

P119 岐阜県西部で確認された最も絶滅に近いクロサンショウウオの個体群について

～系統解析・遺伝的多様性・保全～

岐阜県立大垣北高等学校自然科学部サンショウウオ班 久保田陽貴・棚橋洸介・岩津奏祐・坪井良輔・佐藤陽・北村明香里・大橋亮介・岸田凌

1. はじめに

クロサンショウウオ (*Hynobius nigrescens*)

- 東北から滋賀の北部にかけて分布
- 遺伝的に東北から福井県北部のClade I と福井県と滋賀県の一部のClade II の系統に分けられる
- 環境省は「準絶滅危惧種」、岐阜県は「絶滅危惧Ⅱ類」に指定している



図1. 揖斐川町で捕獲したクロサンショウウオ

岐阜県揖斐川町のクロサンショウウオ

- 従来の生息地よりもかなり南に位置し温暖化の影響を受けやすい
- 生息地の悪化も進んでいる

絶滅の危険性が最も高いクロサンショウウオ個体群

2. 調査地とサンプル

サンプルは以下の産地と個体数を使用した

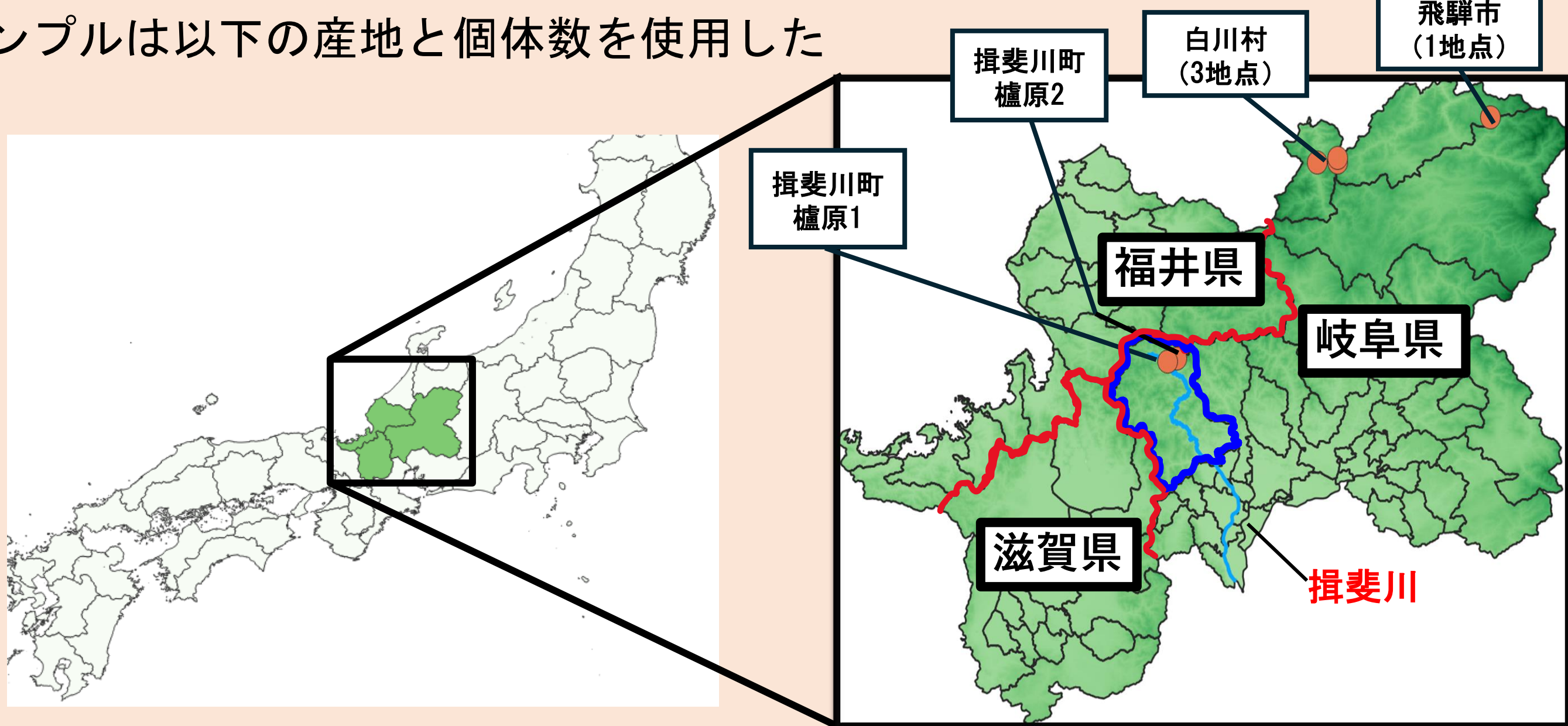


図2. サンプルの採取地点

表1. 遺伝子解析の段階別サンプル数

	尾芽胚→幼生	幼生	成体
樋原1	2	18	-
樋原2	4	-	37

表2. 各発生段階におけるサンプル数

	総サンプル数	DNA抽出・PCR シーケンス
揖斐川町樋原(2地点)	61	16
飛騨地方(飛騨市、白川村)	38	28

3. シーケンスによる系統解析

仮説

