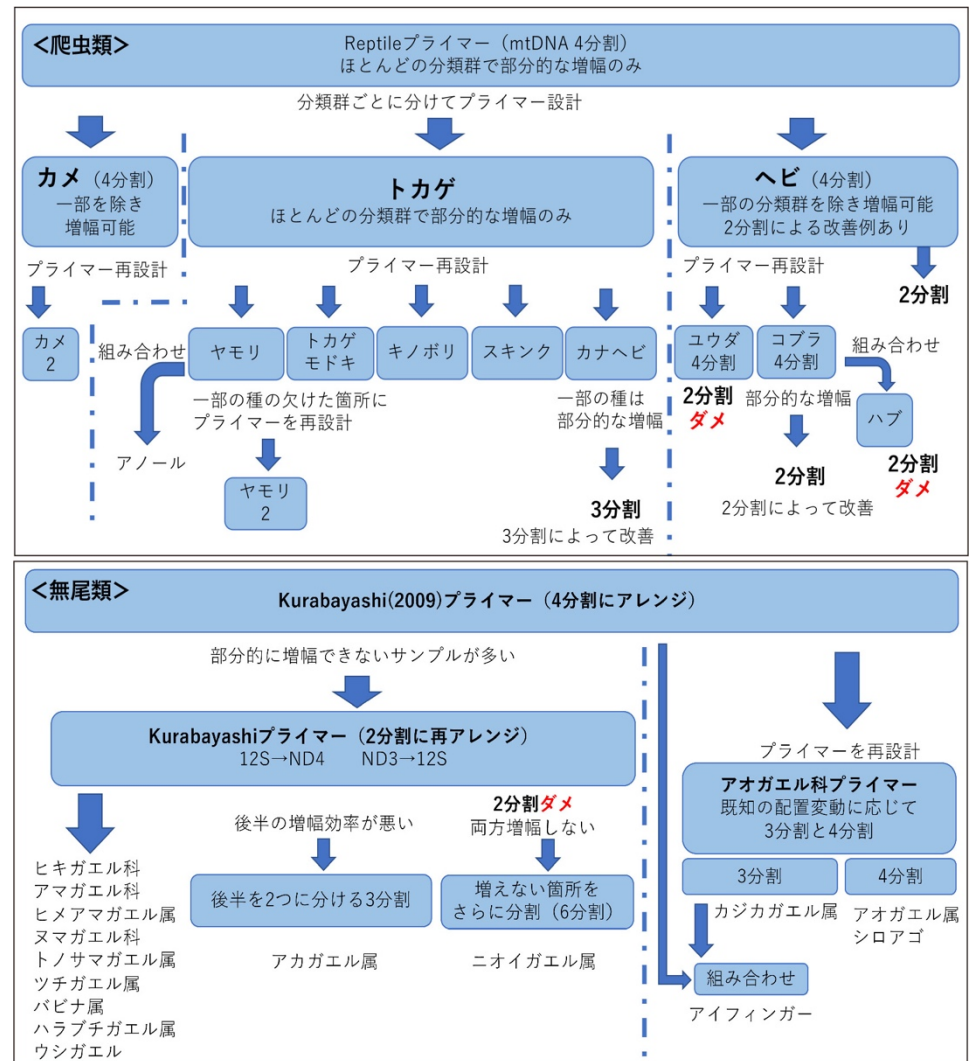
サンガー法で穴埋め（オプション）

（注）調節領域は決まらない

<コスト>

PCR後にまとめて処理することで
低コスト化・省力化

2200-4000円 / 個体



本事業で辿ったPCR増幅までの道のり

<ポイント> ← 結局、もっとも大変なのはPCR

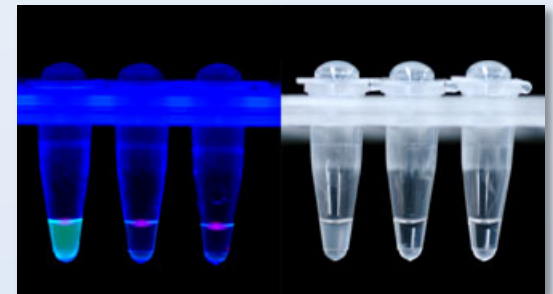
- ・極力、2分割でPCR回数とプライマー数を減らす
- ・サンプルの質の問題を検討できるよう、可能なら複数を準備

