



環境 DNA 分析技術を用いた 調査手法の手引き (淡水魚類・両生類)

はじめて環境 DNA 分析を利用するみなさまへ

第 1 版

環境省自然環境局
生物多様性センター

はじめに

我が国では、多くの絶滅危惧種が里地里山や湿地等の二次的自然に依存しています。そうした中、人口減少、社会構造の変化などに伴い、自然に対する働きかけが縮小し、淡水魚類や両生類をはじめ、生息・生育状況が悪化した種が増えています。

このような状況を踏まえ、環境省では、淡水魚保全のための検討を行い、平成 28 年に有識者からなる淡水魚保全のための検討会により、「二次的自然を主な生息環境とする淡水魚保全のための提言」がとりまとめられ公表されています。また、平成 29 年に「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」が改正され、二次的自然に分布する種などを対象とした特定第二種国内希少野生動植物種制度が創設されました。

今後、二次的自然環境に生息する淡水魚類や両生類をはじめとした生物の保護を図るためには、生息地などの維持・管理が重要ですが、効率的・効果的に生息地の保護を進めていくためには、生物の分布情報を把握するとともに、個々の種ではなく複数の種が集中的に分布する地域を明らかにする必要があります。そうした中で、近年、新たな生物分布調査手法として、環境 DNA 調査が注目されています。環境 DNA 調査とは、水中などの環境中に含まれる「生物由来の DNA」を分析・検出する技術（以下、環境 DNA 分析という）を用いた生物調査です。国内では、平成 30 年に設立された環境 DNA 学会が中心となり、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）が公表されるなど、環境 DNA 分析を用いた生物調査の実用化に向けた取り組みが進められています。

環境省では、この新たな技術を利用して淡水魚類の分布情報の効率的かつ効果的な収集をするために、平成 30 年度から『絶滅危惧種分布重要地域抽出のための環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の標準化・一般化検討業務』において、環境 DNA 分析技術を用いた試行調査や情報収集を進めました。その成果を手引きとしてまとめ、令和 2 年 6 月に第 1 版を公開して以降、令和 2 年 7 月に第 2 版、令和 4 年 6 月に改訂第 2 版、令和 5 年 6 月には第 3 版を公開しました。両生類については、令和 3 年度より『絶滅危惧種分布重要地域抽出のための環境 DNA 分析技術を用いた両生類調査手法の標準化・一般化検討業務』において、環境 DNA 分析技術を用いた試行調査や情報収集を進め、令和 6 年度に淡水魚類の手引きに両生類に関する内容を追加した「環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）第 1 版」を公表しました※。

本手引きは、上記の業務の結果や最新の研究結果等の知見に基づき、淡水魚類（主に二次的自然環境に生息する種）および両生類を対象に、これから環境 DNA 調査の導入を検討されている地方行政機関や保全団体の方々へ、環境 DNA 調査（特に網羅的解析法）について理解を深めていただき、効果的に活用していただくことを目的としてまとめたものです。

今後、本手引きにより、環境 DNA 分析を、種の分布情報の把握、希少種保全の推進や外来種対策の強化などの生物多様性保全施策へ活用していただきたいと思います。

※本手引きは「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 3 版」の「3. 調査計画」に「3-3-2.両生類編」を加え、その他の箇所に両生類についての内容を追記、一部用語の統一化、一部構成の微修正をしたものであり、淡水魚類に関する内容は「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 3 版」と同様のものになります。

環境省 自然環境局 生物多様性センター

令和 6 年 5 月

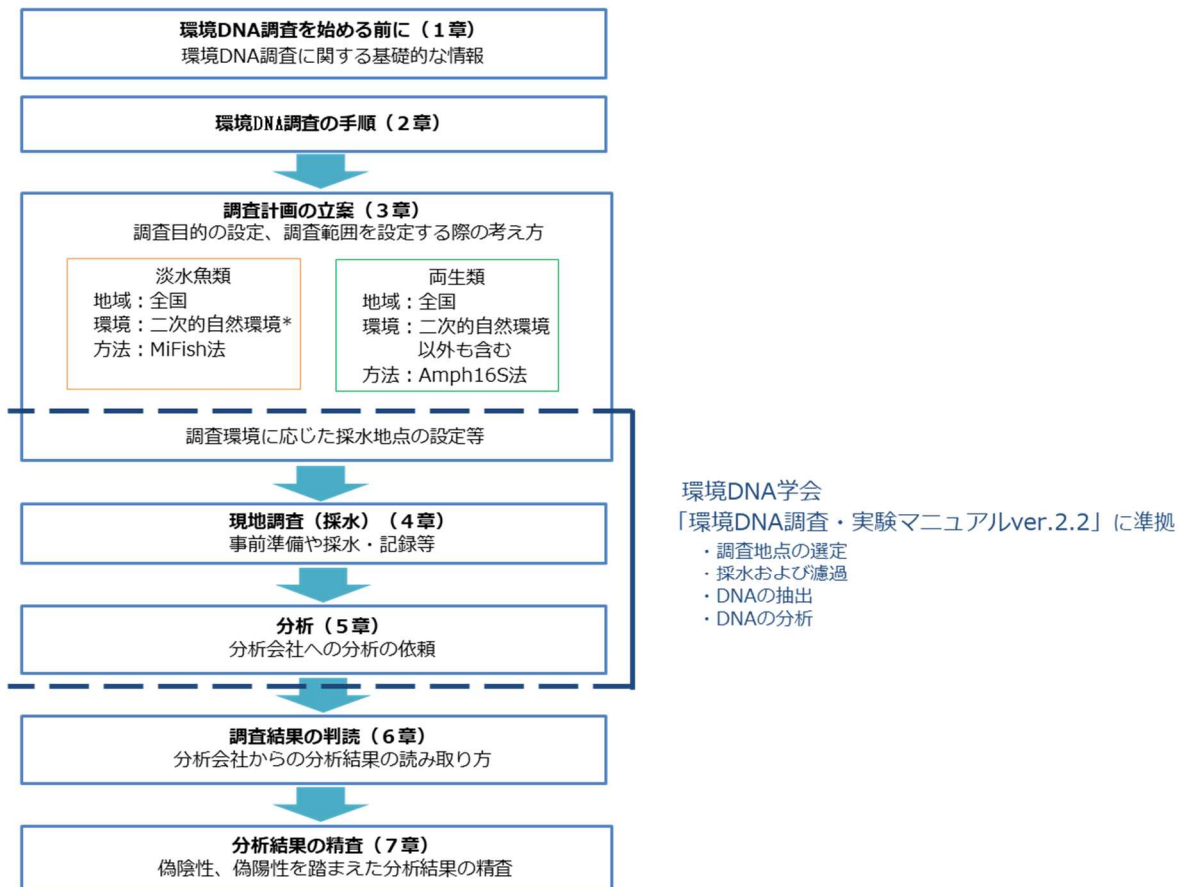
本手引きのご利用にあたって

本手引きは、淡水魚類（主に二次的自然環境※に生息する種）や両生類の保全のために必要な分布情報を得ることを目的に、環境 DNA 調査の導入を検討されている地方行政機関や保全団体の方々に向けたものです。

環境 DNA 調査・実験に関連する情報としては、環境 DNA 学会が環境 DNA 分析手法の普及と標準化を目的として、技術者・研究者向けに作成した「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）がすでに公表されています。このため、本手引きでは、環境 DNA 学会の「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」に準拠しつつ、環境 DNA を利用した淡水魚類や両生類の調査を実施するに当たっての基礎的な情報や、環境 DNA 調査特有の情報、分析結果の判読・精査等についての情報を掲載しています。

以下に、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」と本手引きとの関係を整理しています。以下を踏まえて参照いただければ幸いです。

本手引きの構成



※人が手を加えることで維持、管理されてきた自然環境のこと。里地里山（集落を取り巻く農地、二次林と人工林、草原等で構成される地域）やその地域にある河川や湿原のほか、水田、ため池や水路等の人間の働きかけを通じて形成された水系を含みます。なお、本手引きの淡水魚類に関する部分では、大規模河川を対象としていません。

目 次

はじめに

本手引きのご利用にあたって

1. 環境 DNA 調査の基礎情報	1
1-1 環境 DNA 調査の基礎情報	1
1-1-1 環境 DNA 調査の特徴	2
1-1-2 環境 DNA 分析の種類・特徴	5
1-2 環境 DNA 調査の流れ	7
1-2-1 調査計画のポイント	8
1-2-2 現地調査（採水）のポイント	9
1-2-3 分析のポイント	10
1-3 環境 DNA 調査の導入にあたって知っておくべきこと	11
1-3-1 環境 DNA 調査の注意点	11
1-3-2 偽陽性および偽陰性に関する解説	13
1-3-3 環境 DNA 調査の実施の判断	16
2. 環境 DNA 調査の手順	17
3. 調査計画の立案	18
3-1 調査目的の設定	18
3-2 調査範囲を設定する際の考え方	19
3-3 現地調査計画	20
3-3-1 二次的自然の淡水魚類編	20
1) 二次的自然の淡水魚類の特性	20
2) 既存の調査結果や専門家の知見に関する情報の収集	20
3) 調査地点（位置・地点数）・時期・頻度の設定	21
4) 調査計画を検討する上での参考情報	23
3-3-2 両生類編	26
1) 両生類の特性	26
2) 既存の調査結果や専門家の知見に関する情報の収集	28
3) 調査地点（位置・地点数）・時期・頻度の設定	29
4) 調査計画を検討する上での参考情報	34
4. 現地調査（採水）	35
4-1 事前準備	35
4-1-1 採水方法の特徴と各採水方法に適した調査	35
4-1-2 事前の準備（立ち入り等）	36
4-1-3 安全管理	36
4-1-4 調査機材などの準備	37
4-1-5 現地での注意点	38

4-2 環境 DNA サンプルの採水手順	39
4-2-1 採水地点での確認事項	39
4-2-2 採水準備	39
4-2-3 採水および塩化ベンザルコニウム液の添加	39
4-2-4 フィールドデータの記録	39
4-2-5 保管・輸送	39
4-2-6 フィールドデータの記録方法	43
5. 分析	44
6. 分析結果の判読	46
7. 分析結果の精査	47
おわりに	

<巻末資料>

○用語集.....	51
○引用文献.....	53

<参考資料>

○参考資料 1 国内の二次的自然環境に生息する淡水魚類のリスト	55
○参考資料 2 国内に生息する両生類リスト	69
○参考資料 3 分析会社へお願いする分析工程記録表（例）	75
○参考資料 4 環境 DNA 調査結果のデータ入力項目の事例	77
○参考資料 5 調査計画を検討する上での参考情報	79
○参考資料 6 環境 DNA 分析に関する参考情報	103
○参考資料 7 環境 DNA 調査の事例紹介（淡水魚類）	114
○参考資料 8 環境 DNA 調査の事例紹介（両生類）	119
○参考資料 9 データ公表に対する考え方	126
○参考資料 10 MiFish 法に係る誤同定チェックシートの使い方に関する解説書	127

1. 環境 DNA 調査の基礎情報

1-1 環境 DNA 調査の基礎情報

水中、土壌中、空気中等、あらゆる環境中に存在する「生物由来の DNA」のことを「環境 DNA (environmental DNA, eDNA)」と言います^{4,5)}。近年、この「環境 DNA」に着目した水の中の生物を検出する技術・研究が進んでいます。

詳細は 1-1-2 で後述しますが、環境 DNA 分析を用いた生物種の検出には「網羅的解析法」と「種特異的検出法」の 2 つの手法があります^{1,10)}。本手引きで特に解説する「網羅的解析法」は、専門的な用語では環境 DNA メタバーコーディングとも言います。例えば、魚類向けには MiFish 法、両生類向けには Amph16S 法という網羅的解析法が開発されています^{10,12,17)}。網羅的解析法というのは、環境水に含まれる複数の種の DNA を網羅的に検出できる分析方法で、この技術は野外の河川や湖沼、沿岸域等における魚類調査や両生類調査の新しい手法として利用されています。例えば魚類では、水族館での性能検証の結果、水槽に飼育されている海産魚類の 9 割を超す 168 種の検出に成功しています¹⁵⁾。また、日本全国の海岸線沿いの魚類群集調査では、複数地点の海水サンプルから抽出した環境 DNA より、136 科 521 属 1,220 種もの魚類が検出されています¹⁵⁾。

この環境 DNA 分析を利用した調査は、従来の生体を捕獲する調査とは異なり、現地での作業は分析に必要な水を汲むだけと比較的簡易です。このため、上述した魚類群集調査では、たった 3 ヶ月間という短い期間で全国 528 地点の調査が行われました¹⁵⁾。このように環境 DNA 分析技術を用いることによって、多くの地点・多くの種のデータを短期間で効率的に取得することができるようになっています。しかし、現地で水を汲んでから、最終的な結果（対象分類群の生息情報のリスト）を得るまでには、いくつかの手順があります。

本手引きは、環境 DNA 分析を利用した生物調査のうち、水中に漂う複数種の DNA をまとめて検出することが可能な網羅的解析法を用いて淡水魚類（主に二次的自然環境に生息する種）や両生類の調査を実施するにあたり、理解しておく必要のある各手順（調査計画の立案、現地調査（採水）、分析作業）での考え方や注意事項等について記述したものです。

まず、本章では、環境 DNA 調査の導入を検討する際に知っておくべきことや、その他の基礎的な情報を紹介します。

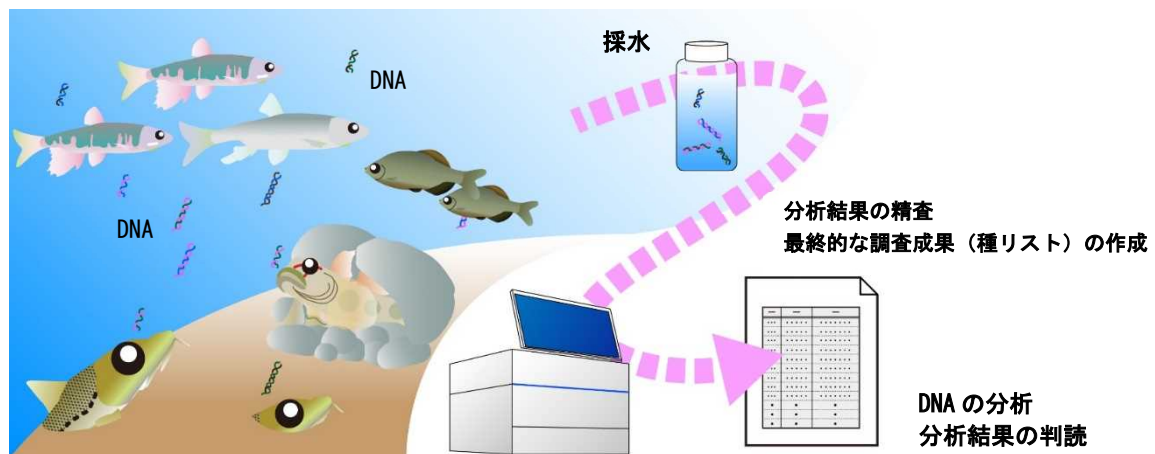


図 1-1 環境 DNA 調査のイメージ図（淡水魚類の例）

1-1-1 環境 DNA 調査の特徴

水中の生物の分布等を調べることは難しく、例えば、二次的自然環境での淡水魚類調査においては、通常定置網や投網等、主に捕獲を主体とする調査が、両生類調査においては目視確認、鳴声調査、捕獲調査等が行われています。これらの手法は、「専門的な技術、労力、費用が必要なこと⁸⁾」、「確認できる種にバイアスがかかること⁹⁾」、「捕獲した魚種の同定に知識が必要なこと⁸⁾」から、広い地域を短期間に調査することは困難です。近年、従来の捕獲を主体とする調査を補完し得る新たな生物分布の調査手法として注目されているのが環境 DNA 技術を活用した調査です。

環境 DNA 調査は、採水サンプルから調査対象としている分類群や種の DNA 分子の有無を調べるもので、従来調査との大きな違いは、「調査対象となる生体を捕獲しないこと²¹⁾」です。このため、環境 DNA 調査では、従来調査のように捕獲した個体から直接得られる情報（体長、体重、生育段階等）¹⁹⁾を把握することはできません。しかし、環境 DNA 調査は、「個体を捕獲しない」で生物分布状況を把握したい場合には有効な手法です。例えば、従来調査と比べると、「1 回当たりの調査労力が小さく（短時間）³⁾」、「現地での調査費用を抑えること¹⁸⁾」ができ、「広範囲・多地点で調査を実施すること⁹⁾」が可能です。また、現地への立ち入りには注意が必要ですが、従来調査のように漁具を使用しないため、「許可申請（特別採集捕獲許可等）が不要」であること、「採水には特殊な技術も必要ない」ことから手軽に調査をすることができます。さらに、従来調査のように対象種を捕獲することで殺傷することではなく、生息地への立ち入りも少なくすむことから、「生物や生態系への影響がほとんどない」といった特徴があります。なお、環境 DNA 調査は、現地での調査費用は従来調査よりも抑えることができますが、採水サンプルの分析作業に費用が必要となります。

以下の表 1-1 には、環境 DNA 調査と従来調査について、事前準備、現地調査、分析作業の各手順の比較結果を示しています。

表 1-1 環境 DNA 調査と従来調査との違い

	比較項目	環境 DNA 調査	従来調査
事前準備	調査の実施や生物捕獲の許可申請等	不要 (立ち入りには注意が必要)	必要に応じて申請等 (立ち入りには注意が必要)
	調査機材	採水キット (P.41 参照)	漁具、調査用具等
現地調査	調査にかかる労力	1 名×10～20 分程度 ^{※1} (1 地点 1 回当たり)	3 名×2 日 ^{※2} (1 湖沼 3 回地点当たり)
	調査手法	採水 (サンプルの送付)	魚類：定置網・投網・タモ網等による捕獲 ^{※2} 両生類：目視、鳴声、タモ網等による捕獲 (夜間調査を含む)
	調査者による精度のばらつき	小さい	大きい
	生物・生息環境への影響	ほとんどない	あり (漁具による殺傷、立ち入りによる生息環境の踏み荒らし)
分析作業	捕獲個体からの情報	なし	あり (体長、重量等)
	サンプル処理等	メタバーコーディング分析等 種特異的検出法	—
	費用 (1 検体当たり)	2～4 万円程度	3～5 万円程度

※1 試行調査(環境省業務)を参照。

※2 モニタリングサイト 1000 湖沼：淡水魚類調査マニュアル参照。

※3 分析費（判読）が主体となるが、分析会社によって金額は異なる（分析結果の精査は別費用）。目的等に応じて異なるが、一般的には、調査では複数の検体が必要になる場合があることに注意。

種特異的検出では、新たにプライマーを設計する場合は別途、費用が必要になることがある。

※4 魚類調査について、例えば魚類相把握のための調査を民間の調査会社等に依頼した場合。

例えば、ある場所に生息する魚類相（その場所に生息する種の網羅的な把握）を調べたいとき、図 1-2 に示すように、従来調査では、生息が予想される魚種や、調査地点の水深や流速等の微生息環境に合わせた複数の調査道具・調査手法（漁具・漁法）を使い分け、さらにそれらを効果的に組み合わせて実施する必要があります。また、調査者の道具の操作技術や経験等は、得られる調査結果に大きく影響します。一方で、環境 DNA 調査では、現場での作業は採水だけであるため、調査する人の技術や経験は必要なく、誰が実施しても同じような調査結果を得ることができます。



【特徴】 生息が予想される魚種や、調査地点の水深や流速等の微生息環境に合わせ、複数の調査道具・手法の使い分けが必要であり、魚類相を把握するには、さらにそれを効果的に組み合わせて実施します。

従来調査



環境 DNA 調査

【特徴】 ため池、湖沼、農業水路、小河川等、どんな調査環境でも現場では採水作業だけでよい。



図 1-2 環境 DNA 調査と従来調査の特徴（淡水魚類調査の例）

また、その他の環境 DNA 調査の利点として、従来調査で採用される形態学的な種同定手法では、例えばドジョウの2つの系統（在来系統・大陸系統）やドジョウとキタドジョウを識別することは非常に難しいですが、環境 DNA 調査ではそれらを識別することができるといった点が挙げられます。

一方で、環境 DNA 調査では、例えば MiFish 法ではゲンゴロウブナを除くフナ属魚類（ギンブナ、キンブナ、オオキンブナ、ニゴロブナ等）を種レベルで識別することは現状では困難ですが、従来調査では捕まえた個体の分類形質（背鰭条数や鰓耙数等）を調べることで種レベルの同定が可能です。また、従来調査では、個体の大きさから成長段階がわかるため、調査を行ったため池で稚魚や幼魚が確認できた場合は、そこで繁殖が行われているという情報等も合わせて得ることができます。

このように、環境 DNA 調査と従来調査のそれぞれが持つ利点を理解した上で、調査の目的に合った方法を選択することが重要です。なお、上記のフナ属の例のように、環境 DNA 調査の網羅的解析法において種の識別性に注意を要するものについては、魚類については参考資料1、両生類については参考資料2で確認してください。

1-1-2 環境 DNA 分析の種類・特徴

環境 DNA 分析を用いた魚類の生物種の検出には「網羅的解析法」と「種特異的検出法」の 2 つの手法があります^{1,9)}。

網羅的解析法（メタバーコーディング）は「水中に漂う DNA に対して網羅的に種を検出する手法」で、調査範囲内に生息する可能性がある種がまとめて分かります。一方、種特異的検出法は「水中に漂う対象種（単一種）の DNA のみを検出する手法」です。このように、それぞれの分析手法によって、検出対象とする DNA が異なるため、それぞれの分析結果の解釈が変わってきます。このため、環境 DNA 分析を用いる場合は性質を考慮した上で、調査計画の立案、現地調査、分析、分析結果の判読・精査をすることが重要です。下記にそれぞれの特徴を示します。

●「網羅的解析法」の特徴

- ・水中の DNA を網羅的に検出し、それぞれ魚類・両生類の種組成をまとめて明らかにすることができる。^{1,20)}
- ・対象分類群に合わせたプライマーを用いる^{1,10)}。
- ・近縁種や地域個体群等は、正確な種の判定ができない場合がある^{1,19)}。

●「種特異的検出法」の特徴

- ・対象種を限定して、その DNA を精度よく検出できる^{1,5)}。
- ・分析費用は比較的安価だが、対象種のプライマーが無い場合、新たなプライマーを設計する必要がある^{1,3)}、別途、設計費用がかかることがある。
- ・水中に含まれる対象種の DNA の量を推定できる^{1,21)}。

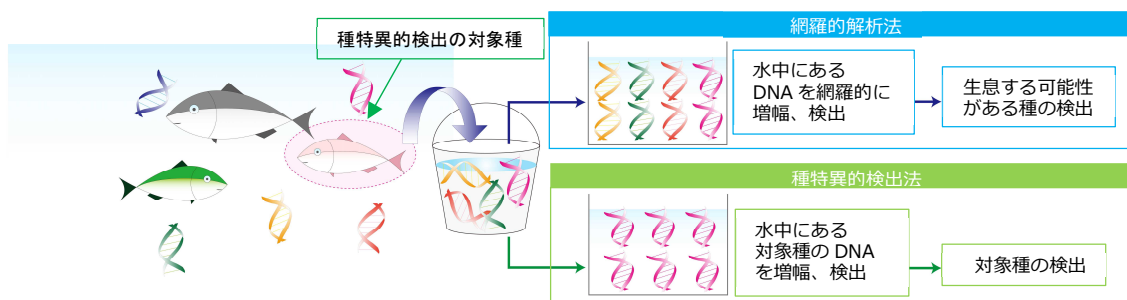


図 1-3 網羅的解析法と種特異的検出法のイメージ

網羅的解析法、種特異的検出法のいずれの分析手法も産学官でその適用性について研究が進められており、現地調査への適用が図られつつあります。特に、研究が先行している種特異的検出法は、すでに希少種や外来種の調査に用いられています。網羅的解析法についても魚類相・両生類相や分布の把握に活用されつつあり、環境省では淡水魚類（主に二次的自然環境に生息する種）や両生類調査への有効性を、国土交通省では河川事業における淡水魚類調査を、農林水産省では農業水路系における淡水魚類や両生類の調査への適用性¹⁴⁾を検討しています。

図 1-4 には、環境 DNA 調査の特徴を踏まえた自然環境保全施策等に活用可能な事例を整理しています。環境 DNA 調査の導入を検討する際に参考にするとよいでしょう。

環境 DNA 調査は上述した通り、直接、個体を捕獲しない手法です。このため、必要に応じて、従来の捕獲調査と組み合わせることで、保全施策に必要なより詳細な情報を得ることができます、迅速かつ効果的な対策につなげることができます。

なお、環境 DNA 分析手法の選択方法の詳細については、第 5 章もご参照ください。

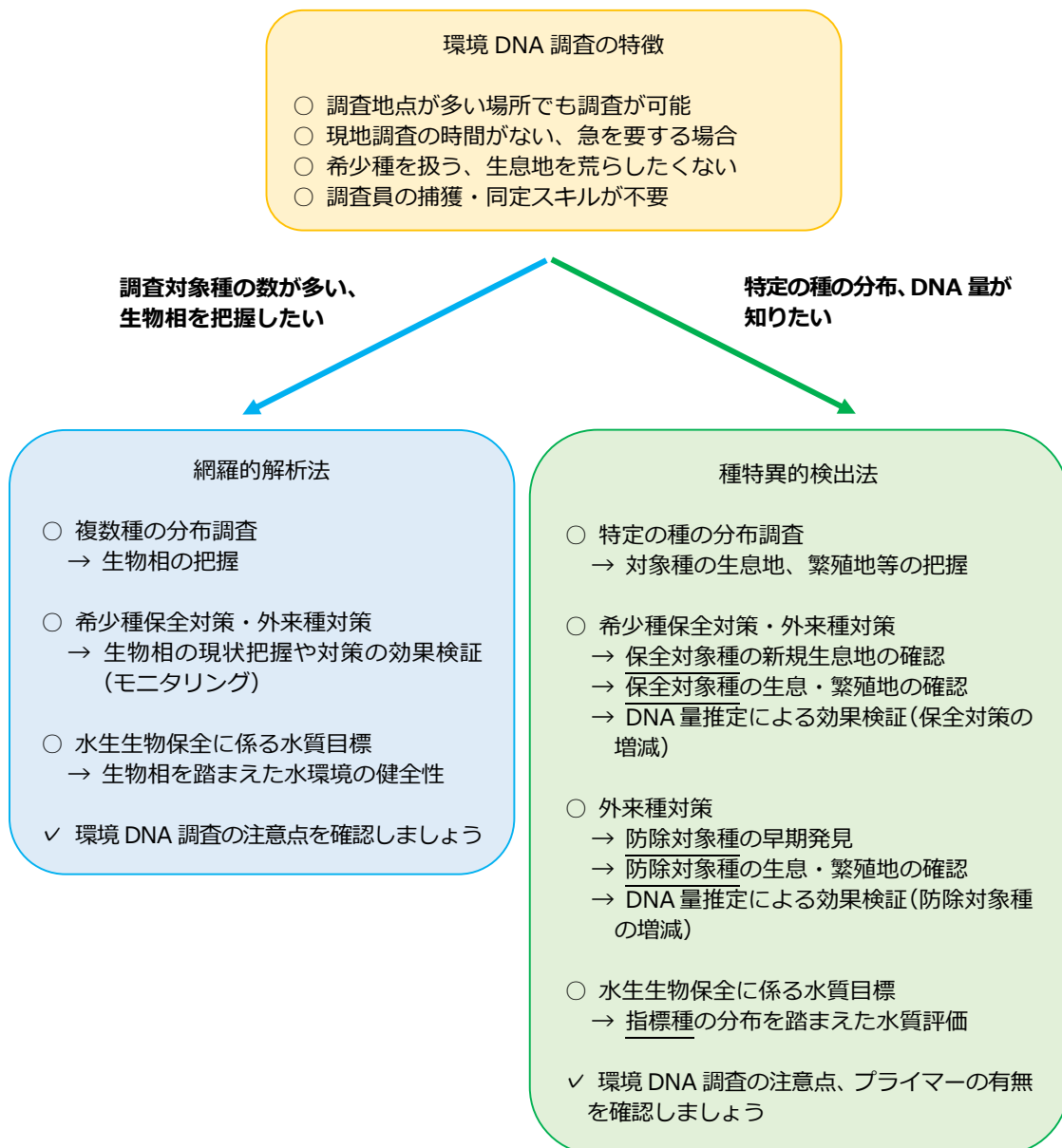


図 1-4 環境 DNA 調査の特徴と各検出方法で活用可能な保全施策の例

1-2 環境 DNA 調査の流れ

環境 DNA 調査の全体的な流れには、大きく分けて「調査計画の立案」・「現地調査（採水）」・「分析」の3つの段階があります（図 1-5）。段階ごとの詳細な内容については、本手引きの第2章以降に記載しています。分析については、専用の分析機器と設備等が必要になるため、基本的には外部の分析機関に委託する必要があります。本項では、それぞれの段階におけるポイントをお示しします。

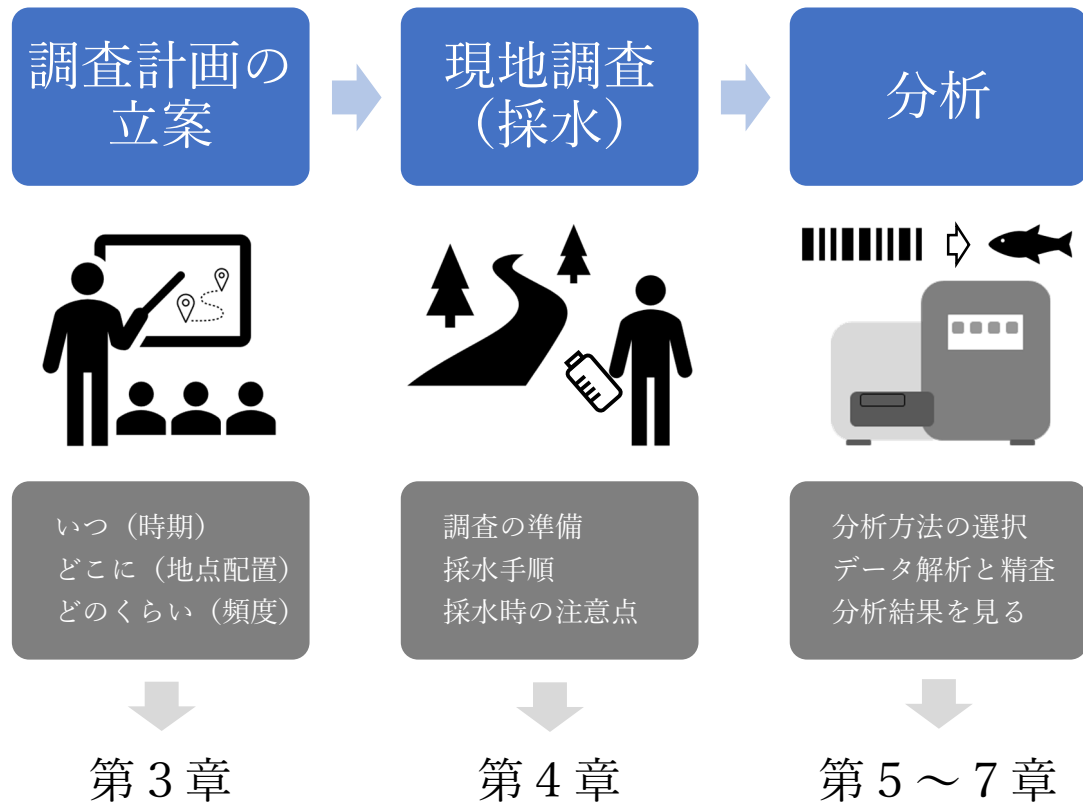


図 1-5 環境 DNA 調査の流れ



写真 1-1 現地採水の様子

1-2-1 調査計画のポイント

調査計画を立てる際のポイントを、以下にまとめます。調査計画の立案に関する詳細な内容については、第3章に記載しています。

＜場所について＞

- 環境 DNA は、水の流れの影響を受けて移動・拡散するので、調査地の水系のつながりをよく把握しておくことが重要です。
- 採水地点を決める時の考え方は、基本的には捕獲調査で地点を選ぶ時と同じで、調査対象とする分類群や種の生息に適すると思われる多様な環境に、なるべく多くの地点を設定します。

＜時期について＞

- 淡水魚類の環境 DNA 調査を行う時期は、一般的に淡水魚類の活動が盛んになる「春から秋にかけて」の時期が適しています。
- 両生類の環境 DNA 調査を行う時期は、水中で多くの種の幼生が見られる時期（主に春から夏にかけて）が適しています。

＜採水の反復回数について＞

- 環境 DNA 調査では、1 地点あたりの採水の回数を1回から2～3回に増やすことで、生息密度の低い種が検出される確率が高まることが期待されます。



写真 1-2 環境 DNA 調査を行った自然環境の一例

1-2-2 現地調査（採水）のポイント

現地調査（採水）を行う際のポイントを、以下にまとめます。現地調査（採水）に関する詳細な内容については、第4章に記載しています。

- 採水に使用する容器やバケツ類は、新品を用意するか、一度使ったものを再利用する場合は、付着した DNA を事前にしっかりと除去しておく必要があります。
- 採水の際は、安全管理に十分に配慮した上で、定められた手順に従って、確実かつ丁寧に進めましょう。
- 暑い時期には、採水したサンプルが高温にならないように、クーラーボックスに保冷材等を入れて冷やして保管しましょう。



写真 1-3 採水作業とサンプル保管のイメージ

1-2-3 分析のポイント

分析方法の選択やデータ精査のやり方、分析結果を見る際のポイントを以下にまとめます。分析に関する詳細な内容については、第 5～7 章に記載しています。

- 分析については、専用の分析機器と設備等が必要になるため、基本的には外部の分析機関に委託する必要があります。
- そこにどんな種がいるかを調べたいときは「網羅的解析法」が、調べたい種が決まっているときは「種特異的検出法」が推奨されます。
- 環境 DNA 調査では、その種が生息しているのに検出できない「偽陰性」と、その種が生息していないのに検出される「偽陽性」に留意して、分析結果を見る必要があります。
- 環境 DNA 調査の分析結果を見る際は、既存の知見（分類、生態、分布、国内外来種としての状況、雑種形成に関する事例等）や専門家の意見等を基に、検出された種ごとにその妥当性を判断する「精査」を行うことが重要です。

1-3 環境 DNA 調査の導入にあたって知っておくべきこと

環境 DNA 調査の導入にあたっては、環境 DNA 調査にどのような特徴があるのか、また、注意しなければならないことはなにかを知っておくことが大切です。ここでは、環境 DNA 調査の特徴を踏まえ、どのような場合に環境 DNA 分析を活用した調査が有効なのかについて紹介します。また、環境 DNA 分析を使った調査における特有の注意点について整理しています。

1-3-1 環境 DNA 調査の注意点

環境 DNA 調査の導入にあたっての注意点に関連して、知っておくべき重要なポイントは以下の3つです。

- 環境 DNA の由来や正体、水中での拡散から消滅までの過程に関する理解が遅れている^{1,9)}（例、DNA が検出された種がいつそこにいたのか、採水ポイントからどれくらい離れた場所にいたのかわからない。環境 DNA は分解、劣化する。河川における環境 DNA の反映距離は数百mと見積もられることもあるが、状況に応じて異なる^{1,5)}）。
- 環境 DNA からは生物の状態がわからない^{1,9)}（例、稚魚、成魚等の成育段階、生きているのかどうかかわらず、死体由来の DNA も検出^{1,21)}）。
- 調査対象種の DNA データがなければ分析ができない^{1,19)}（例、リファレンス配列の整備）。

上記の3つのポイントに関連して、環境 DNA 調査では、くり返し述べている通り、捕獲を主体とする従来調査とは異なり、直接個体を捕獲せずに得た結果（対象種から放出された DNA 分子の有無）のため、「その場所に生息しているはずの種が検出されない（偽陰性）^{1,19)}」、あるいは、「その場所に生息していない種が検出される（偽陽性）¹⁹⁾」といった問題等が生じることがあります。全てではありませんが、調査計画の立案、現地調査、分析、分析結果の判読・精査の各手順で生じ得る注意点および対応策の概要を整理しました（表 1-2）。

このような問題は、今後の研究の進展や情報の蓄積によって解決できるものもありますが、採水サンプルからより精度の高い調査結果を得るためには、以下の注意点を踏まえつつ、各手順で対応策を講じることが重要になります。

表 1-2 環境 DNA 調査の注意点とその対応策

環境 DNA 調査の注意点		対応策	紹介ページ
調査計画の立案	調査対象種の DNA の塩基配列（MiFish・Amph16S 配列）が登録されていないと識別できない ¹⁹⁾ 。【▲】	事前に調査地に生息すると想定される種の塩基配列（MiFish・Amph16S 配列）が登録されているか、確認しましょう。	参考資料 1・2
	網羅的解析法で種を特定するために参照している DNA 内の領域（MiFish・Amph16S 領域）の塩基配列が、近縁種と差がない種は識別できない ¹⁹⁾ 。 ex.チチブとヌマチチブ、タゴガエルとナガレタゴガエル等【▲】	種レベルの識別が難しい分類群とはどういったものかを確認した上で、事前に調査地に生息すると想定される種が「国内の二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト」や「国内に生息する両生類リスト」の「網羅的解析法において識別に注意を有する種」に記載されていないか、確認しましょう	参考資料 1・2

環境 DNA 調査の注意点		対応策	紹介 ページ
	環境 DNA は流れの影響を受けて移動・拡散する。種の生息密度が低いほど、採水したサンプルに当該種の環境 DNA が含まれる可能性は小さくなる。そのため、種の検出率は必ずしも 100%ではない ¹⁹⁾ 。【▲・△】	「調査地点・時期・反復採水の設定における共通の考え方」や「調査地点の環境や調査目的に応じた調査地点・時期の設定の考え方」、「調査計画を検討する上での参考情報」に留意しましょう。	淡水魚類 3-3-1 3) 両生類 3-3-2 3)
	生活排水や養殖場の排水等の影響を受ける ⁵⁾ 。ex.海産魚、一部のサケ科魚類等【△】		
	特定の種や分類群の DNA が優占していると、少数の種が検出されにくい ⁵⁾ 。ex.優占種の繁殖期や集団で遡上・流下する時期等【▲】		
	冬場は環境 DNA の検出率が下がる ⁵⁾ 。【▲】		
現地調査	環境 DNA は分解、劣化していく ⁶⁾ 。【▲】	塩化ベンザルコニウム液(劣化防止剤)を添加するか、保冷剤等で十分に冷やしましょう。 なお、現地濾過を行う場合には、フィルターの保存に保存試薬(RNAlater など)を使用しましょう(現地濾過に関しては「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」(2020 年 4 月 3 日発行) 参照)。	4-2-3 4-2-5
	死体由来の DNA も検出する。【△】	「4-2 環境 DNA サンプルの採水手順の 1. 採水地点での確認事項」を参考にしましょう。	
	水質の影響により分析が阻害されて、生息している種が検出されない ⁶⁾ 。ex.水の濁り、アオコ【▲】		
分析	網羅的解析法では、プライマー配列上に不一致(ミスマッチ)が含まれる種は検出できない。 ex.スナヤツメ、アユ、ワカサギ【▲】	不一致(ミスマッチ)部位の配列を改変したプライマーを新たに設計すれば、検出力の改善が期待されます。	第 5 章 参考資料 6
	採水時や分析時に人為的コンタミネーションが生じる ⁶⁾ 。【△】	「4-2 環境 DNA サンプルの採水手順」や「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」(2020 年 4 月 3 日発行)の方法を遵守することでコンタミネーションを減らすことができます。	4-1-1 4-1-4～ 5 第 5 章
	抽出した DNA 溶液中の相対濃度が非常に低い種は検出されにくい。PCR 阻害物質の影響が強いサンプルも、検出率が低下することがある。【▲】		
分析結果の精査	抽出した DNA から種名を特定するために検索するデータベースに誤った種名が登録されており、誤った種名が結果として出力されることがある。【▲・△】	生データや検索するデータベースを再度確認してみましょう。 また、網羅的解析法に係る誤同定チェックシートを活用しましょう(淡水魚類の場合)。	参考資料 6 参考資料 10
	交雑個体は、交雑親(母系)由来の環境 DNA を検出するため、正しく識別できない。ex. ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴ、ニホンヒキガエルとアズマヒキガエル【▲・△】	同様の事例や文献を調べたり、専門家にヒアリングしたりしましょう。	参考資料 6