- 揖斐川町の個体群は腹部が大きく、繁殖期を過ぎてても水中で生息している→従来とは異なる生態・形態
- 生息地がClade IIが生息している滋賀県と福井県に近い

揖斐川町の個体群はClade IIか未確認の系統に含まれる可能性のある未知の個体群と言える

DNAの抽出方法

- 現地調査で捕獲した個体の尾部から、生体への影響がほぼないと考えられる約2mmの組織サンプルを採取し、99.5%エタノール中で、-20℃で保管
- キアゲン社のDNeasy Blood & Tissue Kitを用いて、DNAを抽出

PCRの方法

- プライマーはHYD_Cytb_F1 (50-CYAAYGCTAAAGCGGCAAAATA-30) と salamander_cytb_R_N2 (50-YTYTCAATCTTKGGYTTACAAGACC-30) (Matsui et al., 2008) を使用し、Cytochrome (シトクロム) 領域の一部の1075bpを増幅
- PCRはプロメガ社のGoTaq® Green Master Mix, を使用して95℃2分間の初期変性の後に95℃60秒, 55℃60秒, 72℃120秒のサイクルを30回行う

電気泳動の方法と結果: DNAの増幅を確認するため、2%アガロースゲルを用いて、100Vで20分間電気泳動を行った

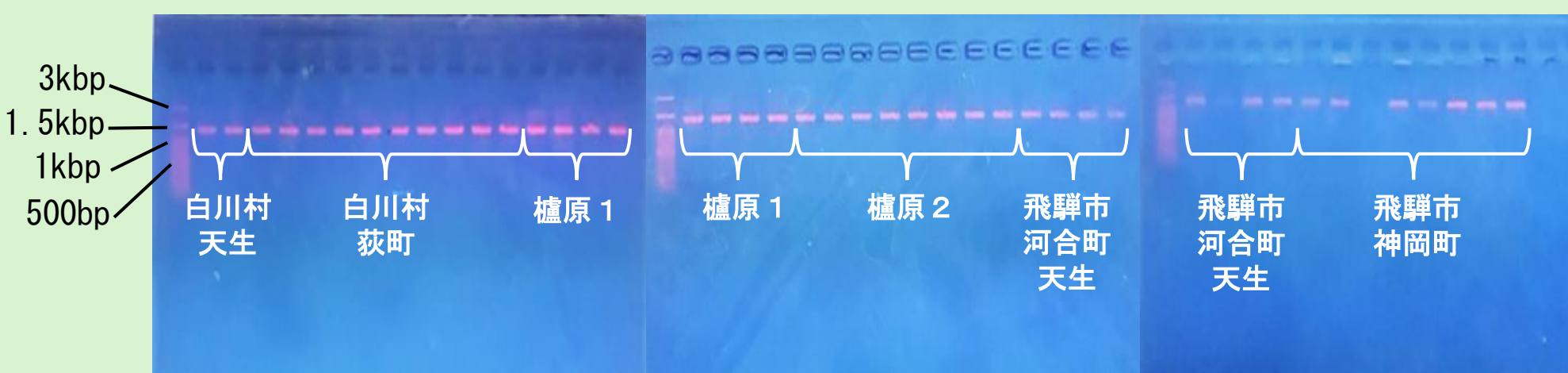


図4. PCRの写真結果(写真は加工済み)