＜研究開発内容＞

1) 目標に挙げた5種群でLAMP同定法の開発を検討

- トウキョウサンショウウオでLAMP法の開発に成功
- トカゲモドキ類は国産種と海外産種を見分けるPCR法に切り替え、マーカー開発に成功
- オオサンショウウオ類は差が小さくてLAMP法は難しく、SSR法がベストと結論
- カメ類2種群は、広く核ミトコンドリア配列があり、簡易なDNA同定は危険と結論

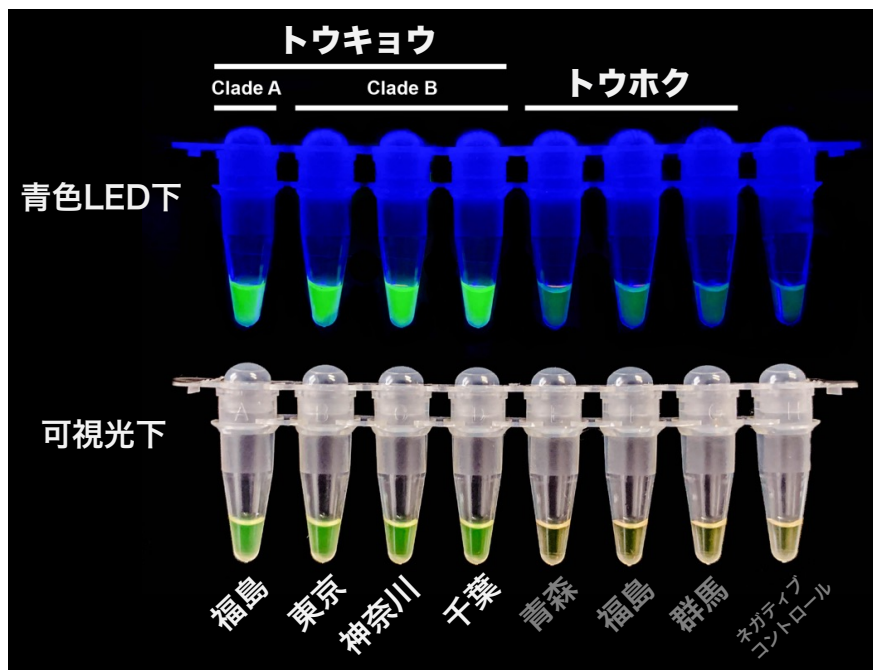
2) 両生類の飼育水から非侵襲的にDNAを取る手法を開発



サブテーマ4

簡便な同定法

LAMP法等、希少種の簡便な同定法の確立



1時間で反応するLAMP法

<環境省希少種保全推進室と合同でプレスリリース>

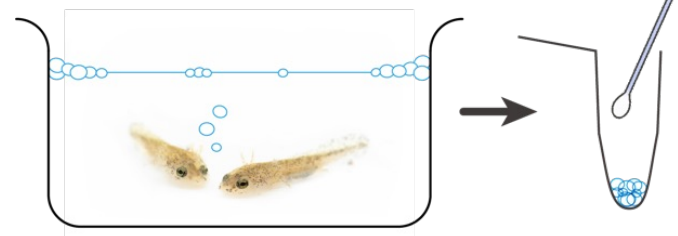
朝日新聞 2021.12.13 「希少種トウキョウサンショウウオ、
短時間で簡単に判別 違法売買防げ」

読売新聞 (2022.2.6 「希少サンショウウオ、1日かかる判別を
1時間で…違法販売防止へ京大など開発」

日本経済新聞 2022.3.4. 「絶滅危惧種サンショウウオの違法
売買防げ」

Suzuki et al. (2021) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for quick identification of the Japanese salamander *Hynobius tokyoensis*. *Genes & Genetic Systems* 96: 247–252.