【▲】…偽陰性の要因となるもの、【△】…偽陽性の要因となるもの

1-3-2 偽陽性および偽陰性に関する解説

- 偽陽性について

偽陽性とは、採水した地点にその種が生息していないにもかかわらず、サンプルからその種の環境 DNA が検出されることを言います。偽陽性が生じると、採水した地点に、その種が生息していると誤判定されてしまうことになります。環境 DNA 調査の精度を管理する上では、現場採水や分析のすべての作業工程において、偽陽性を生じさせないように十分な注意を払う必要があります。



要因① 調査地の外側から流入した水に含まれる DNA に起因する検出



要因② 採水・分析時に生じるサンプル内へのコンタミネーション（試料汚染）



要因③ データ解析時に生じるエラー、データベース等に起因する誤検出・誤同定

図 1-6 環境 DNA 調査で偽陽性が生じる要因

要因①の例としては、養魚場や釣り堀等から流れ出た飼育水や家庭や食品加工場等の排水に含まれていた濃厚な魚類 DNA が検出されたことによる偽陽性があります。また、小河川や水路等の流水域では、調査地外からの流入 DNA の影響レベルは、流速や流入量等の影響を受けて変化しているものと考えられますが、どの程度の範囲内まで影響を受けるかについては、まだ詳細にわかりません。

要因②の例としては、分析時に、実験室内（机や壁）や実験器具等に付着した DNA（主に過去に実験した際の PCR 産物）が、何らかのタイミングでサンプルに混入したことによる偽陽性があります。分析時のコンタミネーションは、それを完全に防ぐための技術はまだ確立されていませんが、コンタミネーションを低減させる対策としては、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）にも記載の通り、サンプル濾過、DNA 抽出、PCR 前の調整、PCR 後の調整等、工程ごとに物理的空間を完全に分けることが推奨されています。

現地調査の過程でもコンタミネーションが生じる可能性があるため、以下の点等に注意することが重要です。

- ・ネガティブコントロールのサンプルを調査サンプルと同じように扱って分析し、結果を比較する（フィールドブランク）。
- ・捕獲等を伴う従来調査を実施する場合は、環境 DNA 調査の採水と調査日を分ける。
- ・調査地点では採水前の調査地点周辺への立ち入りを極力避ける。また、調査者が水に入らざるを得ない場合は、常に採水地点よりも下流側に立つ。
- ・複数の調査地点を設定する場合は、調査地点間の移動順序にも注意する。例えば、流れがある環境では下流側から上流側に向かって作業を進める。また、大量の環境 DNA が調査者や調査機材に付着する可能性が高い地点（対象種が高密度に生息することがわかっている地点等）は作業順序を後に回す。

要因③の例としては、国際塩基配列データベース（検出した DNA 配列から種名を特定するために利用する公開データベース）に登録されている配列情報自体の間違い、交雑個体由来の DNA の検出等による偽陽性があります。

● 偽陰性について

環境 DNA 調査においては、偽陽性のほかに、偽陰性も課題として挙げられます。偽陰性とは、採水した地点にその種が生息しているにもかかわらず、サンプルからその種の環境 DNA が検出されないことを言います。偽陰性が生じると、採水した地点にはその種が生息していないと誤判定されてしまうことになります。

環境 DNA 調査において、その調査結果の評価に悩むポイントの一つが、生息している可能性のある種が、サンプルから検出されなかった場合です。例えば、絶滅危惧種の探索が目的の調査において、サンプルから調査対象種の環境 DNA が検出されなかった場合に、その種が生息していないことを示しているのか、偽陰性による未検出であるのかを、調査結果だけから判断することは非常に難しいと考えられます。そのため、環境 DNA 調査を進める際は、偽陰性を生じるリスクが最小限になるような調査計画を立てることが重要です。



図 1-7 環境 DNA 調査で偽陰性が生じる要因

偽陰性が生じる要因について図 1-7 に示します。要因①の例としては、種固有の生態特性に加えて、水温や日照、季節、餌環境等、様々な条件に応答して、生物が生息環境内を移動することで生じる偽陰性があります。一般的に、種の移動できる範囲が広がるほど、または種の生息密度が低いほど、種の分布の不均一性は大きくなり、結果的に偽陰性が起きやすくなると考えられます。また、調査地点の水深等も種の検出感度に影響を及ぼすと予想されますが、その影響の有無や程度については、まだ十分に解明されていません。

要因②の例としては、環境 DNA 自体が水の流れ等の影響を受けて移動・拡散すること、さらには、環境 DNA の放出量や分解速度が、種の違いや個体の大きさ、水温等の環境条件などによって異なるため、採水地点における環境 DNA の存在状態が時間とともに変化することに影響を受けて生じる偽陰性があります。すなわち、同じ場所で、時間を置かずに連続的に何回か採水したとしても、サンプルの中に含まれている環境 DNA の組成は変わり得ると考えられます。一般的に、種の生息密度が低いほど、採水サンプルにその種の DNA が含まれる可能性は小さくなり、結果的に偽陰性が起きやすくなると考えられます。

要因②による偽陰性への対策方法の一つとして、調査 1 回 1 地点当たりに採水するサンプル本数を 1 本から 2 本以上に増やす「反復採水」があります。反復採水を行うことで、種の DNA がサンプルに含まれる確率が向上し、結果的に偽陰性が生じにくくなると考えられます。反復採水の効果については、その概要が第 3 章の 3-3-1 4) の項に、詳細な検討結果が参考資料 5 に記載されています。

要因③の例としては、サンプルから抽出した環境 DNA 溶液等の全量を分析に使用せず、その一部のみを分取して次の工程に使用することで生じる偽陰性があります。一般的に、抽出した DNA 溶液中の相対濃度が低い種の DNA は、ピペットで吸い取られる確率が低くなり、結果的に偽陰性が起きやすくなると考えられます。また、サンプルによっては PCR 阻害物質が含まれており、DNA が存在していても検出しにくくなったり、網羅的解析法では、プライマー配列上のミスマッチやデータベースの充実度等が影響し、偽陰性が起きる場合もあります。

他にも、網羅的解析法全般の特性としては、使用する分析機器である超並列シーケンサー（次世代シーケンサーとも呼ばれます）の検出原理上、サンプルから抽出した環境 DNA 溶液に含まれているそれぞれの種の相対的な存在比が大きく偏っているとき（例えば、特定の種の DNA だけが多く含まれているとき）、存在比が非常に低い種の DNA は検出されにくくなる場合があります。

なお、要因③による偽陰性については、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2. 2」（2020 年 4 月 3 日発行）でも取り扱われており、例えば 1 検体当たりの PCR 反復数を 8 以上にしたり、PCR 阻害物質の存在が疑われる場合には、抽出 DNA 溶液を適切な超純水やバッファーで希釈するなどの対策方法が記載されています。

1-3-3 環境 DNA 調査の実施の判断

網羅的解析法を用いた環境 DNA 調査では、先述したように、「リファレンスの未登録」、「塩基配列に差がなく識別できない」ことにより、調査対象種の生息が確認されない場合があります。このため、環境 DNA 調査の導入に当たっては、調査対象種が本手法で検出できるのかを見極める必要があります。淡水魚類では参考資料 1 を、両生類では参考資料 2 を参考に、調査対象種の検出可能性をチェックした上で、調査の実施を判断することが重要です。

2. 環境 DNA 調査の手順

ここからは、網羅的解析法を用いた環境 DNA 調査の手順について、紹介していきます。

環境 DNA 調査は、調査計画の立案、現地調査（採水）、分析、分析結果の判読、分析結果の精査の順で実施します。各手順の詳細については、各章を確認して下さい。

以下の手順のうち、分析、分析結果の判読は、分析業者やコンサルティング業者に依頼（外注）することになります。最終的な調査成果（種リスト）を得るためには、分析結果の精査をする必要があります。分析会社等に作業を依頼する際には、分析結果の精査についても事前に相談しておくとい良いでしょう。

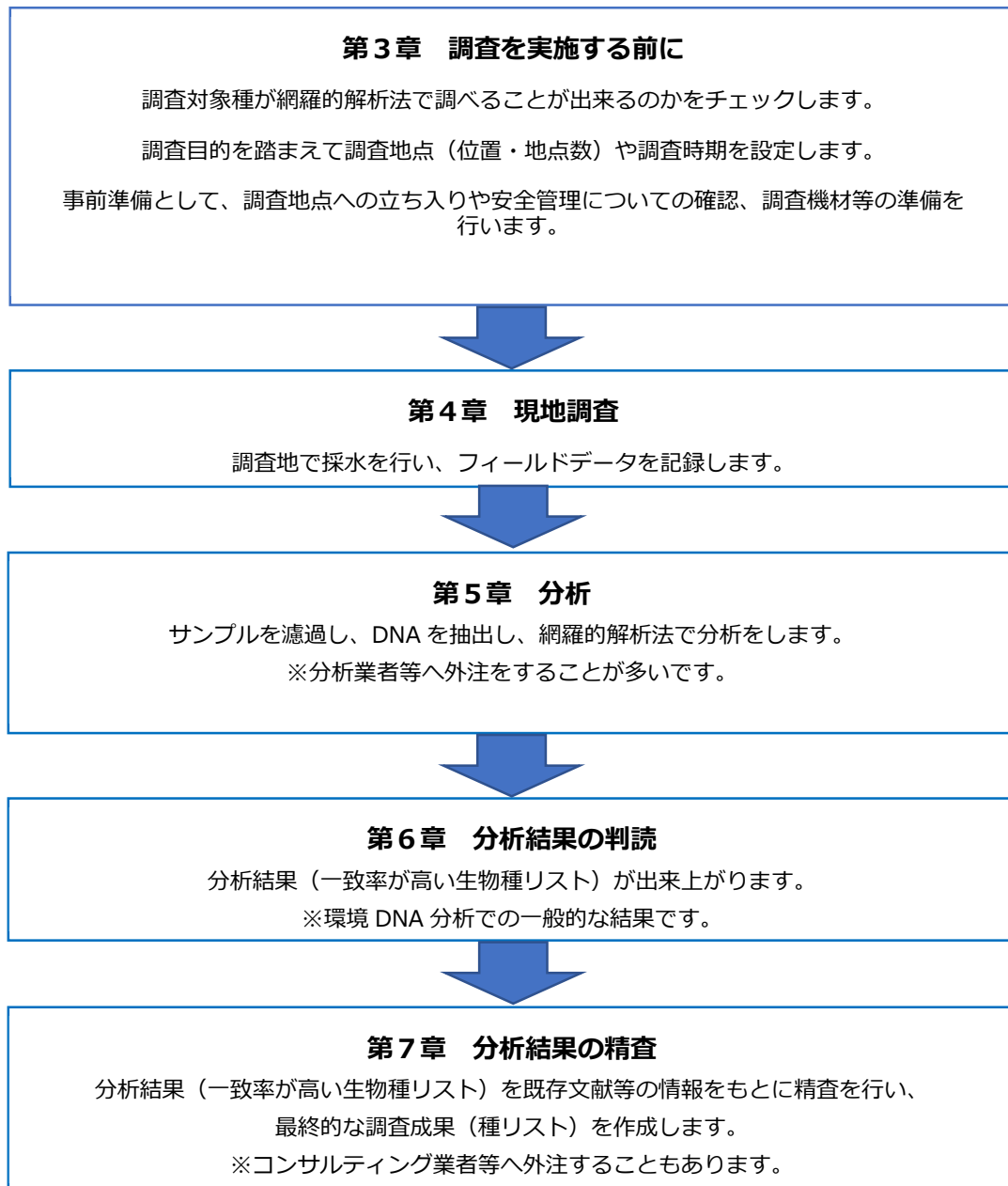


図 2-1 網羅的解析法を用いた環境 DNA 調査の手順

3. 調査計画の立案

3-1 調査目的の設定

環境 DNA 調査を行う際は、従来調査と同様、目的を明確にしておくことが重要です。環境 DNA 分析の特性を踏まえて、調査によって得られる情報（調査地点における環境 DNA の検出結果）を具体的に想定しながら、その目的を達成できるよう調査設計を行います。予算や時間等が限られる場合は、明らかにしたい事項に優先順位をつけ、資源（サンプル数、人的労力等）を効率的に配分することが重要です。

網羅的解析法を用いた環境 DNA 調査は、以下のような保全施策調査に活用することができます。

<生物相調査>

- 生物の目録作成
- 生物相モニタリング
- 各種の分布図作成

<希少種等の保全対策（複数種の場合※）>

- 希少種等の分布確認、生息場所の把握等
- 希少種保全対策の効果検証

<外来種対策（複数種の場合※）>

- 未侵入地域における外来種の早期発見
- 外来種対策の効果検証等

※ 調査対象種の数が多い時は本手引きで説明している網羅的解析法が有効ですが、保全対象種や防除対象種等、特定の種に定まっている場合は種特異的検出法がより効果的です（「1-1-2 環境 DNA 分析の種類・特徴について」参照）。

3-2 調査範囲を設定する際の考え方

環境 DNA を含んだ水は、水域や地形等の状態に応じて、同じ場所に留まる場合もあれば、拡散や流下によって移動する場合があります。そのため環境 DNA 調査を行う際には、調査範囲内の水域の状態（水の流れ、大きさ、水深等）や位置に留意し、生物から DNA が放出される場所（生物の分布地点）と、そうした DNA を含んだ水が移動すること等を想定しておくことが重要です。

● 調べたい水域が絞り込まれている場合

単一の水域を対象とする場合は、調査範囲はその水域だけですので、その内部から採水します。水域の規模が大きいなど水域内で環境 DNA の分布が均一でないと想定される場合は、補完的に複数地点から採水します。また、当該水域に外部からの流れ込みがある場合は、調査範囲外から環境 DNA が混入している可能性もあるため注意が必要です。

● 調べたい空間スケールが大きい場合

調べたい空間スケールが大きい場合は、その中に多数の水域が含まれることも少なくありません。水域ごとに調べるのが望ましいものの、必ずしもすべての水域から採水できないことも想定されます。そうした場合は、水のつながりのある複数の水域をまとめてひとつの調査範囲と位置づけ、それらの水が集約する水路や河川等から採水することでその範囲内における分布状況を調べるという方法もあります。例えば、たくさんの水田があってどれかひとつに採水地点を絞り込めない場合は、水田の越流水が流れ込む直近の水路から採水することで、一帯の複数の水田の分布状況を効率的に調べることができます。

ただし、複数の水域をひとまとめにする場合は、検出された環境 DNA が具体的にどの水域に由来するかわからない点、流下の過程で環境 DNA が消滅して検出されにくくなる点等のデメリットがあります。また、そうした水路等には、調査範囲外からの水の流入があり、調査水域内に生息しない種の環境 DNA が検出されてしまう可能性もあります。複数の水域をひとまとめにする方法については、そうしたメリットとデメリットを踏まえて採用を検討することが重要です。

3-3 現地調査計画

野外には、湖沼、湿地、ため池、水田・水路、小規模な水たまり、河川、溪流等、様々な水域があり、環境ごとに生息する生物が異なります。また、生物各種の水域利用や行動の様式等は季節によって変化する場合があります。このため、環境 DNA 調査では、こうした特性をよく理解して計画を検討、設定することが重要です。また、採水方法にも複数の手法があり、それぞれにメリット・デメリットがあります。

ここでは、淡水魚類と両生類それぞれにおいて、環境 DNA 調査を効果的に実施するための調査時期、様々な水域環境における調査地点の設定の考え方、また、各採水方法の特徴とそれらに適した調査方法について紹介します。淡水魚類と両生類の調査を同時に行うこともできますが、2つの分類群間に異なる点があることに留意する必要があります。

3-3-1 二次的自然の淡水魚類編

1) 二次的自然の淡水魚類の特性

淡水魚類は、大規模河川等にも生息していますが、本手引きでは、里地里山（集落を取り巻く農地、二次林と人工林、草原等などで構成される地域）やその地域にある河川や湿原のほか、水田、ため池や水路等などの人間の働きかけを通じて形成された水系における淡水魚類調査の方法を紹介します。

二次的自然の淡水魚類は、特定の水域に生息する種や、成長段階や越冬期、繁殖期等の生活史に応じて多様な水域環境を利用する種等が含まれます。生息環境も、湖沼、湧水地、水田・水路、ため池と様々です。調査の際の注意点については、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2. 2」（2020 年 4 月 3 日発行）の「2. 調査地点の選定」（p. 12～32）を参考にしてください。

2) 既存の調査結果や専門家の知見に関する情報の収集

適切な調査計画を策定する上では、調査範囲周辺に関する既存の調査結果や、地域の専門家の知見等の情報を事前に収集しておくことが重要です。また、これらの情報は調査結果を精査する上でも重要となるため、情報の有無や内容を調べておきましょう。

二次的自然環境は、天候や季節変化の影響に加えて、農業活動等の影響による環境変動（水位や水量等）が大きいことが知られています。地図情報だけを頼りに、いざ調査地に行ってみると水が全くなかったなどということも予想されるので、環境 DNA 調査を計画する際は、表に示すような準備を事前に行っておくことが重要です。

環境 DNA 調査は、調査地点の環境水を採取し、その水に含まれている DNA を調べる調査です。そのため、調査地点を流れる水が、どこから来ているものなのかを把握しておくことが非常に重要です。さまざまな形で人が利用している二次的自然環境では、水利施設等により人為的に水の流れがコントロールされ、他の地域から運ばれてきた水が流れていたり、複数の系統の水が混ざり合っている場合もあります。こうした「水系のつながり」に関する情報を事前に入手しておくことは、その後の環境 DNA 分析の結果から、今まで地域で確認されることがない種が検出された際にも、その解釈に役立ちます。

表 3-1 主な事前準備の内容

項目	事前準備の内容
調査地の環境把握（踏査）	WEB 上に公開されている地図や衛星写真等から、調査地の環境情報を収集します。地図情報だけでは情報が不十分な場合は、必要に応じて踏査を実施し、調査地の現況を確認します。 ● 水系のつながり ● 養魚場や釣り堀の存在（排水が混入する可能性があるか） ● 採水予定地点へのアクセスルート ● 採水方法の検討（水面からの直接採水が可能か、バケツ等を使用する必要があるか等）
文献調査	既存文献等から、調査地周辺に生息する魚種の情報を収集します。例えば、以下の情報は、調査結果を精査・評価する上で役立ちます。 ● 生物図鑑、学術文献、郷土史資料等 ● 行政機関等による調査データ - 環境省：生物多様性情報システム等 - 国立環境研究所：侵入生物データベース等 - 国土交通省：河川環境データベース等 ● 環境省版および都道府県版のレッドデータブック 既存の情報がない地域であれば、まずは本格的な調査を行う前に、地図情報だけから調査地点を設定して予備的に環境 DNA 調査を行い、調査地周辺に生息する魚種の情報を得る調査（スクリーニング調査）を行うことも有効です。
専門家ヒアリング	必要に応じて、調査地の環境もしくは魚類相に詳しい専門家にヒアリングを行い、さらに詳細な情報を収集します。

3) 調査地点（位置・地点数）・時期・頻度の設定

調査計画立案時に参考となる調査地点・時期の設定にあたり、予め知っておくべき共通の考え方を以下に示します。

調査地点・時期・反復採水の設定における共通の考え方（環境 DNA 特有の問題への対応）²⁰⁾ <調査地点> ・環境 DNA は、水の流れの影響を受けて移動・拡散するので、調査地の水系のつながりをよく把握しておくことが重要（偽陽性・偽陰性の防止）。 ・基本的には捕獲調査で地点を選ぶ時と同じで、魚類の生息に適すると思われる多様な環境に、できるだけ多くの地点数を設定する（偽陰性の防止）。→参考資料 5 ・生活排水や養殖場、食品工場等の偽陽性を生じる可能性がある場所には設定しない（偽陽性の防止）。 ・魚類相を網羅的に把握したい場合は、事前に優占種の産卵場や群になる場所（越冬場等）がわかっていれば、その周辺には設定しない（偽陰性の防止）。 <調査時期> ・一般的に淡水魚類の活動が盛んになる「春から秋にかけて」の時期が適している（偽陰性の防止）。→参考資料 5 ・濁った水を採水したサンプルでは、ろ過の際にフィルターが目詰まりを起こしたり、分析に悪影響を及ぼす物質（PCR 阻害物質等）が増加する傾向があることから、降雨時やその直後の採水は避けることが望ましい。特に、梅雨時期や台風時期には留意が必要（偽陰性の防止）。 ・優占種の産卵期に産卵場周辺で採水をすると、サンプル内に優占種の DNA 断片が多く含まれることで、DNA 断片が少ない種が検出されにくい場合があるので、留意が必要（偽陰性の防止）。 <反復採水> ・1 地点あたりの採水の反復数を 1 回から 2～3 回に増やすことで、生息密度の低い種が検出される確率が高まることが期待される（偽陰性の防止）。→参考資料 5
--

次に、二次的自然環境の各環境（湖沼、湧水地、水田・水路、ため池）において、調査の目的に応じた調査地点・時期の設定の考え方を表 3-2 に、調査地点の配置例を図 3-1 にまとめました。今後の調査・研究の進展によって変更が生じる部分もありますが、この考え方を参考に調査地点・時期を検討するとよいでしょう。

表 3-2 調査地点の環境や調査目的に応じた調査地点・時期の設定の考え方（淡水魚類）⁵⁾

調査地点の環境	調査の目的	調査地点・時期の設定の考え方
湖沼	魚類相の把握	<調査地点> ・湖沼の流出口周辺（効率的な DNA の採取） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） ・流入河川との接続部等で採水すると、上流側から流下した DNA を検出することがあるため、湖沼内の魚類相を把握したい場合は、調査地点として避ける（偽陽性の防止） ・特定の種が繁殖行動をしている時は、主に放出された精子由来の DNA が影響して特定の種が優占的に検出され、相対的に他の魚種が検出されにくくなるため注意が必要（偽陰性の防止） <調査時期> ・生活史の一部を湖沼で生活する魚類を調査対象とした場合は、湖沼での生息時期を調査時期に設定
	外来種対策の効果検証	<調査地点> ・上記と同様 <調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
湧水地	魚類相の把握	<調査地点> ・湧出箇所の下流側（湧水環境に依存した種の効率的な DNA の採取） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） <調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
	外来種対策の効果検証	<調査地点> ・上記と同様 <調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
小河川・水路・水田	魚類相の把握	<調査地点> ・対象とする調査範囲のみの魚類相を調査する場合は、調査範囲の最下流部。ただし、対象水路以外の支線水路や支流との合流部よりも上流側に設定。また、水田からの流入部よりも上流側（偽陽性の防止） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） <調査時期> ・代掻き時期等、水が強く濁りやすい時期は DNA が検出されにくい場合があるので留意が必要（偽陰性の防止）
	外来種対策の効果検証	<調査地点> ・上記と同様 <調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
ため池	魚類相の把握	<調査地点> ・採水しやすい樋管・樋門等の排水施設周辺（安全性の確保） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） ・流入河川や沢・流れ込みとの接続部等で採水すると、上流側から流下した DNA を検出することがあるため、ため池内の魚類相を把握したい場合は、調査地点として避ける（偽陽性の防止）
	外来種対策の効果検証	<調査地点> ・上記と同様 <調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<調査時期> ・調査対象種の繁殖期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）

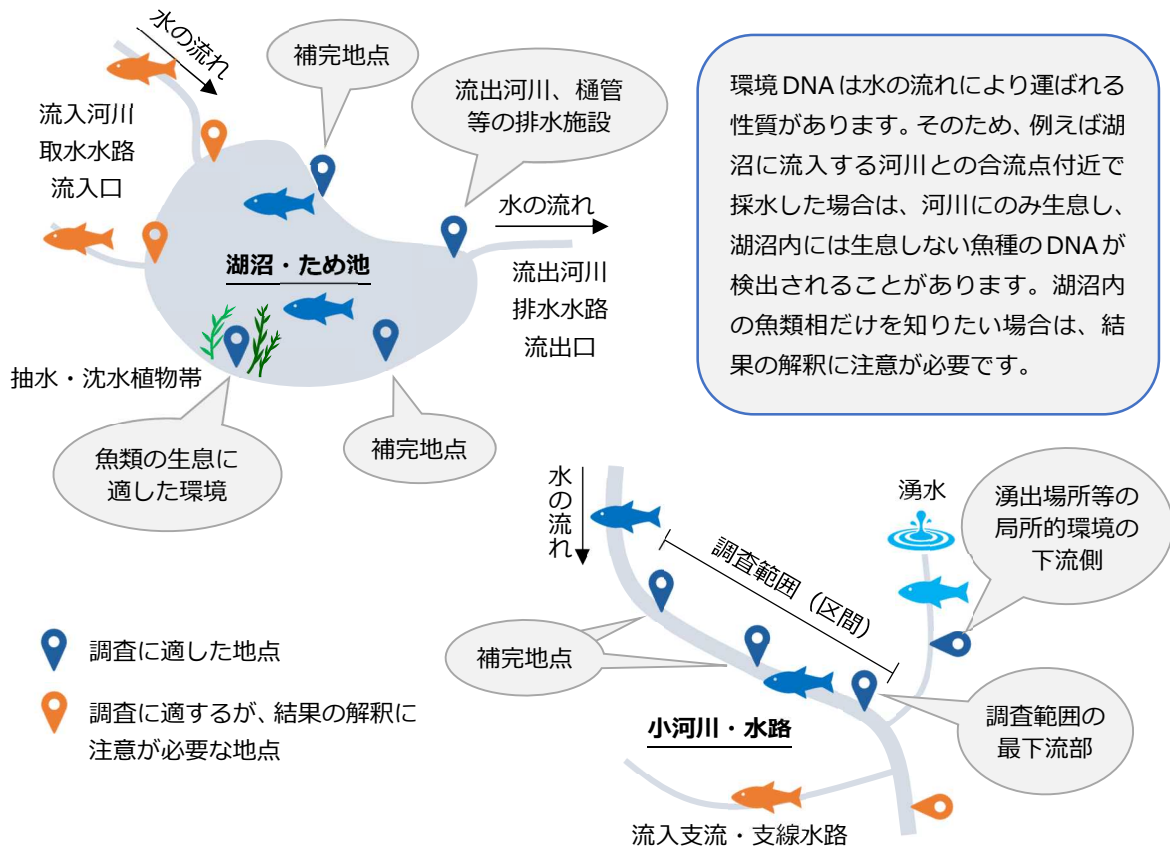


図 3-1 調査地点の配置例（淡水魚類）

4) 調査計画を検討する上での参考情報

調査計画を検討する際には、調査地点数や調査時期の設定が調査結果に影響を及ぼすと考えられますが、そうした調査計画を進める際に参考となる情報は、まだ非常に限られています。そこで、環境省では、個別の調査地における検討事例を積み重ねることで、調査計画時に指針や目安となりうる具体的な参考情報を集めることを目指し、令和2年度には伊豆沼・内沼、令和3年度には琵琶湖の内湖である西の湖とその周辺水域、令和4年度には中部地方の小規模ため池群や小河川において、多地点・高頻度の環境 DNA 調査（以降、重点調査とします）を実施しました。その成果として得られた調査計画を検討する上での参考情報を表 3-3 に整理しました。

なお、本項に関する詳細な内容については、参考資料 5 を参照してください。

表 3-3 調査計画を検討する上での参考情報（淡水魚類）

段階	項目	ポイント
調査計画	反復採水	・ 採水時に反復を取らない場合でも、調査地点の魚類相を調べることができますが、1 地点当たり 2 回以上の反復を取ることで、さらに検出種数を増やすことが期待されます。 ・ ただし、小規模ため池（例：面積 2,000m² 以下）では、反復を取っても検出種数を増やす効果は小さい場合があります。 ・ 生息密度が低いと考えられる種（例えば希少種）の生息調査に環境 DNA 調査を適用する場合は、種の検出確率を高めるため、1 地点当たりの反復数を 2 回以上に増やすことが推奨されます。
	調査地点数	・ 採水する調査地点数は、調査予算が許す範囲で、なるべく多く設定することで、効果的に検出種数を増やせる場合があります。 ・ 地点当たりの採水反復数は、1 回よりも 2～3 回に増やすことで、より少ない地点数で効果的に検出総種数を増やすことが期待されます。 ・ 一つの目安として、大規模止水域（例：伊豆沼、西の湖）では採水の反復が 1 回では 16～17 地点、反復が 2 回では 10～11 地点程度を調査地点数として設定すると、捕獲調査を行ったときと同等レベルの種数が検出できると期待されます。 ・ 小規模ため池（例：面積 2,000m² 以下）では、優占種を把握するためには、1 池当たり 1 地点程度でも十分な場合があります。
	調査時期	・ 一般的に淡水魚類の活動が盛んになる春から秋にかけての時期であれば、環境 DNA 調査に適した時期と言えます。 ・ 調査時期は、調査地の環境や調査対象種の生態的特性も十分考慮した上で、設定する必要があります。
	環境条件の影響	・ 水面規模が大きな湖沼の場合は、流入する河川との合流部や水路状に水面の幅が狭くなっている場所を選ぶことで、検出される種数が増えることがあります。
現地採水	採水方法の工夫 (プーリング採水)	・ 多地点から少量ずつ採水したサンプルを混合し、1 本にまとめるプーリング採水は、分析検体数を減らせるため、調査コストの低減を図ることができます。 ・ プーリング採水では、調査地点の全域に広く生息する主要な種は、検出できることが分かりました。 ・ 生息密度が低く、環境 DNA の存在量が少ないと考えられる種は、プーリング採水では検出しにくいことから、希少種の探索が目的の環境 DNA 調査にプーリング採水を適用する際は、生息しているのに検出できない「偽陰性」が生じやすく、十分な注意が必要です。
	採水方法の工夫 (夜間採水)	・ 淡水魚類を対象とした環境 DNA 調査においては、環境省が行った予備的な検討結果から、夜行性魚類（ニホンウナギ、ナマズ等）の検出に対する採水時間の影響は小さいと考えられますが、今後さらに採水時間の効果に関する研究が進むことが期待されます。
	降雨の影響	・ 降雨の影響によって、平常時より水が濁ったり、水位が上昇している時に採水を行うと、採水した調査地点に生息する種に加えて、そこには生息しないと考えられる種も検出されることがあります。 ・ 濁りの影響による検出種の変化を避けるためには、濁度や水位が平常時の状態に戻るまで、採水を避けた方がよいでしょう。
分析	PCR の反復数	・ 1 検体当たりの 1st PCR の反復数は、環境 DNA 学会発行の「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）で推奨されている通り、少なくとも 8 反復にしましょう。
	取得リード数	・ 1 検体当たりの取得リード数の目標値は、採水反復数が 1 回のときは 100,000 リード程度、採水反復数を 2～3 回程度とるときは 50,000 リード程度を目安にすることが望ましいでしょう。

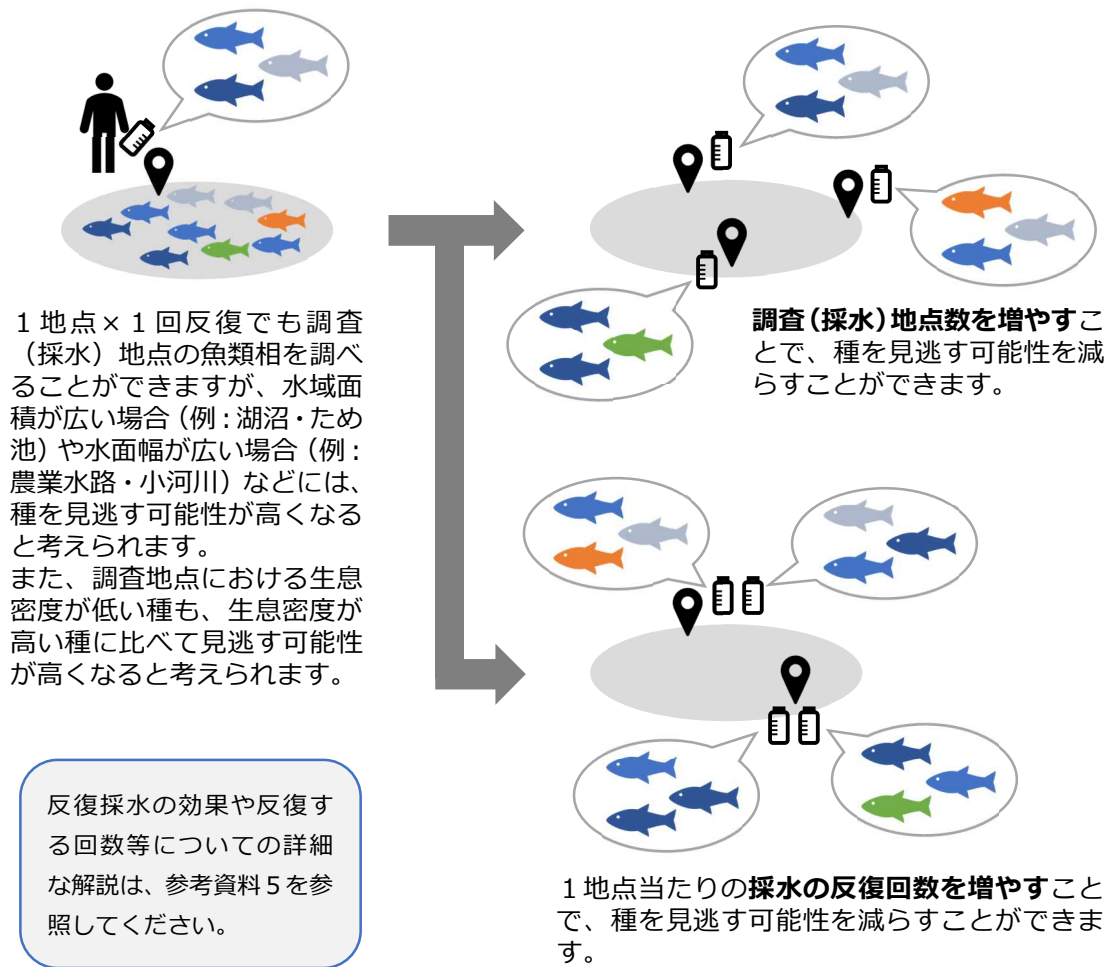


図 3-2 二次的自然の淡水魚類を対象とした環境 DNA 調査における偽陰性を減らすための工夫（概要）

3-3-2 両生類編

1) 両生類の特性

両生類は淡水魚類と異なり、多くの種において生活史の中で一時的にしか水域を利用せず、また魚類とは利用する水域が異なります（表 3-4）。両生類を対象に環境 DNA 調査を実施する際には、次に示す両生類の特性を踏まえ、効果的、効率的な調査計画を立案する必要があります。

両生類は成長の過程で変態し、幼生（オタマジャクシ等）の時期には水中で生活しますが、大部分の種は変態後に上陸します。幼体・成体は湿った陸上等で過ごし、常に水中にいるわけではありません。そのため両生類では、淡水魚類調査以上に、調査適期を外さないよう留意する必要があります。

また両生類では、魚類が生息するような比較的大規模な河川、湖沼で見られる種は限定的で、多くの種は水田や小規模な水路、溪流、水たまり、湿地等の、ごく浅い水域や一時的な水域を利用します。森林に依存する種が多く、一般的に森林内や森林に隣接した水域周辺では多くの種が確認されます。

表 3-4 淡水魚類と両生類の相違点

項目	淡水魚類	両生類
生活史	◆ 一生を水中で生活する。 ◆ 一般的には個体の遊泳範囲が広い。	◆ 一生の中で、水中生活期（卵、幼生）と陸上生活期（幼体、成体）に分かれる。 ◆ 幼生は遊泳能力が低く、孵化した場所の近くに留まる。
水中生活の期間・時期	◆ 年間を通じて個体由来の DNA が水中に放出されるが、環境 DNA 調査は、春から秋にかけて淡水魚類の活動が盛んになる時期が適している。	◆ 主に繁殖期、幼生期に個体由来の DNA が水中に放出される。 ◆ 水中生活期の時期（季節）は地域ごと、種ごとに異なる（春から夏の場合が多い）。
生息環境	◆ 多くは河川、湖沼等の広大な水域に生息する。また、それらの水域は連続していることが多い。	◆ 魚類と比べると、かなり小規模な水域にも生息する。魚類が生息できない環境（源流部、小さな水たまり、高層湿地等）にも生息する。 ◆ 水域間の連続性は低く、互いに隔離している場合がある。

日本には、計 110 種（亜種、外来種を含む）の両生類が山地、中山間地域、平地のいずれか、または複数にまたがり生息しています。一般に、両生類は幼生の生息環境によって止水性と流水性に大別されます。止水性の種は池沼、湿地、水田等の止水環境で、また流水性の種は溪流や河川等の流水環境でそれぞれ産卵し、幼生はそこで生育します。両生類の環境 DNA 調査においては幼生がいる時期・場所での採水を行うことが重要です。

両生類が生息する水域は、概ね表 3-5 のように大別されます。調査対象地域の両生類相を的確に把握するためには、調査目的を考慮しつつ、これらの環境が含まれるよう調査範囲を設定するとよいでしょう。

表 3-5 両生類の主な生息環境と環境 DNA の挙動

環境		環境の特性と環境 DNA の挙動	イメージ	生息する 主な両生類
水田・水路	中山間・平地	浅い湛水域である水田と、そこに水を供給・排出する水路がセットになった環境。水の引き込みは人為的に調整されており、田植えから稲刈りまでの時期を中心とした灌漑期と、それ以外の時期である非灌漑期に大別される。様々な両生類が水田や休耕田、その周辺の水たまりや水路等で繁殖する。 水田から流れ出た水が集約する水路には各種の環境 DNA が集約される傾向がある。ただし、複数の水田の水が集まるため、検出された DNA がどの水田に由来するか特定することは難しい。	 	アマガエル類、アカガエル類、トノサマガエル類、ヌマガエル類等
湿地	平地・中山間、山地	凹地に水がたまって生じる比較的浅い水域。広大な湿原から小さい水たまり、閉塞した水路、水の溜まった耕作放棄地、林内や谷の奥にある流れ込み等もこれに含まれる。水の由来は降雨だけでなく、湧水や雪解け水である場合もあり、水量の増減が激しい安定しない湿地もある。主に止水性の両生類が生息するが、ある程度の水深を必要とするウシガエル等は少ない。 水の流れが滞り、環境 DNA は流下せずに滞留する傾向がある。したがって、池沼等の水量が豊富な止水に比べて、流出口付近に DNA が集約されにくい傾向がある。	 	止水性サンショウウオ類（トウキョウサンショウウオ、クロサンショウウオ、カスミサンショウウオ等）、アカハライモリ、モリアオガエル等
池など	平地・中山間、山地	水田に水を引くために作られたため池や自然池沼、ダム湖等。湿地や水田に比べると、水量が多い状態で安定しており、極端に増減することは稀である。止水性の両生類が生息している。 水の流れがある場合には、DNA はある程度流出口付近に集約される傾向がある。流れがない場合には湿地と同様、環境 DNA は集約されずに滞留する。		クロサンショウウオ、アカハライモリ、ニホンヒキガエル、ウシガエル、ツチガエル等

環境		環境の特性と環境 DNA の挙動	イメージ	生息する 主な両生類
伏流	山地	主に河川の源流部にあり、砂礫層を潜伏して流れている水域。伏流のみを繁殖場所とし、幼生が表流にほとんど出現しない両生類がいる 伏流水に含まれる環境 DNA は地表へ湧出した水や、さらに下流の溪流からも検出される場合がある。		伏流性サンショウウオ類（アカイサンショウウオ、コガタブチサンショウウオ等）等
溪流	山地	地形が急峻な地域を流下する河川上流部の沢。勾配・流速ともに大きく、礫地で、瀬から淵にかけての段差（滝）を伴う場合がある。水量や川幅が比較的小規模のものを指し、一部が砂礫下に伏流している場合がある。流水性の両生類の主たる繁殖場所となっている。生息する種は、それより下流側の河川と異なる傾向がある。 多数の支流が合流していることが多く、目視では確認できない伏流が合流している場合もある。		流水性サンショウウオ類（ハコネサンショウウオ属、ヒダサンショウウオ等）、ナガレヒキガエル、タゴガエル類等
河川	中山間・平地	勾配・流速ともに小さく、礫底または砂泥底。中山間地の中流では瀬・淵が明瞭であり、平地の下流では不明瞭となる。 調査範囲より遥か上流域や水田等からの流入があるため、採水地点周辺には生息しない種の DNA が検出される場合がある。		カジカガエル、ツチガエル、オオサンショウウオ等

