猛禽類 5 種の食性から解明する防砂林の生態学的役割

清水 拓海

山形県

第 1 章：序論

1.1. 捕食者である猛禽類を研究する意義

気候変動や人間活動による生物多様性の劇的な減少が指摘されている中で、1997 年に定められた京都議定書(温暖化防止のための国際会議で取り決められた世界初の国際協定)、名古屋議定書(生物の多様性に関する条約の遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な排便に関する国際協定)、そして 2015 年 9 月の国連サミットでは「持続可能な開発のための 2030 アジェンダ」にて 2016 年から 2030 年までの国際目標として Sustainable Development Goals (SDGs, 持続可能な開発目標)が唱えられている。これは、地球環境の保全と利用のバランスと自然の共存を実現することを目指したものである。このような背景の中、世界的に生物多様性や生態系機能の保全の意識を向上させ、人類による保全事業が自然界に実際に与える影響に対する関心が高まっていると言える。

地球全体の保全が目標であるとはいえ、その足がかりは対象となる独立、もしくは準独立した生態系を成す特定の領域を理解することである。しかし特定の地域における生物多様性の保全を実施する場合でも、その地域に生息する生物種は動物界に絞ったとしても、昆虫などの節足動物から土壌中の環形動物なども含め多種多数となるため、その全貌を網羅的に捉えて調査することは極めて難しい。そのため、生息している生物の中から生物多様性の指標種を選定し、それを多様性の指標とする手法が一般的である(Rodríguez-Estrella et al. 2019)。そのような状況下において生物多様性の保全を推進するために捕食者は生物多様性を象徴する存在として国際的に広く認知されている。

しかし、大型の肉食動物(捕食者)は人間活動による生息地の喪失、餌となる動物の減少、迫害などにより世界の多くの地域で絶滅の危機に晒されている(Ripple et al. 2014; Tinajero et al. 2017)。それらの捕食者の存在はトップダウン効果や、栄養カスケードを通じて関連する生態系に様々な影響を与えることが知られている(Sinclair et al. 2003)。例えば捕食者が存在しない森林では、存在する森林と比べて

草食動物の数が極端に増加し、在来植物の群集構造が変化する(Terborgh et al. 2001). また導入された捕食者であるホッキョクギツネの存在が、陸地に飛来する海鳥の数を制限することで、海から陸に移動する栄養素の量を減らしたことで、草原からツンドラへと環境を変遷させた例もある(Croll et al. 2005). このように捕食者の採餌行動が周囲の生態系、および環境に及ぼす影響は大きく、中でもタカ目、ハヤブサ目、フクロウ目の総称である猛禽類は、食物連鎖における頂点捕食者であるため、その要素は絶大なものになる。鋭い鉤爪や嘴によって獲物となる動物を捕食するこれらの猛禽類は、捕食行動によってトップダウン効果をもたらし、高い生物多様性の維持に貢献していると言える(Sergio et al. 2007; 2008).

同時に、猛禽類はその生息と繁殖に広い面積を必要とすることから、環境の変化に敏感である(Tinajero et al. 2017). 日本の環境アセスメントにおいても、高い生物多様性の指標となるとして猛禽類の注目度は高い。しかし、猛禽類が利用している餌動物が不明なまま採餌環境の評価が行われているなど学術的根拠に乏しい点が散見される(環境省 2012). 採餌に関する情報は生物の生存に深く関連するだけでなく、繁殖にも大きな影響を与えることから、猛禽類が利用している餌動物を種レベルで正確に把握することは、特定の環境に対して彼らが生息可能かを評価する上で非常に重要である。

1.2. 猛禽類における食性解析について

捕食-被食相互作用を理解することは、生態学の中心的な課題のひとつである(Carreón-Martínez and Heath 2010). 特に頂点捕食者を対象とした食性の研究は、生態系における彼らのニッチを明らかにすることに加えて、餌動物の分布や群集構造を理解するためにも重要である(Johnson 1981). 餌動物の特定や選択性の解明は、同定作業の正確性に強く依存するため、種レベルまで餌動物を同定することでその地域の種間相互作用をより深く理解することにつながる。

猛禽類においては、ペリット分析(Korpimäki 1985; Garcia-Heras et al 2017)や胃内容物の分析(Tombäck 1975), 直接観察(Meyer et al. 2004), そして写真撮影や録画(McPherson et al. 2016)といった目視による調査方法が多く用いられてきた歴史がある。中でもペリットの分析は、一般的に使用される方法の一つであり、夜行性で直接観察が難しいフクロウ目において最も信頼できる手法であるとされている(Glading et al. 1943). しかし、ペリット分析を含む目視調査による研究では、いくつかの欠点が存在する。第一に、餌動物の種数を過小評価する可能性があげられ

る。猛禽類の多くは捕獲した餌動物をバラバラにするだけでなく、多くの部位や骨は胃液によって消化される。不完全な状況での餌動物の同定は困難なことに加えて、形態学的な種の同定には、高度な専門知識も求められる。また、採餌行動の直接観察や録画などは多くの時間を必要とするだけでなく、気象条件や使用した機器の性能によって検出結果が大きく異なる可能性があげられる(Lewis et al. 2004)。以上のことから、これまでに行われてきた猛禽類の食性解析は、技術的な制限により餌動物を種レベルまで同定することが困難であると言わざるをえない。

近年、急速に発展している手法である DNA メタバーコーディング技術は従来の食性解析手法に伴う制限を克服し、種レベルで餌動物を特定できる強力な手法となる可能性がある(De Barba et al. 2013)。この手法の食性解析への適用は、餌動物の検出精度を向上させるだけでなく、食物網の栄養カスケードの解明につながる網羅的な情報も提供してくれることが期待される(Hardy et al. 2010; Pompanon et al. 2012)。猛禽類においても雛の口内からサンプリングを行い、DNA メタバーコーディング解析を行った事例が存在するが(Nota et al. 2019)、猛禽類の雛への直接的な干渉は、甚大な調査圧力を対象種に与えることが危惧される。

そこで本研究では、ペリットや糞便、巢内に残された残渣を対象に DNA メタバーコーディング解析を用いて前例のない、調査圧力を軽減した猛禽類の網羅的な食性解析手法の確立を目的とする。