今後の計画

シーケンスの方法

- ニューイングランドバイオラボ社のExo-CIP Rapid PCR Cleanup Kitを用いてPCR産物の精製を行う
- 塩基配列の決定はBigDye ver 3.1を使用したサンガー法で、ABI 3130を用いる

系統解析

シーケンスの結果から系統解析を行い、分子系統樹を作成

遺伝的多様性の評価

シーケンスの結果から、揖斐川町の個体群と岐阜県内の他地域の個体群の遺伝的多様性を評価する

4. クロサンショウウオの頭胴長と全長を基にした形質比較

目的

クロサンショウウオの全長に対する頭胴長の大きさは地域ごとに異なる

揖斐川町の個体群と他地域の個体群の全長に対する頭胴長の割合を比較し、揖斐川町の形質的特徴を調査した

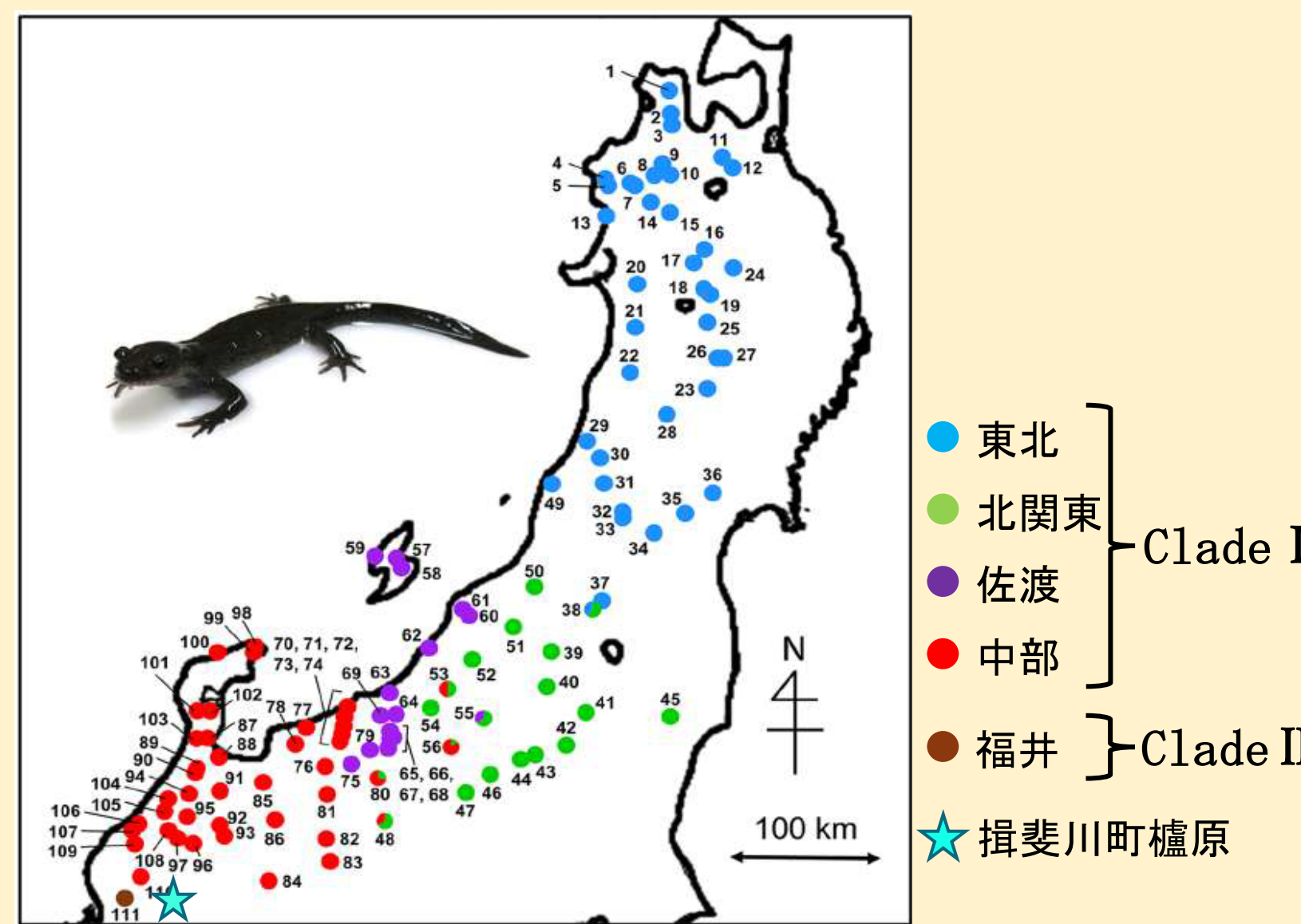


図5. 各系統の分布図, 参考文献 (Morii et al., 2025) より引用

方法

- Morii et al. (2025)・滋賀県サンプル・揖斐川町サンプルのデータを比較(通常、頭胴長は腹面から計測するが、揖斐川町の個体は背面から計測した)
- 比較項目: 頭胴長、頭胴長比(頭胴長/全長)
- 5地点間の平均値を一元配置分散分析(ANOVA)で比較
- 有意差がある(p < 0.05)場合、Tukey-Kramer法で多重比較
- 使用ソフト: Microsoft Excel