2) 既存の調査結果や専門家の知見に関する情報の収集

調査計画を策定する上では、調査範囲周辺に関する既存の調査結果や、地域の専門家の知見等の情報を事前に収集しておくことが重要です。また、これらの情報は調査結果を精査する上でも重要となるため、情報の有無や内容を調べておきましょう。

両生類が生息する環境のうち、とりわけ里地里山等の二次的自然環境においては、天候や季節変化の影響に加えて、農業活動等の影響による環境変動（水位や水量等）が大きいことが知られています。地図情報だけを頼りに、いざ調査地に行ってみると水が全くなかったなどということも予想されるので、環境 DNA 調査を計画する際は表 3-6 に示すような準備を事前に行っておくことが重要です。

環境 DNA 調査では、調査地点の環境水を採取し、その水に含まれている DNA を分析します。そのため、調査地点を流れる水がどこから来ているのかを把握しておくことが非常に重要です。とりわけ農業をはじめ、さまざまな形で人が利用している二次的自然環境では、水利施設等により人為的に水の流れがコントロールされ、他の水域から導かれた水が流れていたり、複

数の系統の水が混ざり合っている場合もあります。こうした「水系のつながり」に関する情報を事前に入手しておくことは、その後の環境 DNA 分析において今まで当該地域で確認されることがない種が検出された際にも、その解釈に役立ちます。

表 3-6 主な事前準備の内容

項目	事前準備の内容
調査地の環境把握 (踏査)	WEB 上に公開されている地図や衛星写真等から、調査地の環境情報を収集します。地図情報だけでは情報が不十分な場合は、必要に応じて、踏査を実施し、調査地の現況を確認します。 ● 水系のつながり、地形、周囲の森林の有無 ● 養魚場や釣り堀の存在（排水が混入する可能性があるか） ● 採水予定地点へのアクセスルート 採水方法の検討（水面からの直接採水が可能か、トレイ等を使用する必要があるか等）
文献調査	既存文献等から、調査地周辺に生息する両生類の情報を収集します。例えば、以下の情報は調査結果を精査・評価する上で役立ちます。 ● 生物図鑑、学術文献、郷土史資料等 ● 行政機関等による調査データ - 環境省：生物多様性情報システム等 - 国立環境研究所：侵入生物データベース等 - 国土交通省：河川環境データベース等 ● 環境省版及び都道府県版のレッドデータブック 既存の情報がない地域であれば、まずは本格的な調査を行う前に、地図情報だけから調査地点を設定して予備的に環境 DNA 調査を行い、調査地周辺に生息する両生類の情報を得る調査（スクリーニング調査）を行うことも有効です。
専門家ヒアリング	必要に応じて、調査地の自然環境もしくは両生類に詳しい専門家にヒアリングを行い、さらに詳細な情報を収集します。 ● 両生類各種の生息状況（繁殖場所や繁殖時期等） ● 水域の位置や状態、その季節的变化 また、水田を含む環境で調査を実施する際には、地域の水田耕作の状況に詳しい人に農事暦（水田への水入れ、代掻き、田植え、中干、刈り取り等の時期）を聞いておくことが重要です。特に、調査時期の検討においては田植えの時期を把握する必要があります。

3) 調査地点（位置・地点数）・時期・頻度の設定

両生類を対象とする調査の計画を立案する際に、予め知っておくべき共通の考え方を以下に示します。

調査地点・時期・反復採水の設定における共通の考え方（環境 DNA 特有の問題への対応）²⁰⁾

<調査地点>

- ・環境 DNA は、水の流れの影響を受けて移動・拡散するので、調査地内の水系の位置やつながりをよく把握しておくことが重要（偽陽性・偽陰性の防止）。
- ・基本的には捕獲調査で地点を選ぶ時と同じで、両生類の生息に適すると思われる個々の環境にできるだけ多くの地点数を設定するのが効果的。両生類は淡水魚類より浅く小規模な水域にも生息する点に注意。
- ・様々な水域から流出した水が集まる河川や水路では、異なる水域に生息する両生類の環境 DNA をまとめて検出できることがある。ただし、隔離した水域、小規模水域等の環境 DNA は、河川や水路ではあまり検出されないことに注意が必要。
- ・森林等、両生類の生息に適した環境に隣接した水系を選ぶ。

- ・魚類に比べ、両生類は目視や鳴声によって存在を確認しやすいため、カエルの声が聞こえる地点、オタマジャクシが目撃される地点等の情報も参考にして採水地点を選択する。
- ・生活排水や淡水魚類の養殖場、食品工場等の、人為由来の DNA が流れ込む地点には設定しない（偽陰性の防止）。
- ・両生類相を網羅的に把握したい場合は、特定の種だけが極端に多い地点には設定しない（偽陰性の防止）。

<調査時期>

- ・一般的に、多くの種の両生類の幼生が見られる時期（主に春から夏）が適している。また、水田を含む環境で調査を行う際には、非灌漑期よりも灌漑期（春から夏）が適している。
- ・過度に濁った水サンプルは分析に不適であることから、降雨時やその直後、田植えの前後等の採水は避けることが望ましい。特に、梅雨時期には留意が必要（偽陰性の防止）。

<その他>

- ・1 地点当たりの採水の反復回数を 1 回から 2～3 回に増やすことで、生息密度の低い種が検出される確率が高まることが期待される。
- ・両生類の環境 DNA は、淡水魚類に比べてひとつの水域内でも偏在している可能性があることから、1 つの水域から少量を採取し、混ぜ合わせて 1 つのサンプルとするプーリング採水が有効な場合がある。
- ・鉄分が多い水域や淡水魚類が多く生息する水域では、DNA が検出されにくい傾向があるため注意する。

両生類の環境 DNA 調査における調査地点・時期の設定の考え方と調査地点の配置例を以下に示します。情報は今後の調査・研究の進展によって変更が生じる部分もありますが、このような考え方を参考に調査地点・時期を検討するとよいでしょう。

① 調査範囲が単一水域または狭い範囲の場合

単一水域において環境 DNA 調査を行う際のポイントを表 3-7 と図 3-3 にまとめます。両生類の分布はひとつの水域内でも均一ではないことが多いため、事前情報として種数が多いことが想定される地点（複数種のおタマジャクシが見られる地点等）が分かればそこに採水地点を設定します。そうした地点が不明の場合は、単一の水域であってもまず水の流れに留意し、水域全体の DNA が集約する傾向のある水域下流端に採水地点を設定します。その次に、補完を目的とした採水地点をそこから離れた場所や環境が異なる場所等に配置します。

調査範囲の外から流入する水には、範囲外で放出された環境 DNA が含まれる可能性があるため（例えば、範囲内に生息しない種の DNA が検出されると、当該種の在情報を誤って判断してしまいます）、調査範囲外からの水の流れ込み付近で採水する場合には特に留意が必要です。

表 3-7 調査地点の環境に応じた調査地点・時期の設定の考え方（両生類）⁵⁾

調査地点の環境	調査地点・時期の設定の考え方
水田・水路	<調査地点> ・水田の流出口付近 ・一帯の水田から水が集まる排水路（範囲内に生息する複数の種の効率的検出） ・谷戸（森林に囲まれた谷沿いの水田）がある場合にはなるべく調査地点を設定する。谷戸下端の水路から採水すると効率的だが、谷の上端等に隔離された水たまり等がある場合は別途採水する <調査時期> ・両生類各種の幼生が多く見られる時期（基本的には春～夏）（効率的検出） ・水量の多い灌漑期。基本的には田植え後 1 ヶ月程度の、中干しの少し前がよい。代掻き、田植え直後等は水が濁って DNA が検出されにくい場合があるので留意が必要（偽陰性の防止） <留意点> ・農作業の邪魔にならないよう十分に配慮する（田植え時期は避ける等） ・ぬかるみのない、足場のしっかりした畦道等に接した地点（畦の破壊等の防止） ・複数の谷戸がある場合には、なるべく各々で採水する
湿地	<調査地点> ・比較的水深が深い場所等、採水しやすい水際（安全性の確保） ・湿地の水の流出口が分かればそれに近い地点（範囲に生息する複数の種の効率的検出） ・補完地点として、上記以外の地点（偏在する DNA の検出） <調査時期> ・両生類各種の幼生が多く見られる時期（基本的には春～夏） <留意点> ・環境保全に配慮する（植生の踏み荒らしを避ける等） ・複数の湿地があればなるべく各々で調査を行う
池など	<調査地点> ・水の流出口に近い地点（範囲内に生息する複数の種の効率的検出） ・補完地点として、上記以外の地点（偏在する DNA の検出） <調査時期> ・両生類各種の幼生が多く見られる時期（基本的には春～夏） <留意点> ・安全を確保する（足場のよい堤の上から採水する等） ・複数の池などがあればなるべく各々で調査を行う
伏流	<調査地点> ・伏流が地表流に切り替わる地点（＝水の流出口）（伏流に生息する種の効率的検出）。 <調査時期> ・伏流で繁殖する両生類の成体が見られる時期（基本的には春） <留意点> ・安全を確保する（落石や滑落等に注意する）。 ・複数の伏流があればなるべく各々で調査を行う
溪流	<調査地点> ・調査範囲の下流部（範囲内に生息する複数の種の効率的検出） ・補完地点として、上記以外の地点。環境の切り替わり（滝が連続する流れから平瀬が連続する流れへの切り替わり等）や支流の合流があれば、なるべく各々で採水する（偏在する DNA の検出） <調査時期> ・両生類各種の幼生が多く見られる時期（基本的には春～夏） <留意点> ・安全を確保する（落石、滑落及び落水等に注意する） ・複数の支流に分かれている場合は、なるべく各々で調査を行う
河川	<調査地点> ・調査範囲の下流部（河川に生息する複数の種の効率的検出） ・補完地点として、上記以外の地点（偏在する DNA の検出） <調査時期> ・両生類各種の幼生が多く見られる時期（基本的には春～夏） <留意点> ・安全の確保（滑落、落水等に注意する） ・範囲内に複数の河川があれば、なるべく各々で調査を行う

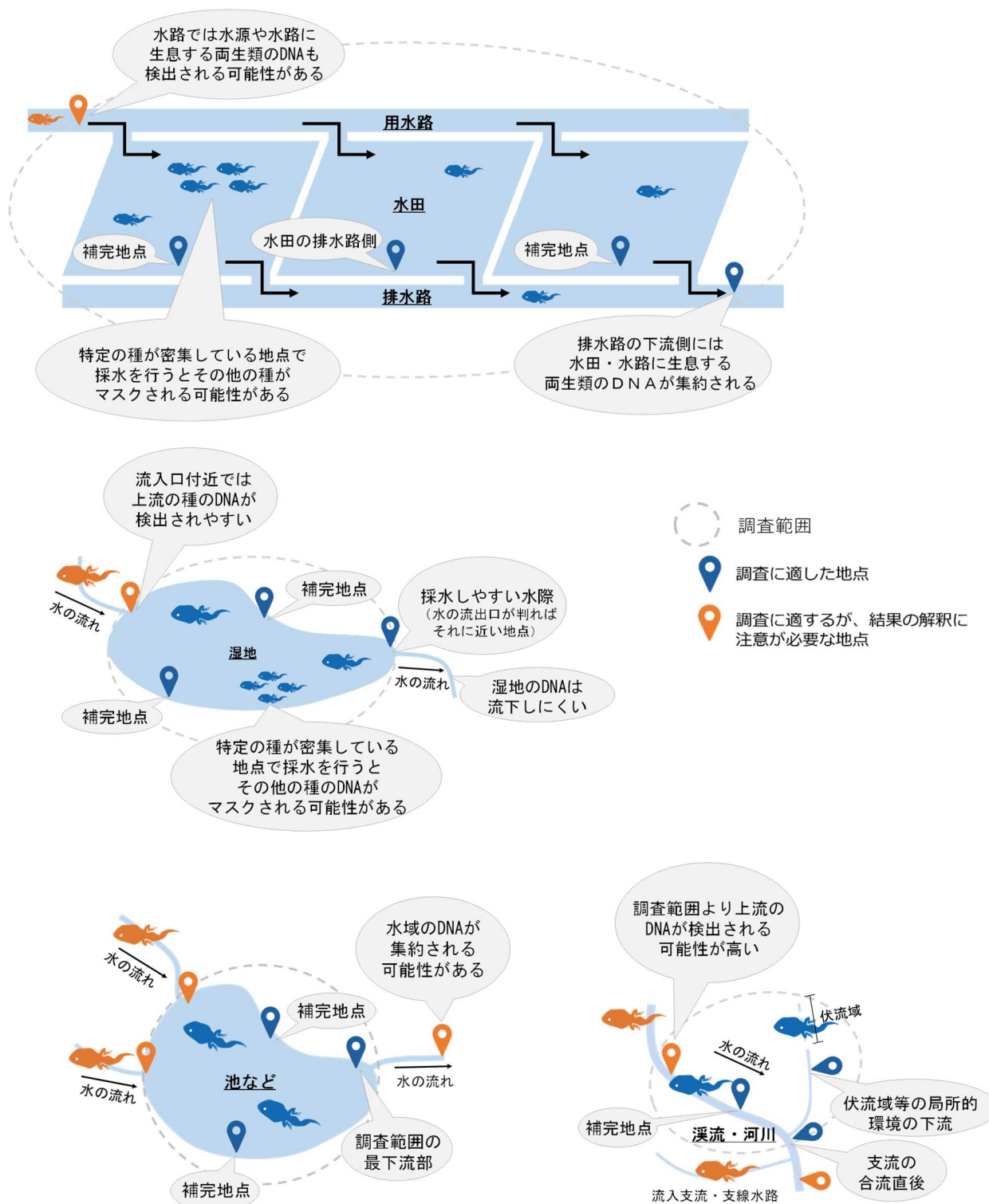


図 3-3 水域の環境ごとの調査地点の配置例

② 調査範囲に複数の水域が含まれる場合

調査範囲が広い場合は、範囲内に複数の水域が含まれることがあります。基本的には、こうした場合でも対象種が生息する可能性のあるすべての水域から採水することが望ましいのですが、予算等の都合で設定できる調査地点数に制約があることも想定されます。ここでは、調

査範囲内のすべての水域における調査が困難な場合の調査地点設定の考え方について紹介します(図3-4)。ただし、ここで紹介する方法は、各水域に調査地点を設定する方法(上記①)と比べると検出率が低くなる傾向があることや、各種の分布の詳細を確認できないことに留意する必要があります。

調査地点を絞り込まざるを得ない場合は、複数の水域内の DNA が流下等によって集約される場所に優先的に調査地点を設定することで、それらの地域一帯に生息する種の DNA をまとめて検出できる可能性があります。例えば、河川や水路等には、当該地域の様々な水域から水が集約する傾向があるため、広い範囲の両生類相を把握したい場合には、調査範囲内の河川や水路の下流部に調査地点を設定すると、その場所より上流に生息する各種の DNA をまとめて検出できる可能性があります。ただし、環境 DNA は長い距離を流下しない場合もあるため、可能な限り上流側に補完を目的とした調査地点を設けることが必要です。補完地点は、両生類が生息する可能性が高い環境(表3-5)の水が集約する地点(例えば、谷戸下端の水路等)や、環境が切り替わる地点(滝が連続する流れから平瀬が連続する流れへの切り替わり等)があれば各々に設定するとよいでしょう。一方で、流水につながっていない水域や湿地等の水量が少ない水域については、そこで放出された環境 DNA が河川や水路に集約されにくいと考えられるため、個別に調査地点を設ける必要があります。

また、一見似た景観、環境であっても生息する両生類の種組成が異なる場合があります。したがって、調査範囲内に同じ種類の水域が複数含まれる場合は(例えば、複数のため池、複数の支流)、どれかひとつだけで調査を行うのではなく、なるべく複数を対象に調査することで、見落としが少なくなると期待されます。

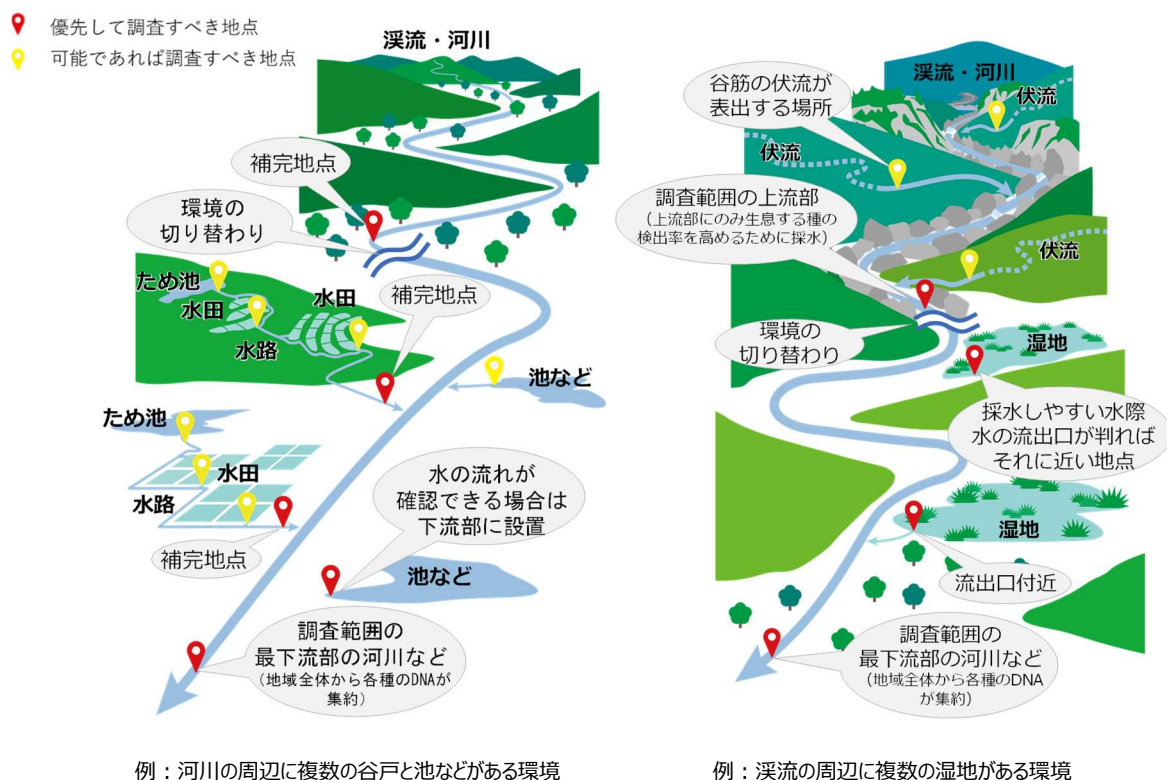


図 3-4 調査範囲内に複数の水域が含まれる場合の調査地点の配置例

4) 調査計画を検討する上での参考情報

調査計画を検討する際には、調査地点数や調査時期の設定が調査結果に影響を及ぼすと考えられますが、両生類においては参考となる事例情報がまだ限られています。そこで環境省では、個別の調査地における検討事例を積み重ねることで、調査計画時に指針や目安となり得る具体的な参考情報を集めることを目指し、令和3～5年度にかけて、両生類が生息するいくつかの環境タイプにおける効果的、効率的な採水地点の設定方法について検討しました。その成果と、3-3-1で示した淡水魚類調査の事例情報のうち両生類と共通する情報を合わせて、表3-8に両生類の調査計画を検討する上での参考情報を整理しました。

表 3-8 調査計画を検討する上での参考情報（両生類）

段階	項目	ポイント
調査計画	調査地点数	- 両生類調査では、河川、湖沼だけでなく、水田や小規模な水路、溪流、水たまり、湿地等の、ごく浅い水域や一時的な水域を調査範囲に含めることが重要です。 - 採水地点数は、調査予算が許す範囲で、なるべく多く設定することで、効果的に検出種数を増やせる場合があります。
	調査時期	- 潜在的に両生類各種の幼生期が重なる時期（基本的には春から夏が適期）。 - 調査時期は、調査地の環境や調査対象種の生態的特性も十分考慮した上で、設定する必要があります。
	環境条件の影響	- 各水域から放出された環境 DNA は、それらの下流に位置する河川や水路から採水することでまとめて検出できる場合があります。湖沼の場合も、流出口で採水することで検出種数が増えることがあります。範囲一帯に生息する種をまとめて検出しようとする場合は、そうした地点から採水することが効果的です。ただし、各水域から直接採水する場合と比べて、検出率が低くなることに留意が必要です。 - 小規模水域や流れのない水域に局在する両生類の環境 DNA は、下流の河川や水路では検出されにくい傾向があります。偽陰性を防ぐために、できるだけそうした両生類各種の生息場所に近い位置に採水地点を設定することが効果的です。 - 流下距離や希釈等によって、環境 DNA が検出されにくくなる場合があります。
現地採水	採水方法の工夫（プーリング採水）	- 多地点から少量ずつ採水したサンプルを混合し、1本にまとめるプーリング採水は、分析検体数を減らせるため、調査コストの低減を図ることができます。 - プーリング採水では、調査地点の全域に広く生息する主要な種は、検出できることが分かりました。 - 生息密度が低く、環境 DNA の存在量が少ないと考えられる種は、プーリング採水では検出しにくいことから、希少種の探索が目的の環境 DNA 調査にプーリング採水を適用する際は、生息しているのに検出できない「偽陰性」が生じやすく、十分な注意が必要です。
	降雨の影響	- 降雨の影響によって、平常時より水が濁ったり、水位が上昇している時に採水を行うと、採水した調査地点に生息する種に加えて、そこには生息しないと考えられる種も検出されることがあります。 - 濁りの影響による検出種の変化を避けるためには、濁度や水位が平常時の状態に戻るまで、採水を避けた方がよいでしょう。
分析	PCR の反復数	1検体当たりの1st PCR の反復数は、環境 DNA 学会発行の「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」（2020年4月3日発行）で推奨されている通り、少なくとも8反復にしましょう。
	取得リード数	- 淡水魚類編にならい、両生類でも1検体当たりの取得リード数の目標値は、100,000リード程度を目安にすることが望ましいでしょう。ただし、今後の研究の進展や情報の蓄積によって、より望ましい取得リード数が明らかになる可能性があります。 - Amph16S法を用いた環境省の試行調査では、両生類だけでなく魚類のDNAも多く増幅され、全分類群リード数に対する両生類リード数の比率が極端に低く、反対に魚類リード数が極端に高い結果となる事例が確認されました。このため、魚類が多く生息すると考えられる環境では必要に応じて1検体当たりの取得リード数をさらに増やすことで、より効果的に検出種数を増やせることが期待されます。

4. 現地調査（採水）

4-1 事前準備

作成した調査計画に基づき、具体的に現地調査の準備を進めます。ここでは、調査地点の環境に合った採水方法、調査を実施する上で必要な手続き、安全管理に必要な情報について紹介いたします。なお、現地調査の詳細については、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）の「3. 採水および濾過」（p. 12～32）を参考にしてください。

4-1-1 採水方法の特徴と各採水方法に適した調査

本項では、「容器による直接採水」、「バケツを用いた採水」、「採水器を用いた直接採水」「トレイを用いた採水」の 4 つの採水方法について紹介しています。ここでは、各採水方法の特徴について紹介します。

表 4-1 採水方法の特徴と各採水方法に適した調査

	採水方法	特 徴	適した調査
1	容器による直接採水 ⁵⁾ →手順は P.44 参照	・採水時に水中に入って直接採水する場合は、調査員の衣服（長靴、胴長、ライフジャケット）に他地域の DNA が付着していることに留意が必要（偽陽性の防止）	・水の中に直接入らない調査 例：写真 4-1～3 のような地点
2	バケツを用いた採水 ⁵⁾ →手順は P.45 参照	・バケツを複数地点で使いまわす場合にはコンタミネーションが発生しやすいため、採水毎にバケツの除染が必要（偽陽性の防止）	・1 地点のみの調査 ・複数地点の採水サンプルを混合して、分析する場合
3	採水器を用いた直接採水 →手順は P.46 参照	・採水器の準備が必要 ・採水毎に採水器の除染が必要（偽陽性の防止）	・上記以外の調査に適している
4	トレイを用いた採水 例：写真 4-4	・コンタミネーションの発生を避けるため、採水毎に新品のトレイを使用（偽陽性の防止）	・水田や水たまり、源流域等、ごく浅い（水深数 cm 以下の）水域での調査



写真 4-1 直接採水の様子



写真 4-2 バケツ採水の様子

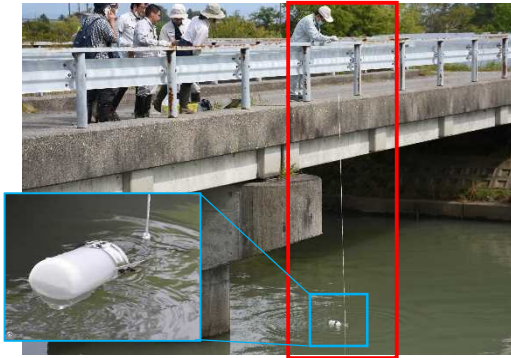


写真 4-3 採水器採水の様子



写真 4-4 トレイ採水の様子

4-1-2 事前の準備（立ち入り等）

調査の実施にあたり、事前に立ち入りに関して確認をしておく必要があります。

- ・調査地に地権者や管理者等（例、漁業協同組合等）がいる場合は連絡をして、調査同意を得ましょう。

※捕獲調査を同時に行う場合には、自然公園法、種の保存法、外来生物法、文化財保護法、水産資源保護法、漁業調整規則等の諸法令の許可申請が必要かどうかを事前に確認し、必要な場合は申請し承諾を得ましょう。許可を得るために数ヶ月の申請期間が必要になるケースもあるので早めの準備が大切です。

4-1-3 安全管理

調査の実施にあたっては、可能な限り現地踏査を行い、現場での危機を予防するとともに、遭遇した際に迅速な対応を行えるようにしましょう。

また、調査前には調査責任者が、降雨による増水や夏季の熱中症等、野外で発生しうる危険について把握した上で調査実施可否の判断をしましょう。調査実施の判断にあたっては、以下のホームページが参考になります。

気象庁 天気予報
<https://www.jma.go.jp/jp/yoho/>



国土交通省 川の防災情報
<http://www.river.go.jp/portal/>



気象庁 高解像度降水ナウキャスト
<https://www.jma.go.jp/jp/highresorad/>



環境省 熱中症予防情報サイト
<http://www.wbgt.env.go.jp/>



4-1-4 調査機材などの準備

調査の実施にあたって、以下の調査機材を準備しましょう。また、調査時には人為的なコンタミネーションを避けるために、マスク、医療用ゴム手袋を着用します（下図参照）。採水キットの準備については、分析会社等へ依頼できる場合がありますので、事前に相談するとよいでしょう。また、ネガティブコントロール（採水日数分）や採水時の予備用として、採水キットは、実際の採水地点数より多めに準備します。

<1 地点あたりの採水キット> ^{xiii}

- ・滅菌済ポリ瓶（1L）
- ・10%塩化ベンザルコニウム液（1.2mL に小分け）
- ・医療用ゴム手袋（2 組）
- ・マスク（2 組）
- ・チャック付きビニール袋（大）

※右写真参照



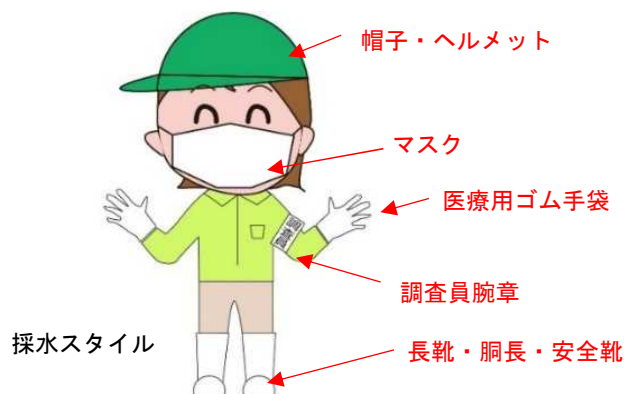
<地点共通で使用する必須機材> ^{xiii}

- ・スプレー式の泡塩素系漂白剤
- ・実験用ペーパータオル
- ・精製水
- ・保冷剤
- ・クーラーボックス
- ・ロープ
- ・バケツ
- ・温度計
- ・水深測定機材（箱尺や錘を付けた紐など）

<用意しておくことが望ましい機材>

- ・ライフジャケット

※ 直接水深のある水際にアクセスする場合は必須



採水スタイル

【淡水魚類】

・採水器

- ※ 採水時のコンタミネーションを避けるため、容器に直接水を採水できるようにステンレス製の金具等で作成（下図参照）



【両生類】

・トレイ

- ※ 水深が浅い採水地での採水時に使用します。トレイはその都度、使い捨てします（下図参照）
- ※ 滅菌済みや塩素系漂白剤などにより除染されたものであれば、瓶のふたなど類似の形状のもので代用することもできます。



4-1-5 現地での注意点

現地では、コンタミネーション等を防ぐため、以下の事項について注意しましょう。

- ・調査時の服装や靴は、きれいに洗濯したものか新品のものを着用しましょう。
- ・水の流れる向きに留意し、採水が完了するまで採水地点の上流側には立ち入らないようにしましょう。
- ・採水時には、底泥の巻上げによって濁りが生じないように留意しましょう。
- ・採水前の食事には、魚や魚が材料として使用されている食品は避けましょう。
- ・同時に既存調査を実施する場合には、すべての地点で採水が完了してから実施しましょう。

4-2 環境 DNA サンプルの採水手順

現地においては、以下の手順により採水・周辺環境の記録を行います。なお、現地調査の詳細については、「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2. 2」(2020 年 4 月 3 日発行)の「3. 採水および濾過」(p. 12~32)を参考にしてください⁵⁾。

4-2-1 採水地点での確認事項

- ・ 予定した採水地点において、工事等による特異的な濁り、釣り人（特に撒き餌）、特定の種が集団で産卵している場合、対象種の死がいがある場合等、環境 DNA 分析に影響が生じる可能性がある事象が確認された場合には、場所を変更する。
- ・ 採水地点に立ち入る前に周辺の外観写真を撮っておく。採水地点の植生・護岸や水路の状況が把握できるようアングルを変えて複数枚撮影する。

4-2-2 採水準備

- ・ 護岸上や橋の上など、安全に採水可能な陸上から採水する。
- ・ 作業時には使い捨てゴム手袋をはめる。

4-2-3 採水および塩化ベンザルコニウム液の添加

採水地点において、容器に採水を行い、塩化ベンザルコニウム液（劣化防止剤）を添加することで、DNA の劣化を防止することができます。ただし、塩化ベンザルコニウム液をサンプルに添加する処理方法は特許が取得されているので、この処理方法を利用する場合には配慮が必要となります。必要に応じて、事前に分析業者等に使用可能かを確認しましょう。

また、塩化ベンザルコニウムを添加しないより簡便な方法としては、採水サンプルをクーラーボックスに収容し、十分な量の保冷材や袋入り氷等でよく冷やしながら輸送する方法もあります。

※本手引きでは、採水方法として、「容器による直接採水」、「バケツを用いた採水」、「採水器を用いた直接採水」の3つの方法について紹介します。各採水方法は次ページ以降に、各採水方法の特徴と適した調査は、表 4-1 に記載しています。

4-2-4 フィールドデータの記録

- ・ コンタミネーションを回避するため、周辺環境の記録はサンプル採水後に行う。
- ・ 水深、水温等を観測し、表 4-2 に示すフィールドデータを記録する。

4-2-5 保管・輸送

- ・ 採水したポリ瓶はクーラーボックスに入れ、保冷剤等で保冷して実験室へ輸送する。
- ・ 宅配便を使用する場合はクール便（4℃）とする。
- ・ 宅配便が実験室に到着するまで2日以上を要する場合は、現場でサンプルを濾過する。（濾過方法については分析担当者と協議して決定する。）

a. 直接採水の手順

- ①ライフジャケットを着用した上で水際にアクセスし、水面の浮遊物等を避けるよう、滅菌ポリ瓶に 1L より少し多めの水を直接採取する。
※採水時には、底泥の巻上げによる濁りが生じないように留意する。
※滅菌ポリ瓶の共洗いは不要。



- ②ポリ瓶に 1.2mL の 10%塩化ベンザルコニウム液を添加し、密栓して、よく混和する。
※数時間以内に分析施設へ輸送して濾過処理が可能な場合は、塩化ベンザルコニウムを添加せずに、保冷材等で十分に冷やすだけの簡易な方法も選べます。



- ③調査日時、地点等を記入する。



- ④瓶の周囲をペーパータオルで拭き取り、地点ごとにファスナー付きのポリ袋へ入れ、保冷して運搬する。



b. バケツを用いた採水の手順

①バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部を泡状の塩素系漂白剤で除染する。漂白剤はペーパータオルできれいに拭き取る。



②現地の水でバケツ内の共洗いを 2～3 回以上（塩素臭がしない程度）行う。
※共洗い後の水は陸地や下流側等、調査地点に影響がない場所に捨てる。



③バケツを投入し、ロープをたぐり寄せて分析用の水を採水する。
※バケツ投入時には、底泥の巻上げによる濁りが生じないように留意する。



④バケツ内の水を滅菌ポリ瓶に 1L より少し多めに移す。
※滅菌ポリ瓶の共洗いは不要。
※使い捨てプラスチックカップ等を使って移し替えてもよい。



⑤ポリ瓶に 1.2mL の 10%塩化ベンザルコニウム液を添加し、密栓して、よく混和する。
ポリ瓶に、調査日時、地点等を記入する。



⑥瓶の周囲をペーパータオルで拭き取り、地点ごとにファスナー付きのポリ袋へ入れ、保冷して運搬する。



c. 採水器を用いた直接採水の手順

①採水器の金属部分を泡状の塩素系漂白剤で除染する。漂白剤はペーパータオルできれいに拭き取る。



②採水器に紐を結ぶ(紐は地点ごとに取り替える)。採水器に滅菌ポリ瓶を取り付ける。蝶ナットの紛失に注意。



③開栓して採水器を投入する。水面の浮遊物等を避けるよう、水面下に降ろし、1L より少し多めに採水する。



④ポリ瓶を採水器から外して予め 1.2mL に分注した 10%塩化ベンザルコニウム液を添加し、密栓して、よく混和する。



⑤調査日時、地点等を記入する。



⑥瓶の周囲をペーパータオルで拭き取り、地点ごとにファスナー付きのポリ袋へ入れ、保冷して運搬する。



4-2-6 フィールドデータの記録方法

環境 DNA 分析結果の妥当性を判断する上では、調査地点周辺の環境情報を記録しておくことが重要です。現地調査時に収集・記録すべき情報を表 4-2 に示します。

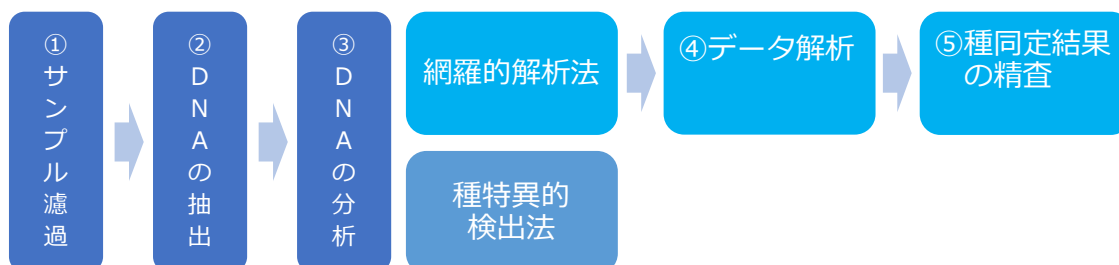
必須項目に関しては、調査データの信頼性を担保するために重要な項目ですので、必ず収集・記録しましょう。

表 4-2 現地調査時に収集・記録すべき情報

No	記録項目	収集・記録すべき情報	優先度
1	サンプル名	採水地点の記録	必須
2	採水者	採水者名を記録	任意
3	採水日時	採水した日付、時刻を記録	必須
4	採水地点座標データ	緯度経度を GPS で記録。調査後にインターネット等で調べてもよい	必須
5	水深	採水場所の水深を箱尺や錘を付けた紐で測定して記録	任意 (推奨)
6	採水水深	採水水深を記録	必須
7	採水機材	機材（バケツ、採水器、トレイ等）を記録	必須
8	採水容器	容器の種類、容量を記録	任意
9	採水容器の再利用	容器の再利用状況を、未利用容器、再利用容器で記録	任意
10	採水量	リットルまたはミリリットルで記録	必須
11	塩化ベンザルコニウム液の添加量	塩化ベンザルコニウム液の添加の有無とその添加量を記録	任意 (推奨)
12	天候	天気を観察して記録	任意
13	気温	温度計で測定して記録	任意
14	水温	温度計で測定して記録	必須
15	透視度	濁りの指標として透視度計で測定して記録	任意
16	流量	流れの有無を、あり、なしで記録 河川の場合は流量計で測定し、m/s で記録	任意
17	外観	濁りの程度濁、微濁、透などの段階で記録 コンクリート護岸、水生植物等の植生といった水際の構成材料を記録	任意
18	採水後の保管	保冷剤、クーラーボックス等による保冷状況等を記録	必須
19	写真撮影	調査地点の外観を写真撮影	必須
20	特記事項	調査地周辺の概況、対象種の確認記録、間接的に影響を与える要因等、調査対象以外の生物の確認情報等を記録	任意

5. 分析

現地調査で採水されたサンプルは、送付等を経て分析業者等の実験室に届いた後、「①採水したサンプルの濾過」→「②DNAの抽出」→「③DNAの分析（網羅的解析法あるいは種特異的な検出・定量）」の工程で分析されます。



詳細な各分析の手順については、以下の表 5-1 に「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）での該当箇所およびページを示していますので、参照してください。また、各分析工程がどのような条件（例：濾過情報、分析条件、プライマー情報等）で分析が行われたか記録しておくことが大切です。このため、分析を依頼する際には、分析に関する情報を記録してもらうようにしましょう。分析記録は、参考資料 3 を参考にするとよいでしょう。

なお、環境 DNA 技術は、今後も研究が進むとともに進展していくものと考えられますので、分析を実施する前に「環境 DNA 調査・実験マニュアル」が更新されていないか確認するとよいでしょう（令和 6 年 5 月現在は ver. 2.2）⁵⁾。

表 5-1 分析手順に対応する「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2」の該当箇所

No	分析手順	該当箇所・ページ	
①	採水したサンプルの濾過	「3.採水および濾過」の「3-2.採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過」	p.26～32
②	DNA の抽出	「4.DNA の抽出」の「4-1.カートリッジ式フィルターを用いた DNA 抽出」	p.34～46
		「4.DNA の抽出」の「4-2.グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出」	p.47～56
③	DNA の分析	「5.DNA の分析」の「5-1.リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的な検出・定量」	p.57～60
		「5.DNA の分析」の「5-2.MiFish メタバーコーディング」	p.61～104

<分析にあたっての注意点>

- 分析時の人為的コンタミネーション（偽陽性）
分析時の人為的なコンタミネーションにより、調査地に生息していない種が検出される場合があります。これを防ぐためにも、上述した通り、分析を依頼する業者等に対して、「環境 DNA 調査・実験マニュアル」に従って実施することをお伝えすることをお勧めします。例えば、上記マニュアルでは、コンタミネーションを減らす工夫として、DNA 抽出室は PCR 関連の部屋とは空間的に十分に隔離しなければならないこと等が示されています。
- 網羅的解析法では、プライマーに不適合な種は検出できない（偽陰性）
淡水魚類ではヤツメウナギ類、アユ、ワカサギ等、網羅的解析法では検出しにくい、検出できない種があります。このような種が調査対象の場合には、分析業者等に事前に相談し、改変されたプライマーを追加することで、種の検出力が改善されることが期待されます。

環境 DNA 分析の手法には、主に「網羅的解析法」と「種特異的検出法」の2種類があります。2つの分析手法は、それぞれ調べることができる内容が異なるため、調査の目的に合わせて選択する必要があります。