1.3. 山形県庄内地方における防砂林について

「遊佐町、酒田市、鶴岡市にまたがる庄内海岸の防砂林は、総延長 33 km、幅は 1.5 km から 3 km に及ぶ。飛砂から庄内平野の稲作や砂丘の農業を守る役割を果たしているが、400 年ほど前はうっそうとした広葉樹の森林であった。それが、年貢として納める塩の製造に用いる薪として、さらには建築用の木材として無計画に伐採が進行。豪族同士の争いも加わって、庄内砂丘は草木も生えない荒地に変わり果ててしまった。もともと砂地であったために自然に再生するのは極めて困難で、家や田畑は飛んでくる砂に埋まり、河口を塞がれた川の水は行き場を失って氾濫を繰り返し、ついには村が滅びるといふ最悪の事態に陥った。

稲作の望みがなくなり庄内藩の財政に暗い影を落とし始めたことから藩主酒井侯は 1745 年救難を志願する志士を募集した。それに応じた酒屋を営んでいた藤左エ門とその息子[藤蔵]がクロマツの植林に尽力し、砂地の改善にはネムノキが

有効であると突き止めた。この手法は現代の植林事業にも広く活用されている。藤蔵の植え付けから 250 余年、その偉業を讃えるとともに遺徳を偲ぶ[藤蔵祭り]が毎年 11 月 10 日に行われている。」(web サイト,ふれあい酒田より引用)

その後第二次世界大戦の混乱によって放置、乱伐された防砂林は再度荒廃してしまう。1960 年頃には飛砂によって砂が入り込むことから家の中でも傘をさして食事をする様子が写真に収められている。その後住民が民有林を国に寄付することで昭和 25 年に国営の海岸砂地造林事業が開始された。以降はクロマツを中心とした植栽により、防砂林・防風林として地域の農作物を守る重要な役割を担っている。

このように人間活動によって荒廃してきた海岸林は人の手によって再生されてきた歴史がある。そして現在における大きな課題として松食い虫によるクロマツの枯死問題が挙げられる。松食い虫被害は、マツノマダラカミキリとマツノザイセンチュウによって引き起こされる伝染病で、平成 28 年の被害量は 30 千 m³を超えて、過去最大の被害を記録していることから伐採や薬剤散布などの対策が行われている(庄内海岸防砂林再生計画より)。

第 2 章: DNA メタバーコーディングを用いた猛禽類の食性解析

2.1. 背景

調査対象種としてオオタカ(*Accipiter gentilis*), ノスリ(*Buteo japonicus*), ミサゴ(*Pandion haliaetus*), トラフズク(*Asio otus*), そしてフクロウ(*Strix uralensis*)の 5 種を選定し、上述した課題に焦点を絞った調査を行うことにした。

オオタカは北半球のユーラシア大陸から北アメリカ大陸に至る亜寒帯と温帯地域に広く分布している。日本においても北海道から本州の広い範囲で繁殖を行っている。絶滅危惧 II 類に指定されていたが、近年の個体数推定の変化からレッドリストの改訂により準絶滅危惧に変更されていた(環境省 2019)。それに伴い平成 29 年 8 月 29 日閣議決定の「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律施行令の一部を改正する政令」によって「国内希少野生動植物種」から解除された。このような背景から日本においても研究が盛んに行われており、鳥綱を好んで捕食する習性を持つ(Mizumura et al. 2018)。

ノスリはシベリア、モンゴル、中国、日本に分布し、平地から山地の森林に生息する。食性は動物食で節足動物や、両生類、爬虫類、鳥類、小型哺乳類などを捕食することが知られている。

ミサゴは極地を除く全世界に分布し、ユーラシア大陸や北アメリカ大陸の亜寒帯や温帯地域などで繁殖する。日本においては留鳥として全国に分布する。主に魚を専食することが知られているが、爬虫綱や鳥綱などを捕食する事例も確認されている。食性解析事例が国内外に存在するが、そのいずれも直接観察やカメラによる映像分析によるものである(馬場 2005; Kalvans and Bajinskis 2016)。他の猛禽類と異なり、ペリットはほとんど吐かないことが知られている(風間 1997)。

フクロウはスカンジナビア半島からユーラシア大陸北部にかけて帯状に広く分布し、日本においても留鳥として九州以北から北海道にかけて広く分布している。夜行性鳥類のため食性解析は主にペリット分析が用いられているが、巣箱に設置したカメラによる映像分析なども行われている(白石ら 2007; 米田 1979)。いずれの研究においてもフクロウの餌資源の組成は哺乳類、特に小型の哺乳類が大半を占めているとされている。本種は木のウロなどに営巣し、ペリットを含め、食べ残しや糞などを巣内にため込むことが知られている。

トラフズクは、英国およびヨーロッパ西部、南西アフリカからオホーツク沿岸域、北日本、北アメリカに生息する中型のフクロウ目に属する猛禽類である(König and Weick 2008)。夜行性の猛禽類である本種の食性は、直接観察が困難であることから主にペリット分析によって明らかにされており、様々な地域においてペリット分析が行われている(Tome 1994; Zaho et al. 2011)。しかし、日本や中国などのアジア地域における研究例は少なく、これらの研究はいずれも目視による調査結果であり、序論で述べたペリット分析の手法を完全には克服できていないと考えられる(Chiba et al. 2005; 平野 2005; Zhao et al. 2011)。

これら5種の猛禽類は目視による分析によって多くの先行研究が存在し、食性についても一定の知見が得られている。加えて、これらの種に対してDNAメタバーコーディングによる食性解析は行われておらず、先行研究と比較を行うことで、DNAメタバーコーディングが食性解析手法として有効か検証できると考えた。本章ではオオタカとノスリに対してDNAの混入に配慮したサンプル採取手法の検討を行う。ペリットの採取が困難なミサゴとフクロウに対しては、それぞれ巣内に残された残渣と、糞便に対するDNAメタバーコーディングによる食性