幼生： 飼育している際に飼育容器に溜まる気泡を集めることで抽出が可能 (LAMPで確認済)



成体： スワブで体表粘膜を採取することで抽出が可能 (LAMPで確認済)



飼育水からのスワブサンプルでLAMP法まで可能

1) 目標に挙げた5種群でAI学習を実施

- オオサンショウウオで有効なAI学習モデルの構築に成功
- トカゲモドキ類も有効なモデルができたが、精度に検討の余地が残った
- セマルハコガメでは同定精度に改善の余地があり、他の手法との併用も検討
- トノサマガエル類、カナヘビ類は予備解析のみ
(環境省との会合でニーズを確認し、残り3群に注力することを決定)

2) オオサンショウウオの識別アプリを試作・運用

- * 観察会で参加者が利用、動作を確認 + 意見を聴取

3) ヒアリング調査

- *那覇空港・沖縄税関で密輸検査の状況を聞き取り、意見聴取



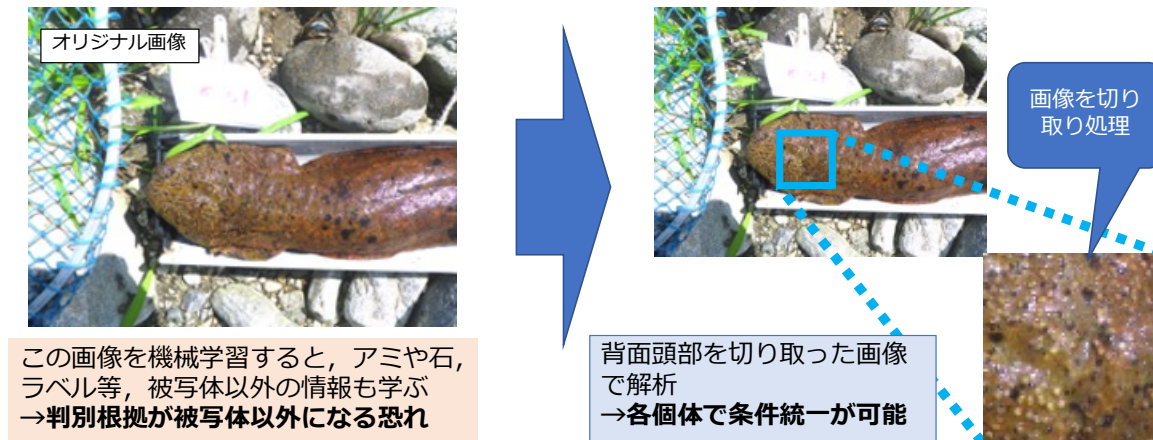
サブテーマ5

画像による同定

AIを使った画像認証による
同定ツールの開発

画像の背景処理に苦勞したが、思い切って頭部だけを切り取ることで解決

→もともと本種群に特化した同定ツールでよいので、これでもOK



- ↓
- ・二次的に変化させた画像を学習させること（水増し手法）で識別精度は向上
 - ・オリジナル25枚程度の学習でも有効なモデルが構築できる

学習したモデル	種群	精度 (F1)	学習したモデル	種群	精度 (F1)
学習 5 枚	日本産	85.7%	学習 5 枚	日本産	100%
	中国・交雑	80.0%	水増し手法	中国・交雑	100%
学習25枚	日本産	96.8%	学習25枚	日本産	100%
	中国・交雑	96.6%	水増し手法	中国・交雑	100%
学習50枚	日本産	100%	学習50枚	日本産	100%
	中国・交雑	100%	水増し手法	中国・交雑	100%
学習75枚	日本産	96.8%	学習75枚	日本産	100%
	中国・交雑	96.6%	水増し手法	中国・交雑	100%