なお、環境 DNA 分析の手法およびデータ解析についてのさらに詳しい解説は、参考資料6に記載されていますので、より深く理解したい場合はそちらを参照してください。

表 5-2 網羅的解析法と種特異的検出法

項目	網羅的解析法	種特異的検出法
得られる結果	● 生物相の情報＝種のリスト（採水地点に、どんな種類が生息していたかがわかる） ● 現時点では、網羅的解析法の結果から、検出されたそれぞれの種の生物量は評価できないとされています（今後の研究の進展により、生物量の相対的な比較が可能になることが期待されます）。	● 特定の種の環境 DNA の有無および濃度（採水地点に、調査したい種の環境 DNA がどのくらいの濃度で存在していたかがわかる） ● 環境 DNA 濃度は、生物量と相関していることが多く、サンプル間での相対的な生物量の比較ができるとされています。
調べられる種	● 国際塩基配列データベースに、網羅的解析法で使用する配列（ミトコンドリア DNA の 12S リボソーム RNA 遺伝子領域あるいは 16S リボソーム RNA 遺伝子領域）が登録されている種 ● 国際塩基配列データベースには、日本産の淡水魚類や両生類の多くの種において、MiFish 法や Amph16S 法で使用する配列が登録されています。 ● 一部の種では未登録のため、個別の種については、参考資料 1・2 で確認してください。	● 種特異的に DNA と反応する「PCR プライマー」が設計されている種 ● PCR プライマーが設計されている種は、参考資料 1・2 で確認してください。 ● 現在は PCR プライマーが設計されていない種でも、民間の分析機関や大学等の研究者に依頼して設計することにより、分析ができるようになります。
利点	● 1 度の分析で、複数の種の生息情報がわかる	● 網羅的解析法と比べて、微量な DNA の検出感度が高い傾向にあり、偽陰性が生じにくい ● 一般的に生息密度が低い希少種の探索に向いている ● 駆除の効果が進み、生息密度が低くなった外来種の検出に向いている ● 同一の分析手順で得られた結果であれば、サンプル間の量的な比較ができる
欠点	● サンプル中の存在比率が非常に低い DNA を検出できないことがあり、結果的に偽陰性が生じる ● 検出された種のサンプル間の量的な比較はできない	● 1 度の分析で、1 種の生息情報しかわからないため、複数の種を調べたいときは、種数に応じた分析コストがかかる
適用調査例	● 対象生物相のモニタリング ● 希少種等の調査対象種の探索 ● 外来種の駆除効果の確認	● 特定の種のモニタリング ● 希少種等の調査対象種の探索 ● 外来種の駆除効果の確認

6. 分析結果の判読

環境 DNA の分析結果は、データ処理の過程に応じていくつかのファイルが出力されます。一般的に出力される分析結果を表 6-1 に示します。

分析結果のうち「一致率が高い生物種リスト」を用いて、調査地（採水場所）に生息する種を推定することになります。つまり、「一致率が高い生物種リスト」は最終的に知りたい調査結果の種リストではありません。次の分析結果の精査で、「生息している種が検出されない（偽陰性）」あるいは「生息していない種が検出される（偽陽性）」が含まれていないかなどの確認が必要になります。

なお、「一致率が高い生物種リスト」以外の生成ファイル（表 6-1 の 1～3）は、分析結果の精査や、その後の活用（今後の技術の進展などによって、より詳細な解析を行う際の基礎的なデータとしての利用など）にあたって重要なデータとなるため、併せて保存しておくことが大切です。

表 6-1 分析結果の種類と記載内容

No.	分析結果の種類	記載内容	代表的なファイル形式
1	塩基配列に関する生データ	検出された塩基配列の生データ	fastq 形式
		DDBJ-DRA(国立遺伝学研究所が作成している DNA の塩基配列の配列データベース)への登録時に必要な情報（サンプル調製方法、ラン条件、ファイルの破損チェック等）	tsv 形式
2	OTU の代表配列	一定割合の相同性（塩基配列の類似性）で生データをクラスタリングした結果	csv 形式
		生データのうち 0.1%以上の出現頻度があるデータ	csv 形式
3	代表塩基配列のリード数と一致率解析結果	代表配列の結果から推定される生物種の対応表。BLAST 検索といわれる検索プログラムを用いて、配列一致率が最も高い生物種の配列情報を記載したもの	csv 形式
4	一致率が高い生物種リスト	一致率が高い生物種の一覧表。これを元に調査範囲の生息種を推定する。上位 1～10 位までが示されることが一般的（※BLAST 検索結果の上位種）	csv 形式

＜一致率が高い生物種リストの例（淡水魚類）＞

ID	リード数	TopHit	一致率	学名	和名	塩基配列
Zotu1	580	LC468877.1	100	Hemibarbus barbus	ニゴイ	CACCGCGGTTAAA
Zotu2	55335	LC492321.1	100	Tribolodon hakonensis	ウグイ	CACCGCGGTTAAA
Zotu3	3772	LC468871.1	100	Carassius auratus grandis	オオキンブナ／ギンブナ	CACCGCGGTTAGA
Zotu4	9599	LC458044.1	100	Phoxinus steindachneri	アブラハヤ	CACCGCGGTTAAA
Zotu5	18244	LC385178.1	100	Rhinogobius fluvialis /s	旧トウヨシノボリ種群	CACCGCGGTTATA
Zotu6	34625	LC020972.1	100	Zacco platypus	オイカワ	CACCGCGGTTAAA
Zotu7	13019	LC492321.1	98.864	Tribolodon hakonensis	ウグイ	CACCGCGGTTAAA
Zotu8	5497	LC474233.1	100	Gymnogobius urotaenia	ウキゴリ	CACCGCGGTTATA
Zotu9	1926	LC468891.1	100	Misgurnus anguillicaudatus	ドジョウ（在来型）	CACCGCGGTTATA

代表配列と同じ配列を持つ塩基配列が検出された数。

アクセッション番号
(DNA データベースの登録番号)

DNA データベースに登録された塩基配列と代表塩基配列との一致率。一致率が低い時は種レベルではなく、属レベルあるいは科レベルの一致と判断する。

DNA データベースに登録されている学名と和名

代表配列

7. 分析結果の精査

「一致率が高い生物種リスト」を精査するには、調査対象地域における既往知見や対象種群の分布域の確認など、専門的な知識が必要になります。精査の必要性については、参考資料6を参照してください。現時点では、精度の高い種リストを作成するための方法は確立しておらず、場合によっては魚類または両生類に詳しい専門家に相談する必要があります。このため、環境DNA分析を依頼する場合には、どのような成果が必要か事前に確認しておく必要があります。なお、「一致率が高い生物種リスト」の精査は、追加の費用が発生する場合がありますので、分析業者等に依頼する際には確認しておくといよいでしょう。また、淡水魚類については参考資料10のMiFish法に係る誤同定チェックシートを活用することで、簡易的に精査を行うことが可能です。

以下に、環境省の試行調査で実施した分析結果の精査の方法を事例として紹介します。

事例

分析結果の精査（環境省の試行調査の場合）

環境省が実施した試行調査では、分析結果の判読で得られた「一致率が高い生物種リスト」を以下のステップで精査を行い、最終的な対象種リストを確定させています。

ステップ1 分析結果に誤った種名が記載されていないか？

まず、種名が正しく記載されているかを確認します。

ステップ	チェック	チェックの具体的な方法（淡水魚類の例）
1	分析結果に誤った種名が記載されていないか	「MiFish法による種の識別に注意を要する淡水魚類リスト」や「MiFish法に係る誤同定チェックシート」等を参考に、種名の表記に誤りがないかを確認し、必要に応じて変更します。

ステップ2 調査地点周辺における生息が疑わしい種が含まれていないか？

次に、下記のチェックフローに従って、分析結果に調査地点周辺において生息が疑わしい種が含まれていないかを確認します。偽陽性（すなわち、生息していない）と判断された場合は、「一致率が高い生物種リスト」からの削除を検討します。

ステップ	チェック	チェックの具体的な方法
2-1	既知の分布域等に調査地点が該当するか	図鑑、既存文献等により確認した対象種の既知の分布域および生息環境に、調査地点が該当しているかを確認します。

該当する



生息の可能性が高いと判断

該当しない

ステップ	チェック	チェックの具体的な方法
2-2	調査地点周辺における生息の可能性はあるか	既存文献、専門家へのヒアリング等により、調査地点における対象種の生息可能性を判断します。特に、移入や交雑個体の存在に関する最新情報、調査地点の上流域における分布情報などを重点的に確認し、総合的に生息可能性を判断します。

生息可能性はある



生息の可能性が高いと判断

可能性が非常に低い

ステップ	チェック	チェックの具体的な方法
2-3	採水時・分析時にコンタミネーションが生じた可能性があるか	調査地点周辺および上流側に、偽陽性の原因となる外来DNAの放出源（例えば、養魚場や家庭排水、食品工場排水など）が存在しないか確認します。分析を委託した機関に、分析時のコンタミネーションの可能性等がないかを確認します。

存在しない可能性がない



生息の可能性は保留

可能性はある（疑いも含む）

偽陽性（生息していない）と判断

おわりに

淡水魚類や両生類の調査はこれまで捕獲や目視、鳴声（両生類）による方法が一般的でしたが、環境 DNA 分析技術の発展により、現地調査の方法に選択肢が増え、今までになかった新たな知見を得ることができるようになりました。

環境 DNA 調査は、従来調査に入れ替わるものではありませんが、得られる成果からは、様々な活用の仕方が期待されています。また、従来の捕獲や目視調査による方法と組み合わせることにより多くの情報を得ることができるでしょう。

環境 DNA 調査の特徴を踏まえ、目的に応じて現地調査に上手く導入することができれば、これまで以上に生物多様性保全に必要なデータを効果的に得ることが可能となります。そのためには、まずしっかりと環境 DNA 調査の基礎的な部分について理解することが重要となります。本手引きが、これから環境 DNA 調査を始める方々の役に立てば幸いです。

本手引きは、令和 6 年（2024 年）度時点での知見を基に作成されたものです。環境 DNA 分析は新しい技術でもあり、今後も飛躍的に技術が進歩していくことが予想されるため、本手引きについても、状況に応じて再び改訂される可能性があります。

本手引きは「絶滅危惧種分布重要地域抽出のための環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の標準化・一般化に関する検討会」と「環境 DNA 分析技術を用いた両生類調査手法の標準化・一般化に関する検討会」において、以下の検討委員の助言・監修を受けて作成されました。

【淡水魚類】

検討委員（敬称略・50 音順）

鬼倉 徳雄 九州大学大学院 農学研究院資源生物科学部門 教授
金尾 滋史 滋賀県立琵琶湖博物館 主任学芸員
近藤 倫生 東北大学大学院 生命科学研究科 教授（座長）
土居 秀幸 京都大学大学院 情報学研究科 教授
深谷 肇一 国立環境研究所 主任研究員（臨時検討委員）
源 利文 神戸大学大学院 人間発達環境学研究科 教授
宮 正樹 千葉県立中央博物館 資料管理研究科 主任上席研究員
渡辺 勝敏 京都大学大学院 理学研究科 准教授

【両生類】

検討委員（敬称略・50 音順）

倉林 敦 長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 准教授
島田 知彦 愛知教育大学 教育学部 准教授
高原 輝彦 島根大学 生物資源科学部 准教授
土居 秀幸 京都大学大学院 情報学研究科 教授
西川 完途 京都大学大学院 人間・環境学研究科 教授
源 利文 神戸大学大学院 人間発達環境学研究科 教授（座長）

また、本手引きの作成段階、手引きを作成するために平成 30 年度から実施した試行調査および重点調査においては、検討会委員のほかに、以下の方々から多大なるご協力を頂きましたことを深く感謝いたします。

調査または本手引きの作成過程でご協力いただいた方・機関（敬称略・50音順）

【淡水魚類】

阿部 司 株式会社ラーゴ
石川 裕之 農村環境クリエイト株式会社
岩崎 渉 東京大学
大澤 剛士 東京都立大学
栃木県水産試験場
中島 淳 福岡県保健環境研究所
中野 繭 信州大学
藤本 泰文 公益財団法人宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団
森 誠一 岐阜協立大学
横井 謙一 特定非営利活動法人日本国際湿地保全連合

【両生類】

秋田 耕佑 大阪市立環境科学研究センター
株式会社環境総合リサーチ
草野 保 トウキョウサンショウウオ研究会
久保田 繁雄 横沢入里山管理市民協議会
関 慎太郎 自然写真家
中尾 遼平 山口大学大学院
林 光武 栃木県立博物館
八木 幸市 千葉県野生生物研究会
吉田 一郎 糸魚川ジオパーク自然資源保全委員会

< 卷 末 資 料 >

➤ Amph16S 領域

ミトコンドリアゲノムの全長配列の中で多くの両生類に共通している 2 か所の塩基配列に囲まれた、変化の激しい短い領域（超可変領域）のこと。種間で塩基配列に相違があるため、網羅的解析法における種の検出に用いられる。

➤ 塩化ベンザルコニウム

DNA の分解抑制をする薬剤。採取した水に添加することで、常温下でも数日程度 DNA の分解が抑制され、水中に保存される。ただし、塩化ベンザルコニウム液（劣化防止剤）をサンプルに添加する処理方法は特許が取得されているので、この処理方法を利用する場合には配慮が必要となる。必要に応じて、事前に分析業者等に使用可能かを確認する。

➤ 環境 DNA メタバーコーディング

特定の遺伝子領域の短い塩基配列 (DNA バーコード) を用いて生物種を同定する方法のこと。一般的には、網羅的解析法と呼ばれることがある。メタバーコーディング用のバーコード遺伝子領域としては、16SrRNA 遺伝子の V4 領域や 12SrRNA 遺伝子の MiFish 領域等などが用いられる。

➤ 近縁種

生物の進化や類縁関係を見たときに、共通祖先までの世代数（世代距離）が近く、血縁度の高い種を近縁種という。一般的には、分類体系の属レベルが同一のものをいう。

➤ クラスタリング

手引きで示しているクラスタリングは、分析データで得られた各塩基配列について相同性が近いものを集め、代表配列を決定する方法で、これにより効率的に塩基配列を検索できる。

➤ 交雑

雑種が形成される遺伝的組成の異なる 2 個体の交配。

➤ コンタミネーション

環境 DNA マニュアルでは汚染を意味し、組織片に由来する DNA や PCR によって得られた増幅産物のような高濃度の DNA によって生じるとされている。

➤ OTU

OTU は Operational Taxonomic Unit の略称。塩基配列をコンピュータ上でその類似度を指標に分類したときに得られる単位をいう。クラスタリングで相同性が高い塩基配列を 1 つのまとまりとして扱うための単位。

➤ 地域個体群

地域性に着目して特定される個体群。移動能力のそれほど大きくない生物は、同じ種でも地域によって遺伝的特性や生態的特性が異なることが多く、種を単位とする把握では十分でない場合がある。このような場合に、地域個体群という概念が用いられる。

➤ ネガティブコントロール（陰性対照）

採水やろ過、その後の分子生物学的な各実験ステップで汚染や混入が起こっていないことを確認するために設定されるもの。採水作業では、フィールドブランクとして、DNA が含まれていない水（超純水や蒸留水等）を他の試料水と同じように運搬・処理する。

➤ **PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）**

ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction）の略。標的とする特定の DNA 領域を DNA ポリメラーゼ（DNA を複製する酵素）によって簡便かつ迅速に複製し、分析や検出を可能とする量に DNA を増殖する技術。

➤ **プライマー**

PCR によって増幅される DNA 断片の両端に結合する短い人工の 1 本鎖 DNA。プライマーのデザイン（設計）では、特定の種に固有の配列を用いて集団 DNA から対象種の DNA だけが増幅されるようにすること（種特異的解析）や、多くの種に共通の配列を用いた汎用プライマー（ユニバーサルプライマー）を設計して広範囲の種の DNA を増幅すること（網羅的解析）が可能となる。網羅的解析法（MiFish 法）のプライマーは、板鰐類用（サメ・エイ類に最適化したプライマー）の MiFish-E、硬骨魚類用①（硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー）MiFish-U、硬骨魚類用②（温帯の沿岸域で一般的なアナハゼ類に最適化したプライマー）MiFish-U2 の 3 種類が知られており、淡水魚類には硬骨魚類用①を適用する。

➤ **MiFish 領域**

ミトコンドリアゲノムの全長配列の中で、多くの魚類に共通している 2 か所の塩基配列に囲まれた、変化の激しい短い領域（超可変領域）のこと。種間で塩基配列に相違があるため、網羅的解析法における種の検出に用いられる。

➤ **ミトコンドリア DNA**

ミトコンドリアに含まれる小さな環状の DNA。動物や多くの植物では母性遺伝する。MiFish プライマーは、ミトコンドリア DNA のゲノムにコードされる 12SrRNA 遺伝子の超可変領域（平均長が約 170bp の断片）を用いて設計している。

➤ **谷戸（谷津）**

丘陵地や台地に、湧水や雨水の流れによって侵食され形成された谷状の低湿地で、水田耕作が行われることが多い。周囲を森林に囲まれ、年間を通じて湿潤な環境が保たれているため、両生類など里地里山の生物の重要な生息地になっている。

➤ **リアルタイム PCR**

従来の PCR は反応の最終的な産物のみを扱うのに対して、リアルタイム PCR は増幅の過程をリアルタイムでモニターする原理により、サンプル中に含まれるターゲット（調査対象種）の DNA や RNA 量を、高い精度で定量することができる技術。

➤ **リード・リード数**

各断片の塩基配列の単位をリードといい、解析するために断片化された DNA 鎖（塩基配列）のことで、リード数は各 DNA 鎖（塩基配列）の数量。

➤ **リファレンス**

本手引きで示しているリファレンスとは、種の同定に参照する塩基配列（リファレンス配列）のこと。分析で得られた代表配列に対して、このリファレンスを参照して種を特定する。

➤ **ワンド**

平常時も本川と連続している止水域や高水敷にみられる閉鎖的水域等、河川区域内にみられる河川の通常の流れと分離された水域。

○ 引 用 文 献

- 1) 土居秀幸・近藤倫生（編）（2021）環境 DNA－生態系の真の姿を読み解く－. 共立出版, 東京.
- 2) Fujii F. et al. (2019) Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. *PLOS One*, 14, e0210357.
- 3) Jerde C. L. et al. (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4: 150-157.
- 4) （一社）環境 DNA 学会ホームページ (<http://ednasociety.org/edna>) より
- 5) （一社）環境 DNA 学会（2020）環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2（2020 年 4 月 3 日発行）
- 6) 近藤倫生（2018）環境 DNA 技術：理論と実践，将来の展開，水環境学会誌，41 (A)，118-122.
- 7) 今藤夏子ら（2018）水環境における環境 DNA を用いた生物モニタリング：霞ヶ浦における定置網と環境 DNA を用いた魚類調査と種多様性の比較，水環境学会誌，41 (A)，137-140.
- 8) 源利文（2018）特集環境 DNA が拓く魚類生態研究の未来：環境 DNA とは何か，海洋と生物 234（vol. 40, no. 1），3-8.
- 9) 源利文（2018）水環境における環境 DNA を用いた生物モニタリング：種特異的な環境 DNA 検出によるマクロ生物の生態調査，水環境学会誌，41 (A)，123-127.
- 10) 宮正樹（2018）水環境における環境 DNA を用いた生物モニタリング：魚類環境 DNA メタバーコーディング法による多様性評価：技術開発と応用，水環境学会誌，41 (A)，132-136.
- 11) Miya M. et al. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2, 150088.
- 12) Miya M. et al. (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science*, 86(6), 939-970.
- 13) 中村圭吾（2019）環境 DNA の河川事業への適用を目指した検討について，第 2 回環境 DNA 学会神戸大会環境 DNA 技術の活用～社会実装に向けて～プログラム集，12.
- 14) 農林水産省 農村振興局 鳥獣対策・農村環境課（2018）農業水路系における生物多様性保全のための技法と留意事項. (https://www.maff.go.jp/j/nousin/kankyo/kankyo_hozen/attach/pdf/index-9.pdf)
- 15) 長田穰（2019）多地点・多種データから明らかにする沿岸魚類群集の形成要因，第 2 回環境 DNA 学会神戸大会 環境 DNA 技術の活用～社会実装に向けて～プログラム集，15.
- 16) Sakata M. K. et al. (2020) Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river. *Limnology*, 22, 1-15.
- 17) Sakata M. K. et al. (2022) Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. *Metabarcoding and Metagenomics* 6, 15-26.
- 18) Sigsgaard E. E. et al. (2015) Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, 183, 46-52.
- 19) 高原輝彦ら（2016）特集環境 DNA 分析を利用した水中生物モニタリング：環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～，日本生態学会誌，66，583-599.
- 20) 辻冨月ら（2014）水域における環境 DNA 法を用いた生物モニタリング：里山学研究センター2014 年度年次報告書，188-191.
- 21) 山中裕樹ら（2016）環境 DNA 分析の野外調査への展開，日本生態学会誌，66，601-611.

<参 考 資 料>

参考資料 1 二次的自然環境に生息する淡水魚類のリスト

本資料は、二次的自然環境に生息する淡水魚類を対象に、MiFish 領域を含むリファレンスの登録状況、MiFish 法における種・種内系統の識別性に関する情報^{※1}、種特異的検出法に用いるプライマーの整備状況について整理を行いました。環境 DNA 調査を実施する際の参考にしてください。

※1 二次的自然環境に生息する淡水魚類の多くは、MiFish 法で種の識別が可能です。しかし、一部の種では、国内に生息する近縁種と MiFish 配列が完全に一致するため、種の識別が困難なものがあり、海外に生息する近縁種と MiFish 配列が完全に一致するため、種の識別に注意を要するものがあります。今後、国際塩基配列データベース上に登録されるリファレンスが増えることで、種・種内系統の識別性に対する判断が変更される可能性があります。

<作成にあたっての条件>

・作成する範囲

環境省レッドリスト 2020、Watanabe et al. (2017)^{※2}の 181 種 244 系群全て、生態系被害防止外来種リスト掲載種、河川水辺の国勢調査のための生物リスト（魚類）掲載種の一部。ただし、汽水・淡水域への依存度の低い分類群（上記 3 リストの掲載種が含まれない科）を除く。

※2 Watanabe, K., K. Tominaga, J. Nakajima, R. Kakioka and R. Tabata (2017) Chapter 7. Japanese freshwater fishes: biogeography and cryptic diversity. In: Motokawa, M. and H. Kajihara (eds.) Species Diversity of Animals in Japan, Diversity and Commonality in Animals. Springer, pp.183-227.

・採用した和名の出典

環境省レッドリスト 2020 年版、中坊(2013)「日本産魚類検索 第 3 版」、中坊(2018)「日本魚類館」、中島(2017)「日本のドジョウ」、本村(2022)「日本産魚類全種リスト(JAF リスト ver. 18)」

・学名の採用の優先順位

1) 環境省レッドリスト 2020 年版、2) Watanabe et al. (2017)、3) その他の情報源（令和 4 年度河川水辺の国勢調査のための生物リスト（魚類）、生態系被害防止外来種リスト、本村 2022 「日本産魚類全種リスト（JAF リスト ver. 18）。一部は、国際塩基配列データベース上で使用される taxonomy リストも参照する。

・対象としたリファレンス

2023 年 2 月 7 日時点で国際塩基配列データベースに登録されている MiFish 領域を含む配列。

<表中の凡例>

【MiFish 領域の登録の有無】◎：登録配列あり、×：登録配列なし、

【MiFish 法における種・種内系統の識別性】◎：種レベルでの識別が可能である、△：種レベルでの識別が困難、もしくは、注意を要する

【環境省 RL2020】環境省レッドリスト 2020 年版「汽水・淡水魚類」の掲載種。カテゴリーは以下のとおり。

EX：絶滅、EW：野生絶滅、CR：絶滅危惧ⅠA 類、EN：絶滅危惧ⅠB 類、VU：絶滅危惧Ⅱ類、NT：準絶滅危惧、DD：情報不足、LP：絶滅のおそれのある地域個体群

【外来種リスト】我が国の生態系等に被害を及ぼすおそれのある外来種リスト（環境省、2015 年）の掲載種。カテゴリーは以下のとおり。

OY：その他の定着予防外来種、KT：緊急対策外来種、JT：重点対策外来種、OT：その他の総合対策外来種、SK：産業管理外来種

【種特異的検出用プライマーの有無】●：種特異的検出法に用いる PCR プライマーが文献等により公開されている種

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
1	ミツバヤツメ	<i>Entosphenus tridentatus</i>	○	◎		LP		
2	カワヤツメ	<i>Lethenteron japonicum</i>	○		△	VU		
3	シベリアヤツメ	<i>Lethenteron kessleri</i>	○		△	NT		
4	スナヤツメ北方種	<i>Lethenteron</i> sp. N	○	◎		VU		
5	スナヤツメ南方種	<i>Lethenteron</i> sp. S	○	◎		VU		●
6	チョウザメ	<i>Acipenser medirostris</i>	○	◎		EX		
7	アリゲーターガー	<i>Atractosteus spatula</i>	○	◎			OY	
8	スポッテッドガー	<i>Lepisosteus oculatus</i>	○		△		OY	
9	ロングノーズガー	<i>Lepisosteus osseus</i>	○		△		OY	
10	ショートノーズガー	<i>Lepisosteus platostomus</i>	○		△		OY	
11	ニューギニアウナギ	<i>Anguilla bicolor pacifica</i>	○	◎		DD		
12	ニホンウナギ	<i>Anguilla japonica</i>	○	◎		EN		●
13	オオウナギ	<i>Anguilla marmorata</i>	○	◎				●
14	コゲウツボ	<i>Uropterygius concolor</i>	○	◎		CR		
15	ナミダカワウツボ	<i>Echidna rhodochilus</i>	○	◎		CR		
16	ニシン	<i>Clupea pallasii</i>	○	◎		LP		
17	ドロクイ	<i>Nematalosa japonica</i>	○	◎		EN		
18	エツ	<i>Coilia nasus</i>	○	◎		EN		
19	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	○	◎				●
20	コイ(飼育品種、飼育型)	<i>Cyprinus carpio</i>	○	◎				
21	コイ(ノゴイ、野生型)	<i>Cyprinus carpio</i>	○	◎		LP		
22	キンギョ	<i>Carassius auratus</i>	○		△			●
23	オオキンブナ	<i>Carassius buergeri buergeri</i>	○		△			
24	ニゴロブナ	<i>Carassius buergeri grandoculis</i>	○		△	EN		
25	ナガブナ	<i>Carassius buergeri</i> subsp. 1	×			DD		
26	キンブナ	<i>Carassius buergeri</i> subsp. 2	○		△	VU		
27	ゲンゴロウブナ	<i>Carassius cuvieri</i>	○	◎		EN		
28	ギンブナ	<i>Carassius</i> sp.	○		△			
29	フナ属の1種(琉球列島)	<i>Carassius</i> sp.	○		△	CR		
30	ヤリタナゴ	<i>Tanakia lanceolata</i>	○	◎		NT		
31	ヤリタナゴ groupF (LA1)	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
32	ヤリタナゴ groupE (LA2)	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
33	ヤリタナゴ groupA (LA3)	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
34	ヤリタナゴ groupG (LA4)	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
35	ヤリタナゴ groupB	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
36	ヤリタナゴ groupC	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
37	ヤリタナゴ groupD-1	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
38	ヤリタナゴ groupD-2	<i>Tanakia lanceolata</i>	○					
39	ヤリタナゴ groupD-3	<i>Tanakia lanceolata</i>	×					
40	アブラボテ	<i>Tanakia limbata</i>	○	◎		NT		
41	アブラボテ LI1	<i>Tanakia limbata</i>	○					
42	アブラボテ LI2	<i>Tanakia limbata</i>	○					
43	アブラボテ LI3	<i>Tanakia limbata</i>	○					
44	ミヤコタナゴ	<i>Tanakia tanago</i>	○	◎		CR		
45	イチモンジタナゴ	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>	○	◎		CR		
46	イチモンジタナゴ clade1	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>	○					
47	イチモンジタナゴ clade2	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>	○					
48	イチモンジタナゴ clade3	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>	○					

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
49	イタセンバラ	<i>Acheilognathus longipinnis</i>	○	◎		CR		●
50	イタセンバラ(琵琶湖－淀川型)	<i>Acheilognathus longipinnis</i>	○					
51	イタセンバラ(濃尾型)	<i>Acheilognathus longipinnis</i>	○					
52	イタセンバラ(富山型)	<i>Acheilognathus longipinnis</i>	×					
53	オオタナゴ	<i>Acheilognathus macropterus</i>	○	◎			OT	
54	タナゴ	<i>Acheilognathus melanogaster</i>	○	◎		EN		
55	カネヒラ	<i>Acheilognathus rhombeus</i>	○	◎				
56	アカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira erythropterus</i>	○	◎		EN		
57	ミナミアカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira jordani</i>	○	◎		CR		
58	セボシタビラ	<i>Acheilognathus tabira nakamurae</i>	○	◎		CR		
59	シロヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira tabira</i>	○	◎		EN		
60	キタノアカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira tohokuensis</i>	○	◎		EN		
61	ゼニタナゴ	<i>Acheilognathus typus</i>	○	◎		CR		●
62	カゼトゲタナゴ	<i>Rhodeus atremius atremius</i>	○	◎		EN		●
63	スイゲンゼニタナゴ	<i>Rhodeus atremius suigensis</i>	○	◎		CR		●
64	ニッポンバラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	○	◎		CR		
65	ニッポンバラタナゴ(大阪型)	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	○					
66	ニッポンバラタナゴ(山陽型)	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	○					
67	ニッポンバラタナゴ(九州型)	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	○					
68	タイリクバラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	○	◎			JT	
69	ハクレン	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	○		△		OT	●
70	コクレン	<i>Aristichthys nobilis</i>	○		△		OT	●
71	ワタカ	<i>Ischikauia steenackeri</i>	○	◎		CR		
72	パールダニオ	<i>Danio albolineatus</i>	○	◎			OT	
73	ゼブラダニオ	<i>Danio rerio</i>	○	◎			OT	
74	カワバタモロコ	<i>Hemigrammocypripis neglectus</i>	○	◎		EN		●
75	カワバタモロコ(本州－四国型)	<i>Hemigrammocypripis neglectus</i>	○					
76	カワバタモロコ(九州型)	<i>Hemigrammocypripis neglectus</i>	○					
77	ハス	<i>Opsariichthys uncirostris uncirostris</i>	○	◎		VU		●
78	オイカワ	<i>Zacco platypus</i>	○	◎				
79	オイカワ WJ(西日本型)	<i>Zacco platypus</i>	○					
80	オイカワ EJ(東日本型)	<i>Zacco platypus</i>	○					
81	オイカワ KY(九州型)	<i>Zacco platypus</i>	○					
82	ヌマムツ	<i>Nipponocypris sieboldii</i>	○	◎				
83	ヌマムツ group1	<i>Nipponocypris sieboldii</i>	○					
84	ヌマムツ group2	<i>Nipponocypris sieboldii</i>	○					
85	ヌマムツ group3	<i>Nipponocypris sieboldii</i>	○					
86	カワムツ	<i>Nipponocypris temminckii</i>	○	◎				
87	カワムツ group1	<i>Nipponocypris temminckii</i>	○					
88	カワムツ group2	<i>Nipponocypris temminckii</i>	○					
89	カワムツ group3	<i>Nipponocypris temminckii</i>	○					
90	ヒナモロコ	<i>Aphyocypris chinensis</i>	○	◎		CR		
91	ソウギョ	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	○	◎			OT	●
92	アオウオ	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	○	◎			OT	
93	ヤマナカハヤ	<i>Phoxinus lagowskii yamamotoi</i>	×			DD		
94	ヤチウグイ	<i>Phoxinus perenurus sachalinensis</i>	○	◎		NT		
95	アブラハヤ	<i>Rhynchocypris lagowskii steindachneri</i>	○	◎				
96	タカハヤ	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>	○	◎				

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
97	タカハヤ group1	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>	○					
98	タカハヤ group2	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>	○					
99	ジュウサンウグイ	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>	○	◎		LP		
100	ジュウサンウグイ TBB1	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>	○					
101	ジュウサンウグイ TBB2	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>	×					
102	マルタ	<i>Tribolodon brandtii maruta</i>	○	◎				
103	ウグイ	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○	◎				
104	ウグイ group1 (TH1)	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○					
105	ウグイ group2 (TH2)	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○					
106	ウグイ group3 (TH3)	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○					
107	ウグイ group4 (TH4)	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○					
108	ウグイ group5 (TH5)	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○					
109	ウグイ group6 (TH6)	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○					
110	ウケチウグイ	<i>Tribolodon nakamurai</i>	○	◎		EN		
111	エゾウグイ	<i>Tribolodon sachalinensis</i>	○	◎		LP		
112	モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>	○		△			●
113	モツゴ group1	<i>Pseudorasbora parva</i>	○					
114	モツゴ group2	<i>Pseudorasbora parva</i>	○					
115	モツゴ group3	<i>Pseudorasbora parva</i>	○					
116	モツゴ group4	<i>Pseudorasbora parva</i>	○					
117	ウシモツゴ	<i>Pseudorasbora pugnax</i>	○	◎		CR		
118	シナイモツゴ	<i>Pseudorasbora pumila</i>	○	◎		CR		
119	アブラヒガイ	<i>Sarcocheilichthys biwaensis</i>	○	◎		CR		
120	ビワヒガイ	<i>Sarcocheilichthys variegatus microoculus</i>	○		△			
121	カワヒガイ	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>	○		△	NT		
122	カワヒガイ(東海型)	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>	○					
123	カワヒガイ(西日本型)	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>	○					
124	ムギツク	<i>Pungtungia herzi</i>	○	◎				
125	ホンモロコ	<i>Gnathopogon caeruleus</i>	○		△	CR		●
126	タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	○		△			
127	タモロコ E1(西日本型)	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	○					
128	タモロコ E2(東海型)	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	○					
129	タモロコ E3(伊那型)	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	○					
130	スワモロコ	<i>Gnathopogon elongatus suwae</i>	×			EX		
131	ヨドゼゼラ	<i>Biwia yodoensis</i>	○	◎		EN		
132	ゼゼラ	<i>Biwia zezera</i>	○	◎		VU		
133	ゼゼラ(岐阜型)	<i>Biwia zezera</i>	○					
134	ゼゼラ(琵琶湖型)	<i>Biwia zezera</i>	○					
135	ゼゼラ(山陽型)	<i>Biwia zezera</i>	○					
136	ゼゼラ(九州型)	<i>Biwia zezera</i>	×					
137	ナガレカマツカ	<i>Pseudogobio agathonectris</i>	○	◎				
138	カマツカ	<i>Pseudogobio esocinus</i>	○	◎				
139	スナゴカマツカ	<i>Pseudogobio polystictus</i>	○	◎				
140	ツチフキ	<i>Abbottina rivularis</i>	○	◎		EN		
141	ツチフキ(大陸型)	<i>Abbottina rivularis</i>	○	◎				
142	ツチフキ(日本在来型)	<i>Abbottina rivularis</i>	○	◎				
143	ニゴイ	<i>Hemibarbus barbus</i>	○		△			
144	コウライニゴイ	<i>Hemibarbus labeo</i>	○		△			