解析を実施する。トラフズクに関しては落下してから時間の経過したペリットを対象に解析を実施した。

2.2. 手法

2.2.1. DNA の混入に配慮したサンプル採取手法の検討

山形県庄内地方のクロマツ林を調査対象地とした。周囲は畑に囲まれており、格子状にクロマツ林が形成されている。詳細な地点は猛禽類の生息地保護の観点から記載を控える。サンプルの採取は猛禽類の繁殖期にあたる 2019 年 5 月 30 日から 2019 年 7 月 11 日までの間に行った。DNA の混入によるサンプルの汚染を防ぐ目的でビニールシートをオオタカとノスリ、ミサゴの営巣木の下に設置した後、3 日間連続で訪れ、シートの上に落下したペリットと糞便を採取した。同時に営巣木を中心に周囲 5 m 程度の範囲を踏査し、地面に落下していたペリットも採取した。フクロウは営巣に利用していたクロマツのウロより、巣内に残されていた残渣を 100 g 程度採取した。トラフズクは営巣が確認された地点の周辺を踏査し、地面に落下していたペリットを採取した。ミサゴに関しては同様の手法で気仙沼市舞根地区の海岸林においても糞便の採取を行った。採取したサンプルはそれぞれ 50 ml ファルコンチューブに入れた後に、冷凍保存した。

営巣木下に設置したシート上からオオタカのペリットが 3 つ、ノスリのペリットが 3 つ採取された。またそれぞれ 9 個、12 個の落下していたペリットも採取された。ノスリのペリットはミサゴについては、気仙沼市舞根地区の営巣地において 1 つの糞便が採取された。庄内地域のミサゴからは十分なサンプルを採取することができなかったため、解析には気仙沼のものを用いた。

2.2.2. DNA メタバーコーディング解析

解析にはそれぞれ、オオタカの営巣木周辺の地面に落下していたペリット 3 つをまとめたものと、6 月 29 日にシートの上に落下したペリット 1 つ、ノスリの巣の周辺に落下していたペリットとシート上に落下していたペリット 1 つずつ、そしてフクロウが営巣したウロに残されていた残渣を用いた。トラフズクに関しては営巣が確認できた場所周辺に落下していたペリットを 2 つまとめて解析に用いた。それぞれのサンプルを凍結乾燥し、攪拌した後に 15 g ずつ取り出し、NucleoSpin Plant II Maxi Kit (U0772A; TaKaRa, Japan)を用いて DNA 抽出を行っ

た. 気仙沼市舞根地区で採取したミサゴの糞便は GenCheck®DNA extraction Kit Type S/F (GC002-1N; FASMAG, Japan)を用いて DNA 抽出を行った.

オオタカ, ノスリ, フクロウ, トラフズクのサンプルから抽出した DNA 溶液に対する 1st PCR には, 真核生物全般の検出を可能とするミトコンドリア DNA における COI(cytochrome oxidase subunit I)領域の一部を対象とした COI プライマーセット, 哺乳綱の特異的な検出を目的として設計された, ミトコンドリア DNA における 12S 領域の一部を対象とした MiMammal プライマーセット, そして鳥綱の特異的な検出を目的として設計された, ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域の一部を対象とした gBird プライマーセットを用いた(表 1). ミサゴの糞便から抽出した DNA 溶液に対する PCR には魚類の検出を目的として設計されたミトコンドリア DNA の 12s rRNA 領域の一部を対象とした Mifish プライマーセットを用いた(Miya et al. 2015)(表 3). フォワードプライマー(IntF, MiMammal-U-F, MiMammal-E-F, MiMammal-B-F, gBirdF, Mifish-U-F, Mifish-E-F)には領域特異的配列とアダプター配列: 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' を, リバースプライマー (HCOmR, MiMammal-U-R, MiMammal-E-R, MiMammal-B-R, gBirdR, Mifish-U-R, Mifish-E-R)には領域特異的配列とアダプター配列: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3' を付加して設計した. DNA ライブラリーは上記プライマーセットを用いて, 2-Step taild PCR 法によって調整した(Miya et al. 2015). 標的アンプリコンに対して 600-cycle MiSeq Reagent Nano Kit v3 (MS-102-3003; Illumina, US) を用いて MiSeq シーケンス解析を行った. MiSeq によって取得されたシーケンスに基づいて種の同一性を判断するために, FASTX Toolkit のコンポーネントである FASTQ Barcode Splitter を使用してデータを処理し, 使用したプライマーと一致する読み値を持つ配列のみを抽出した. プライマー配列と 20 塩基未満の配列は, Sickle tool を使用して MiSeq 分析から得られた読み取り配列から削除した.

40 塩基以下のシーケンスはペアシーケンスとともに破棄した. FLASH ツールを使用して高品質のペアリードを結合し, USEARCH とバインディングシーケンスを使用して OTU (操作上の分類単位) クラスタリングを実行した. 相同性が 97%を超える配列リードを抽出し, OTU を nr データベースに対して BLAST 検索し, 系統推定を行った. 系統推定によりバクテリアなどの原核生物が検出された場合はプライマーのミスマッチとして結果から除外した. 同時に MiMammal プライマーセットと gBird プライマーセットを使用して得られた配列リードに対する

系統推定によって真菌が検出された場合もプライマーのミスマッチとみなして結果から除外した。ミサゴ、フクロウのサンプルから得られた配列リードに対する系統推定によって得られた真菌は、猛禽類が利用している餌動物ではなく DNA の混入によるものが明確なため、結果から除外した。次世代シーケンサーを用いた塩基配列の特定は株式会社生物技研に委託した。

表 1. 1st PCR に用いたプライマーセット一覧

本研究の DNA メタバーコーディング解析における 1st PCR に用いられたプライマーセット一覧を示す。MiMammal プライマーセットに関しては検出率の向上のため 3 種類のプライマーを混合して使用した(Ushio et al. 2016)。

Primer Name	Gene	5'-3' sequence of primer tail	5'-3' sequence of primer
IntF	CO1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC
HCOmR	CO1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	TAHACTTCNGGGTGKCCRAARAATCA
MiMammal UEBmixF	mitochondrial 12S rRNA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	NNNNNNGGGTTGGTAAATTCGTGCCAGC
			NNNNNN GGACTGGTCAATTCGTGCCAGC
			NNNNNN GGGTTGGTTAATTCGTGCCAGC
MiMammal UEBmixR	mitochondrial 12S rRNA	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	NNNNNNCATAGTGGGTATCTAATCCAGTTTG
			NNNNNN CATAGTGAGGTATCTAATCTCAGTTTG
			NNNNNN CATAGTGGGTATCTAATCCAGTTTG
gBird F	mitochondrial 16S rRNA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	NNNNNNCAAGTATTGAAGGTGATG
gBird R	16S rRNA	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	NNNNNNCCCTGGGGTAGCTTGG