アプリ化

＊ スマートフォンで使えるようにし，野外観察会でテスト

京都大学・東海大学の先生と行く
オオサンショウウオ観察会 in 秋の京北

- ・ 2023年10月22-23日
- ・ あうる京北
- ・ 参加者20名



＊ 多少の改良が必要
＊ 是非，使えるようにして欲しいとの声



5. 研究成果 —概要—

サブテーマ	研究成果
1	✓ 8つの未記載種を認識（2種を記載/1種は投稿中） <=保全上の扱いについて提言 ✓ 位置付けが不確定だったものを確定（外来種であることなど） <=保全上の提言 ✓ 博物館標本からの劣化したDNA抽出法を確立
2	✓ 48種61個体で全ゲノム解析（重要なものを選定） => 参照データの構築 ✓ 10 群で脆弱性評価 <=保全上の扱いについて有用な情報 ✓ 少数標本の縮約解析でもヘテロ接合度が推定可能 =>簡便な脆弱性評価法の提案
3	✓ 199種でmtDNAのほぼ全長配列を決定 / 423個体のCOI配列 => 参照データを構築 ✓ 有尾類のバーコーディング領域の開発 <=国産全種を識別できる ✓ 参照データ構築ワークフローの提示 / コストを提示 <= 2,200-4,000円/個体
4	✓ トウキョウサンショウウオでLAMPを開発 <=大きく報道 ・ ・ 違法売買抑止に貢献 ✓ トカゲモドキはPCRで識別 他の3つでも有効な同定法/限界を提言 ✓ 両生類の飼育水からの非侵襲的DNA抽出法の確立 <=取締りの現場に実装可能
5	✓ 3つに絞って進めた（2つは予備的解析） ✓ オオサンショウウオ類で有効な識別モデルを構築 ✓ アプリ化/観察会で運用 ✓ 税関等で意見を聞いた

5. 研究成果 —環境政策への提言—

1. 希少種等の分類について

1-1. 国内希少種2種の分類の変更について

1-2. 小型サンショウウオ類

1-3. リュウキュウヤマガメ

1-4. タシロヤモリ

2. 希少種の保全単位と優先順位について

2-1. キクザトサワヘビ

2-2. ミヤコトカゲ

3. バーコーディングライブラリについて

3-1. 両生類・爬虫類のライブラリの構築

3-2. 有尾類バーコーディング領域の開発

4. 両生類の飼育水からの非侵襲的DNA採取法について

5. オオサンショウウオ同定ツールについて

保全上の扱い

保全の取り組み・
取り締まりでの
活用

5. 研究成果 —目標の達成状況—

サブテーマ	目標	達成状況
1	・10の種群で分類の見直し（記載・保全単位の認識 ・博物館標本からのDNA分析	✓ 18の分類群で分類の整理 目標を上回る ✓ 抽出法を確立
2	・60属の全ゲノム・データベース ・ゲノム解析による脆弱性評価	・全ゲノム解析は48種61個体（重要種を選定） ✓ 10群で脆弱性評価 ✓ 少数標本による脆弱性評価法の検討 目標通り
3	・全種200種+のmtDNA配列を決定 ・相同性検索の解析パイプライン ・作業ワークフロー/コスト	✓ 199種の配列を決定 ● 別の方法に切り替え ✓ ワークフロー/コストを提示 目標通り
4	・5群で簡便同定ツールを開発 ・キット化	✓ 2つの種群で開発に成功 3でも有効な同定法/限界を提言 ● 非侵襲的抽出法の確立 目標を上回る
5	・5種で画像認証ツールを開発 ・その一部を現場に実装	● 3つに絞って進めた（2つは予備的解析） 1つの種群で有効なモデルを構築 ✓ アプリ化/観察会で運用 目標通り
全体	・5つのサブテーマを進める	✓ 5つのサブテーマが連動し、種分類から簡便同定ツール開発までを達成 目標通り ● 新型コロナで進行が遅れ、成果公表が遅れがち

6. 研究成果の発表状況

研究成果の発表件数

査読付き論文	10件
査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	0件
口頭発表（学会等）	13件
「国民との科学・技術対話」の実施	33件
マスコミ等への公表・報道等	10件
本研究費の研究成果による受賞	0件
その他の成果発表	0件