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
145	ズナガニゴイ	<i>Hemibarbus longirostris</i>	○	◎				
146	コウライモロコ	<i>Squalidus biwae tsuchigae</i>	○		△			
147	スゴモロコ	<i>Squalidus chankaensis biwae</i>	○		△	VU		
148	イトモロコ	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>	○	◎				
149	イトモロコ group1	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>	○					
150	イトモロコ group2	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>	○					
151	イトモロコ group3	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>	○					
152	デメモロコ	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>	○		△	VU		
153	デメモロコ(琵琶湖型)	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>	○					
154	デメモロコ(濃尾型)	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>	○					
155	アカヒレ	<i>Tanichthys albonubes</i>	○	◎			OT	
156	ドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	○	◎		NT		●
157	ドジョウ(在来系統)	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	○	◎				
158	ドジョウ(大陸系統)	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	○	◎				
159	キタドジョウ	<i>Misgurnus</i> sp. (Clade A)	○	◎		DD		
160	シノビドジョウ	<i>Misgurnus</i> sp. IR	○	◎		DD		
161	ヒョウモンドジョウ	<i>Misgurnus</i> sp. OK	○	◎		DD		
162	カラドジョウ	<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	○	◎			OT	
163	アリアケスジシマドジョウ	<i>Cobitis kaibarai</i>	○	◎		EN		
164	オオガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis magnostriata</i>	○		△	EN		
165	ヤマトシマドジョウ	<i>Cobitis matsubarae</i>	○	◎		VU		
166	サンヨウコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii minamorii</i>	○	◎		CR		
167	ビワコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii oumiensis</i>	○		△	EN		
168	サンインコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii saninensis</i>	○	◎		EN		
169	トウカイコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii tokaiensis</i>	○		△	EN		
170	ヨドコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii yodoensis</i>	×			CR		
171	オオヨドシマドジョウ	<i>Cobitis sakahoko</i>	○	◎		EN		
172	ヒナインドジョウ	<i>Cobitis shikokuensis</i>	○	◎		EN		
173	オオシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type A	○	◎				
174	ニシシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type B	○	◎				
175	ヒガシシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type C	○	◎				
176	トサシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type D	○	◎		VU		
177	ヤマトシマドジョウ A 型	<i>Cobitis</i> sp. 'yamato' complex Type A	○	◎				
178	オンガスジシマドジョウ	<i>Cobitis striata fuchigamii</i>	○		△	EN		
179	ハカタスジシマドジョウ	<i>Cobitis striata hakataensis</i>	○		△	CR		
180	チュウガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis striata striata</i>	○		△	VU		
181	インドジョウ	<i>Cobitis takatsuensis</i>	○	◎		EN		
182	タンゴスジシマドジョウ	<i>Cobitis takenoi</i>	○		△	CR		
183	アジメドジョウ	<i>Niwaella delicata</i>	○	◎		VU		
184	アジメドジョウ G(太平洋側型)	<i>Niwaella delicata</i>	○					
185	アジメドジョウ S(日本海側型)	<i>Niwaella delicata</i>	○					
186	フクドジョウ	<i>Barbatula oreas</i>	○	◎				
187	ヒメドジョウ	<i>Lefua costata</i>	○	◎				
188	エゾホトケドジョウ	<i>Lefua costata nikkonis</i>	○	◎		EN		
189	ホトケドジョウ	<i>Lefua echigonia</i>	○	◎		EN		
190	ホトケドジョウ(北陸型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
191	ホトケドジョウ(近畿型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
192	ホトケドジョウ(東海型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
193	ホトケドジョウ(山形型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
194	ホトケドジョウ(東北型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
195	ホトケドジョウ(北関東型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
196	ホトケドジョウ(南関東型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
197	ホトケドジョウ(岩手型)	<i>Lefua echigonia</i>	○					
198	ナガレホトケドジョウ	<i>Lefua torrentis</i>	○	◎		EN		
199	ナガレホトケドジョウ(紀伊ー四国型)	<i>Lefua torrentis</i>	○					
200	ナガレホトケドジョウ(山陽ー山陰型)	<i>Lefua torrentis</i>	○					
201	トウカイナガレホトケドジョウ	<i>Lefua tokaiensis</i>	○	◎		EN		
202	アユモドキ	<i>Parabotia curtus</i>	○	◎		CR		●
203	アリアケギバチ	<i>Tachysurus aurantiacus</i>	○	◎		VU		
204	ネコギギ	<i>Tachysurus ichikawai</i>	○	◎		EN		●
205	ギギ	<i>Tachysurus nudiceps</i>	○	◎				
206	ギバチ	<i>Tachysurus tokiensis</i>	○	◎		VU		
207	コウライギギ	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	○	◎			OT	
208	ナマズ	<i>Silurus asotus</i>	○		△			
209	ビワコオオナマズ	<i>Silurus biwaensis</i>	○	◎				
210	イワトコナマズ	<i>Silurus lithophilus</i>	○		△	NT		
211	タニガワナマズ	<i>Silurus tomodai</i>	○		△			
212	アカザ	<i>Liobagrus reinii</i>	○	◎		VU		●
213	アカザ Group1	<i>Liobagrus reinii</i>	○					
214	アカザ Group2	<i>Liobagrus reinii</i>	○					
215	チャネルキャットフィッシュ	<i>Ictalurus punctatus</i>	○	◎				
216	ヒレナマズ	<i>Clarias fuscus</i>	○	◎			OT	
217	マダラロリカリア	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	○		△		OT	
218	シシヤモ	<i>Spirinchus lanceolatus</i>	○	◎		LP		●
219	キュウリウオ	<i>Osmerus dentex</i>	○	◎				
220	ワカサギ	<i>Hypomesus nipponensis</i>	○	◎				●
221	イシカリワカサギ	<i>Hypomesus olidus</i>	○	◎		NT		
222	アユ	<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	○	◎				●
223	リュウキュウアユ	<i>Plecoglossus altivelis ryukyuensis</i>	○	◎		CR		●
224	アリアケシラウオ	<i>Salanx ariakensis</i>	○	◎		CR		
225	アリアケヒメシラウオ	<i>Neosalanx reganius</i>	×			CR		
226	イトウ	<i>Hucho perryi</i>	○	◎		EN		●
227	ブラウントラウト	<i>Salmo trutta</i>	○	◎			SK	
228	カワマス	<i>Salvelinus fontinalis</i>	○	◎			OT	
229	ゴギ	<i>Salvelinus leucomaenis imbricus</i>	○		△	VU		
230	ヤマトイワナ	<i>Salvelinus leucomaenis japonicus</i>	○		△	LP		
231	アメマス	<i>Salvelinus leucomaenis leucomaenis</i>	○		△			●
232	ニッコウイワナ	<i>Salvelinus leucomaenis pluvius</i>	○		△	DD		
233	オシロコマ	<i>Salvelinus malma krascheninnikovi</i>	○		△	VU		●
234	ミヤバイワナ	<i>Salvelinus malma miyabei</i>	○		△	VU		
235	レイクトラウト	<i>Salvelinus namaycush</i>	○	◎			SK	
236	カラフトマス	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	○	◎				
237	クニマス	<i>Oncorhynchus kawamurae</i>	○		△	EW		
238	サケ	<i>Oncorhynchus keta</i>	○		△			
239	サツキマス(アマゴ)	<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>	○		△	NT		
240	サクラマス(ヤマメ)	<i>Oncorhynchus masou masou</i>	○		△	NT		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
241	ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	○	◎			SK	●
242	ベニザケ(ヒメマス)	<i>Oncorhynchus nerka</i>	○		△	CR		
243	ビワマス	<i>Oncorhynchus</i> sp.	○	◎		NT		
244	タウナギ(本土産)	<i>Monopterus albus</i>	○	◎				
245	タウナギ(沖縄産)	<i>Monopterus</i> sp.	○	◎		CR		
246	イトヨ	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>	○		△			●
247	イトヨ(降海型)	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>	×					
248	イトヨ(福井型)	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>	○					
249	イトヨ(那須型)	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>	○					
250	太平洋系陸封型イトヨ	<i>Gasterosteus aculeatus</i> subsp. 1	○		△	LP		
251	ハリヨ	<i>Gasterosteus aculeatus</i> subsp. 2	○		△	CR		
252	ハリヨ(濃尾型)	<i>Gasterosteus aculeatus</i> subsp. 2	○					
253	ハリヨ(近江型)	<i>Gasterosteus aculeatus</i> subsp. 2	○					
254	イトヨ湖沼型(福島県)	<i>Gasterosteus aculeatus</i> subsp. 3	○	◎				
255	ニホンイトヨ	<i>Gasterosteus nipponicus</i>	○	◎		LP		
256	ミナミトミヨ	<i>Pungitius kaibarae</i>	○	◎		EX		
257	トミヨ属淡水型	<i>Pungitius</i> sp. 1	○		△	LP		
258	トミヨ属汽水型	<i>Pungitius</i> sp. 2	○		△	NT		
259	トミヨ属雄物型	<i>Pungitius</i> sp. 3	○		△	CR		
260	ムサシトミヨ	<i>Pungitius</i> sp. 4	○	◎		CR		
261	エゾトミヨ	<i>Pungitius tymensis</i>	○	◎		VU		
262	カクレトミヨ	<i>Pungitius modestus</i>	×					
263	アミメカワヨウジ	<i>Hippichthys heptagonus</i>	○	◎		EN		
264	ホシイッセンヨウジ	<i>Microphis argulus</i>	×			CR		
265	ヒメテングヨウジ	<i>Microphis jagorii</i>	×			CR		
266	タニヨウジ	<i>Microphis retzii</i>	×			CR		
267	カワボラ	<i>Cestraeus plicatilis</i>	○	◎		CR		
268	ナガレフウライボラ	<i>Crenimugil heterocheilos</i>	×			EN		
269	オニボラ	<i>Ellochelone vaigiensis</i>	○	◎		DD		
270	アンピンボラ	<i>Chelon subviridis</i>	○	◎		DD		
271	モンナシボラ	<i>Moolgarda engeli</i>	○	◎		DD		
272	カマヒレボラ	<i>Moolgarda pedaraki</i>	○	◎		DD		
273	ペヘレイ	<i>Odontesthes bonariensis</i>	○	◎			OT	
274	ネッタイソイワシ	<i>Atherinomorus duodecimalis</i>	○	◎		DD		
275	ミナミギンソイワシ	<i>Hypoatherina temminckii</i>	○	◎		DD		
276	グリーンソードテール	<i>Xiphophorus hellerii</i>	○	◎				
277	カダヤシ	<i>Gambusia affinis</i>	○	◎			JT	
278	グッピー	<i>Poecilia reticulata</i>	○	◎			OT	
279	ミナミメダカ	<i>Oryzias latipes</i>	○	◎		VU		●
280	ミナミメダカ(ヒメダカ)	<i>Oryzias latipes</i>	○	◎				
281	キタノメダカ	<i>Oryzias sakaizumii</i>	○	◎		VU		●
282	コモチサヨリ	<i>Zenarchopterus dunckeri</i>	○	◎		NT		
283	クルメサヨリ	<i>Hyporhamphus intermedius</i>	○	◎		NT		
284	アゴヒゲオコゼ	<i>Tetraroge barbata</i>	○	◎		CR		
285	ヒゲソリオコゼ	<i>Tetraroge nigra</i>	×			CR		
286	アカメ	<i>Lates japonicus</i>	○	◎		EN		
287	インドタカサゴイシモチ	<i>Pseudambassis ranga</i>	○	◎				
288	ナンヨウタカサゴイシモチ	<i>Ambassis interrupta</i>	○	◎		DD		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
289	ハナダカカサゴイシモチ	<i>Ambassis macracanthus</i>	×			DD		
290	オヤニラミ	<i>Coreoperca kawamebari</i>	○	◎		EN		●
291	オヤニラミ group1	<i>Coreoperca kawamebari</i>	×					
292	オヤニラミ group2	<i>Coreoperca kawamebari</i>	×					
293	スズキ	<i>Lateolabrax japonicus</i>	○		△	LP		●
294	シラヌイハタ	<i>Epinephelus bontoides</i>	○	◎		DD		
295	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>	○	◎			KT	●
296	コクチバス	<i>Micropterus dolomieu</i>	○	◎			KT	●
297	オオクチバス	<i>Micropterus salmoides</i>	○	◎			KT	●
298	カガミテンジクダイ	<i>Yarica hyalosoma</i>	○	◎		CR		
299	ワキイシモチ	<i>Fibramia lateralis</i>	×			DD		
300	ヒルギヌメリテンジクダイ	<i>Pseudamia amblyuroptera</i>	○	◎		DD		
301	ウラウチフェダイ	<i>Lutjanus goldiei</i>	×			CR		
302	ダイダイコショウダイ	<i>Plectorhinchus albobittatus</i>	×			DD		
303	ナンヨウチヌ	<i>Acanthopagrus pacificus</i>	○	◎		VU		
304	アオギス	<i>Sillago parvisquamis</i>	○	◎		CR		
305	アトクギス	<i>Sillaginops macrolepis</i>	○	◎		EN		
306	テッポウウオ	<i>Toxotes jaculatrix</i>	○	◎		CR		
307	カワスズメ	<i>Oreochromis mossambicus</i>	○	◎			OT	
308	ナイルティラピア	<i>Oreochromis niloticus</i>	○	◎			OT	
309	ジルティラピア	<i>Tilapia zillii</i>	○	◎			OT	
310	ニセシマイサキ	<i>Mesopristes argenteus</i>	○	◎		CR		
311	ヨコシマイサキ	<i>Mesopristes cancellatus</i>	○	◎		CR		
312	シミズシマイサキ	<i>Mesopristes iravi</i>	○	◎		CR		
313	トゲナガユゴイ	<i>Kuhlia munda</i>	×			EN		
314	ヤマノカミ	<i>Trachidermus fasciatus</i>	○	◎		EN		
315	エゾハナカジカ	<i>Cottus amblystomopsis</i>	○	◎				●
316	カンキョウカジカ	<i>Cottus hangiongensis</i>	○	◎		LP		●
317	カマキリ	<i>Cottus kazika</i>	○	◎		VU		
318	ハナカジカ	<i>Cottus nozawae</i>	○	◎		LP		
319	ハナカジカ(北海道型)	<i>Cottus nozawae</i>	○					
320	ハナカジカ(北東北型)	<i>Cottus nozawae</i>	×					
321	ハナカジカ(山形型)	<i>Cottus nozawae</i>	○					
322	カジカ	<i>Cottus pollux</i>	○		△	NT		
323	ウツセミカジカ(カジカ小卵型)	<i>Cottus reinii</i>	○	◎		EN		
324	ウツセミカジカ(琵琶湖型)	<i>Cottus reinii</i>	○					
325	ウツセミカジカ(回遊型)	<i>Cottus reinii</i>	○					
326	カジカ中卵型	<i>Cottus sp.</i>	○		△	EN		
327	ウラウチヘビギンポ	<i>Enneapterygius cheni</i>	×			CR		
328	ヒルギギンポ	<i>Omox biporos</i>	×			CR		
329	ゴマクモギンポ	<i>Omobranchus elongatus</i>	○	◎		DD		
330	カワギンポ	<i>Omobranchus ferox</i>	×			CR		
331	ナリタイトヒキヌメリ	<i>Pseudocalliarichthys ikedai</i>	×			DD		
332	ツバサハゼ	<i>Rhyacichthys aspro</i>	○	◎		CR		
333	イシドンコ	<i>Odontobutis hikimius</i>	○	◎		VU		
334	ドンコ	<i>Odontobutis obscura</i>	○	◎				
235	ドンコ(西九州型)	<i>Odontobutis obscura</i>	○					
336	ドンコ(西瀬戸内海型)	<i>Odontobutis obscura</i>	○					

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
337	ドンコ(東瀬戸内海型)	<i>Odontobutis obscura</i>	○					
338	ドンコ(山陰－琵琶湖－伊勢型)	<i>Odontobutis obscura</i>	○					
339	タナゴモドキ	<i>Hypseleotris cyprinoides</i>	○	◎		EN		
340	オウギハゼ	<i>Bunaka gyrinoides</i>	○		△	NT		
341	テンジクカワアナゴ	<i>Eleotris fusca</i>	○	◎				
342	カワアナゴ	<i>Eleotris oxycephala</i>	○	◎				
343	エリトゲハゼ	<i>Belobranchus belobranchus</i>	○	◎		DD		
344	ヤエヤマノコギリハゼ	<i>Butis amboinensis</i>	○	◎		CR		
345	ジャノメハゼ	<i>Bostrychus sinensis</i>	○	◎		EN		
346	ホシマダラハゼ	<i>Ophiocara porocephala</i>	○	◎		VU		
347	タメトモハゼ	<i>Giuris</i> sp. 1	○	◎		EN		
348	ゴシキタメトモハゼ	<i>Giuris</i> sp. 2	×			EN		
349	ドウクツミズハゼ	<i>Luciogobius albus</i>	×			CR		
350	ネムリミズハゼ	<i>Luciogobius dormitoris</i>	×			DD		
351	ナガレミズハゼ	<i>Luciogobius fluvialis</i>	×			NT		
352	ユウスイミズハゼ	<i>Luciogobius fonticola</i>	○	◎		NT		
353	イドミズハゼ	<i>Luciogobius pallidus</i>	○	◎		NT		
354	ミナミヒメミズハゼ	<i>Luciogobius ryukyuensis</i>	○		△	VU		
355	ヒモハゼ	<i>Eutaeniichthys gilli</i>	○	◎		NT		
356	シロウオ	<i>Leucopsarion petersii</i>	○	◎		VU		
357	ワラスボ	<i>Odontamblyopus lacepedii</i>	○	◎		VU		
358	アサガラハゼ	<i>Caragobius urolepis</i>	○	◎		VU		
359	チワラスボ	<i>Taenioides cirratus</i>	○		△	EN		
360	コガネチワラスボ	<i>Taenioides gracilis</i>	○	◎				
361	ヒゲワラスボ	<i>Trypauchenopsis intermedia</i>	○	◎		VU		
362	トカゲハゼ	<i>Scartelaos histophorus</i>	○	◎		CR		
363	ムツゴロウ	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	○	◎		EN		
364	タビラクチ	<i>Apocryptodon punctatus</i>	○	◎		VU		
365	トビハゼ	<i>Periophthalmus modestus</i>	○	◎		NT		
366	ヒメトサカハゼ	<i>Cristatogobius aurimaculatus</i>	×			CR		
367	トサカハゼ	<i>Cristatogobius lophius</i>	○	◎		EN		
368	クロトサカハゼ	<i>Cristatogobius nonatoae</i>	○	◎		CR		
369	シマサルハゼ	<i>Oxyurichthys</i> sp. 2	○	◎		CR		
370	ミスジハゼ	<i>Callogobius</i> sp.	○	◎		CR		
371	ハゼクチ	<i>Acanthogobius hasta</i>	○	◎		VU		
372	ミナミアシシロハゼ	<i>Acanthogobius insularis</i>	○	◎		VU		
373	ヨロイボウズハゼ	<i>Lentipes armatus</i>	○	◎		CR		
374	カエルハゼ	<i>Smilosicyopus leprurus</i>	○	◎		CR		
375	ヒノコロモボウズハゼ	<i>Sicyopus auxilimentus</i>	×			DD		
376	アカボウズハゼ	<i>Sicyopus zosterophorus</i>	○	◎		CR		
377	ボウズハゼ	<i>Sicyopterus japonicus</i>	○	◎				
378	ルリボウズハゼ	<i>Sicyopterus lagocephalus</i>	○	◎		VU		
379	ヒスイボウズハゼ	<i>Stiphodon alcedo</i>	○	◎		CR		
380	コンテリボウズハゼ	<i>Stiphodon atropurpureus</i>	×			CR		
381	ハヤセボウズハゼ	<i>Stiphodon imperiorientis</i>	○	◎		CR		
382	トラフボウズハゼ	<i>Stiphodon multisquamis</i>	×			DD		
383	ニライカナイボウズハゼ	<i>Stiphodon niraikanaensis</i>	×			DD		
384	ナンヨウボウズハゼ	<i>Stiphodon percnopterygionus</i>	○	◎				

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
385	カキイロヒメボウズハゼ	<i>Stiphodon surrufus</i>	×			DD		
386	ワカケサラサハゼ	<i>Amblygobius linki</i>	×			NT		
387	シラヌイハゼ	<i>Silhouettea dotui</i>	×			NT		
388	ニセシラヌイハゼ	<i>Silhouettea</i> sp.	×			NT		
389	ギンボハゼ	<i>Parkraemeria saltator</i>	○	◎		VU		
390	マングローブゴマハゼ	<i>Pandaka lidwilli</i>	○	◎		VU		
391	ゴマハゼ	<i>Pandaka</i> sp.	○	◎		VU		
392	カブキハゼ	<i>Eugnathogobius mindora</i>	×			NT		
393	ホホグロハゼ	<i>Mugilogobius cavifrons</i>	○	◎		EN		
394	フタホシハゼ	<i>Mugilogobius fuscus</i>	×			DD		
395	ムジナハゼ	<i>Mugilogobius mertoni</i>	×			VU		
396	コクチスナゴハゼ	<i>Pseudogobius gastrospilos</i>	○	◎		DD		
397	マサゴハゼ	<i>Pseudogobius masago</i>	○	◎		VU		
398	シマエソハゼ	<i>Schismatogobius ampluvinculus</i>	○	◎		EN		
399	エソハゼ	<i>Schismatogobius roxasi</i>	○	◎		EN		
400	ドウケハゼ	<i>Stenogobius ophthalmoporus</i>	×			DD		
401	タネカワハゼ	<i>Stenogobius</i> sp.	○	◎				
402	クロミナミハゼ	<i>Awaous melanocephalus</i>	○		△			
403	ショウキハゼ	<i>Tridentiger barbatus</i>	○	◎		NT		
404	シモフリシマハゼ	<i>Tridentiger bifasciatus</i>	○	◎				
405	ヌマチチブ	<i>Tridentiger brevispinis</i>	○		△			
406	ナガノゴリ	<i>Tridentiger kuroiwae</i>	○		△			
407	シロチチブ	<i>Tridentiger nudicervicus</i>	○	◎		NT		
408	チチブ	<i>Tridentiger obscurus</i>	○		△			
409	アカオビシマハゼ	<i>Tridentiger trigonocephalus</i>	○	◎				
410	タスキヒナハゼ	<i>Redigobius balteatus</i>	○	◎		DD		
411	カワクモハゼ	<i>Bathygobius</i> sp.	○	◎		CR		
412	ビワヨシノボリ	<i>Rhinogobius biwaensis</i>	○	◎		DD		
413	クロヨシノボリ	<i>Rhinogobius brunneus</i>	○		△			
414	カワヨシノボリ	<i>Rhinogobius flumineus</i>	○	◎				
415	カワヨシノボリ group1	<i>Rhinogobius flumineus</i>	×					
416	カワヨシノボリ group2	<i>Rhinogobius flumineus</i>	○					
417	カワヨシノボリ group3	<i>Rhinogobius flumineus</i>	○					
418	カワヨシノボリ(老岐佐賀型)	<i>Rhinogobius flumineus</i>	○					
419	オオヨシノボリ	<i>Rhinogobius fluviatilis</i>	○		△			
420	クロダハゼ	<i>Rhinogobius kurodai</i>	○		△			
421	ルリヨシノボリ	<i>Rhinogobius mizunoi</i>	○		△			
422	シマヨシノボリ	<i>Rhinogobius nagoyae</i>	○		△			
423	オガサワラヨシノボリ	<i>Rhinogobius ogasawaraensis</i>	○		△	EN		
424	ゴクラクハゼ	<i>Rhinogobius similis</i>	○	◎				
425	アオバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. BB	○		△	CR		
426	シマヒレヨシノボリ	<i>Rhinogobius tyoni</i>	○		△	NT		
427	ヤイマヒラヨシノボリ	<i>Rhinogobius yaima</i>	○		△			
428	ケンムンヒラヨシノボリ	<i>Rhinogobius yonezawai</i>	○		△			
429	カズサヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. KZ	○		△			
430	アヤヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. MO	○		△			
431	オウミヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. OM	○		△			
432	旧トウヨシノボリ類	<i>Rhinogobius</i> sp. OR	○		△			

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	和名 種内系統 (系統名、系統記号)	学名	MiFish 領域の 登録の 有無	MiFish 法におけ る種・種内系統 の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能	識別は 要注意			
433	トウカイヨシノボリ	<i>Rhinogobius telma</i>	○	◎		NT		
434	キバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. YB	○		△	EN		
435	イリオモテパイヌキバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius aonumai aonumai</i>	×					
436	イシガキパイヌキバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius aonumai ishigakiensis</i>	×					
437	コンジキハゼ	<i>Glossogobius aureus</i>	○	◎		CR		
438	アゴヒゲハゼ	<i>Glossogobius bicirrhosus</i>	×			CR		
439	スダレウロハゼ	<i>Glossogobius circumspectus</i>	○	◎		NT		
440	フタゴハゼ	<i>Glossogobius</i> sp.	×			DD		
441	ニセツムギハゼ	<i>Acentrogobius audax</i>	○	◎		NT		
442	ホクロハゼ	<i>Acentrogobius caninus</i>	○	◎		NT		
443	ホホグロスジハゼ	<i>Acentrogobius suluensis</i>	○	◎		NT		
444	キララハゼ	<i>Acentrogobius viridipunctatus</i>	○	◎		VU		
445	ジュズカケハゼ	<i>Gymnogobius castaneus</i>	○		△	NT		
446	キセルハゼ	<i>Gymnogobius cylindricus</i>	○	◎		EN		
447	イサザ	<i>Gymnogobius isaza</i>	○	◎		CR		
448	エドハゼ	<i>Gymnogobius macrognathos</i>	○	◎		VU		
449	ヘビハゼ	<i>Gymnogobius mororanus</i>	○	◎		DD		
450	コシノハゼ	<i>Gymnogobius nakamurae</i>	×			CR		
451	シマウキゴリ	<i>Gymnogobius opperiens</i>	○	◎				
452	スミウキゴリ	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>	○	◎		LP		
453	クボハゼ	<i>Gymnogobius scrobiculatus</i>	○	◎		EN		
454	ムサシノジュズカケハゼ	<i>Gymnogobius</i> sp. 1	○	◎		EN		
455	ホクリクジュズカケハゼ	<i>Gymnogobius</i> sp. 2	○		△	CR		
456	ホクリクジュズカケハゼ group1	<i>Gymnogobius</i> sp. 2	×					
457	ホクリクジュズカケハゼ group2	<i>Gymnogobius</i> sp. 2	○					
458	シンジコハゼ	<i>Gymnogobius taranetzi</i>	○		△	VU		
459	チクゼンハゼ	<i>Gymnogobius uchidai</i>	○	◎		VU		
460	ウキゴリ	<i>Gymnogobius urotaenia</i>	○	◎				
461	ウラウチイソハゼ	<i>Eviota ocellifer</i>	○	◎		CR		
462	ナミノコハゼ	<i>Gobitrichinotus radiocularis</i>	×			NT		
463	トンガスナハゼ	<i>Kraemeria tongaensis</i>	×			DD		
464	クジャクハゼ	<i>Parioglossus caeruleolineatus</i>	×			DD		
465	ヒメサツキハゼ	<i>Parioglossus interruptus</i>	×			CR		
466	マイコハゼ	<i>Parioglossus lineatus</i>	×			DD		
467	ボルネオハゼ	<i>Parioglossus palustris</i>	○	◎		VU		
468	コビトハゼ	<i>Parioglossus rainfordi</i>	×			EN		
469	コマチハゼ	<i>Parioglossus taeniatus</i>	×			CR		
470	チョウセンブナ	<i>Macropodus ocellatus</i>	○	◎				
471	タイワンキンギョ	<i>Macropodus opercularis</i>	○	◎		CR		
472	カムルチー	<i>Channa argus</i>	○	◎				●
473	コウタイ	<i>Channa asiatica</i>	○	◎				
474	タイワンドジョウ	<i>Channa maculata</i>	○	◎				
475	クサフグ	<i>Takifugu alboplumbeus</i>	○		△	LP		

種特異的プライマーの情報が記載された論文リスト

種名	検出系	文献名
スナヤツメ南方種 アカザ オヤニラミ	TaqMan	丹羽英之・坂田雅之・源利文・清野未恵子 (2018) 河川における流程 500m 間隔での環境 DNA 分析と現地採集調査による魚類検出結果の比較. 保全生態学研究, 23(2): 257-264.
ニホンウナギ	TaqMan	Minegishi Y, Yoshinaga T, Aoyama J, Tsukamoto K (2009) Species identification of <i>Anguilla japonica</i> by real-time PCR based on a sequence detection system: a practical application to eggs and larvae. ICES Journal of Marine Science, 66(9): 1915-1918.
		Itakura H, Wakiya R, Yamamoto S, Kaifu K, Sato T, Minamoto T (2019) Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance and biomass of Japanese eels at the river basin scale. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 29: 361-373.
コイ	TaqMan	Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. PLoS ONE, 7(4): e35868.
キンギョ	SYBR	Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM (2014) Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. Environmental Science & Technology, 48 (3): 1819-1827.
ゼニタナゴ	TaqMan	Sakata MK, Maki N, Sugiyama H, Minamoto T (2017) Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, <i>Acheilognathus typus</i> , in a natural river in Japan. The Science of Nature, 104: 100-108.
ハクレン	TaqMan	Merkes CM, McCalla SG, Jensen NR, Gaikowski MP, Amberg JJ (2014) Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data. PLoS ONE, 9: e113346.
コクレン	TaqMan	Wilson C, Wright E, Bronnenhuber J, MacDonald F, Belore M, Locke B (2014) Tracking ghosts: combined electrofishing and environmental DNA surveillance efforts for Asian carps in Ontario waters of Lake Erie. Management of Biological Invasions, 5: 225-223.
カワバタモロコ	TaqMan	福岡 有紗, 高原 輝彦, 松本 宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸 敦史, 源 利文 (2016) 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立. 日本生態学会誌, 66: 613-620.
ハス	TaqMan	Yamanaka H, Takao D, Maruyama A, Imamura A (2018) Species-specific detection of the endangered piscivorous cyprinid fish <i>Opsariichthys uncirostris uncirostris</i> , three-lips, using environmental DNA analysis. Ecological Research, 33(5): 1075-1078.
モツゴ	SYBR	Robinson C, de Leaniz CG, Rolla M, Consuegra S (2018) Monitoring the eradication of the highly invasive topmouth gudgeon (<i>Pseudorasbora parva</i>) using a novel eDNA assay. bioRxiv, 409821.
アユ リュウキュウアユ	TaqMan	Yamanaka H, Minamoto T (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. Ecological Indicators, 62: 147-153.
イトウ	TaqMan	Mizumoto H, Urabe H, Kanbe T, Fukushima M, Araki H (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. Limnology, 19(2): 219-227.
アメマス オシロコマ ニジマス	TaqMan	Minamoto T, Hayami K, Sakata MK, Imamura A (2019) Real-time polymerase chain reaction assays for environmental DNA detection of three salmonid fish in Hokkaido, Japan: Application to winter surveys. Ecological Research, 34(1): 237-242.
イトヨ	TaqMan	Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE, 7(8): e41732.
キタノメダカ ミナメダカ	TaqMan	Tsuiji S, Iguchi Y, Shibata N, Teramura I, Kitagawa T, Yamanaka H (2018) Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: an application on two Japanese medaka species. Scientific Reports, 8: 9138.
ブルーギル	TaqMan	Takahara T, Minamoto T, Doi H (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. PLoS ONE, 8: e56584.
オオクチバス	TaqMan	Yamanaka H, Motozawa H, Tsuiji S, Miyazawa RC, Takahara T, Minamoto T (2016) On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. Ecological Research, 31(6): 963-967.
カムルチー	TaqMan	Simmons M, Tucker A, Chadderton WL, Jerde CL, Mahon AR (2016) Active and passive environmental DNA surveillance of aquatic invasive species. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 73(1): 76-83.
イタセンパラ	(SYBR)	山崎裕治, 西尾正輝 (2019) 簡易的な環境 DNA 分析方法を用いた絶滅危惧種イタセンパラの検出. 魚類学雑誌 66(2): 171-179.
コクチバス ミナメダカ ドジョウ	TaqMan	Jo T, Fukuoka A, Uchida K, Ushimaru A, Minamoto T (2020) Multiplex real-time PCR enables the simultaneous detection of environmental DNA from freshwater fishes: a case study of three exotic and three threatened native fishes in Japan. Biological Invasions, 22(2): 455-471.

種特異的プライマーの情報が記載された論文リスト

種名	検出系	文献名
リュウキュウアユ	TaqMan	Akamatsu Y, Kume G, Gotou M, Kono T, Fujii T, Inui R, Kurita Y (2020) Using environmental DNA analyses to assess the occurrence and abundance of the endangered amphidromous fish <i>Plecoglossus altivelis ryukyuensis</i> . Biodiversity Data Journal 8: e39679.
スズキ ニホンウナギ	TaqMan	Takahara T, Taguchi J, Yamagishi S, Doi H, Ogata S, Yamanaha H, Minamoto T (2020) Suppression of environmental DNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride. Limnology and Oceanography: Methods 18: 437-445.
シシヤモ	TaqMan	Yatsuyanagi T, Ishida R, Sakata MK, et al. (2020) Environmental DNA monitoring for short-term reproductive migration of endemic anadromous species, Shishamo smelt (<i>Spirinchus lanceolatus</i>). Environmental DNA, 2: 130-139.
オオウナギ	TaqMan	Itakura H, Wakiya R, Sakata MK, Hsu HY, Chen SC, Yang CC, Huang YC, Han YS, Yamamoto S, Minamoto T (2020) Estimations of riverine distribution, abundance, and biomass of anguillid eels in Japan and Taiwan using environmental DNA analysis. Zoological Studies, 59: 1-17.
アユモドキ	TaqMan	Sugiura K, Tomita S, Minamoto T, Mishina T, Iwata A, Abe T, Yamamoto S, Watanabe K (2021) Characterizing the spatial and temporal occurrence patterns of the endangered botiid loach <i>Parabotia curtus</i> by environmental DNA analysis using a newly developed species-specific primer set. Ichthyological Research, 68(1): 152-157.
カンキョウカジカ エゾハナカジカ (両種の識別はせず)	SYBR	北川哲郎, 村岡敬子, 中村圭吾 (2021) 河川下流域における回遊型カジカ族の稚魚に由来する環境 DNA 含有物質の拡散. 河川技術論文集, 27: 301-304.
ホンモロコ	TaqMan	Uchii K, Wakimura K, Kikko T, Yonekura R, Kawaguchi R, Komada H, Yamanaka H, Kenzaka T, Tani K (2021) Environmental DNA monitoring method of the commercially important and endangered fish <i>Gnathopogon caeruleus</i> . Limnology, 23: 49-56.
イタセンパラ	TaqMan	Nagayama S, Oota M, Fujita T, Kitamura J, Minamoto T, Mori S, Kato M, Takeyama N, Takino F, Yonekura R, Yamanaha H (2022) Autumn dispersal and limited success of reproduction of the deepbody bitterling (<i>Acheilognathus longipinnis</i>) in terrestrialized floodplain. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 423, 4.
カゼトゲタナゴ	TaqMan	百富修平, 柞磨佑紀, 梅村啓太郎, 栗田喜久, 鬼倉徳雄 (2023) 絶滅危惧種カゼトゲタナゴの環境 DNA 分析を用いた検出法の確立. Ichthy, Natural History of Fishes of Japan, 28: 1-5.
ネコギギ	TaqMan	Takahara T, Doi H, Kosuge T, Nomura N, Maki N, Minamoto T, Watanabe K (2022) Effective environmental DNA collection for an endangered catfish species: testing for habitat and daily periodicity. Ichthyological Research, Published Online 24 Dec 2022, https://doi.org/10.1007/s10228-022-00900-2
ワカサギ シラウオ	TaqMan	Takahara T, Fukui K, Hiramatsu D, Doi H, Fujii M, Minamoto T (2023) Development of primer-probe sets for environmental DNA-based monitoring of pond smelt <i>Hypomesus nipponensis</i> and Japanese icefish <i>Salangichthys microdon</i> . Landscape and Ecological Engineering, 19: 11-19.
スイゲンゼニタナゴ	TaqMan	Otsuki K, Hamada M, Koizumi N, Sakamoto T, Nakata K (2023) Quantitative PCR method to detect an extremely endangered bitterling fish (<i>Rhodeus atremius suigensis</i>) using environmental DNA. Landscape and Ecological Engineering, 19: 79-86.

(余 白)

参考資料2 国内に生息する両生類のリスト

本資料は、国内に生息する両生類を対象に、Amph16S 領域を含むリファレンスの登録状況、Amph16S 法における種の識別性に関する情報^{※1,2,3}、種特異的検出法あるいは属特異的検出法に用いるプライマーの整備状況について整理したものです。環境 DNA 調査を実施する際の参考にしてください。

- ※1 国内に生息する両生類の多くは、Amph16S 法で種の識別が可能です。しかし、一部の種では、国内に生息する近縁種と Amph16S 配列が完全に一致するため、種の識別が困難なものがあります。今後、国際塩基配列データベース上に登録されるリファレンスが増えることで、種の識別性に対する判断が変更される可能性があります。
- ※2 地域間変異などによって、同じ種の中に DNA の塩基配列が異なる複数の種内系統群が内包される場合があります。こうした種においては、国際塩基配列データベース上に登録されていても、種内系統が網羅されていなければ正確な種の判定ができない場合があることから、分析結果の精査を行う際には注意が必要です。
- ※3 国内に生息する両生類には、種間交雑による遺伝子浸透が確認されている集団があります。Amph16S 法では交雑個体を正しく識別できないことから、そのような集団が確認されている地域では結果の解釈に注意が必要です。

<作成にあたっての条件>

・作成する範囲

日本爬虫両棲類学会が公表している日本産爬虫両生類標準和名リスト(2023 年 12 月 15 日版)の掲載種全て(110 種)、生態系被害防止外来種リスト掲載種の一部。

・採用した和名の出典

日本産爬虫両生類標準和名リスト(2023 年 12 月 15 日版)、生態系被害防止外来種リスト

・学名の採用の優先順位

1) 日本産爬虫両生類標準和名リスト(2023 年 12 月 15 日版)、2) 生態系被害防止外来種リスト。

・対象としたリファレンス

2024 年 1 月 16 日時点で国際塩基配列データベースに登録されている Amph16S 領域を含む配列。

<表中の凡例>

【Amph16S 領域の登録の有無】○：登録配列あり、×：登録配列なし、

【Amph16S 法における種の識別性】◎：種レベルでの識別が可能である、○：種レベルでの識別に注意を要する、

△：種レベルでの識別が困難

【環境省 RL2020】環境省レッドリスト 2020 年版「両生類」の掲載種。カテゴリーは以下のとおり。

CR：絶滅危惧ⅠA 類、EN：絶滅危惧ⅠB 類、VU：絶滅危惧Ⅱ類、NT：準絶滅危惧、DD：情報不足

【外来種リスト】我が国の生態系等に被害を及ぼすおそれのある外来種リスト(環境省、2015 年)の掲載種。カテゴリーは以下のとおり。

OY：その他の定着予防外来種、KT：緊急対策外来種、JT：重点対策外来種、OT：その他の総合対策外来種

【種特異/属特異的検出用プライマーの有無】●：種特異的検出法あるいは属特異的検出法等に用いる PCR プライマーが文献等により公開されている種

国内に生息する両生類リスト

No.	和名	学名	Amph16S 領域の登 録の有無	Amph16S 法 における 種の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異/属 特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能/注意	識別は 困難			
1	キタサンショウウオ	<i>Salamandrella keyserlingii</i>	○	◎		EN		●
2	アカイサンショウウオ	<i>Hynobius katoi</i>	○	◎		EN		
3	アキサンショウウオ	<i>Hynobius akiensis</i>	×			EN		
4	アブサンショウウオ	<i>Hynobius abuensis</i>	×			EN		
5	アベサンショウウオ	<i>Hynobius abei</i>	×			CR		
6	アマクササンショウウオ	<i>Hynobius amakusaensis</i>	○	◎		CR		
7	イズモサンショウウオ	<i>Hynobius kunibiki</i>	×					
8	イシヅチサンショウウオ	<i>Hynobius hirosei</i>	○	◎		NT		
9	イヨシマサンショウウオ	<i>Hynobius kuishiensis</i>	○	◎		VU		
10	イワキサンショウウオ	<i>Hynobius sengokui</i>	×					
11	イワミサンショウウオ	<i>Hynobius iwami</i>	×			EN		
12	エゾサンショウウオ	<i>Hynobius retardatus</i>	○	◎		DD		
13	オオイタサンショウウオ	<i>Hynobius dunni</i>	○	◎		VU		
14	オオスミサンショウウオ	<i>Hynobius osumiensis</i>	○	◎		EN		
15	オオダイガハラサンショウウオ	<i>Hynobius boulengeri</i>	○	◎		VU		●
16	オキサンショウウオ	<i>Hynobius okiensis</i>	×			VU		
17	カスミサンショウウオ	<i>Hynobius nebulosus</i>	○	◎		VU		
18	ゲイヨサンショウウオ	<i>Hynobius geiyoensis</i>	×					
19	クロサンショウウオ	<i>Hynobius nigrescens</i>	○	◎		NT		
20	コガタブチサンショウウオ	<i>Hynobius stejnegeri</i>	○	◎		VU		
21	サンインサンショウウオ	<i>Hynobius setoi</i>	×			EN		
22	セトウチサンショウウオ	<i>Hynobius setouchi</i>	×			VU		
23	ソボサンショウウオ	<i>Hynobius shinichisatoi</i>	○	◎		EN		
24	タゴサンショウウオ	<i>Hynobius tagoi</i>	×					
25	チクシブチサンショウウオ	<i>Hynobius oyamai</i>	○	◎		VU		
26	チュウゴクブチサンショウウオ	<i>Hynobius sematonotos</i>	○	◎		VU		
27	ツシマサンショウウオ	<i>Hynobius tsuensis</i>	○	◎		NT		
28	ツルギサンショウウオ	<i>Hynobius tsurugiensis</i>	○	◎		EN		
29	トウキョウサンショウウオ	<i>Hynobius tokyoensis</i>	○	◎		VU		
30	トウホクサンショウウオ	<i>Hynobius lichenatus</i>	○	◎		NT		
31	トサシミズサンショウウオ	<i>Hynobius tosashimizuensis</i>	×			CR		
32	ナンヨサンショウウオ	<i>Hynobius oni</i>	×					
33	ハクバサンショウウオ	<i>Hynobius hidamontanus</i>	○	◎		EN		
34	ヒガシヒダサンショウウオ	<i>Hynobius fossigenus</i>	○	◎		VU		●
35	ヒダサンショウウオ	<i>Hynobius kimurae</i>	○	◎		NT		●
36	ヒバサンショウウオ	<i>Hynobius utsunomiyaorum</i>	×			VU		
37	ヒロシマサンショウウオ	<i>Hynobius sumidai</i>	×					
38	ブチサンショウウオ	<i>Hynobius naevius</i>	○	◎		EN		
39	ベッコウサンショウウオ	<i>Hynobius ikioi</i>	○	◎		VU		
40	ホクリクサンショウウオ	<i>Hynobius takedai</i>	×			EN		
41	マホロバサンショウウオ	<i>Hynobius guttatus</i>	○	◎		VU		
42	ミカワサンショウウオ	<i>Hynobius mikawaensis</i>	×			CR		
43	ヤマグチサンショウウオ	<i>Hynobius bakan</i>	○	○※1		VU		
44	ヤマトサンショウウオ	<i>Hynobius vandenburghi</i>	○	◎		VU		●
45	キタオウシュウサンショウウオ	<i>Onychodactylus nipponoborealis</i>	○	◎				
46	シコクハコネサンショウウオ	<i>Onychodactylus kinneburi</i>	×			VU		
47	タダミハコネサンショウウオ	<i>Onychodactylus fuscus</i>	×			NT		
48	ツクバハコネサンショウウオ	<i>Onychodactylus tsukubaensis</i>	×			CR		