表 2. 1st PCR に用いた Mifish プライマーセットの塩基配列

ミサゴの糞便に対する DNA メタバーコーディング解析における 1st PCR に用いられた Mifish プライマーセットの塩基配列を示す。Mifish プライマーセットは検出率の向上のため 2 種類のプライマーを混合して使用した(Miya et al. 2016)。

Primer name	Gene	5'-3' sequence of primer tail	5'-3' sequence of primer
Mifish-UEmix-F	mitochondrial 12S rRNA	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'	5'-GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC-3' 5'-GTTGGTAAATCTCGTGCCAGC-3'
Mifish-UEmix-R	mitochondrial 12S rRNA	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'	5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG-3' 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG-3'

2.3. 結果

2.3.1. プライマーセットの併用は餌動物の網羅的な検出を可能にする

営巣木の下に設置したシート上に落ちたオオタカのペリットに対する DNA メタバーコーディング解析とデータ処理の結果、それぞれ COI プライマーセットとして 31389 リード、MiMammal プライマーセットとして 37896 リード、gBird プラ

イマーセットとして 13777 リードが得られた。読み取った塩基配列から種レベルまで餌動物を分類すると、3 種の鳥綱、2 種の節足動物そして 1 種類の真菌が検出された(表 3)。地面に落下したオオタカのペリットに対する DNA メタバーコーディング解析とデータ処理の結果、それぞれ COI プライマーセットとして 26221 リード、MiMammal プライマーセットとして 4493 リード、gBird プライマーセットとして 58773 リードが得られた。読み取った塩基配列から種レベルまで餌動物を分類すると、4 種の鳥綱、7 種の節足動物そして 9 種の真菌が検出された(表 4)。シートの上に落下していたノスリのペリットに対する DNA メタバーコーディング解析とデータ処理の結果、それぞれ COI プライマーセットとして 16358 リード、MiMammal プライマーセットとして 54092 リード、gBird プライマーセットとして 22467 リードが得られた。読み取った塩基配列から種レベルまで餌動物を分類すると、5 種の鳥綱、1 種の哺乳綱そして 1 種の爬虫綱が検出された(表 5)。フクロウの巣に残された残渣に対する DNA メタバーコーディング解析とデータ処理の結果、それぞれ COI プライマーセット: 15008 リード、MiMammal プライマーセット: 45853 リード、gBird プライマーセット: 24105 リードが得られた。読み取った塩基配列から種レベルまで餌動物を分類すると、16 種の鳥綱、6 種の哺乳綱、16 種の真菌が検出された(表 6)。モウコアカモズ(*Lanius isabellinus*)、タカサゴモズ(*Lanius schach*)がそれぞれ MiMammal プライマーセットと gBird プライマーセットによって検出されているが、調査地である山形県には分布していないため、近縁種であるモズ(*Lanius bucephalus*)、もしくはチゴモズ(*Lanius tigrinus*)の DNA データベースが未登録であるために検出された可能性が高い、同様の理由により、MiMammal プライマーセットにおいてキクチハタネズ(*Microtus kikuchi*)が検出されているのは近縁種であるハタネズミ(*Microtus montebelli*)を検出している可能性が高い。ミサゴの糞便に対する DNA メタバーコーディング解析とデータ処理の結果、Mifish プライマーセットとして 40645 リードが得られ、読み取った塩基配列から種レベルまで餌動物を分類すると、ブリ(*Seriola quinqueradiata*)が検出され、データベースとの一致率は 100%であった。ノスリの地面に落下していたペリットとトラフズクの地面に落下していたペリットからは十分な DNA の増幅が見られず、解析には用いることができなかった。

2.3.2. 営巣木下へのシート設置と高頻度でのサンプル採取は DNA の混入を低減する

営巣木の下に設置したシートと高頻度でのサンプル採取によって、DNAの混入が低減され、DNAメタバーコーディングによる餌動物の検出率が向上するの
かについて検証を行った。オオタカの営巣木周辺の地面に落下していたペリット
と、設置したシートの上に落下していたペリットから得られた結果を比較する
と、小型の節足動物や菌類などの検出種数は16種から3種に、リード数は21
494から11987へと著しく減少した(表4, 表5)。以上の結果から、猛禽類のペリ
ットや糞便などのサンプル採取におけるシートの設置と高頻度でのサンプル採取
はDNAの混入を低減させ、餌動物の検出率を上昇させることを示されたと言え
る。

表3. オオタカの営巣木下に設置したシート上に落下したペリットから検出された生物種一覧

検出された生物のリード数とデータベースとの一致率が示されている。キジバト、ムクドリに加
えてオオタカが主に検出され、解析に使用したペリットを吐き出した個体が、キジバトとムクドリ
を捕食していたことがわかる。DNAの混入によって種の同定に至らなかったものも含めて節足動物
2種と菌類1種が検出された。

Primer name	Avan			Arthropod			Fungi		
	Reads	Spices	Identify	Reads	Spices	Identify	Reads	Spices	Identify
COI	12 244	<i>Streptopelia orientalis</i>	99.4%	7 255	<i>Anthomyia sp</i>	99.4%	48	<i>Galactomyces candidum</i>	100%
	6 737	<i>Accipiter gentilis</i>	100.0%	4 684	<i>Lasius platythorax</i>	98.4%			
	421	<i>Sturnus cineraceus</i>	100.0%						
MIMammal	30 184	<i>Streptopelia orientalis</i>	100.0%						
	7 564	<i>Accipiter gentilis</i>	100.0%						
	148	<i>Sturnus cineraceus</i>	100.0%						
gBird	12 059	<i>Streptopelia orientalis</i>	100.0%						
	1 662	<i>Accipiter gentilis</i>	100.0%						
	56	<i>Sturnus cineraceus</i>	100.0%						

表4. 地面に落下していたオオタカのペリットから検出された生物種一覧

検出された生物のリード数とデータベースとの一致率が示されている。鳥綱はオオタカ、キジバ
ト、ムクドリ、キジが検出された。COIプライマーセットによって種の同定に至らなかった結果も
含めて、節足動物7種、真菌9種が検出された。