結果

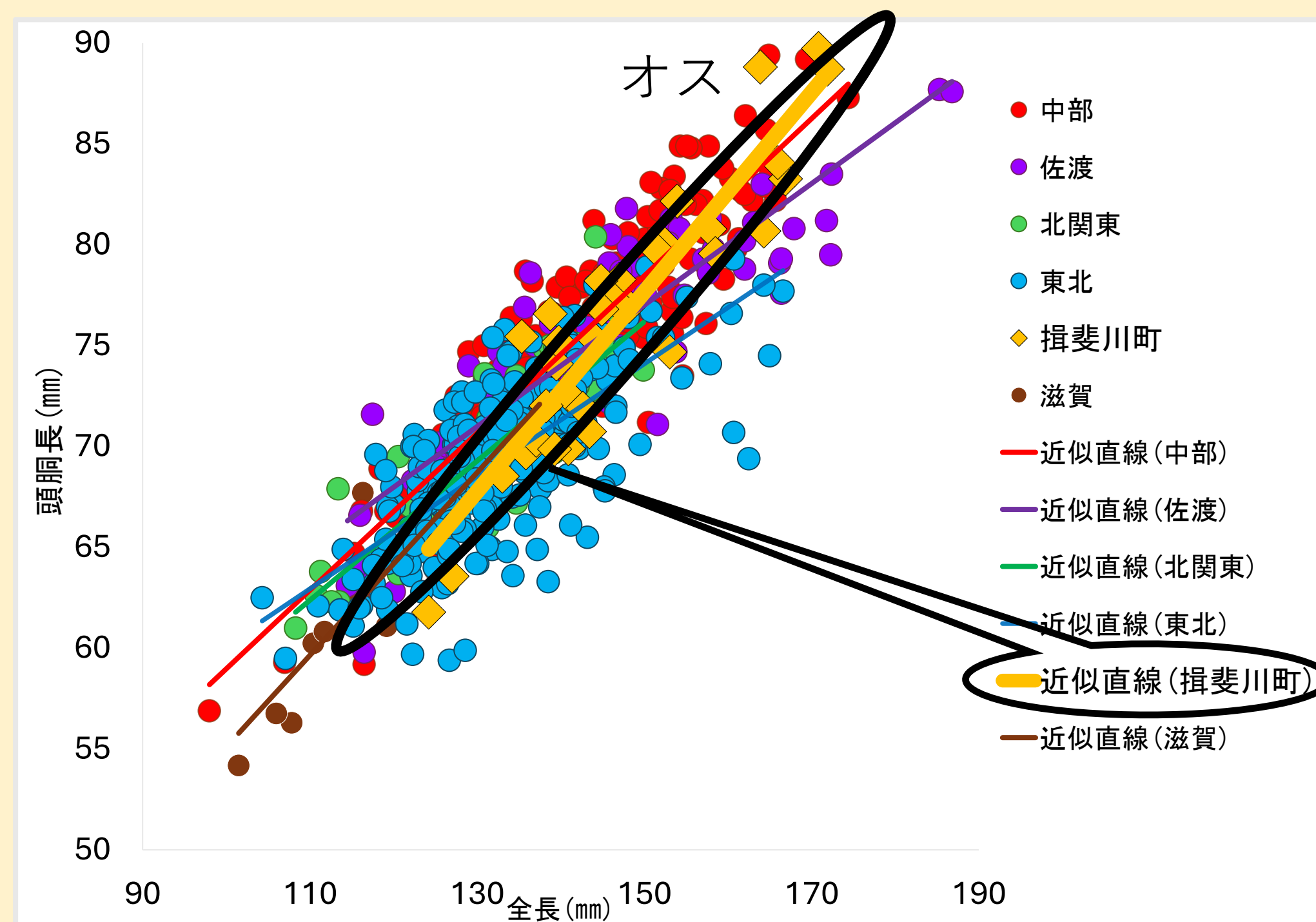


図6. 地域ごとのクロサンショウウオの全長と頭胴長の割合を比較したグラフ (Morii et al., 2025)のデータを使用

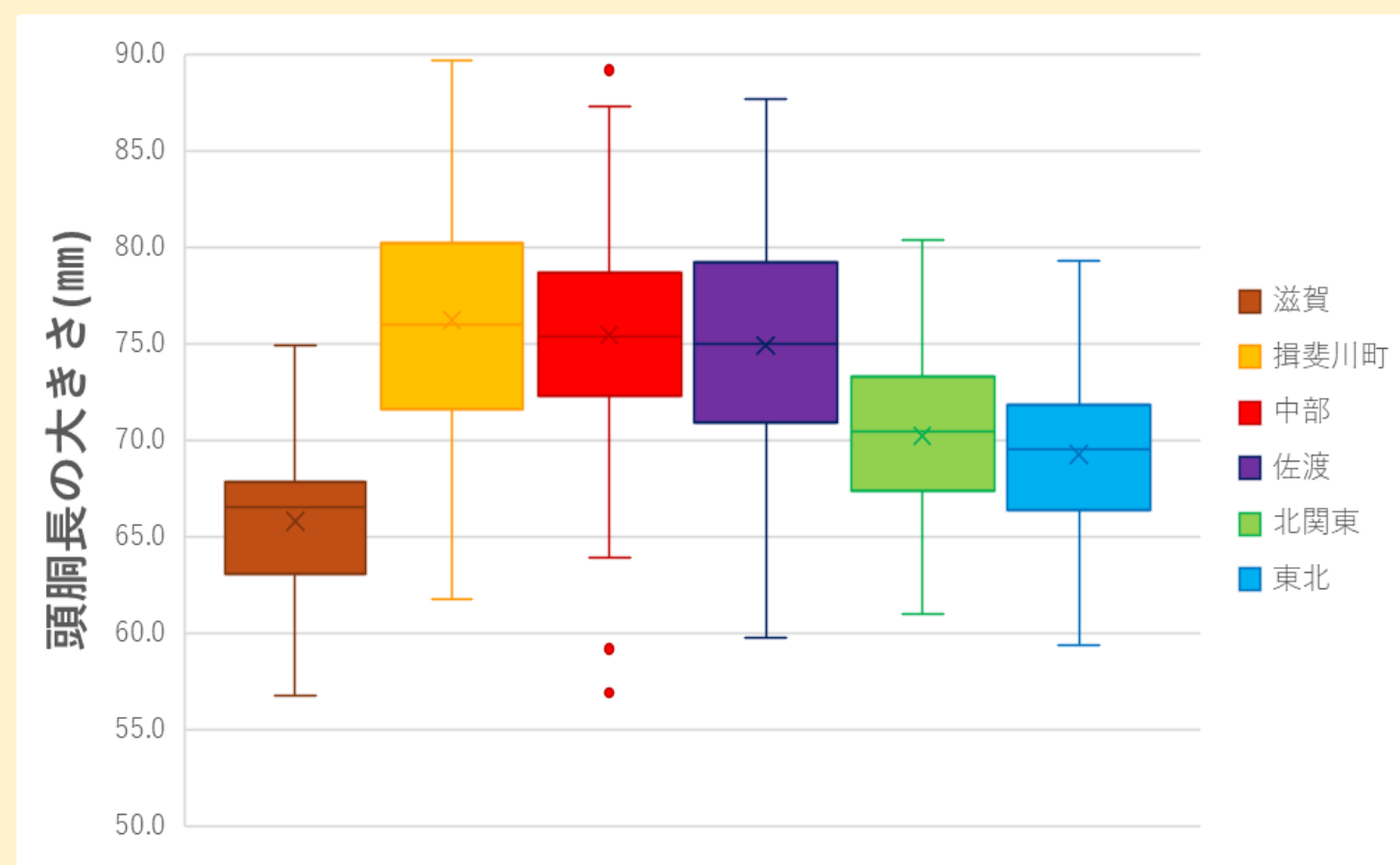


図7. 頭胴長の地域間比較の箱ひげ図

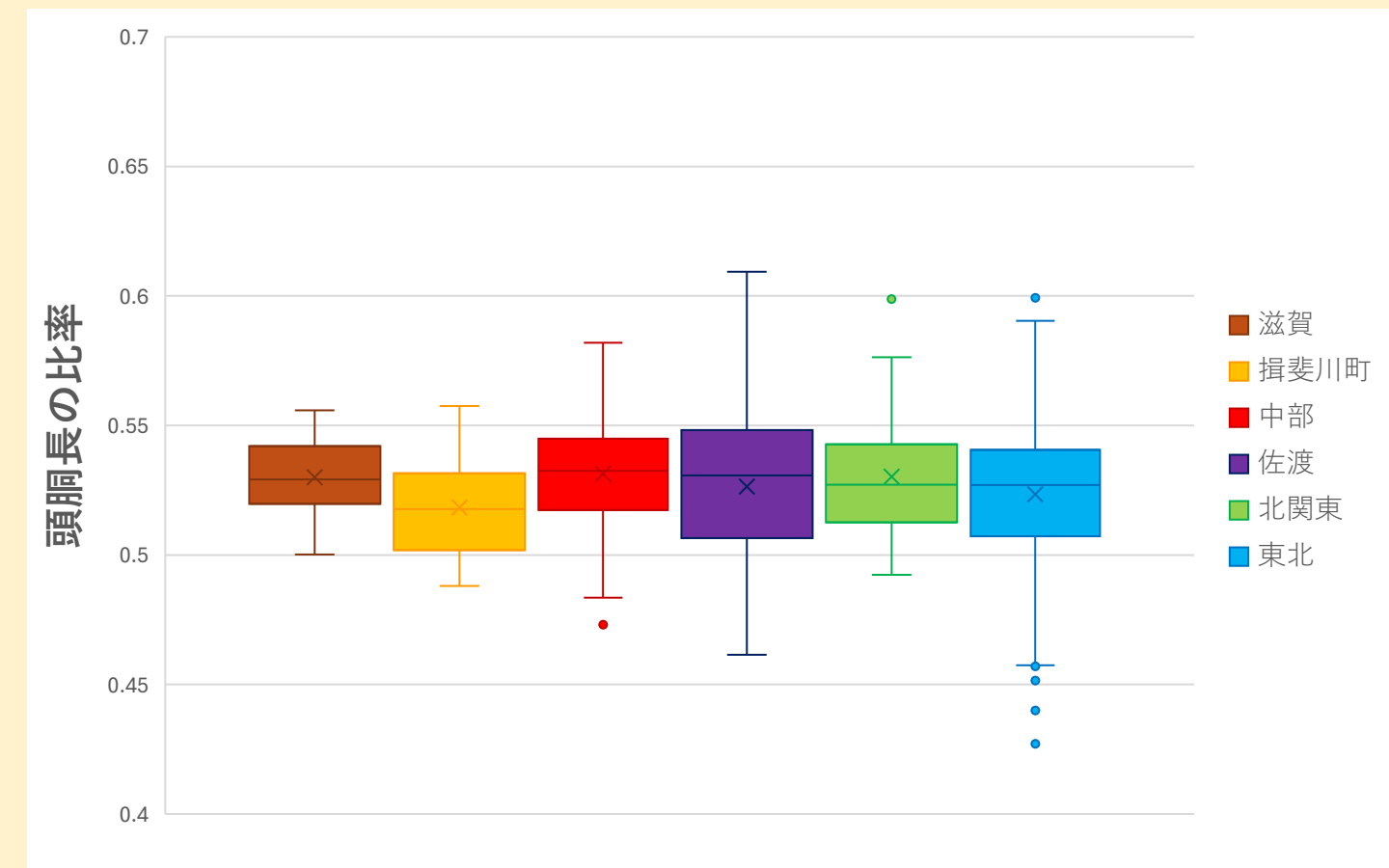


図8. 全長に対する頭胴長の割合の地域間比較の箱ひげ図

表3. 各地域間におけるクロサンショウウオの頭胴長の多重比較

比較ペア	大小関係(平均値)	判定(p値)
揖斐川町 / 滋賀	揖斐川町 > 滋賀	有意差あり(0.001)
滋賀 / 中部	中部 > 滋賀	有意差あり(0.001)
揖斐川町 / 北関東	揖斐川町 > 北関東	有意差あり(0.001)
揖斐川町 / 東北	揖斐川町 > 東北	有意差あり(0.001)
揖斐川町 / 中部	揖斐川町 > 中部	有意差なし(0.9)