国内に生息する両生類リスト

No.	和名	学名	Amph16S 領域の登 録の有無	Amph16S 法 における 種の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異/属 特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能/注意	識別は 困難			
49	ハコネサンショウウオ	<i>Onychodactylus japonicus</i>	○	○※2				●
50	バンダイハコネサンショウウオ	<i>Onychodactylus intermedius</i>	×			NT		
51	ホムラハコネサンショウウオ	<i>Onychodactylus pyrrhonotus</i>	×					
52	オオサンショウウオ	<i>Andrias japonicus</i>	○	◎		VU		●
53	チュウゴクオオサンショウウオ	<i>Andrias davidianus</i>	○	◎			JT	●
54	アマミイボイモリ	<i>Echinotriton raffaellii</i>	×			(VU)		
55	オキナワイボイモリ	<i>Echinotriton andersoni</i>	○	◎		(VU)		
56	アカハライモリ	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	○	◎		NT		
57	シリケンイモリ	<i>Cynops ensicauda</i>	○	◎		NT		
58	アマミシリケンイモリ	<i>Cynops ensicauda ensicauda</i>	×					
59	オキナワシリケンイモリ	<i>Cynops ensicauda popei</i>	○	○※3				
60	アフリカツメガエル	<i>Xenopus laevis</i>	○	◎			OT	●
61	オオヒキガエル	<i>Rhinella marina</i>	○	◎			KT	●
62	アジアヒキガエル	<i>Bufo gargarizans</i>	○	◎			OY	
63	ミヤコヒキガエル	<i>Bufo gargarizans miyakonis</i>	○	◎		NT		
64	アズマヒキガエル	<i>Bufo formosus</i>	○	○※4				●
65	ナガレヒキガエル	<i>Bufo torrenticola</i>	○	◎				
66	ニホンヒキガエル	<i>Bufo japonicus</i>	○	○※5				
67	ニホンアマガエル	<i>Dryophytes japonicus</i>	○	◎				●
68	ハロウエルアマガエル	<i>Hyla hallowellii</i>	×					
69	アマミアカガエル	<i>Rana kobai</i>	○	◎		NT		
70	エゾアカガエル	<i>Rana pirica</i>	○	◎				
71	オキタゴガエル	<i>Rana okiensis</i>	○	○※6		NT		
72	ゴトウタゴガエル	<i>Rana matsuo</i>	○	○※7				
73	タゴガエル	<i>Rana tagoi</i>	○	○※8	△※a			
74	チョウセンヤマアカガエル	<i>Rana uenoi</i>	○	◎		NT		
75	ツシマアカガエル	<i>Rana tsushimensis</i>	○	◎		NT		
76	ナガレタゴガエル	<i>Rana sakuraii</i>	○		△※a			
77	ニホンアカガエル	<i>Rana japonica</i>	○	◎				
78	ネバタゴガエル	<i>Rana neba</i>	○	○※9	△※a			
79	ヒメタゴガエル	<i>Rana kyoto</i>	○	○※10	△※a			
80	ヤクシマタゴガエル	<i>Rana yakushimensis</i>	○	○※11		NT		
81	ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	○	◎				
82	リュウキュウアカガエル	<i>Rana ulma</i>	○	◎		NT		
83	ウシガエル	<i>Lithobates catesbeianus</i>	○	○※12			JT	●
84	ツチガエル	<i>Glandirana rugosa</i>	○	◎				
85	サドガエル	<i>Glandirana susurra</i>	○	○※13		EN		
86	ムカシツチガエル	<i>Glandirana reliquia</i>	○	○※14				
87	ダルマガエル	<i>Pelophylax porosus</i>	○	○※15				
88	トウキョウダルマガエル	<i>Pelophylax porosus porosus</i>	○	◎		NT		
89	ナゴヤダルマガエル	<i>Pelophylax porosus brevipodus</i>	○	◎		EN		
90	トノサマガエル	<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	○	◎		NT		
91	アマミハナサキガエル	<i>Odorrana amamiensis</i>	○	◎		VU		●
92	アマミイシカワガエル	<i>Odorrana splendida</i>	○	○※16		EN		●
93	オオハナサキガエル	<i>Odorrana supranarina</i>	○	◎		NT		
94	オキナワイシカワガエル	<i>Odorrana ishikawae</i>	○	◎		EN		
95	コガタハナサキガエル	<i>Odorrana utsunomiyaorum</i>	○	◎		EN		
96	ハナサキガエル	<i>Odorrana narina</i>	○	◎		VU		

国内に生息する両生類リスト

No.	和名	学名	Amph16S 領域の登 録の有無	Amph16S 法 における 種の識別性		環境省 RL2020	外来種 リスト	種特異/属 特異 的検出 用ブラ イマー の有無
				識別は 可能/注意	識別は 困難			
97	オットンガエル	<i>Babina subaspera</i>	○	◎		EN		●
98	ホルストガエル	<i>Babina holsti</i>	○	◎		EN		
99	ヤエヤマハラブチガエル	<i>Nidirana okinavana</i>	○	◎		VU		
100	ナミエガエル	<i>Limnonectes namiyei</i>	○	◎		EN		
101	サキシマヌマガエル	<i>Fejervarya sakishimensis</i>	○	○※17				
102	ヌマガエル	<i>Fejervarya kawamurai</i>	○	○※18				
103	アイフィンガーガエル	<i>Kurixalus eiffingeri</i>	○	◎				
104	オキナワアオガエル	<i>Zhangixalus viridis</i>	○	◎				
105	アマミアオガエル	<i>Zhangixalus amamiensis</i>	○	○※19				
106	シュレーゲルアオガエル	<i>Zhangixalus schlegelii</i>	○	◎				
107	モリアオガエル	<i>Zhangixalus arboreus</i>	○	◎				
108	ヤエヤマアオガエル	<i>Zhangixalus owstoni</i>	○	◎				
109	カジカガエル	<i>Buergeria buergeri</i>	○	◎				
110	ヤエヤマカジカガエル	<i>Buergeria choui</i>	○	○※20				
111	リュウキュウカジカガエル	<i>Buergeria japonica</i>	○	◎				
112	シロアゴガエル	<i>Polypedates leucomystax</i>	○	◎			JT	
113	ヒメアマガエル	<i>Microhyla okinavensis</i>	○	◎				
114	ヤエヤマヒメアマガエル	<i>Microhyla kuramotoi</i>	○	○※21				

■種レベルでの識別に注意を要する種（現在の学名と国際塩基配列データベースに登録されている学名が異なる等）

- ※1 一部地域のヤマグチサンショウウオは、系統関係が不明確または分類学的位置づけが未整理な場合があるため要注意。
- ※2 ハコネサンショウウオは、*Onychodactylus cf. japonicus* としての登録も有る。一部地域の個体群は系統関係が不明確または分類学的位置づけが未整理な場合があるため要注意。
- ※3 オキナワシリケンイモリは、*Cynops ensicauda* として登録されている。
- ※4 アズマヒキガエルは、*Bufo japonicus*、*Bufo japonicus montanus*、*Bufo japonicus formosus* として登録されている。
- ※5 ニホンヒキガエルは、*Bufo japonicus yakushimensis* としての登録も有る。
- ※6 オキタゴガエルは、*Rana tagoi okiensis* として登録されている。
- ※7 ゴトウタゴガエルは、*Rana tagoi tagoi*、*Rana sp.* 1-KE-2022 として登録されている。
- ※8 タゴガエルは、*Rana tagoi tagoi* としての登録も有る。一部地域の個体群は系統関係が不明確または分類学的位置づけが未整理な場合があるため要注意。
- ※9 ネバタゴガエルは、*Rana tagoi*、*Rana tagoi tagoi* として登録されている。一部地域の個体群は系統関係が不明確または分類学的位置づけが未整理な場合があるため要注意。
- ※10 ヒメタゴガエルは、*Rana tagoi tagoi* として登録されている。
- ※11 ヤクシマタゴガエルは、*Rana tagoi yakushimensis* として登録されている。
- ※12 ウシガエルは、*Aquarana catesbeiana* として登録されている。
- ※13 サドガエルは、*Glandirana rugosa* としての登録も有る。
- ※14 ムカシツチガエルは、*Glandirana rugosa* として登録されている。
- ※15 ダルマガエルは、*Pelophylax porosus porosus*、*Pelophylax porosus brevipodus* として登録されている。
- ※16 アマミイシカワガエルは、*Odorrana ishikawae* としての登録も有る。
- ※17 サキシマヌマガエルは、*Fejervarya limnocharis* としての登録も有る。
- ※18 ヌマガエルは、*Fejervarya limnocharis* としての登録も有る。
- ※19 アマミアオガエルは、*Zhangixalus viridis* として登録されている。
- ※20 ヤエヤマカジカガエルは、*Buergeria japonica* として登録されている。
- ※21 ヤエヤマヒメアマガエルは、*Microhyla okinavensis* として登録されている。

■種レベルでの識別が困難な種

- ※a タゴガエル・ナガレタゴガエル・ネバタゴガエル・ヒメタゴガエルは、種レベルでの識別が困難な場合があるため要注意。

種特異的/属特異的プライマーの情報が記載された論文リスト（両生類）

種名	文献名
キタサンショウウオ	Takeshita D, Terui S, Ikeda K, Mitsuzuka T, Osathanunkul M, Minamoto T (2020) Projection range of eDNA analysis in marshes: a suggestion from the Siberian salamander (<i>Salamandrella keyserlingii</i>) inhabiting the Kushiro marsh, Japan. PeerJ, 8: e9764.
オオダイガハラサンショウウオ	Sakata MK, Takeshita D, Nishizawa R, Sato T, Minamoto T (2023) An efficient environmental DNA detection method for rare species: a case study of a small salamander (<i>Hynobius boulengeri</i>). Analytical Sciences, 39: 721-728.
ヒガシヒダサンショウウオ	長谷部勇太, 武田麻由子, 中山駿, 菊池宏海, 白子智康 (2020) サンショウウオ類分布調査における環境DNA活用のための基礎的検討. 全国環境研会誌, 45: 38-44.
ヒダサンショウウオ	Jo, T, Tomita S, Kohmatsu Y, Osathanunkul M, Ushimaru A, Minamoto T (2020) Seasonal monitoring of Hida salamander <i>Hynobius kimurae</i> using environmental DNA with a genus-specific primer set. Endangered Species Research, 43: 341-352.
ヤマトサンショウウオ	Sakai Y, Kusakabe A, Tsuchida K, Tsuzuku Y, Okada S, Kitamura T, Tomita S, Mukai T, Tagami M, Takagi M, Yaoi Y, Minamoto T (2019) Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (<i>Hynobius vandenburghi</i>) by GIS and eDNA analysis. Environmental DNA, 1: 281-289.
ハコネサンショウウオ	長谷部勇太, 武田麻由子, 中山駿, 菊池宏海, 白子智康 (2020) サンショウウオ類分布調査における環境DNA活用のための基礎的検討. 全国環境研会誌, 45: 38-44. Katano I, Harada K, Doi H, Souma R, Minamoto T (2017) Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. PLoS One, 12: e0176541.
オオサンショウウオ チュウゴクオオサンショウウオ	Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T (2015) A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: A case study of giant salamanders in Japan. Journal of Applied Ecology, 52: 358-365.
アフリカツメガエル	Secondi J, Dejean T, Valentini A, Audebaud B, Miaud C (2016) Detection of a global aquatic invasive amphibian, <i>Xenopus laevis</i> , using environmental DNA. Amphibia-Reptilia, 37: 131-136.
オオヒキガエル	Edmunds RC, Burrows D (2019) Development of an eDNA assay for cane toad (<i>Rhinella marina</i>). Report 19/08, Centre for Tropical Water and Aquatic Ecosystem Research (TropWATER), James Cook University, Townsville.
アズマヒキガエル	Mizumoto H, Kishida O, Takai K, Matsuura N, Araki H (2022). Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan. Biological Invasions, 24: 1199-1211.
ニホンアマガエル	Yoo N, Kim KY, Heo JS, Yoon JD, Kim KS (2022) Novel non-invasive molecular identification method for two tree frogs, <i>Dryophytes suweonensis</i> and <i>Dryophytes japonicus</i> , based on high resolution melting (HRM) analysis. Korean Journal of Environmental Biology, 40: 199-205.
ウシガエル	Everts T, Halfmaerten D, Neyrinck S, De Regge N, Jacquemyn H, Brys R (2021) Accurate detection and quantification of seasonal abundance of American bullfrog (<i>Lithobates catesbeianus</i>) using ddPCR eDNA assays. Scientific Reports, 11: 11282.

(余 白)

参考資料 3 分析会社へお願いする分析工程記録表（例）

環境 DNA 分析（MiFish 法）では、各分析工程がどのような条件（例、濾過情報、分析条件、プライマー情報など）で行われたか、分析会社から提供を受けることが大切です。このため、分析を依頼する際には、以下の分析工程記録表を添付すると良いでしょう。

No	項 目			優先度	
1	濾過 関連情報	濾過者		◎	
2		濾過日時		◎	
3		濾過水量		◎	
4		フィルターの種類		◎	
5		フィルターの数（個）		◎	
6		濾過後の保管		◎	
7	分析 関係情報	分析日時		◎	
8		分析会社名		○	
9		DNA 抽出の試薬情報		◎	
10		使用機材	PCR	○	
11			NGS	△	
13		試薬情報	精製	△	
14			NGS	△	
15		プライマー情報	プライマー名 1stF:	配列情報（5' →3' ）	◎
16			プライマー名 1stR:	配列情報（5' →3' ）	◎
17			プライマー名 2ndF:	配列情報（5' →3' ）	◎
18			プライマー名 2ndR:	配列情報（5' →3' ）	◎
19		酵素情報	1stPCR DNA ポリメラーゼ（酵素）	種類	◎
20			2ndPCR DNA ポリメラーゼ（酵素）	種類	◎
21		反応液組成	1stPCR DNA ポリメラーゼ（酵素）	濃度/液量（μ L）	◎
22			1stPCR フォワードプライマー	濃度/液量（μ L）	○
23			1stPCR リバースプライマー	濃度/液量（μ L）	○
24			2ndPCR DNA ポリメラーゼ（酵素）	濃度/液量（μ L）	△
25			2ndPCR フォワードプライマー	濃度/液量（μ L）	△
26			2ndPCR リバースプライマー	濃度/液量（μ L）	△
27		分析条件	1stPCR	初期変性、最終伸長の各条件（温度/時間(s））	○
28				変性、アニーリング、伸長、最終伸長の各条件（サイクル数/温度/時間(s））	○
29				PCR 繰り返し数	○
30			2ndPCR	初期変性、最終伸長の各条件（温度/時間(s））	○
31				変性、アニーリング、伸長、最終伸長の各条件（サイクル数/温度/時間(s））	○
32		分析時の情報	ネガティブコントロールの評価結果		◎
33			ライブラリーの濃度・電気泳動結果		◎
34	分析 結果情報	解析方法（代表配列を決定するまでの手順）		◎	
35		塩基配列の生データ FASTQ（ファイルの提出）		◎	
36		代表配列（OTU）（ファイルの提出）		◎	
37		代表塩基配列のリード数と一致率解析結果（ファイルの提出）		◎	
38		一致率の高い生物リスト（ファイルの提出）		◎	

(余 白)

参考資料4 環境 DNA 調査結果のデータ入力項目の事例

環境 DNA 調査結果を広く活用するためには、生物情報の他に、調査地点や分析に関する情報を一元管理することが大切となります。ここでは、標本や観察データの標準交換形式である Darwin Core への入力を想定した、入力項目を例示します。入力項目フォーマットとしては、調査の基礎的な情報となる「調査情報（コアファイル）」と、調査ごとの生物情報となる「コアファイルに付随する生物情報の入力項目」の2つ形式を示しています。

なお、生物情報には、希少種の位置情報やその特定を容易にする情報が含まれるため、情報の管理は特に慎重に行うことが必要です。下表には公開の可否に関する情報も掲載しています。参考にすると良いでしょう。

調査情報（コアファイル）の入力項目（案）

分類	No.	項目名	公開 重要 度	環境 DNA 情報の入力例	Darwin Core 項目	公開 可否
全体情報	1	調査名	●	環境省環境 DNA 標準化試行調査第3回	datasetName	◎
	2	試料名	●	伊豆沼・内沼 St1-1	eventName	×
	3	採水日	●	2019/5/24	samplingDate	◎
現地情報	4	調査方法（DNA 試料採取方法）	●	2019 年度環境省環境 DNA 標準化業務試行調査手順（採水・ろ過・DNA 抽出）	samplingProtocol	◎
	5	ろ過水量	●	125mL（ろ過水量）	sampleSizeValue	◎
	6	フィルターの数	○	2 本（フィルターの個数）	samplingEffort	◎
	9	野帳・生データのファイル名	○	keea:eDNA:E19W00192（DNA 溶液の検体番号）、サンプリング野帳	sampleFieldNotes	◎
	8	採水者	○	地域環境計画 後藤	sampledBy	◎
分析情報	9	分析方法（MiFish）	●	2019 年度環境省環境 DNA 標準化業務試行調査手順（ライブラリ調製・NGS）	treatingProtocol	◎
	10	分析日	●	2019/8/6	treatingDate	◎
	11	プライマー	●	MiFish-U/MiFish-L	treatingPrimers	◎
	12	PCR 条件	○	8replicates for 1stPCR, Enzyme: KOD One	treatingPCR	◎
	13	分析機器	○	iSeq100	treatingMachine	◎
	14	分析者	○	九州環境管理協会 貞末	treatedBy	◎
	15	分析データへのリンク	○	FASTQ:DRA accession No. xxxxxxxx	treatedFieldNotes	◎
解析情報	16	解析方法	●	2019 年度環境省環境 DNA 標準化業務試行調査手順（解析パイプライン）	analyzingProtocol	◎
	17	解析日	●	2019/9/13	analyzingDate	◎
	18	解析パイプライン	●	KEEA Pipeline for MiFish ver0.1 (UNOISE3)	analyzingMethod	◎
	19	参照データベース	●	GenBank BLAST (2019/9/13)	analyzingReference	◎
	20	解析結果の要約	○	Number of OTUs: 16, Total size: 135537	analysisSummary	◎
	21	解析者	○	●●株式会社 山田	analyzedBy	◎
	22	解析データへのリンク	○	OTU-table: 5St1-1	analyzedFieldNotes	◎

調査情報（コアファイル）の入力項目（案）

分類	No.	項目名	公開 重要 度	環境 DNA 情報の入力例	Darwin Core 項目	公開 可否
同定 情報	23	同定方法	●	2019 年度環境省環境 DNA 標準化業務試行調査手順（魚類同定作業）	identifyingProtocol	◎
	24	同定日	●	2019/9/30	identifyingDate	◎
	25	根拠目録（図鑑等）	●	日本産魚類検索 第三版、日本のドジョウ	identifyingReference	◎
	26	同定者	○	九州環境管理協会 宇野	identifiedBy	◎
地理 情報	27	地点名	○	伊豆沼北西岸	verbatimLocality	×
	28	緯度（十進）	○	38. xx	decimalLatitude	×
	29	経度（十進）	○	141. xx	decimalLongitude	×
	30	座標系	○	JGD2011	geodeticDatum	◎
	31	地域メッシュコード（2 次）	○	5841xx	meshCode	◎
	32	公開レベル	○	公開レベル：10km	georeferenceRemarks	◎

※1 入力的重要性：●は必須項目、○は推奨項目

※2 公開可否：◎は公開情報、×は非公開情報

コアファイルに付随する生物情報の入力項目（案）

分類	No.	項目名	公開の 重要度	環境 DNA 情報の入力例	Darwin Core 項目	公開 有無
環境 DNA に関する 情報	1	試料名	●	biodic:eDNA:s003:smp10001:tr1:an01	eventID	◎
	2	OTU 番号	●	biodic:eDNA:s003:smp10001:tr1:an01:otu0001	occurrenceID	◎
	3	サイズ（リード数）	●	10258	occurrenceSize	◎
	4	塩基配列	●	CACCGCGTTAGACGAGAGGCCCTAGTTG ATATTACAACGCGTAAAGGG・・・・	organismNucleotideSequence	◎
	5	リファレンスのトップヒット	○	NC_042402.1	organismBlastTopHit	◎
	6	リファレンスとの一致率	○	100	organismIdentity	◎
	7	生物名・系統名等	●	Carassius auratus/gibelio	organismName	◎
	8	生物名・系統名等（日本語）	○	キンギョ／フナ属大陸系（ギベリオブナ）	organismJapName	◎
	9	備考	○	コンタミの疑いあり	organismRemarks	◎
生物 情報	10	種番号	○	21	taxonID	◎
	11	学名	○	Carassius sp.	scientificName	◎
	12	分類階級	○	属	taxonRank	◎
	13	和名	○	フナ属の 1 種	taxonJapaneseName	◎

※1 入力的重要性：●は必須項目、○は推奨項目

※2 公開可否：◎は公開情報、×は非公開情報

参考資料 5 調査計画を検討する上での参考情報

環境 DNA 調査では、調査計画を立てる段階において、種の検出確率を上げ、偽陰性ができるだけ生じないような調査デザインを行うことが重要です。偽陰性が生じる主な要因としては、手引き 1-3-2 章に記載の通り、大きく分けて 3 つあります。環境省では、令和 2 年度から令和 4 年度にかけて環境 DNA 調査を実施し、これらの偽陰性を減らすために調査計画時に検討することが望ましい対策等について、検討を行ってきました。

その調査から得られた偽陰性を減らすための対策について、偽陰性が生じる 3 つの要因ごとに表-参 5- 1 に示します。ここにまとめた内容の根拠となる環境省の調査結果については、続く (1) ～ (4) 章で詳細な解説を行います。

表-参 5- 1 調査計画時に検討すべき偽陰性を減らすための対策

要因	項目	対策の内容
① 採水地点における種の分布の時間的・空間的な不均一性	調査地点数	(大規模水域、小規模水域[小河川]の事例) - 採水する調査地点数は、調査予算が許す範囲で、なるべく多く設定することで、効果的に検出種数を増やせる場合があります。 - 地点当たりの採水反復数は、1 回よりも 2 ～ 3 回に増やすことで、より少ない地点数で効果的に検出総種数を増えることが期待されます。 (小規模水域[ため池]の事例) - 小規模ため池(例：面積 2,000m² 以下)では、優占種を把握するには、1 池当たり 1 地点程度でもよい場合があります。
	調査時期	- ほとんどの調査地で、5 月から 11 月の期間であれば、どの調査時期であっても検出される種数に有意差はありませんでした。 - 一般的に淡水魚類の活動が盛んになる春から秋にかけての時期であれば、環境 DNA 調査に適した時期と言えます。 - 調査時期は、調査地の環境や調査対象種の生態的特性も十分考慮した上で、設定する必要があります。
	環境条件の影響	水面規模が大きな湖沼の場合は、流入する河川との合流部や水路状に水面の幅が狭くなっている場所を選ぶことで、検出される種数が増えることがあります※¹。
② 採水時に種の DNA がサンプルに含まれる確率の揺らぎ	反復採水	(大規模水域の事例) - 採水の際は、調査予算が許す範囲で、地点当たり 2 ～ 3 回程度の反復を取ると効果的な場合があります。 - 採水時に反復を取らない場合でも、調査地点の魚類相を調べることができますが、1 地点当たり 2 回以上の反復を取ることで、さらに検出種数を増えることが期待されます。 - 特に、生息密度が低いと考えられる種の検出を試みるときは、採水時に種の DNA がサンプルに入る確率が低くなるため、採水反復数を 2 回以上に増やすことが推奨されます。 (小規模水域の事例) - 小規模ため池では、反復を取っても検出種数を増やす効果は小さい場合があります。 - 小河川では、小規模ため池とは異なり、1 地点当たり 2 回以上の反復を取ることで、種を見逃す可能性をより小さくできると考えられます。

※1 検出される種の一部には、採水地点の上流側から流下してきた DNA に由来するものも含まれます。

表-参 5- 1 調査計画時に検討すべき偽陰性を減らすための対策（続き）

要因	項目	対策の内容
② 採水時に種の DNA がサンプルに含まれる確率の揺らぎ	採水方法の工夫 (プーリング採水)	・ プーリング採水では、調査地点の全域に広く生息する主要な種は、検出できることが分かりました。 ・ 生息密度が低く、環境 DNA の存在量が少ないと考えられる種は、プーリング採水では検出できなかったことから、希少種の探索が目的の環境 DNA 調査にプーリング採水を適用する際は、生息しているのに検出できない「偽陰性」が生じやすく、十分な注意が必要です。
	採水方法の工夫 (夜間採水)	・ 夜行性魚類（ニホンウナギ、ナマズなど）の検出に対する採水時間の影響は小さいと考えられますが、今後さらに採水時間の効果に関する研究が進むことが期待されます。
③ 分析時に種の DNA が検出される確率の揺らぎ	PCR の反復数	・ 1 検体当たりの 1st PCR の反復数は、環境 DNA 学会発行の「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）で推奨されている通り、少なくとも 8 反復にしましょう^{※2}。 ・ 分析を外注する場合は、1 検体当たりの取得リード数の目標値や 1st PCR の反復数を指定することが可能か委託業者に確認しましょう。
	取得リード数	・ 1 検体当たりの取得リード数の目標値^{※3} は、採水反復数が 1 回のときは 100,000 リード程度、採水反復数を 2 ～ 3 回程度とるときは 50,000 リード程度を目安にすることが望ましいでしょう。
【参考】 偽陽性の要因としての 流下 DNA の影響	降雨の影響	・ 降雨の影響によって、平常時より水が濁ったり、水位が上昇している時に採水を行うと、採水した調査地点に生息する種に加えて、そこには生息しないと考えられる種も検出されることがあります。 ・ 濁りの影響による検出種の変化を避けるためには、濁度や水位が平常時の状態に戻るまで、採水を避けた方がよいでしょう。

※2 環境 DNA 学会の「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2（2020 年 4 月 3 日発行）」では、5-2-1 章の中で 1st PCR の反復数は 8 反復とされています。

※3 分析終了時に得られる 1 検体当たりの取得リード数（リード深度ともいいます）は、分析者が正確にコントロールすることは難しいですが、取得リード数の目標値は、使用する試薬キットの種類に合わせて、分析する検体総数やライブラリの濃度等を調整することにより、ある程度は分析者がコントロールすることができます。目標値を設定して分析を行うことにより、分析終了時に得られる取得リード数も目標値に近い数値が得られやすくなります。

なお、これらの内容は、環境省が行った調査の結果から検証されたものでありますが、必ずしもすべての水域に当てはまるものではありません。環境 DNA 調査の結果は、調査地の環境条件（流速、流れの向き、水深、水温、各種水質等）、調査対象とする種の生息密度、DNA 抽出サンプルに含まれる PCR 阻害物質の量など、それぞれの調査地固有の要因に影響される可能性があることに、十分留意する必要があります。

(1) 反復採水の効果：大規模水域の事例

調査地点の環境水には、そこに生息する生物種由来の環境 DNA が含まれています。調査地点における環境 DNA の存在量は、個体の大きさや生息密度、環境 DNA の放出率や分解率、環境条件など複合的な要因の影響を受けた結果として、種ごとにばらつきがあります。また、調査地点における環境 DNA の分布範囲も、空間的、かつ、時間的なばらつきがあります。環境 DNA の存在量や分布範囲のばらつきは、種の検出確率に直接的に影響し、ときには偽陰性を生じさせる一因となります。

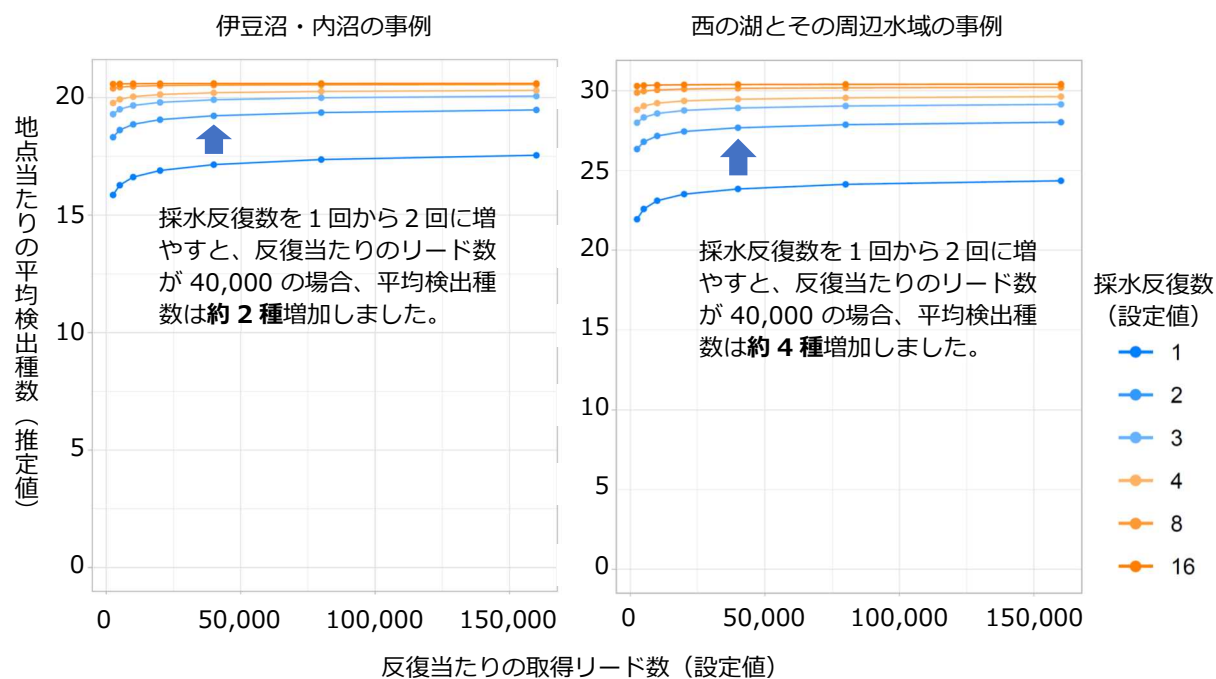
そこで、環境省では、個別の調査地における検討事例を積み重ねることで、調査計画時に指針や目安となりうる具体的な参考情報を集めることを目指し、令和 2 年度には伊豆沼・内沼、令和 3 年度には琵琶湖の内湖である西の湖とその周辺水域において、多地点・高頻度の環境 DNA 調査（以降、重点調査とします）を実施しました。

重点調査では、1 地点当たり 4 回反復で採水を実施しました。それぞれの採水サンプルは MiFish 法により分析し、その結果は「サイト占有モデル」と呼ばれる統計モデリングの手法を用いて解析しました。さらに、反復採水が偽陰性を減らす効果を検証するため、上記の解析モデルを用いて、反復を取らないとき（すなわち反復 1 回のとき）と反復を最大 16 回まで取ったときを想定し、地点当たりの検出種数がどのように変化するかを推定しました（図-参 5- 1）。なお、この調査における「反復」とは、1000mL ボトルを使って、1 地点につき連続的に採水を繰り返して得た反復サンプルであり（右写真）、例えば 4 回反復で採水した場合は、4 本の反復サンプルを個々に分析して 4 つの分析結果を得ることを指します。反復と言っても、調査日や調査地点をずらした上で、繰り返して採水した場合とは意味が異なることに注意してください。



解析の結果から、平均検出種数は、地点当たりの採水反復数を増やすほど増加する傾向があり、伊豆沼及び西の湖のどちらの事例においても、その効果は反復数が 2～3 回までは明らかですが、反復数が 4 回以上では大きく変化しないことが分かりました。また、反復当たり（1 検体当たり）の取得リード数を増やすことでも検出種数は増加する傾向があり、その効果は取得リード数が 40,000 リードまでは明らかですが、80,000 リード以上では大きく変化しませんでした。すなわち、図-参 5- 1 で言えば、採水反復数を増やすことで検出種数が増える効果（図中の青矢印）に比べ、反復当たりの取得リード数を増やすことで検出種数が増える効果（横軸の数字が増えることに対する検出種数の変化量）は、限定的であると言えます。

以上のことから、地点当たり 2 回もしくは 3 回の反復を取って採水することで、分析コストと労力の面から、最も効率的に地点当たりの検出種数が高まる（すなわち偽陰性を減らす）ことが分かりました。また、この重点調査では、1 地点当たりの反復を 4 回取っていましたが、それぞれの反復回の種ごとの検出結果を個別に比較すると、調査地における生息密度が高いことが知られている種は、反復 4 回中に 4 回とも検出されたのに対し、生息密度が低いと考えられる種では、反復 4 回中に 1 回もしくは 2 回のみ検出されていました（希少種の分布情報を含むため、調査データは未掲載）。したがって、希少種のように、一般的に生息密度が低いと考えられる種の検出を目的として環境 DNA 調査を実施する場合は、偽陰性が生じる可能性をできるだけ少なくするために、1 地点当たりの反復数を 2 回以上取ることが推奨されます。



※反復当たりのリード数は、最小が2,500、最大が160,000として、2倍ずつ増やす条件で設定しています。

図-参5-1 採水反復数に対する平均検出種数（推定値）の変化（大規模水域の事例）

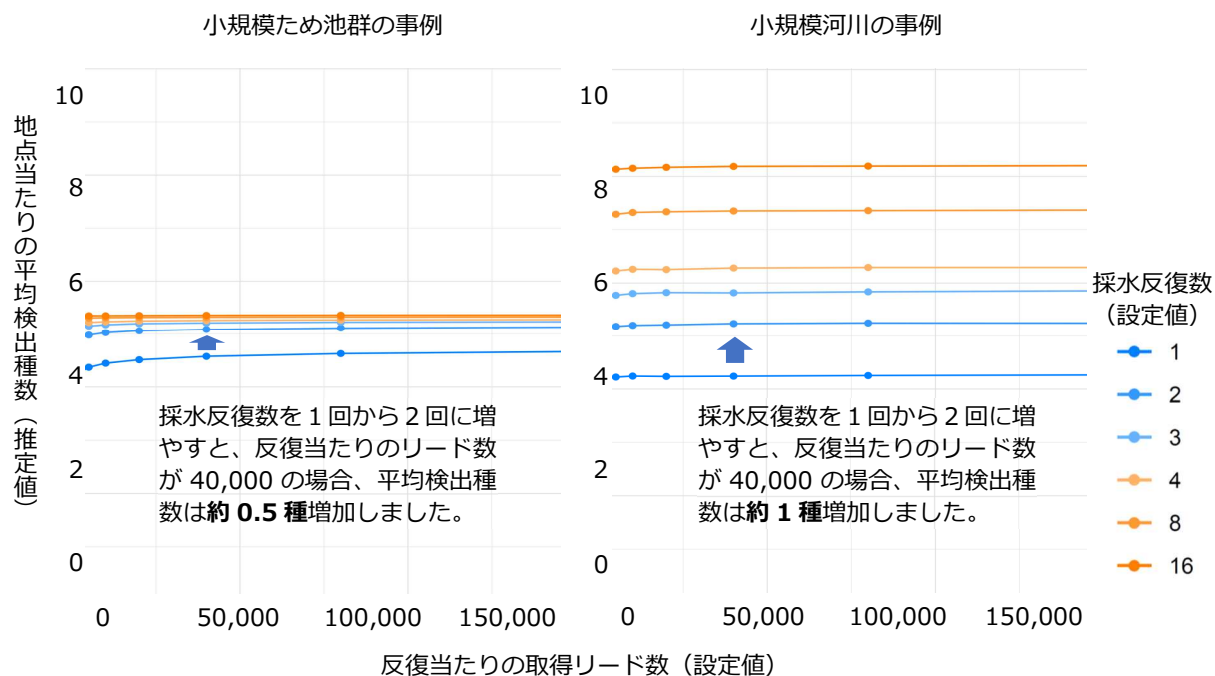
(2) 反復採水の効果：小規模水域の事例

前章では、大規模水域における反復採水の効果事例を示しましたが、二次的自然環境には、ため池や小河川などのさらに小規模な水域も含まれます。こうした小規模水域における反復採水の効果を検証するため、環境省では、令和4年度に中部地方の希少種が生息する小規模ため池群や小河川において、大規模水域と同様の方法で、1地点当たり4回反復で採水する環境DNA調査（重点調査）を実施しました。なお、重点調査は、面積が500～2000m²程度の農業用ため池群（ため池数計8か所）と、平均水面幅5.2m、平均流速0.7m/秒の山間部の水田地帯（重要里地里山に選定された地区）を流れる小河川で実施しました（右写真）。



本調査結果を「サイト占有モデル」を用いて解析した結果、平均検出種数は、地点当たりの採水反復数を増やすほど増加する傾向がみられましたが、その効果は、小規模ため池群では反復数を2回以上に増やしても0.5種程度の増加にとどまり、反復を取ることの利点は小さいことが分かりました（図-参5-2）。一方、小河川では、採水反復数を1回から2回に増やすと平均検出種数は約1種、4回に増やすと平均検出種数は約2種増加しました。

以上のことから、小規模ため池では反復を取っても検出種数を増やす効果は小さいこと、また、小河川では地点当たり2回以上の反復を取って採水することで、地点当たりの検出種数が増える（すなわち偽陰性を減らす）効果があることが示唆されました。



※反復当たりのリード数は、最小が2,500、最大が160,000として、2倍ずつ増やす条件で設定しています。

図-参5-2 採水反復数に対する平均検出種数（推定値）の変化（小規模水域の事例）

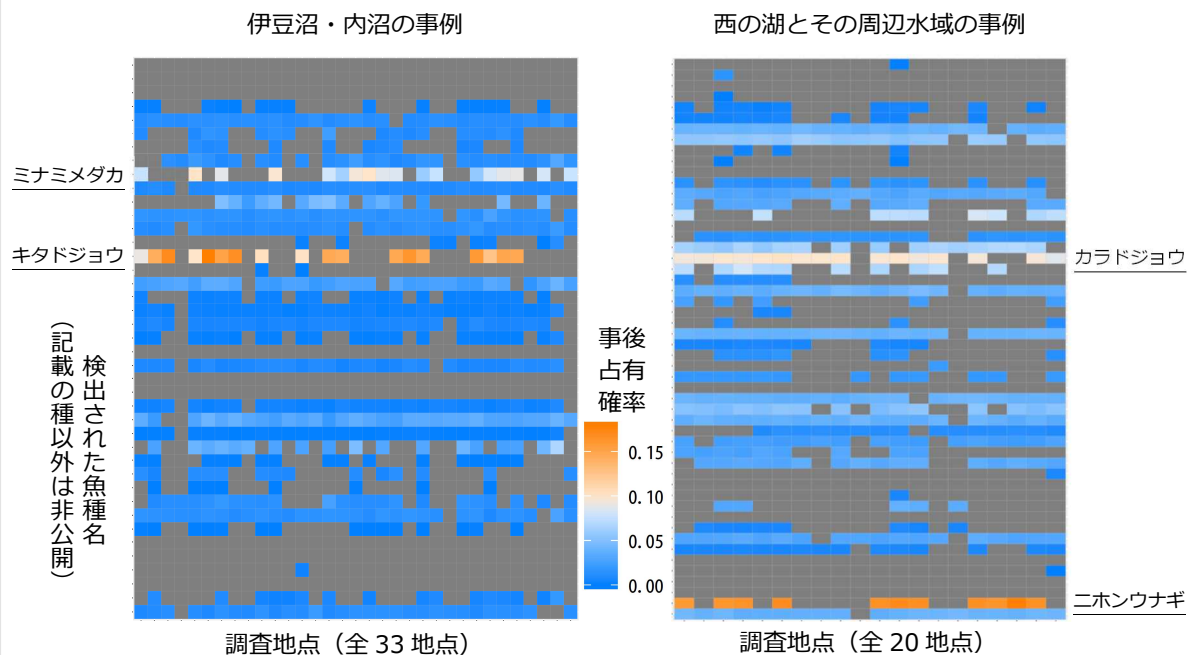


コラム 調査地が変わると、偽陰性が起きやすい種も変わる

環境省の重点調査では、サイト占有モデルを用いた解析を実施しましたが、この解析では、MiFish 法による環境 DNA 分析を進める際の3つの過程における種の検出しやすさ（言い換えれば、偽陰性の起こりやすさ）を定量的に説明することができます。3つの過程とは、1-3-2 章で触れた偽陰性が生じる3つの要因と深く関係するものであり、サイト占有モデルを用いた解析の過程において、それぞれの偽陰性の要因の発生確率を計算することもできます。

下図に示した事後占有確率とは、環境 DNA が未検出となった種に対して、実際は調査地点にその種の DNA が存在していた確率（すなわち偽陰性の発生確率）を表しています。事後占有確率が高くなった種は、伊豆沼ではキタドジョウとミナミメダカ、西の湖ではカラドジョウとニホンウナギと推定されました。このことから、特定の種だけで偽陰性が起こりやすいわけではなく、調査地が変わると偽陰性が起こりやすい種も変わることが分かりました。

偽陰性が起こりやすくなる要因としては、種差に基づくものとして MiFish プライマーのミスマッチなどが、調査環境に基づくものとして水深などの物理環境条件や種の存在量などが影響すると考えられます。上記4種では、ミナミメダカは MiFish プライマーのミスマッチが、他の3種は調査環境に基づくものが影響したものと推測されました。環境 DNA 調査では、このように調査地ごとに種の検出確率に偏りがあることに留意が必要です。



※灰色のタイルは、その種の環境 DNA が検出されたため、事後占有確率が 1 であることを表す。

図 事後優占確率の推定結果

サイト占有モデルを用いた環境 DNA 分析（網羅的解析）結果の解析にさらに興味がある方は、以下の論文を参照してください。

Fukaya et al. (2021) Multispecies site occupancy modelling and study design for spatially replicated environmental DNA metabarcoding. *Methods in Ecology and Evolution*, 13:183-193.