Primer name	Avian			Arthropod			Fungi		
	Reads	Species	Identify	Reads	Species	Identify	Reads	Species	Identify
COI	2307	<i>Accipiter gentilis</i>	100%	1424	<i>Scaptomyza pallida</i>	99.0%	9764	<i>Mucor circinelloides</i>	100%
	2123	<i>Streptopelia orientalis</i>	100%	4684	<i>Lasius platythorax</i>	98.4%	2660	<i>Fusarium cf</i>	100%
	226	<i>Phasianus versicolor</i>	100%	785	<i>Musca domestica</i>	99.7%	977	<i>Colletotrichum acutatum</i>	100%
	71	<i>Sturnus cineraceus</i>	100%	74	<i>Monopis pavlovskii</i>	100%	591	<i>Nectria haematococca</i>	100%
				47	<i>Monopis longella</i>	100%	276	<i>Dulymella pinodes</i>	97.7%
			44	<i>Pineus boernerii</i>	100%	66	<i>Fusarium babinda</i>	98.7%	
			37	<i>Hemiptera.sp</i>	97.4%	42	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	100%	
						16	<i>Trichoderma gamsii</i>	99%	
						7	<i>Lecanicillium lecanii</i>	99.4%	
MiMammal	2433	<i>Streptopelia orientalis</i>	100%						
	1882	<i>Accipiter gentilis</i>	100%						
	141	<i>Phasianus versicolor</i>	100%						
	37	<i>Sturnus cineraceus</i>	100%						
gBird	23451	<i>Streptopelia orientalis</i>	100%						
	23303	<i>Accipiter gentilis</i>	100%						
	12019	<i>Phasianus versicolor</i>	100%						

表 5. シート上に落下していたノスリのペリットから検出された生物種一覧

検出された生物のリード数とデータベースとの一致率が示されている。鳥綱はノスリ、ハクセキレイ、キジ、モズ、モウコアカモズ、キジバトが検出された。哺乳綱はキクチハタネズミ(ハタネズミ)が、爬虫綱はシマヘビがそれぞれ検出された

Primer name	Avian			Mammal			Reptiles		
	Reads	Species	Identify	Reads	Species	Identify	Reads	Species	Identify
COI	14697	<i>Buteo rufinus</i>	99.4%				48	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	100%
	604	<i>Phasianus versicolor</i>	100.0%						
	379	<i>Motacilla alba</i>	100.0%						
	21	<i>Lanius bucephalus</i>	100.0%						
MiMammal	25210	<i>Buteo japonicus</i>	100.0%	24750	<i>Microtus kikuchii</i>	97.60%			
	654	<i>Motacilla alba</i>	100.0%						
	455	<i>Lanius isabellinus</i>	100.0%						
	27	<i>Phasianus versicolor</i>	98.9%						
gBird	21973	<i>Buteo regalis</i>	99.2%						
	168	<i>Phasianus versicolor</i>	98.4%						

表 6. フクロウの巣内に残された残渣から検出された生物種一覧

検出された生物のリード数とデータベースとの一致率が示されている。鳥綱はフクロウ、カワラヒワ、キジバト、ツグミ、ホシムクドリ、シメ、ホオジロ、ヒヨドリ、メジロ、モズ、アオジ、シロハラ、アトリ、シジュウカラ、モウコアカモズ、タカサゴモズが検出された。哺乳綱はヒミズ、アズマモグラ、キクチハタネズミ、クマネズミ、ジネズミ、ドブネズミが検出された。COI プライマーセットによって種の同定に至らなかったものも含めて、節足動物 16 種が検出された。

Primer name	Avian			Mammalia			Arthropod		
	Reads	Species	Identify	Reads	Species	Identify	Reads	Species	Identify
COI	5572	<i>Strix uralensis</i>	100%	37	<i>Rattus flavipectus</i>	100%	1927	<i>Ceratophyllidae sp</i>	98.7%
	3428	<i>Carduelis sinica</i>	100%	11	<i>Rattus norvegicus</i>	100%	418	<i>Carnus hemapterus</i>	100%
	1889	<i>Sturnus cineraceus</i>	100%				131	<i>Martynia ussuriella</i>	99.4%
	1526	<i>Streptopelia orientalis</i>	100%				57	<i>Muscina stabulans</i>	100%
	488	<i>Turdus naumanni</i>	100%				57	<i>Carcinops pumilio</i>	100%
	299	<i>Sturnus vulgaris</i>	100%				44	<i>Pimeas boernerii</i>	100%
	248	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	100%				36	<i>Bourletiellidae sp</i>	99.0%
	94	<i>Emberiza cioides</i>	100%				23	<i>Periplaneta japonica</i>	100%
	41	<i>Microscelis amaurotis</i>	100%				21	<i>Neossos broerseii</i>	99%
	33	<i>Zosterops japonicus</i>	100%				16	<i>Colobopyga pritchardiae</i>	100%
	26	<i>Lanius bucephalus</i>	100%				12	<i>Eupodilus sp</i>	98.7%
	24	<i>Schoenichus spodoccephala</i>	100%				12	<i>Tydeidae sp</i>	100%
	22	<i>Turdus poliochus</i>	100%				10	<i>Pyralis farinalis</i>	100%
	13	<i>Fringilla montifringilla</i>	99.7%				8	<i>Apanteles sp</i>	100%
							5	<i>Polistes rothneyi</i>	100%
						6	<i>Noctuidae sp</i>	100%	
Mammal	12000	<i>Carduelis sinica</i>	100%	12848	<i>Urotrichus talpoides</i>	97.2%			
	6026	<i>Streptopelia orientalis</i>	100%	5506	<i>Mogera imazumii</i>	100%			
	2232	<i>Strix uralensis</i>	100%	4798	<i>Microtus kikuchii</i>	97.6%			
	294	<i>Emberiza cioides</i>	99.5%	1006	<i>Rattus tanezumi</i>	100%			
	169	<i>Fringilla montifringilla</i>	100%	517	<i>Crocodyra dsinezumi</i>	100%			
	119	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	100%	321	<i>Rattus norvegicus</i>	100%			
	17	<i>Lanius isabellinus</i>	100%						
gBird	10631	<i>Carduelis sinica</i>	100%						
	7562	<i>Streptopelia orientalis</i>	100%						
	2744	<i>Turdus eunomus</i>	100%						
	1397	<i>Strix uralensis</i>	99.5%						
	1055	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	99.7%						
	415	<i>Lanius schach</i>	99.7%						
	178	<i>Sturnus vulgaris</i>	100%						
67	<i>Fringilla montifringilla</i>	100%							
56	<i>Parus major</i>	100%							