揖斐川町 / 佐渡	揖斐川町 > 佐渡	有意差なし(0.729)
中部 / 佐渡	中部 > 佐渡	有意差なし(0.9)

今後

自分たち自身が実際に現地に赴き、捕獲・測定を通して詳細なデータを手に入れ、形質の傾向を解明したい

5. 今後の展望

調査・研究

- 揖斐川町の個体群のシーケンスデータを用いた同個体群の遺伝的多様性の評価
- 形質的・生態的な違いの原因の解明

保全

- 南方に位置する個体群
- 天敵が多い
- 水深が浅い
- 遮水シートを設置し、新たな池を作る
- 保全の必要性を発信



図9. 悪化している生息地

6. 謝辞・参考文献

- 写真家 関慎太郎氏には本研究に使用したサンプルの計測データを送っていただいた。また、東京大学大学院総合文化研究科 森井椋太特任研究員にはクロサンショウウオの全長・頭胴長データの使用許可をいただいた。さらに、揖斐川町役場の小川直美氏、愛知県岡崎市の片町礼子氏、生命の水と森の活動センターの高木俊紀センター長には、クロサンショウウオの新規繁殖場所を発見していただき、現地への案内をしていただいた。その他、多くの方にご協力いただいた。厚く御礼申し上げる。以下に、本稿における参考文献を掲載する。
- Shintaro Seki and Naoki Mito. 2023. A record of Japanese black salamander (*Hynobius nigrescens*) from Shiga Prefecture.
 - 岐阜県公式ホームページ: <https://www.pref.gifu.lg.jp/page/4306.html>
 - Matsui, Masafumi, Yoshikawa, Natsuhiko, Aoki, Gen, Sasamori, Koji, Matsui, Masamichi, et al. 2020. Wide Distribution but Low Differentiation: Phylogenetic Relationships and Phylogeography of *Hynobius nigrescens* (Amphibia: Caudata)
 - Matsui, M., N. Yoshikawa, A. Tominaga, T. Sato, S. Takenaka, S. Tanabe, K. Nishikawa, and S. Nakabayashi. 2008. Phylogenetic relationships of two *Salmandrellia* species as revealed by mitochondrial DNA and allozyme variation (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 48: 84-93.
 - Morii, Ryota, Shona Yasuda, Atsuo S. Nishino, and Hiroshi Ikeda. 2025. "Latitudinal Patterns in a Reproductive Trait Driven by Sexual Selection." Ecological Monographs 95 (2): e70017.