(3) 調査地点数の目安：大規模水域の事例

調査計画時に頭を悩ませることの一つとして、「ある調査範囲において、どのくらいの地点数を設定するのがよいのか」という問題があります。しかし、そうした検討を詳細に行った研究事例は、まだほとんどありません。また、調査地点数を考える上では、調査範囲の広さ、求める調査精度、投入できる調査コストなど様々な条件を考慮する必要があり、調査地点数の設定に対する単純な数値基準を求めることは難しいと言えます。しかし、検討事例を積み重ねることで、およそその目安となる目標値を求めることができれば、調査計画時において、より具体的な調査地点数の設定に役立つものになると考えました。

そこで、比較的大規模な止水域を調査対象範囲とした際に、必要な調査地点数の目安を求めるため、(1)章と同じ解析モデルから、調査地点数を徐々に増やした時に調査地全体から検出される総種数がどのように変化するかを推定しました（図-参5-3、図-参5-4）。

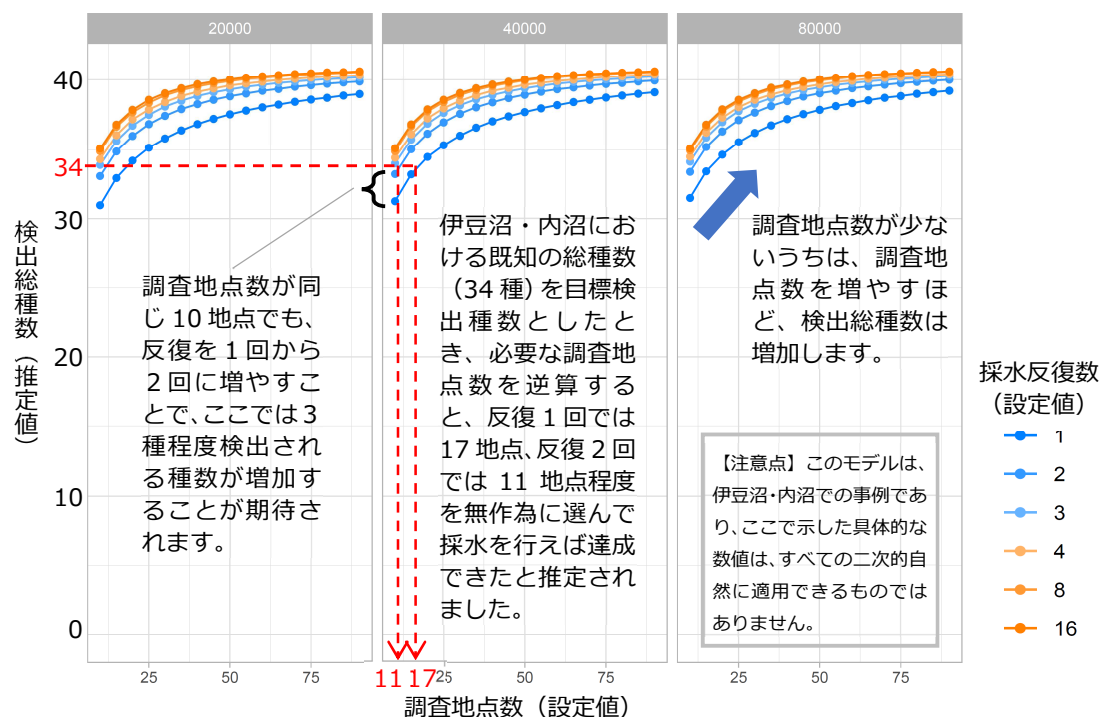
その結果、伊豆沼及び西の湖の両調査地において、調査地点数が少ないうちは、地点数を増やすほど検出される総種数は増加しましたが、その効果は30地点を超えるあたりから小さくなりました。また、1地点当たりの採水反復数は、1回（すなわち反復を取らない）のときよりも、反復を2回以上取ることで、より少ない地点数で検出総種数を増やす効果が得られることが分かりました。

調査を行った伊豆沼では、環境DNA調査からは計41種が検出され、過去の継続的な捕獲調査からは計34種が確認されています。そこで、図-参5-3の結果を基に、環境DNA調査により捕獲調査と同等レベルの34種以上を検出することを目標として、必要な調査地点数を逆算しました。採水反復当たりの取得リード数を40,000リードに設定したときでは、反復1回（すなわち反復を取らないとき）では17地点で採水する必要であったのに対し、反復2回ではそれよりも少ない11地点で目標の検出種数を達成できたと推定されました。すなわち、反復を2回に増やすことで必要な調査地点数を2/3に減らせるため、調査地点に移動して作業を行うためのコストも2/3になると言えます。

同じく、西の湖では、環境DNA調査からは計52種が検出され、過去の捕獲調査等からは計44種が確認されています。そこで、図-参5-4の結果を基に、捕獲調査と同等レベルの44種以上を検出することを目標として、必要な調査地点数を逆算しました。その結果、反復1回では16地点で採水する必要であったのに対し、反復2回ではその2/3に当たる10地点で採水を行えば、目標の検出種数を達成できたと推定されました。

これらの結果から、伊豆沼（面積3.32km²）・内沼（面積1.05km²）や西の湖（面積2.85km²）と同等規模の止水域を対象に環境DNA調査を行う場合には、一つの目安として、反復1回（すなわち反復を取らないとき）では16～17地点、反復2回では10～11地点程度を調査地点数として設定すると、捕獲調査を行ったときと同等レベルの種数が検出できると期待されます。なお、この結果は、伊豆沼・内沼及び西の湖における推定値であり、異なる調査地においては、その地域の魚類相や調査範囲の広さ、湖沼や水路など環境の違い等によって必要な調査地点数は変化するものと考えられます。

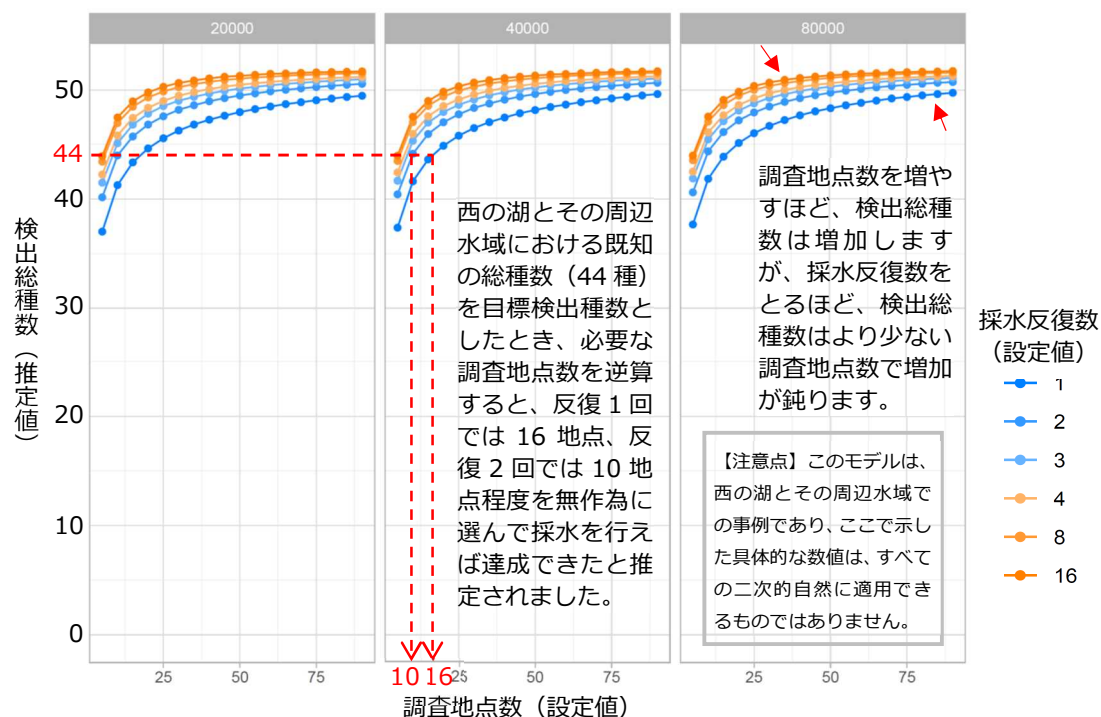
一方で、地点数が増えるほど、また、採水反復数が増えるほど、採水作業や分析にかかるコストが増えます。実際には、求める調査精度と投入できる調査コスト等とのバランスを考え、その上で少数の反復を取りながらなるべく多くの地点数で採水できれば、偽陰性による未検出が生じることを最小限に抑えた環境DNA調査を実施することができると考えられます。また、調査予算などの都合上、複数回の反復を取ることが難しく、設定できる調査地点数も非常に限られてしまう場合は、改善の策として、捕獲調査で調査地点を選ぶ時と同様の考え方を参考に、一般的に魚類の生息に適する環境（検出したい種が決まっている場合は、その種の生息環境）や既存資料等から魚類の種多様性が高いことが分かっている場所などから調査地点を選ぶなどの工夫が考えられます。



※調査地点数は10～90地点で設定し、5地点ずつ増やした時の総検出種数を推定しています。グラフでは省略している地点数が1から10までの部分は、検出総種数は単調増加しています。

※グラフ最上部の数値は、モデルで設定した採水反復当たりの取得リード数を示します。

図-参5-3 調査地点数に対する検出総種数（推定値）の変化：伊豆沼・内沼の事例



※調査地点数は1～90地点で設定し、5地点ずつ増やした時の総検出種数を推定しています。

※グラフ最上部の数値は、モデルで設定した採水反復当たりのリード数を示します。

図-参5-4 調査地点数に対する検出総種数（推定値）の変化：西の湖とその周辺水域の事例

< 重点調査の内容に関する補足説明 >

令和2年度調査の伊豆沼・内沼では、2つの沼の周囲とその周辺に約500m間隔で計33地点を配置し、令和3年度調査の西の湖とその周辺水域では、エリア内にあるタイプの異なる環境を任意に選り出して計20地点を配置しました。両調査地ともに、1地点あたりの採水反復数を4回としてサンプルを採取し、各検体は個別に環境DNA分析（MiFish法）を行いました。

その結果を基に、「サイト占有モデル」を用いて解析を行い、反復数や調査地点数を増やした時に、調査地から検出される種数がどのように変化するかをモデルから推定しました。環境DNA調査では、調査地（サイト）内に、環境DNAが存在（占有）しているのに検出できないという偽陰性による誤差を含みます。サイト占有モデルとは、このような偽陰性による誤差を考慮して、サイト内の占有状態の推測を行うための階層モデルです。なお、今回のサイト占有モデルによる解析は、国立環境研究所の深谷肇一主任研究員に委託し、実施したものです。



重点調査の調査地点図（伊豆沼・内沼）



重点調査の調査地点図（西の湖とその周辺水域）

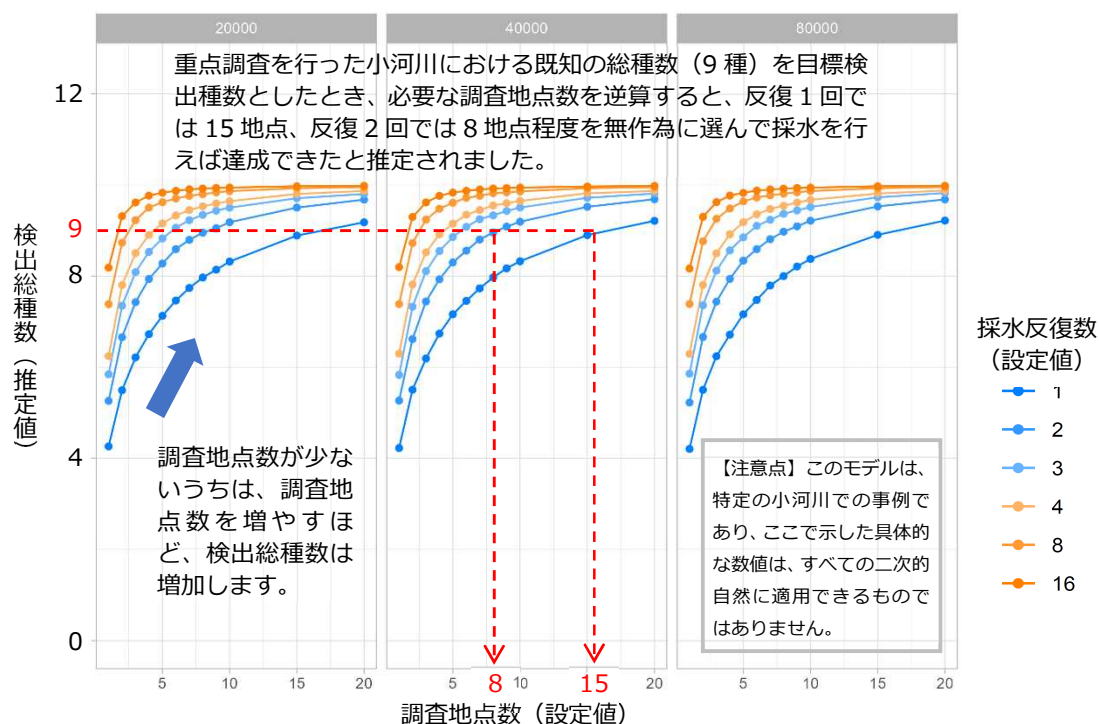
(4) 調査地点数の目安：小規模水域の事例

前章の大規模水域に対して、小規模水域を調査対象範囲とした際に必要な調査地点数の目安を求めるため、(2) 章と同じ解析モデルから、小河川において調査地点数を徐々に増やした時に調査地全体から検出される総種数がどのように変化するかを推定しました（図-参 5- 5）。

その結果、小河川の事例では、調査地点数が少ないうちは、地点数を増やすほど検出される総種数は増加しますが、その効果は 10 地点を超えるあたりから小さくなりました。また、1 地点当たりの採水反復数は、1 回（すなわち反復を取らない）のときよりも反復を 2 回以上取ることで、より少ない地点数で検出総種数を増やす効果が得られることが分かりました。

重点調査を行った小河川では、過去の文献記録や捕獲調査では計 9 種が確認されており、今回実施した環境 DNA 調査では計 10 種が検出されています。そこで、図-参 5- 5 の結果を基に、捕獲調査と同等レベルの 9 種以上を検出することを目標として、必要な調査地点数を逆算しました。その結果、反復 1 回では 15 地点で採水する必要であったのに対し、反復 2 回ではその約半分にあたる 8 地点で採水を行えば、目標の検出種数を達成できると推定されました。

ただし、実際に必要十分な調査地点数については、小河川の規模や調査対象とする範囲の広さ、その地域の魚種の多様性など様々な条件が影響するため、この結果はあくまでも一つの事例として参考とする程度に留めてください。



※調査地点数は 1～20 地点で設定し、1 地点ずつ（10 地点以降は 5 地点ずつ）増やした時の総検出種数を推定しています。

※グラフ最上部の数値は、モデルで設定した採水反復当たりのリード数を示します。

図-参 5- 5 調査地点数に対する検出総種数（推定値）の変化：小河川の事例

以上のことから、小河川において環境 DNA 調査を行う場合に、過去の文献や捕獲調査等から確認されているその地域の種多様性を網羅しようとするならば、代表する 1 地点だけの調査では生息し

ている種を見逃す可能性があり、少なくとも複数の調査地点を設定する必要があります。そのため、求める結果の精度と投入できる調査コスト等とのバランスを考えた上で、なるべく多くの地点数で採水するとよいでしょう。また、偽陰性による未検出を最小限に抑えたい場合には、さらに1地点当たりの採水反復を2～3回程度取ることで、種を見逃す可能性が大きく低下することが期待されます。

続いて、小規模ため池において調査地点数を徐々に増やした時に、そのため池から検出される総種数がどのように変化するかを推定しました（図-参5-6）。その結果、解析を行った3箇所のため池のうち2箇所（St05、St13）では、1池当たりの調査地点数が1～3地点程度で検出される種がほぼ飽和しました。残る1箇所（St08）では、非常に少ないリード数で、かつ、反復4回のうちの1回分から検出された2種を検出しようとする、4地点で4回反復による採水を実施する必要があります。しかし、その2種を除く4種の「優占種」を把握する目的であれば、調査地点数が1地点程度で検出される種は飽和しました。

以上のことから、重点調査を行ったため池と同程度の規模（面積2000m²以下）のため池では、1池当たりの調査地点数が1地点程度でも、その池に生息する主要な種は把握することが可能であると考えられます。ただし、実際に必要十分な調査地点数については、ため池の広さや貯水量、その池の魚種の多様度など様々な条件が影響するため、この結果はあくまでも一つの事例として参考とする程度に留めてください。

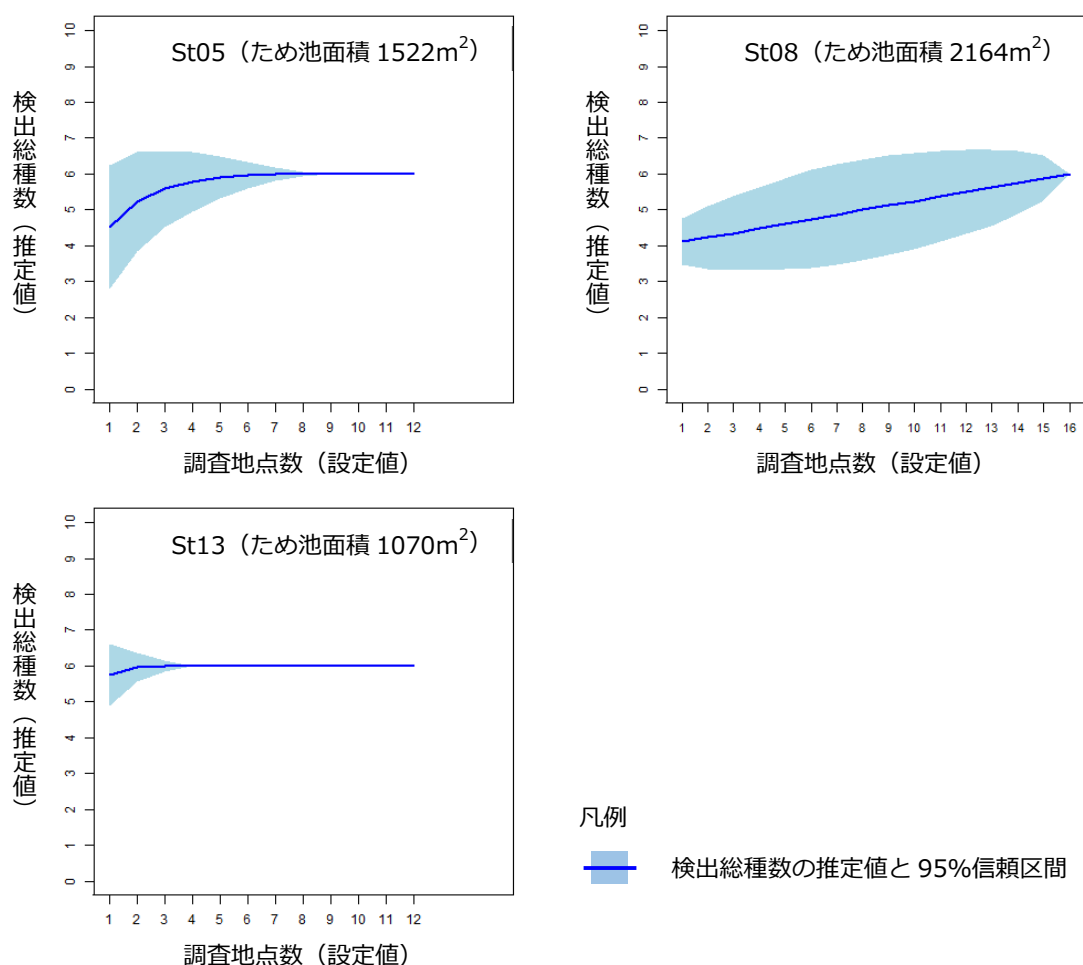


図-参5-6 1池当たりの調査地点数に対する検出総種数（推定値）の変化：小規模ため池の事例

(5) 調査時期

二次的自然環境は、一般的な季節変動に加えて、かんがい用水など様々な形で人が水を利用する過程で、水深や流速、濁り等の人為的変動が重なり、環境条件が大きく変化しやすいという特徴があります。こうした環境に生息する淡水魚類も、その変動に反応するように、それぞれの種の生態特性に合わせて、生息環境を移動するため、調査する時期によって得られる結果が変わる可能性があります。

そこで、全国の様々なタイプの二次的自然環境において、環境省が平成 30～31 年度に行った試行調査の結果から、最適な調査時期を調べました（図-参 5- 7）。その結果、ほとんどの調査地で 5 月から 11 月の期間であれば、調査時期の違いにより検出される種数は、多少の変動はあるものの、顕著な差はありませんでした。したがって、調査時期は、一般的に淡水魚類の活動が盛んになる春から秋にかけての時期が適していると言えます。

なお、伊豆沼・内沼では、9 月において、他の調査時期に比べて検出種数が多い傾向がありました。しかし、これは調査前々日からの弱い降雨による水量増加の影響により、調査地の upstream に生息する魚種（主にサケ科魚類）の DNA が検出されたことで、種数が増加したものと推察されました。

今回の検討では、検出種数のみに着目しましたが、検出される種の組成をより詳細に確認すると、季節によって検出される種が異なる場合もあるので、調査時期は、調査地の環境や調査対象種の生態的特性も十分考慮した上で、設定する必要があります。

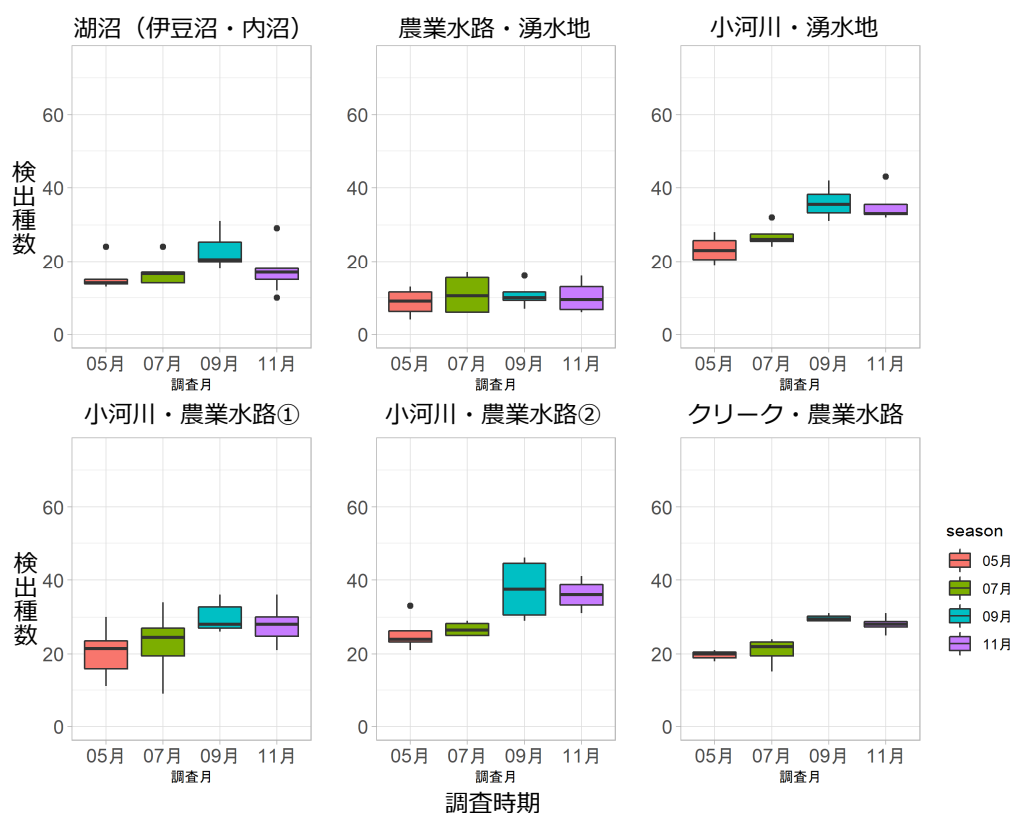


図-参 5- 7 調査時期による検出種数の比較

(6) 調査地点の環境条件の影響：大規模水域の事例

本手引きでは、二次的自然環境に生息する淡水魚類に着目していますが、二次的自然環境と言っても、そこには多種多様なタイプの環境が存在します。例えば、湖沼や小河川、湿原などの自然度の高い水域のほか、水田やため池、農業用水路などの人間の働きかけを通じて形成された水域も含まれます。こうした二次的自然環境を対象とした環境 DNA 調査において、調査地に生息する魚種をできるだけ効果的に検出したい場合、どのような環境条件を選ぶとよいのか（もしくは、避けるべきなのか）という情報があれば、偽陰性を減らすことに役立つ可能性があります。

西の湖における重点調査では、採水時に、調査地点の水温や水質（pH、D0、EC、濁度、など）のほか、水深や流速などの物理環境項目を測定し、さらに調査地点の環境の特徴をいくつかのカテゴリーに区分しました。その上で、環境 DNA 調査により検出された総種数が、どのような環境条件に対して多くなるのかを検証しました。

その結果、表-参 5- 2 に示すように、調査地点によって検出された総種数（実測値）にばらつきが見られました。環境の特徴のカテゴリー区分のうち、「流入河川との合流部」と「水面が閉鎖的（例えば水路形状）」に該当する調査地点では、検出総種数が多い傾向にあることが分かりました。一方で、測定した各種の水質や物理環境は、今回の調査地においては検出総種数に対して影響を与えていた項目はありませんでした。このように、環境 DNA 調査では、同じ調査地内の地点であっても、地点ごとに異なる魚類相が結果に反映されるため、調査地点を設定する際には、調査地の環境条件も含めて十分配慮する必要があります。

表-参 5- 2 環境条件と検出総種数：西の湖とその周辺水域の事例

環境の特徴	水面区分	岸辺の状態	検出総種数	検出総種数のカテゴリー別内訳			
				文献記録あり	文献記録なし	上流域に生息	交雑個体由来
流入合流部	閉鎖的	自然	43	33	6	3	1
流入合流部	閉鎖的	護岸	40	32	4	2	2
流入合流部	閉鎖的	自然	39	33	3	1	2
接続水域	閉鎖的	自然	38	32	3	1	2
接続水域	閉鎖的	自然	37	31	4	0	2
接続水域	開放的	自然	35	28	3	2	2
湖岸	開放的	護岸	33	30	1	0	2
湖岸	閉鎖的	自然	32	28	2	0	2
湖岸	開放的	護岸	30	27	1	0	2
接続水域	閉鎖的	護岸	30	27	1	0	2
接続水域	開放的	自然	29	26	1	0	2
水路	閉鎖的	自然	29	23	3	1	2
水路	閉鎖的	護岸	26	22	2	0	2
湖岸	開放的	護岸	26	23	1	0	2
湖岸	開放的	自然	25	22	1	1	1
湖岸	開放的	自然	22	21	1	0	0
接続水域	開放的	自然	21	18	1	0	2
湖岸	開放的	自然	21	19	1	0	1
湖岸	開放的	自然	19	18	1	0	0
湖岸	開放的	自然	18	16	1	0	1

※表中の「上流域に生息」は、調査地点に生息する可能性が低く、流下 DNA の影響で検出されたと推定されるものを、「交雑個体由来」は雑種個体を持つ DNA（参考資料 5 を参照）を検出したと推定されるものを示します。

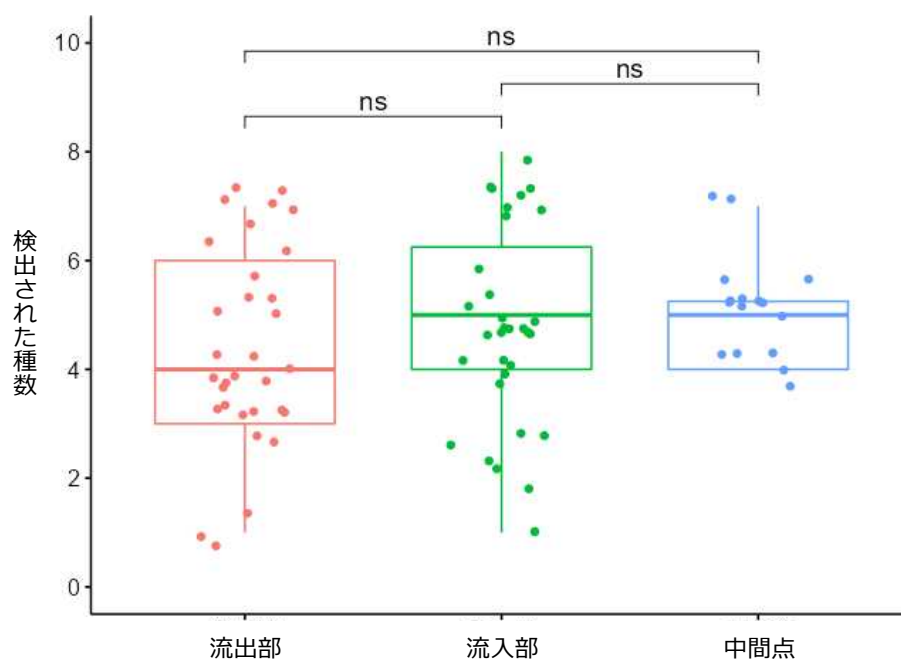
(7) 調査地点の環境条件の影響：小規模水域の事例

ため池には、一般的に、水を抜いたり、過剰に流入してきた水を逃がすための排水施設が設置されています。こうした排水施設及びその付近（以降、流出部とします）に設定された調査地点では、常時もしくは一時的にため池内の水を下流側に流出させていることから、流出部付近を流れる水にはため池内に生息する魚類の環境 DNA が集まりやすいのではないかとこの可能性が考えられました。また、ため池の種類（特に谷池）によっては、周辺からため池内に沢水や河川水などが流入している場所（以降、流入部とします）があり、そうした地点も検出される種数に変化がある可能性が考えられました。

そこで、重点調査を行った小規模ため池群において、実際に採水した調査地点を「流出部・流入部・中間点（流出部・流入部との間の中間的な位置）」の3つの環境条件に分け、環境 DNA 調査により検出された種数が環境条件間で異なるかを検証しました。

その結果、図-参 5- 8 に示すように、重点調査を行った小規模ため池群では、流出部・流入部・中間部のいずれにおいても検出される種数に有意な差はないことが分かりました。このことから、面積が 500～2000m² 程度の小規模ため池を対象とした環境 DNA 調査では、作業安全性を十分に考慮した上で、ため池周囲の任意の場所を調査地点として設定してよいと考えられます。

なお、今回の重点調査を小規模ため池群は、流入及び流出する水量が非常に小さく、流出部の流速はほぼ測定不可能なレベルでした。そのため、流入及び流出する水量がある程度大きなため池では、今回とは異なる結果が得られる可能性があります。



注) 図中の「ns」印は p 値が 0.05 以上であり、有意差がないことを示します。

図-参 5- 8 調査地点の環境条件の違いによる検出種数の比較：小規模ため池の事例

(8) 採水方法の工夫（プーリング採水）

環境 DNA 調査は、作業の簡便性から、1 日で多地点の調査を行うことができます。一方で、多地点の調査を行うと、多数の分析サンプルが発生するため、分析に係るコストが増加します。そのジレンマを解消する採水方法として、多地点から少量ずつ採水したサンプルを混合し、1 本にまとめてから分析を行うことを目的とした「プーリング採水」があります。

ここでは、通常の採水方法で採取したサンプルから検出された種が、プーリング採水でもすべて検出できるかを検証しました（図-参 5- 9）。その結果、通常の採水方法で多くの地点から検出された種は、プーリング採水でも検出されました。しかし、検出された地点数が少ない種、すなわち生息密度が低く、環境 DNA の存在量が少ないと考えられる種は、プーリング採水では検出できませんでした。したがって、希少種の探索が目的の環境 DNA 調査にプーリング採水を適用する際は、偽陰性が生じやすくなる可能性があることに十分な注意が必要です。

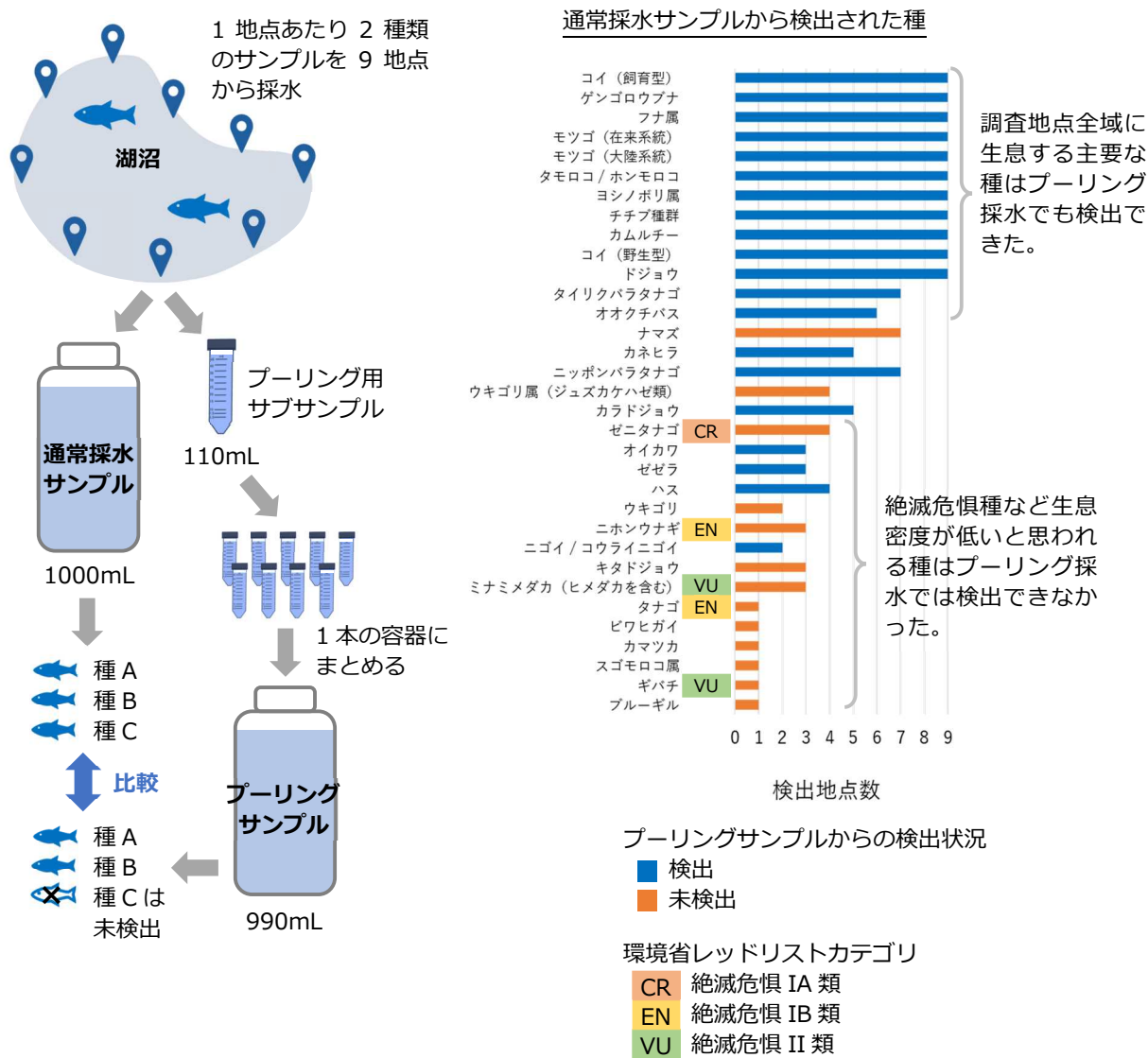


図-参 5- 9 通常採水とプーリング採水の比較

(9) 採水方法の工夫（夜間採水）

二次的自然環境に生息する淡水魚類の中でも、ニホンウナギやナマズ目魚類の多くの種は、夜行性であると言われています。夜行性魚類は、昼間は石や構造物の間隙に隠れており、夜になるとそこから出てきて活動することから、環境 DNA の挙動も昼間と夜間では異なる可能性があると思われました。

そこで、ニホンウナギやナマズの生息が捕獲調査により確認されていた伊豆沼の2地点において、同一日の昼間と夜間にそれぞれ採水を行い、夜行性魚類の検出精度が変化するかを調べました（図-参5-10）。その結果、夜間に採水を行っても、夜行性魚類（ニホンウナギ、ナマズ）の検出感度が向上するという結果は得られませんでした。したがって、今回の結果からは、淡水魚類を対象とした環境DNA調査においては、夜行性魚類の検出に対する採水時間の影響は小さいと考えられますが、今後さらに採水時間の効果に関する研究が進むことが期待されます。

種名	St. A			St. B		
	昼間 採水	夜間 採水	捕獲 結果	昼間 採水	夜間 採水	捕獲 結果
ニホンウナギ						
コイ（飼育型）						
コイ（野生型）						
ゲンゴロウブナ						
フナ属						
タイリクバラタナゴ						
オイカワ						
モツゴ（在来系統）						
モツゴ（大陸系統）						
タモロコ / ホンモロコ						
ニゴイ / コウライニゴイ						
ドジョウ						
カラドジョウ						
ナマズ						
ミナミメダカ（ヒメダカを含む）						
ブルーギル						
オオクチバス						
ウキゴリ						
ヨシノボリ属						
チチブ種群						
カムルチー						

夜間採水により夜行性魚類の検出効率が良くなる傾向はみられなかった

凡例

検出	
検出(夜間のみ)	
未検出	
捕獲で確認	

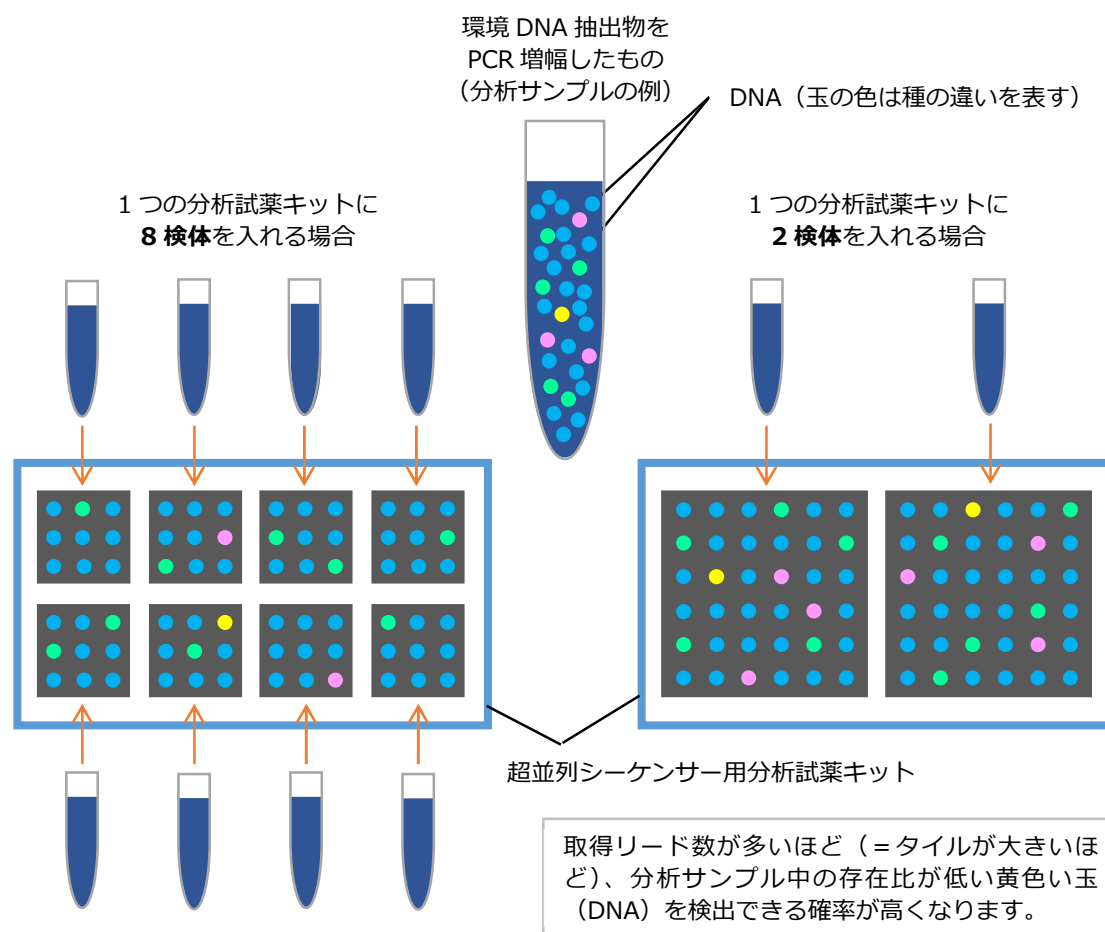
※夜間採水は、夏季の日没から2時間後（21時頃）に行いました。

図-参5-10 昼間採水と夜間採水の比較

(10) 分析時の条件（PCR の反復数と取得リード数）

偽陰性の発生しやすさに影響する分析条件は、1st PCR の反復数以外にも複数ありますが、影響が大きいと考えられる条件項目の一つとして、超並列シーケンサーで取得する 1 検体当たりのリード数があります。図-参 5-4 に示したイメージ図のように、超並列シーケンサー（ここではイルミナ社の装置を想定）は、同時に複数のサンプルを分析できる仕様になっています。