2.4. 議論

本項では、オオタカに対してシートを設置と高頻度でのペリット採取によるサンプル採取手法の改善と、3種のプライマーセットの併用がDNAメタバーコーディングによる餌動物の検出率を向上させることを示した。またフクロウとミサゴを対象に、巣内に残された残渣や糞便などからもDNAメタバーコーディングを用いることで餌動物を網羅的に検出可能であることも判明した。ここでは、1)複数のプライマーセットを併用したことで検出された餌動物について、2)営巣木下に設置したシートと高頻度のサンプル採取によるDNAの混入防止について議論していく。

2.4.1. 複数のプライマーセットの併用によって餌動物の検出率が向上する可能性

鳥糞に対するDNAメタバーコーディングによる食性解析の事例としてチャカタルリツグミ(*Sialia mexicana*)やミナミミズツグミ(*Parkesia motacilla*)などの糞便を用いた解析や(Vo and Jedlicka. 2014; Trebelline et al. 2016), ハイロチュウヒの雛の口内からDNAを採取する手法などがこれまでに用いられている(Nota et al.

2019). いずれの研究においても1つの分類群に対して1種類のプライマーセットを用いて解析を行っている.

本研究では猛禽類が吐き出したペリット, 糞便, 巣内に残した残渣に対して DNA メタバーコーディング解析を行い, サンプルに対して同一の分類群に属する餌動物の検出が可能な3種類のプライマーセット(COI, MiMammal, gBird)を併用して DNA メタバーコーディング解析を行った. COI プライマーセットと gBird プライマーセットを用いた場合, 原理上は餌動物として同一の鳥綱が検出されるはずだが, 得られた結果には差異が多く見られた. 例えば, 地面に落下していたオオタカのペリットからはキジバト(*Streptopelia orientalis*), ムクドリ(*Sturnus cineraceus*), そしてキジ(*Phasianus versicolor*)が餌動物として検出されたが, gBird プライマーセットではムクドリが検出されなかった(表 4). 同様にフクロウの巣内に残された残渣からは餌動物としてカワラヒワ(*Carduelis sinica*), キジバト, ツグミ, ホシムクドリ(*Sturnus vulgaris*), シメ(*Coccothraustes Coccothraustes*), ホオジロ, ヒヨドリ, メジロ(*Zosterops japonicus*), モズ, アオジ(*Schoeniclus spodocephala*), シロハラ(*Turdus pallidus*), アトリ(*Fringilla montifringilla*), シジュウカラ(*Parus major*), ヒミズ(*Urotrichus talpoides*), アズマモグラ(*Mogera imaizumii*), ハタネズミ, クマネズミ(*Rattus tanezumi*), ジネズミ(*Crocidura dsinezumi*), そしてドブネズミ(*Rattus norvegicus*)が検出されたが, ヒヨドリ, メジロ, アオジ, そしてシロハラは COI プライマーセットでのみ検出され, ヒミズ, アズマモグラ, クマネズミ, そしてジネズミは MiMammal プライマーセットでのみ検出された. シジュウカラは gBird プライマーセットでのみ検出された(表 6). このように, 1つのサンプルに対する DNA メタバーコーディング解析において, 使用するプライマーセットによって検出される種に差異が生じた要因に, PCR バイアスとプライマーの親和性が影響しているものと推察される(Aird et al. 2011). 元々, 1つのプライマーセットによる評価だけでなく, 複数の塩基配列を対象とした解析を比較することで結果の信頼度を高めることが期待されていたが, 本結果はその考え方を支持するだけでなく, DNA メタバーコーディングの持つ偽陰性, 偽陽性といった課題に対して一定の成果を出すことに成功したと言える.

またフクロウの巣内に残された残渣に対する COI プライマーセットを用いた DNA メタバーコーディング解析によって, 16種の節足動物が検出された(表 6). これまでに, チョウ目やコウチュウ目がフクロウの巣内から発見されていることから(Nasu et al. 2007; 浅野ら. 2016), これらの生物が猛禽類の巣内を利用してい

る可能性を示している。これらの DNA の混入も餌動物の検出率を低下させる要因になるが、哺乳綱や鳥綱の検出を目的に作成されたプライマーセット (MiMammal や gBird) を併用することで、節足動物の検出を排除した網羅的な餌動物の検出が可能になる。

2.4.2. 営巣木下に設置したシートと高頻度のサンプル採取による DNA の混入防止について

本項ではオオタカの吐き出すペリットを対象として DNA メタバーコーディング解析を行った。ペリットは鳥類の前胃や腺胃で消化できなかった餌動物の骨や羽、嘴、爪、昆虫の外骨格などがまとめて吐き出されたものであるため、ハイタカ *Accipiter nisus* のペリットからウスグロイガ *Niditinea baryspilas* が発生するなど (那須ら, 2007)、節足動物や微生物などがよく利用することが知られている。実際に筆者も地面に落下したペリットを摂食しているオオヒラタシデムシ *Necrophila japonica* を観察している。DNA メタバーコーディング解析は非常に検出精度が高いため、地面に落ちて時間が経過したペリットを解析に用いると、それらを利用する節足動物や菌類、微生物などの DNA が混入し、検出されてしまうと推察される。DNA メタバーコーディング解析は、読み込める塩基配列量が限られており、餌動物ではない生物の DNA の混入が起きてしまうと検出率が低下するが、シートを設置し、高頻度で新鮮なサンプルを採取したことで、DNA の混入や微生物、細菌の増殖を低減させることに成功したと推察される。

第 3 章：総括

DNA メタバーコーディングを用いて庄内地方に生息する猛禽類 5 種の食性解析に取り組んだ。結果としてトラフズクとミサゴは庄内に生息する個体からの解析は行うことができなかったが、オオタカ、ノスリ、フクロウに関しては餌動物の種まで特定することができた。中でもオオタカ、フクロウが捕食していたムクドリは庄内梨や庄内メロンといった地域の特産品への鳥獣被害をもたらしており、平成 30 年度の被害額は 1,605,000 円にも及ぶ(平成 30 年度野生鳥獣による農作物の被害状況調査)。またノスリやフクロウが捕食していたハタネズミなども水田の畔やビニールハウスなどに穴をあけるなどの被害が出ている(清水聞き取り)、ことから防砂林を営巣地として利用している猛禽類はこれらの鳥獣の個体数調整に大きな役割を担っているものと推察される。

庄内地方の海岸林は松食い虫の影響でクロマツ林に隙間があいたことから、そこに入り込む広葉樹が多く見られ、針葉樹と広葉樹の混合林化が進んでいる。移入種であるニセアカシアが多く進入していた時期もあったが、除根や除草剤を利用した駆除が精力的に行われてきた結果、ニセアカシアが優占する林は激減し、代わりにムベやカシワなどが増加傾向にある。このように単一なクロマツ林から様々な樹種が混じる混合林となることで、単純一斉林だったころと比べてその生物多様性は高くなってきている(庄内海岸砂防林再生計画)。

本研究によって猛禽類は中型、小型鳥類、小型哺乳類だけでなく、中間捕食者として重要な爬虫類を捕食しており、庄内海岸の防砂林の頂点捕食者として周囲の生態系に大きな影響を与えていることが判明した。また、沿岸地域の主要な農作物であるメロンや梨、柿などに被害を与えるムクドリやネズミ類を捕食していることから、それらの被害を軽減する益鳥としての側面も持ち合わせていると考えられる。

今後はさらにサンプル数を増やし、海岸林を利用している猛禽類がどのように棲み分けているのかなどについて研究を行っていきたいと考えている。また、2020年度5月に再度庄内地方の海岸林を訪れ、2019年度の巣の下にシートを設置する調査による影響の確認を行なった。その結果、いずれの巣においても再度の営巣が確認され、シートを設置することによる調査圧力も猛禽類が営巣地を放棄するほどではないことを確認した。

参考文献 別紙に記載。

謝辞

本研究はタカラハーモニストファンด์のご支援のおかげで実施することができました。この場を借りて御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

参考文献リスト

- Ahmet, Y.S., Kemal, B., and Haluk K (2017) Comparison of winter diet of long-eared owls *Asio otus* (L., 1758) and short-eared owls *Asio flammeus* (Pontoppidan, 1763) (Aves: Strigidae) in Northern Turkey. *Acta Zool Bulgar* 69: 345–348.
- Aird, D., Ross, G.M., Chen, W., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, B.D., Nusbaum, C., and Gnirke, A. (2011) Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol* 12: R18. [PMID: 21338519]
- Andujar C, Arribas P, Yu DW, Vogler AP and Emerson BC (2018) Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the metazoa. *Mol Ecol* 27: 3968–3975. [PMID: 30129071]
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., and Taberlet, P. (2013) DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Mol Ecol Resour* 14: 306–323. [PMID: 24128180]
- Bálint, M., Nowak, C., Márton, O., Pauls, U.S., Wittwer, C., Aramayo, L.J., et al (2018) Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Mol Ecol Resour* 18: 1415–1426. [PMID: 30155977]
- Birrer, S. (2009) Synthesis of 312 studies on the Diet of the Long-eared owl *Asio otus*. *Ardea* 97: 615–624.
- Bohmann, K., Gopalakrishnan, S., Nielsen, M., Nielsen, L.D.S.B., Jones, G., Streicker, D.G., et al (2018) Using DNA metabarcoding for simultaneous inference of common vampire bat diet and population structure. *Mol Ecol Resour* 18:1050-1063. [PMID: 29673092]
- Chiba, A., Onojima, M., and Kinoshita, T. (2005) Prey of the long-eared owl *Asio otus* in the suburbs of Niigata City, central Japan, as revealed by pellet analysis. *Ornithol Sci* 4: 169–172.
- Ciesielska, A., Kornilowicz-Kowalska, T., Kitowski, I., and Bohacz, J. (2017) The dispersal of rodent-borne strains of *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* by pellets of predatory birds. *Avian Biol Res* 10: 218–230.
- Croll, D. A., Maron, J. L., Estes, J. A., Danner, E. M., and Byrd, G. V. (2005) Introduced predators transform subarctic islands from grassland to tundra. *Science*, 307: 1959–1961. [PMID: 15790855]
- Emin, D., Toxopeus, G.A., Groen, A.T., Kontogeorgos, I., Georgopoulou, E., and Xirouchakis, S. (2018) Home range and habitat selection of long-eared Owls (*Asio otus*) in Mediterranean agricultural landscape (Crete, Greece). *Avian Biol Res* 11: 204–218.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vriegenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotech* 3: 294–299. [PMID: 7881515]
- Garcia-Heras, M. S., Mougeot, F., Arroyo, B., Avery, G., Avery, M., and Simmons, R. E. (2017) Is the Black Harrier *Circus maurus* a specialist predator? Assessing the

- diet of a threatened raptor species endemic to southern Africa. *Ostrich*, 88: 1–8.
- Glading, B., Tillotson, D.F., and Selleck, D.M. (1943) Raptor pellets as indicators of food habits. *Calif Fish Game* 29: 92–121.
- Göçer, E. (2016) Diet of a nesting pair of Long-eared Owls, *Asio otus*, in an urban environment in southwestern Turkey (Aves: Strigidae). *Zoology in the middle east* 25-28.
- Gryz, J., and Krauze-Gryz, D. (2015) Seasonal variability in the diet of the long-eared owl *Asio otus* in a mosaic of field and forest habitats in central Poland. *Acta Zool Cracov* 58: 173–180.
- Hardy, C.M., Krull, E.S., Hartley, D.M., and Oliver, R.L. (2010) Carbon source accounting for fish using combined DNA and stable isotope analyses in a regulated lowland river weir pool. *Mol Ecol* 19: 197–212. [PMID: 19912537]
- Korpimäki, E. (1985) Diet of the Kestrel *Falco tinnunculus* in the breeding season. *Ornis Fennica* 62: 130–137.
- Lewis, S.B., Fuller, R.A. and Titus, K. (2004) A comparison of 3 methods for assessing raptor diet during the breeding season. *Wildl Soc Bull* 32: 373–385.
- McPherson, S.C., Brown, M., and Downs, C.T. (2016) Diet of the crowned eagle (*Stephanoaetus coronatus*) in an urban landscape: potential for human-wildlife conflict? *Urban Ecosyst* 19: 383–396.
- Meyer, K.D., McGehee, S.M., and Collopy, M.H. (2004) Food deliveries at swallow-tailed kite nests in southern Florida. *Condor* 106: 171–176.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., et al (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci* 2: 150088. [PMID: 26587265]
- Nasu, Y., Murahama, S., Matsumoro, H., Hashiguchi, D. and Murahama, C. (2007) First record of Lepidoptera from Ural owl nests in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 42: 607-612.
- Nota, K., Downing, S., and Iyengar, A. (2019). Metabarcoding - based dietary analysis of hen harrier (*Circus cyaneus*) in Great Britain using buccal swabs from chicks. *Conservation Genetics*, 20:1389–1404.
- Oehm, J., Juen, A., Nagiller, K., Neuhauser, S., and Traugott, M. (2011) Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Mol Ecol Resour* 11: 620–628. [PMID: 21676193]
- Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O., Brown, D.S., Jarman, S.N., and Taberlet, P. (2012) Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Mol Ecol* 21: 1931–1950. [PMID: 22171763]
- Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M. et al. (2014) Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* 343: 1241484. [PMID: 24408439]

- Rodríguez-Estrella, R., Estrada, C. G., Alvarez-Castañeda, S. T., and Ferrer-Sánchez, Y. (2019) Comparing individual raptor species and coarse taxonomic groups as biodiversity surrogates in desert ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 28: 1225–1244.
- Sergio, F., Caro, T., Brown, D., Clucas, B., Hunter, J., Ketchum, J., ... Hiraldo, F. (2008) Top Predators as Conservation Tools: Ecological Rationale, Assumptions, and Efficacy. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 1–19.
- Sergio, F., Marchesi, L., Pedrini, P., and Penteriani, V. (2007) Coexistence of a generalist owl with its intraguild predator: distance-sensitive or habitat-mediated avoidance? *Animal Behaviour*, 74: 1607–1616.
- Sheppard, S.K., Bell, J., Sunderland, K.D., Fenlon, J., Skervin, D., and Symondson, W.O.C. (2005) Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators. *Mol Ecol* 14: 4461–4468. [PMID: 16313606]
- Sinclair, A.R., Mduma, S., and Brashares, J.S. (2003) Patterns of predation in a diverse predator–prey system. *Nature* 425: 288–290. [PMID: 13679915]
- Sullins, D.S., Haukos, D.A., Craine, J.M., Lautenbach, J.M., Robinson, S.G., Lautenbach, J.D., et al (2018) Identifying the diet of a declining prairie grouse using DNA metabarcoding. *The Auk* 135: 583–608.
- Terborgh, J., Lopez, L., Nuñez, P. V., Rao, M., Shahabuddin, G., Orihuela, G., ... Balbas, L. (2001). Ecological meltdown in predator-free forest fragments. *Science*, 294: 1923–1926. [PMID: 11729317]
- Tian, L., Zhou, X., Shi, Y., Guo, Y., and Bao, W. (2015) Bats as the main prey of wintering long-eared owl (*Asio otus*) in Beijing: Integrating biodiversity protection and urban management. *Integr Zool* 10: 216–226.
- Tinajero, R., Barragán, F., and Chapa-Vargas, L. (2017). Raptor Functional Diversity in Scrubland-Agricultural Landscapes of Northern-Central-Mexican Dryland Environments. *Tropical Conservation Science*, 10: 194008291771242. [PMID: 25316405]
- Tomback, DF. (1975) An emetic technique to investigate food preferences. *The Auk* 92: 581–583.
- Tome, D. (1994) Diet composition of the long-eared owl in central Slovenia: seasonal variation in prey use. *J Raptor Res* 28: 253–258.
- Trevelline, B.K., Latta, S.C., Marshall, L.C., Nuttle, T., Porter, B.A. (2016) Molecular analysis of nestling diet in a long-distance Neotropical migrant, the Louisiana Waterthrush (*Parkesia motacilla*). *The Auk* 131: 415–428.
- Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., et al (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol Ecol Resour* 17: 63–75. [PMID: 28603873]
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.E., et al (2016)

- Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol* 25: 929–942. [PMID: 26479867]
- Vo, A.T., and J.A. Jedlicka. (2014) Protocols for metagenomic DNA extraction and Illumina amplicon library preparation for faecal and swab samples. *Molecular Ecology Resources* 14:1183–1197. [PMID: 24774752]
- Yoccoz, N. G. (2012). The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology*, 21: 2031–2038
- Zhao, W., Shao, M., Song, S., and Liu, N. (2011) Niche separation of two sympatric owls in the desert of northwestern China. *J Raptor Res* 45: 174–179.
- 浅野涼太, 小川龍司, 佐藤悠子, 出口翔太. (2016) フクロウの巣箱からはじめて発見されたチビコブスジコガネ. *昆虫(ニューシリーズ)* 19(3): 94-96.
- 風間辰夫 (1997) ミサゴ *Pandion haliaetus* とハシブトウミガラス *Uria lomvia* の保護と放鳥. *鳥類標識誌* 12(1): 5-7.
- 川口敏, 山本貴仁. (2003) 愛媛県で越冬したトラフズクのペリットから見つかった餌動物. *日本鳥学会誌* 52(1): 29-31.
- 環境省 (2012) 猛禽類保護の進め方.
- 寒川町動植物調査. 2016
- 白石浩隆, 北原正彦. (2007) 富士山北麓における人工巣を利用したフクロウの繁殖生態と給餌食物の調査. *富士山研究*, 1: 17-23.
- 那須義次, 村濱史郎, 坂井誠, 山内健生. (2007) 日本において鳥類の巣・ペリットおよび肉食哺乳類の糞から発生したヒロズコガ(鱗翅目, ヒロズコガ科). *Jpn J Ent* 10(4): 89-97.
- 野口和恵 (2000). 大阪南港における越冬期のトラフズク *Asio otus* のペリット分析. *香川生物* 27: 27-32.
- 馬場智子 (2005) 香川県高松市屋島におけるミサゴの食性. *日本鳥学会誌* 54(1): 45-48.
- 平野敏明 (2012) 渡良瀬遊水池とその近隣農耕地におけるトラフズクの食性. *日本鳥学会誌* 61(1): 130-136.
- 米田政明 (1979) 耕地防風林におけるエゾフクロウの冬季間の食性. *山階鳥研報* 11(1): 49-53.
- 庄内海岸松原再生計画~公益の森がつくる豊かな暮らし~[改訂版] 平成31年一部改訂. 出羽庄内公益の森づくりを考える会