1 個の分析試薬キットから取得できる総リード数はキットの種類ごとに決まっているため、分析者は、1 検体当たりから取得したいリード数（取得リード数の目標値）を考慮して、1 個のキットで同時に分析する検体数を決めることになります。分析サンプルに含まれている DNA は、種ごとに存在比が異なっており、さらに分析サンプル中の DNA はランダムに試薬キットに入ります。その結果、取得されたリード数が多いほど、分析サンプル中の存在比が相対的に少ない種の DNA を検出できる確率が高くなり、偽陰性を生じにくくすることができます。



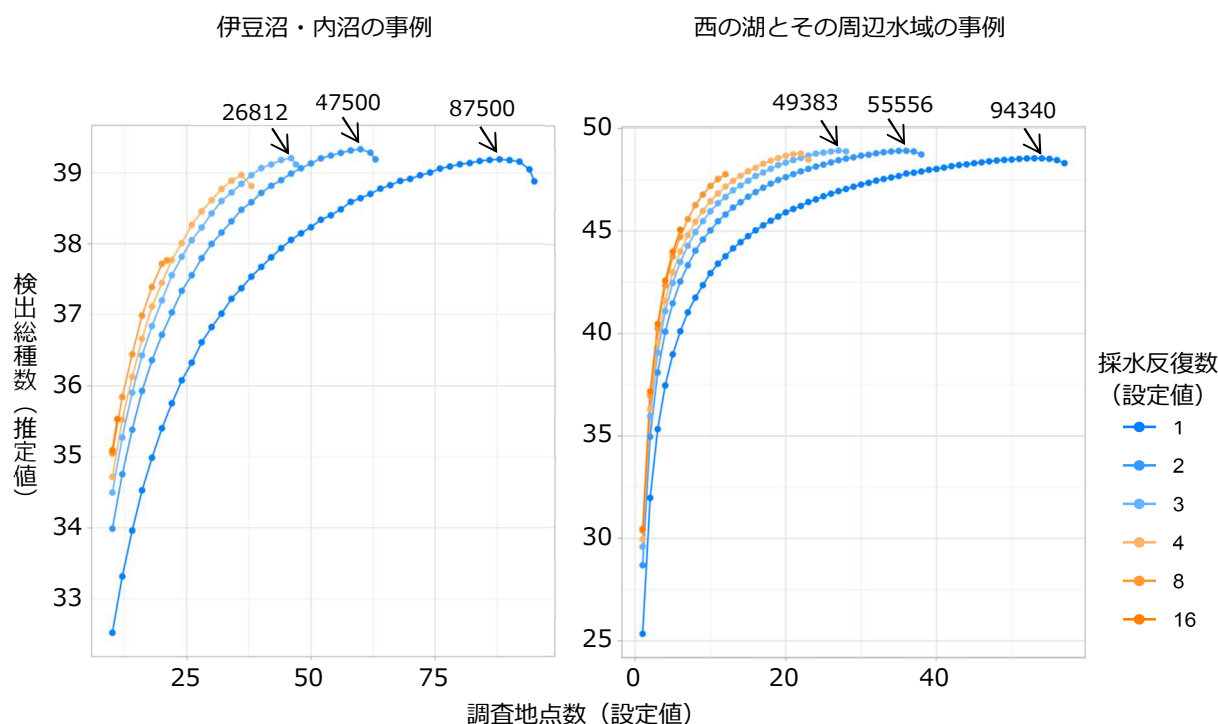
※分析試薬キットに並べられる灰色のタイルの総面積と 1 つのタイルに並べられる玉 (DNA) の個数がほぼ固定されているとき、タイルの数が同時に分析できるサンプルの検体数、タイルの大きさが 1 検体当たりの取得リード数を表しています。

図-参 5- 11 検体当たりの取得リード数の違いが種の検出感度を与える影響（イメージ）

取得されるリード数を多くするためには、1 個の分析試薬キットに入れるサンプルの検体数を少なくする必要がありますが、一方で、1 個の分析試薬キットに入れる検体数を少なくすると、1 検体当たりの分析コストが高くなります。したがって、環境 DNA 分析では、取得リード数と分析コストのバランスを適切に調整する必要があります。

そこで、1 検体当たりの取得リード数として適切な目標値の目安を求めるため、(1) と同じ解析モデルから、調査・分析コストを固定した条件下で調査地点数、地点当たりの反復数、反復（検体）当たりの取得リード数をそれぞれコスト換算して変化させた時に、調査地全体から検出される総種数がどのように変化するかを推定しました（図-参 5-5）。

その結果、伊豆沼及び西の湖の両調査地において、1 地点当たりの採水反復を取ることで、より少ない地点数で効果的に検出総種数を増やすことが期待できる点は、(2) 章の通りですが、検出総種数をできるだけ多くしたい場合は、反復数が少ないときほど多くのリード数が必要になることが分かりました。1 検体当たりの取得リード数は、目標値として、採水反復数が 1 回のときは 100,000 リード程度、採水反復数を 2～3 回程度とるときは 50,000 リード程度を目安にすることが望ましいと言えます。



※図中の矢印と数字は、推定された検出総種数が最大となる時のリード数を示します。
 ※調査地点数は、伊豆沼は最小が 10、最大が 96 として 2 地点ずつ増やした時の条件で、
 西の湖は最小が 1、最大が 57 として 1 地点ずつ増やした時の条件で設定しています。
 ※グラフの視認性を良くするため、グラフの縦軸（検出総種数）はプロットが描画されている数値範囲を切り取っていることに注意してください。

図-参 5- 12 調査コストを固定した条件下での調査地点数・採水反復数・取得リード数に対する
 検出総種数（推定値）の変化

環境 DNA 分析（ここでは MiFish 法を指す）では、一般的な流れとして、まず採水サンプルをフィルターでろ過し、続いてフィルター上の残渣から環境 DNA を抽出します。1 検体 1000mL の採水サンプルに含まれていた環境 DNA は、抽出後には 50～200 μ L 程度の溶液中に濃縮されます（以降、これを環境 DNA 抽出液と言います）。しかし、そこまで濃縮された環境 DNA も、そのままでは分析機器で検出するには濃度が薄すぎるため、PCR 増幅（1st PCR とも言う）という工程において魚類の DNA だけを選択的に増やす必要があります。このとき、環境 DNA 抽出物を 1 検体当たり数 μ L 程度（標準的には 2 μ L）だけを取り出し、チューブに入れて試薬と混ぜ、PCR 増幅に使用します。このとき、1 本のチューブに入れることができる環境 DNA 抽出物の液量はほぼ決められているため、1 検体当たりに環境 DNA 抽出物を何本のチューブに反復して取り出すかが最終的に得られる調査結果に影響します。

環境 DNA 学会の「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2（2020 年 4 月 3 日発行）」では、5-2-1 章の中で 1st PCR の反復数は、8 反復とされています。ただし、分析を委託する機関によって標準的な反復数が 8 反復より少ない場合があるため、分析を委託する際は、分析機関が採用している標準的な 1st PCR の反復数を確認することが望ましいです。

(11) 降雨の影響

環境 DNA 調査では、調査地点の環境水を採水しますが、調査地点の環境水の状態は、降雨やそれに伴う増水、人為的な攪乱（例えば、工事、代かきなどの農業活動）などの影響を受けて変化し、一時的に水が濁ることがあります。しかし、調査地点の水が明らかに濁った状態にあり、その濁った環境水を採水してサンプルとしたとき、調査結果にどのような影響が出るのかという点は、まだあまりよくわかっていません。

そこで、西の湖周辺の小河川において、降雨により濁りが発生する前後のタイミングで採水と水質測定を実施し、調査結果がどのように変化するかを予備的に検証しました（図-参 5- 13）。

その結果、降雨の影響によって、濁度が平常時よりやや上昇している時に採水を行うと、採水した調査地点に生息する種に加えて、そこには生息しないと考えられる種も検出されることが分かりました。採水した調査地点周辺には生息しない種には、採水地点よりもかなり上流側の河川・流入水路に生息する種（アジメドジョウ、ニシシマドジョウ）や琵琶湖の本湖にのみ生息する種（イサザ、ソウギョ）が含まれていました。琵琶湖の本湖にのみ生息する種が検出されたことと濁りとの直接的な因果関係は不明ですが、採水を行った調査地点周辺では、琵琶湖の湖水を汲み上げてパイプラインで上流側に運び、水田等に引き込む「逆水灌漑」と呼ばれる農業用水システムが採用されており、その逆水灌漑の用水に含まれていた環境 DNA を検出した可能性があると考えられました。以上のことから、濁りの影響による検出種の変化を避けるためには、濁度や水位が平常時の状態に戻るまで、採水を避けた方がよいでしょう。

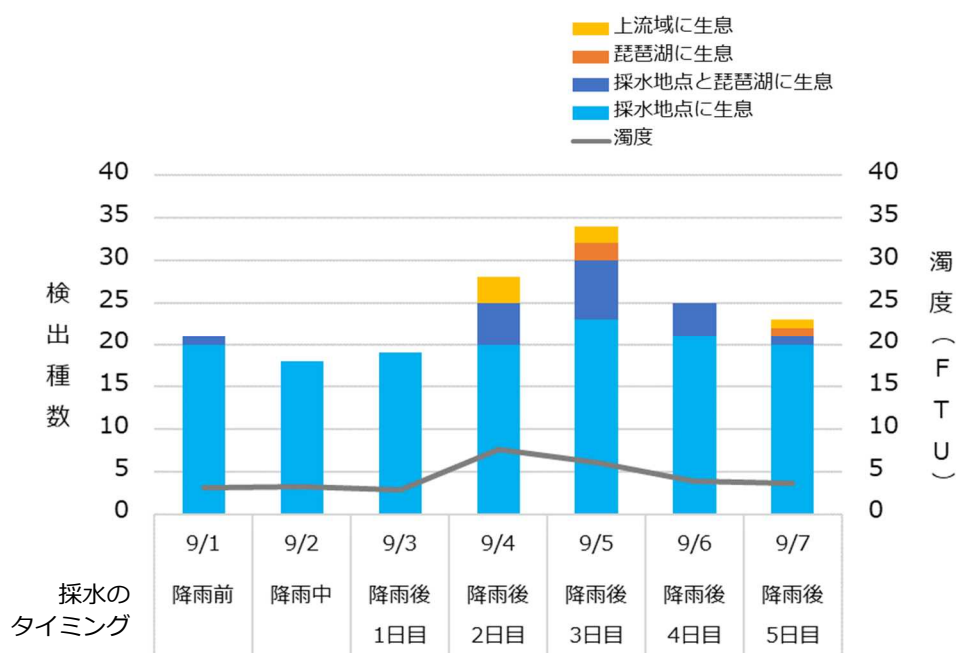


図-参 5- 13 降雨による濁りの発生状況とカテゴリ別の検出種数

また、環境 DNA 分析時にサンプルをろ過するフィルターは、非常に孔径が小さく、一般的に汎用されるグラスファイバー製フィルターでは $0.7\mu\text{m}$ 、カートリッジ式フィルターでは $0.45\mu\text{m}$ もしくは $0.22\mu\text{m}$ 程度です。そのため、濁りの強いサンプルでは、ろ過作業中に微粒子がフィルターを目詰まりさせ、結果的にろ過できるサンプルの量が減少したり、全量をろ過するために多くのフィルターが必要となってしまいます。さらに、降雨により濁りや増水が発生する状況では、調査時の安全確保の面からも、なるべく採水を避けた方がよいでしょう。

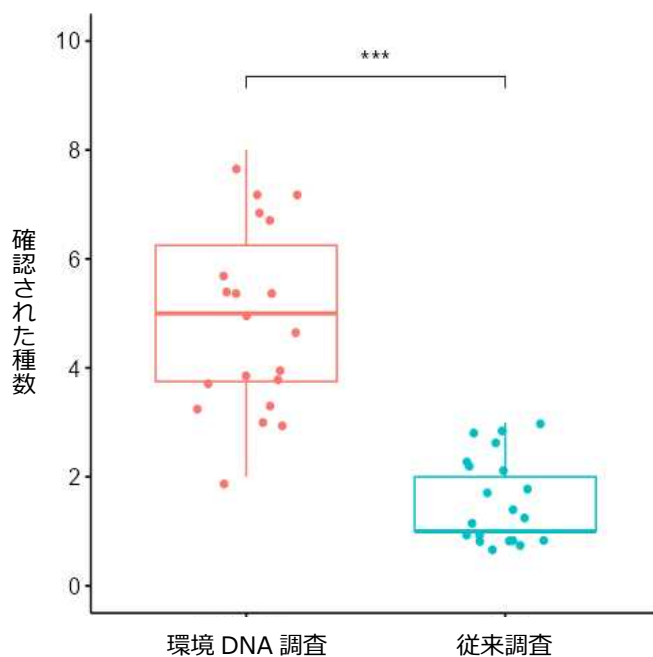
なお、ここで言う「濁り」とは、平常時と比べて明らかに濁りの度合いが増している場合を指しており、一部の沼やため池などのように、平常時においても環境水が濁っている場合は、平常時と判断される状態であれば、採水を行うことに問題はありません。

(12) 従来調査との比較事例

二次的自然環境において魚類調査を計画する際、これまでは漁具を用いた捕獲調査（従来調査）が主に採用されてきました。従来調査では、捕獲した個体からのみ得られる情報（形態的特徴、体長、体重、雌雄、性成熟、栄養状態等）を知ることができるという特徴がありますが、調査員の技術や経験の度合いにより得られる結果の差が大きいこと、1地点当たりに必要な人的コスト及び時間的コストが高くなりやすいといった側面があります。

令和4年度に小規模ため池群において実施した重点調査では、ため池8箇所において、ため池の大きさに合わせて1箇所あたり2～4地点の調査地点（計20地点）を設定し、環境DNA調査と従来調査をそれぞれ実施しました。

その結果、それぞれの調査地点において、魚類を対象とした環境DNA調査と従来調査（漁具を使った捕獲調査）を行い、確認された種数を比較した結果、従来調査よりも環境DNA調査の方が有意に多いという結果が得られました。このように、確認される種数が従来調査よりも環境DNA調査で多いという傾向は、今回のため池群に限らず、小河川や河跡湖といった別のタイプの二次的自然環境でも報告されています^{16, 17)}。

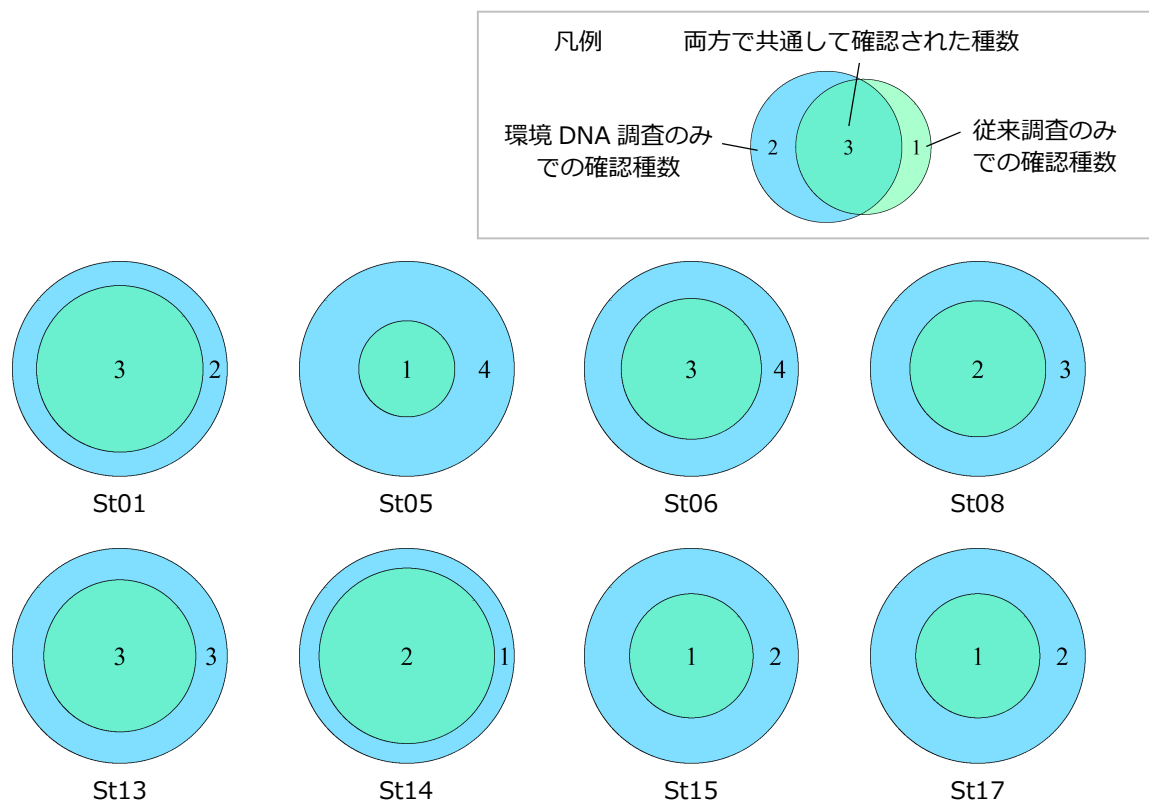


注 1) 図中の「***」印は p 値が 0.001 未満で有意差があることを示します。

注 2) 環境 DNA 調査では、1 地点当たり 4 回反復で採水したうち、任意の反復 1 回分から検出された種数のみを採用しました（反復なしの調査を実施した時と同じ条件としました）。

図-参 5- 14 環境 DNA 調査及び従来調査により確認された種数の比較

また、いずれのため池でも、従来調査で確認された種はすべて環境 DNA 調査で確認されており、さらに従来調査では見逃されてしまった種を環境 DNA 調査で検出できていた可能性も示唆されました（図-参 5- 15）。



- 注 1) 環境 DNA 調査では、1 地点当たり 4 回反復で採水したうち、任意の反復 1 回分から検出された種数のみを採用しました（反復なしの調査を実施した時と同じ条件としました）。
- 注 2) ドジョウの 2 つの系統（在来系統・大陸系統）は、従来調査では識別が困難であるため、環境 DNA 調査の検出種数としては 1 種としてまとめて数えました。

図-参 5- 15 環境 DNA 調査と従来調査による確認された種数の比較（小規模ため池群）

今回重点調査を実施した一部のため池では、水深が調査員の腰の高さ以上あり、かつ、底質が非常に柔らかいために人が立ち入ることの難しい場所がありました。よって、作業の安全上、従来調査で使える漁具が岸から仕掛けられるタイプのもの（例えば、カゴ網やセルビン等）に限定されました。そのため、カゴ網やセルビンでは捕獲しにくい魚種を従来調査では確認することが難しくなり、結果的にそこに生息していた一部の種を見逃してしまった可能性が考えられました。このことから、ため池を対象とした調査では、従来調査の代替法として環境 DNA 調査が有効であり、調査を実施するため池の状況によっては、従来調査では見逃されてしまう可能性のある種を環境 DNA 調査によって効果的に確認できると考えられます。

令和 4 年度の重点調査では、平均水面幅 5.2m、平均流速 0.7m/秒の山間部の水田地帯（重要里地里山に選定された地区）を流れる小河川に計 5 地点を設定し、環境 DNA 調査と従来手法による調査をそれぞれ実施しました。その結果、5 地点中 2 地点（St03、St05）では、従来調査で確認された種の一部が環境 DNA 調査では確認されないケースが生じました（図-参 5- 16）。環境 DNA 調査で未検出となった種は、それぞれ従来調査でも 1 個体のみ捕獲された種であったことから、小河川においては、生息密度が低い種の場合、環境 DNA 調査では見逃してしまう可能性があると言えます。なお、St03 及び St05 で環境 DNA が未検出となった種は、4 回反復のうちの 1 回分からは検出されませんでした。残りの 3 回分からはいずれも検出されており、小河川では反復採水を行うことにより、

偽陰性のリスクを減らせることが分かりました。

なお、予算などの都合上、多くの調査地点の設定や、反復を取ることが難しい場合は、例えば小河川であれば、瀬や淵のような河床型のほか、河床材料や水際植生等の違い等を考慮し、異なるハビタットをできるだけ網羅するように調査地点を選ぶといった工夫をするとよいでしょう。

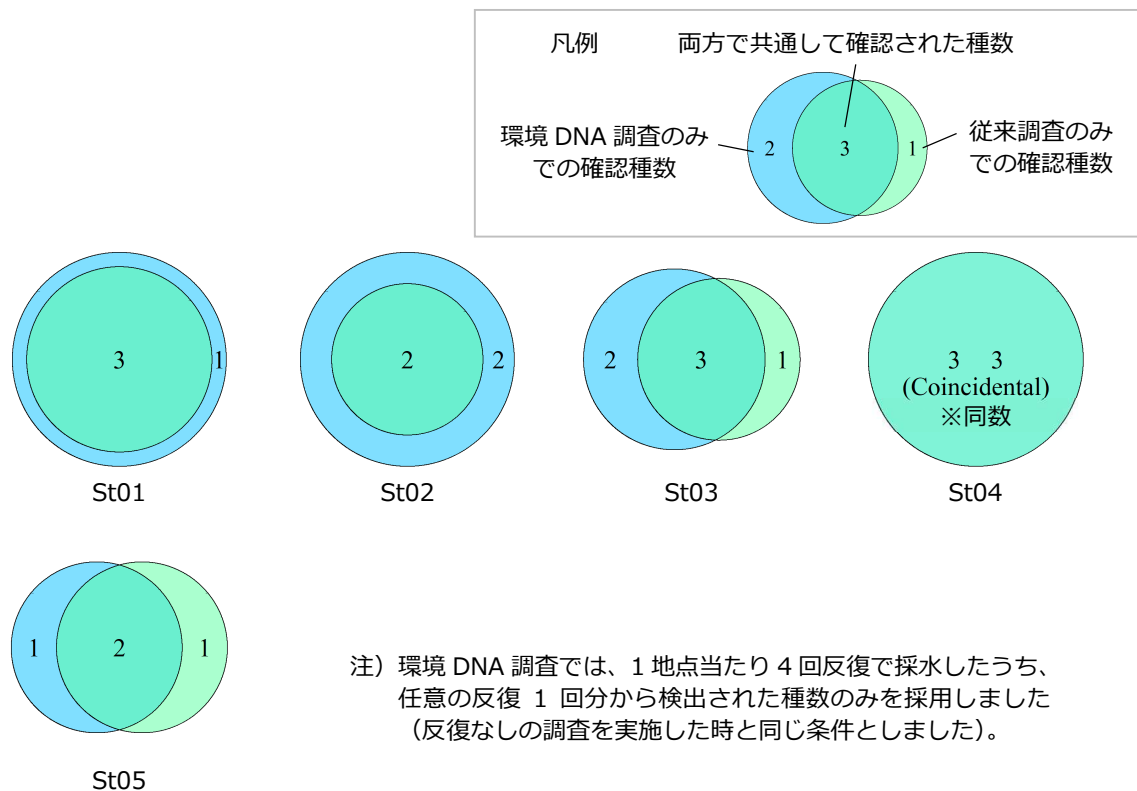


図-参 5- 16 環境 DNA 調査と従来調査による確認された種数の比較 (小河川)

(1) 分析手法の解説（網羅的解析法）

網羅的解析法とは、超並列シーケンサー（次世代シーケンサーとも呼ばれます）を用いて、採水サンプルの中に含まれる環境 DNA の配列を読み取り、その配列情報をデータベースと照合することで、種を同定する分析技術です。

図-参 6- 1 に示すように、分析機関に運ばれた採水サンプルは、濾過と DNA 抽出が行われた後、さらにいくつかの前処理操作を経て、超並列シーケンサーにかけられます。超並列シーケンサーは、サンプルに含まれていた大量の DNA 配列を読み取ります。その読み取られた配列は、国際塩基配列データベースに登録されている膨大な数の魚の DNA 配列情報と照合し、完全に一致するか、もしくは非常に一致率が高い（すなわち、非常によく似通っている）登録配列を、専用のコンピュータソフトウェアを使って探し出します。非常に一致率が高い配列が見つければ、その登録配列に紐づけられている種名（学名）が、サンプルから得た配列と同種である可能性が非常に高いと判断し、種を同定します。

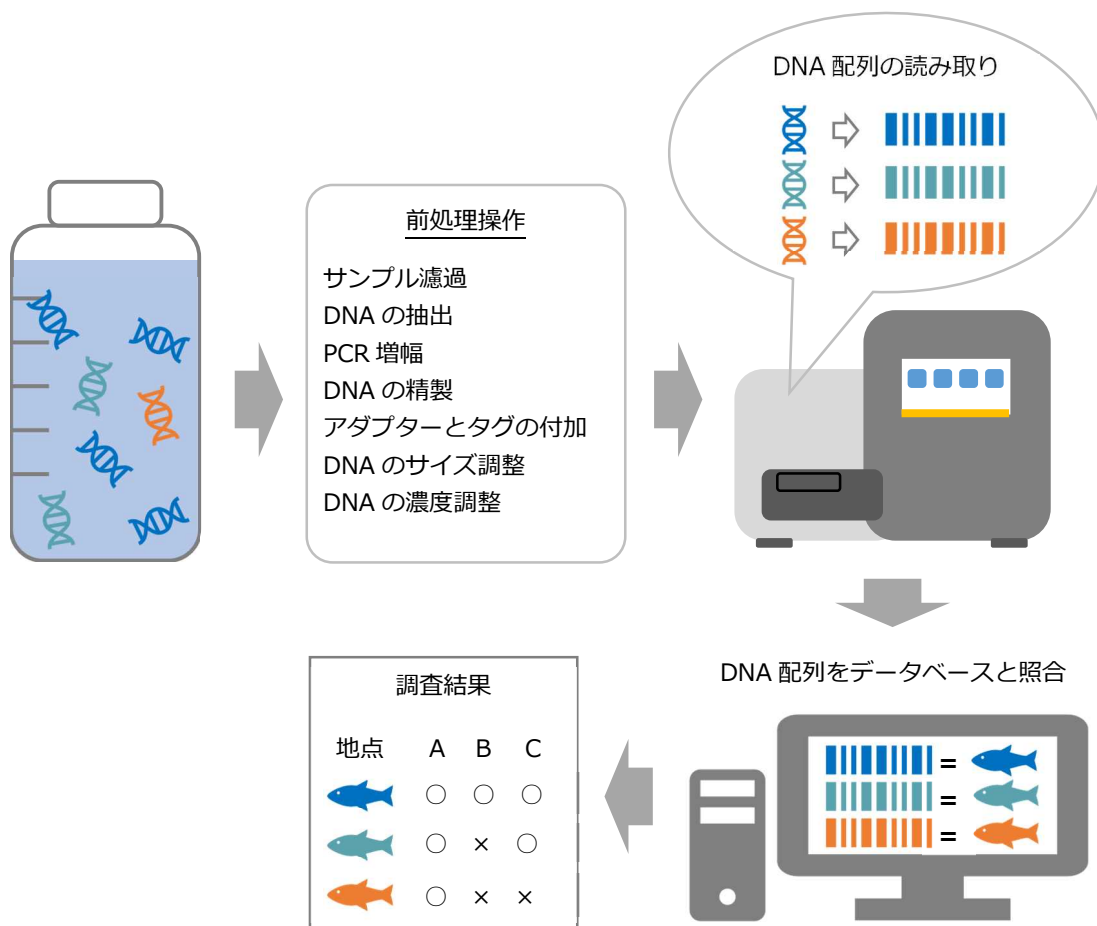


図-参 6- 1 網羅的解析法の概要

網羅的解析法では、前処理操作の「PCR 増幅」の段階で使用する「ユニバーサルプライマー」と呼ばれる試薬の種類を変えることで、検出する分類群を任意に変えることができます。本手引きでは、淡水魚類が検出対象の分類群であるため、魚類の DNA に反応する網羅的解析法である MiFish 法のユニバーサルプライマーを取り扱っていますが、表-参 6- 1 に示す通り、魚類以外の分類群を検出できる解析法が開発されています。

表-参 6- 1 網羅的解析法により検出できる分類群とその文献

検出できる 分類群	分析方法が記された文献
魚類	Miya M. <i>et al.</i> (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. <i>Royal Society Open Science</i> 2(7): 150088. (通称: MiFish 法) Miya M. <i>et al.</i> (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. <i>Fisheries Science</i> , 86: 939–970. (MiFish 解析用改変プライマーの情報)
哺乳類	Ushio M. <i>et al.</i> (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. <i>Molecular ecology resources</i> , 17(6): e63-e75. (通称: MiMammal 法)
鳥類	Ushio M. <i>et al.</i> (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. <i>Scientific Reports</i> , 8: 4493. (通称: MiBird 法)
十脚目甲殻類 (エビ・カニ類)	Komai T. <i>et al.</i> (2019) Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. <i>Metabarcoding and Metagenomics</i> , 3: 1-19. (通称: MiDeca 法)
両生類	Sakata K. M. <i>et al.</i> (2022) Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. <i>Metabarcoding and Metagenomics</i> , 6: 15-26.

魚類の網羅的解析法 (MiFish 法) で使用するユニバーサルプライマーは、一部の分類群において、プライマー配列に塩基の不一致 (ミスマッチ) が含まれていることがわかっています。プライマー配列にミスマッチが存在すると、PCR 増幅の際に鋳型 DNA (サンプル中の環境 DNA) とプライマーが結合できないため、DNA の増幅が起こりません。すなわち、プライマー配列とのミスマッチがある種は、その種の環境 DNA が PCR で増えないため、DNA が存在していても検出できないことになり、結果的に偽陰性を生じます。

Miya *et al.* (2020) では、ヤツメウナギ科の一部 (カワヤツメ属)、キュウリウオ科の一部 (ワカサギ属、アユ属)、カジカ科の一部 (アナハゼ属、サラサカジカ属、イダテンカジカ属、スズキ属) におけるミスマッチの部位が示されています。これらの魚種が生息する可能性のある調査で採水する場合には、ミスマッチ部位がそれぞれの魚種の配列と一致するように改変したプライマーを、最初の PCR 増幅の際に混合添加することで、プライマーに起因する偽陰性が生じることを防ぐ効果が期待されます。

これらの魚種以外にも、ミスマッチが確認されている分類群及びそのミスマッチ部位を図-参 6- 2 に整理しました。本手引きでは、改変プライマーを混合する組み合わせや混合比率等については示

さないため、各表に示した改変プライマーを使用する際は、分析を委託するときに分析機関等へ相談してください。

	Forward Primer	MiFish-U-F	G	T	C	G	G	T	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
No.	該当する主な分類群や種 (一部のみ抜粋)	プライマー名 (仮称)	塩基配列 (5' → 3')																				
1	ヤツメウナギ科	MiFish-L-F	G	C	T	G	G	T	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C	
2	コイ目,サケ目ほか	MiFish-01-F	G	C	C	G	G	T	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
3	エツ,ミズスルルほか	MiFish-02-F	G	T	C	G	G	T	T	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
4	イセゴイ	MiFish-03-F	A	C	T	G	G	T	A	A	A	T	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
5	ナマズ目,シナイモツゴほか	MiFish-04-F	G	C	C	G	G	T	A	A	A	A	T	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
6	ナマズ目	MiFish-05-F	G	T	C	G	G	T	A	A	A	A	T	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
7	キュウリウオ科,アユ,シラウオ	MiFish-06-F	G	C	C	G	G	T	T	A	A	T	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
8	キュウリウオ科,カマスベラ	MiFish-07-F	G	C	C	G	G	T	T	A	A	T	T	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
9	ボラ,シモフリシマハゼほか	MiFish-08-F	G	C	C	G	G	T	A	A	A	T	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
10	タウナギ,レピソステウス科ほか	MiFish-09-F	G	T	C	G	G	T	C	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
11	ボラ科,メダカ科ほか	MiFish-10-F	A	C	C	G	G	T	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
12	メダカ科,アンピンボラ,ヒナハゼ	MiFish-11-F	A	C	C	G	G	T	T	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
13	カダヤシ科,ハゼ科,アカメほか	MiFish-12-F	G	C	C	G	G	T	T	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
14	カダヤシ科	MiFish-13-F	G	C	C	G	G	T	C	A	A	A	T	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
15	メバル科,ハゼ科,ヘラヤガラほか	MiFish-14-F	G	C	C	G	G	T	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C	
16	カワアナゴ科	MiFish-15-F	G	C	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
17	ハゼ科	MiFish-16-F	G	C	C	G	G	T	G	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
18	ハゼ科,ニベ科,沖縄産タウナギほか	MiFish-17-F	G	C	C	G	G	T	C	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
19	ハゼ科,リボンスズメダイ	MiFish-18-F	G	C	C	G	G	T	C	A	A	C	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
20	ミナミウシノシタ	MiFish-19-F	C	C	G	G	T	A	A	A	A	C	C	T	T	G	T	G	C	C	A	G	C
21	セトウシノシタ	MiFish-20-F	C	T	G	G	T	C	A	A	A	T	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
22	シマウシノシタ	MiFish-21-F	T	C	G	G	T	A	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C
23	カワハギ	MiFish-22-F	G	C	C	G	G	T	A	A	A	A	C	C	G	T	G	C	C	A	G	C	C

	Reverse Primer	MiFish-U-R	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	A	T	C	T	A	A	T	C	C	C	A	G	T	T	T	G
No.	該当する主な分類群や種（一部のみ抜粋）	プライマー名（仮称）	塩基配列（5' → 3'）																										
1	ヤツメウナギ科	MiFish-L-R	C	A	T	A	G	C	G	G	G	G	T	A	T	C	T	A	A	T	C	C	C	G	G	T	T	T	G
2	アリゲーターガー	MiFish-02-R	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	A	T	T	T	A	A	C	C	C	C	A	G	T	T	T	G
3	アナゴ科	MiFish-03-R	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	A	T	C	A	A	A	T	C	C	C	A	G	T	T	T	G
4	タウナギ, 沖縄産タウナギ	MiFish-04-R	C	A	T	A	G	T	G	A	G	G	T	A	T	C	T	A	A	T	C	T	C	A	G	T	T	T	G
5	ボラ科, ハタ科, イサキ科ほか	MiFish-05-R	C	A	T	A	A	T	G	G	G	G	T	A	T	C	T	A	A	T	C	C	C	A	G	T	T	T	G
6	アカササノハベラ	MiFish-06-R	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	A	T	C	T	A	A	T	T	C	C	A	G	T	T	T	G
7	ロングノーズガー, ミナミイソハゼほか	MiFish-07-R	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	A	C	C	T	A	A	T	C	C	C	A	G	T	T	T	G
8	カウスズメ科, ミナミウシノシタほか	MiFish-08-R	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	C	T	C	T	A	A	T	C	C	C	A	G	T	T	T	G

※本表は、国際塩基配列データベースに登録されている配列情報を基に、学名レベルで情報を集約整理したものであり、ミスマッチを改変したプライマーの効果については検証していません。

図-参 6- 2 網羅的解析法 (MiFish 法) のユニバーサルプライマーにミスマッチが確認された魚種

(2) 分析手法の解説（種特異的検出法）

種特異的検出法とは、リアルタイム PCR 装置と種特異的に反応するように設計された PCR プライマー及び蛍光プローブを用いて、採水サンプルの中に含まれる特定の種の環境 DNA の有無や濃度（正確には DNA 配列のコピー数）を測定する分析技術です。

図-参 6- 3 に示すように、分析機関に運ばれた採水サンプルは、濾過と DNA 抽出が行われます。抽出した DNA は、分析用試薬と混合調整され、リアルタイム PCR 装置にかけられます。リアルタイム PCR では、種特異的なプライマーと蛍光プローブが、サンプルに含まれていた検出対象種の DNA にのみ反応し、PCR 増幅が起こることで、増幅曲線として可視化されます。増幅曲線は、サンプル中の検出対象種の DNA が多いほど早く立ち上がり、指数関数的な増幅期を経て、最終的にプラトーに達します。最後に、濃度既知の標準 DNA サンプルの増幅曲線を使って書いた検量線から、サンプル中の環境 DNA の有無の判断や濃度への換算をします。

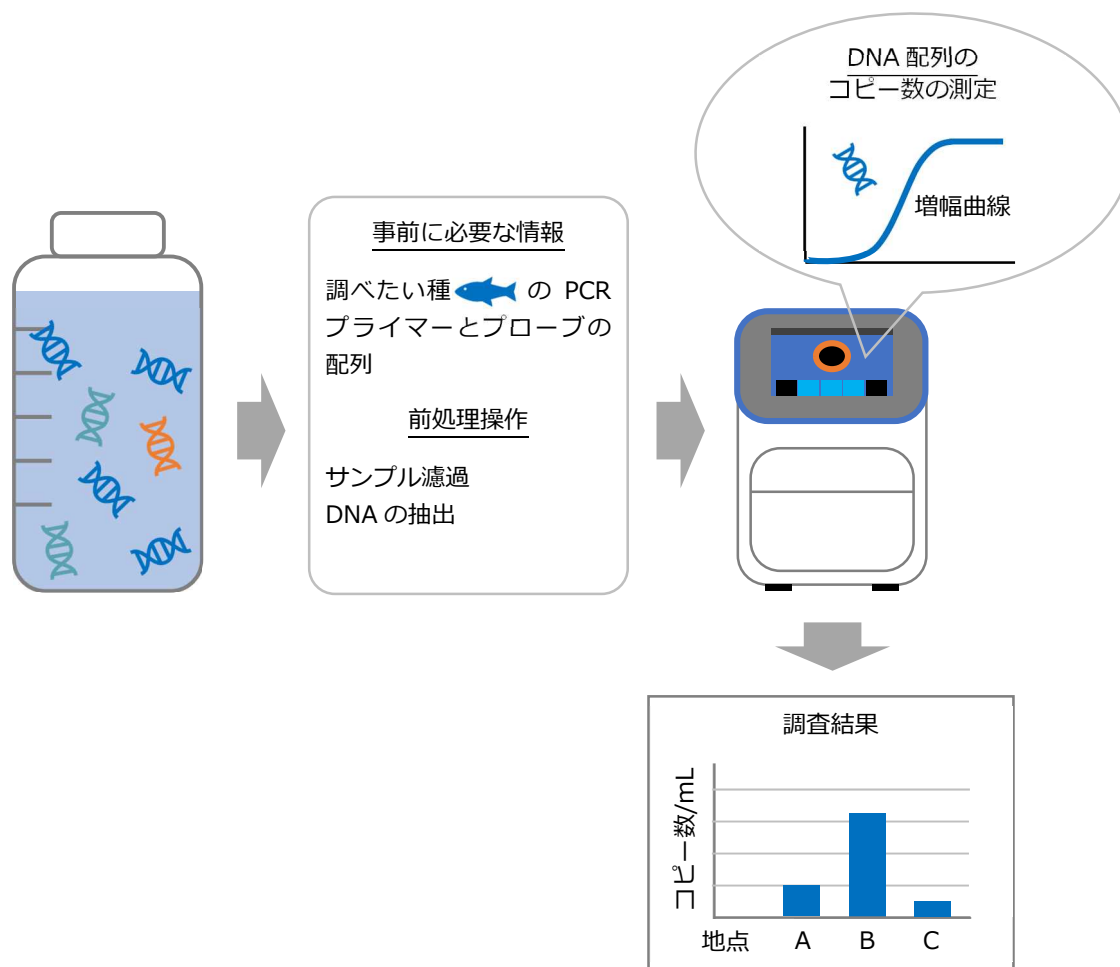


図-参 6- 3 種特異的検出法の概要

採水サンプルから抽出した DNA 溶液には、魚類の DNA だけでなく、その水に含まれていたすべての生物（植物、動物、細菌など）の DNA が混ざり合っています。種特異的検出法では、その複数種の DNA が混ざり合ったサンプルから、調べたい種の DNA にだけ特異的に反応するように設計された PCR プライマー及び蛍光プローブを用いることで、特定の種の環境 DNA の有無や濃度を調べるものです。そのため、同じ抽出 DNA サンプルに対して、使用する PCR プライマー及び蛍光プローブを変えるこ

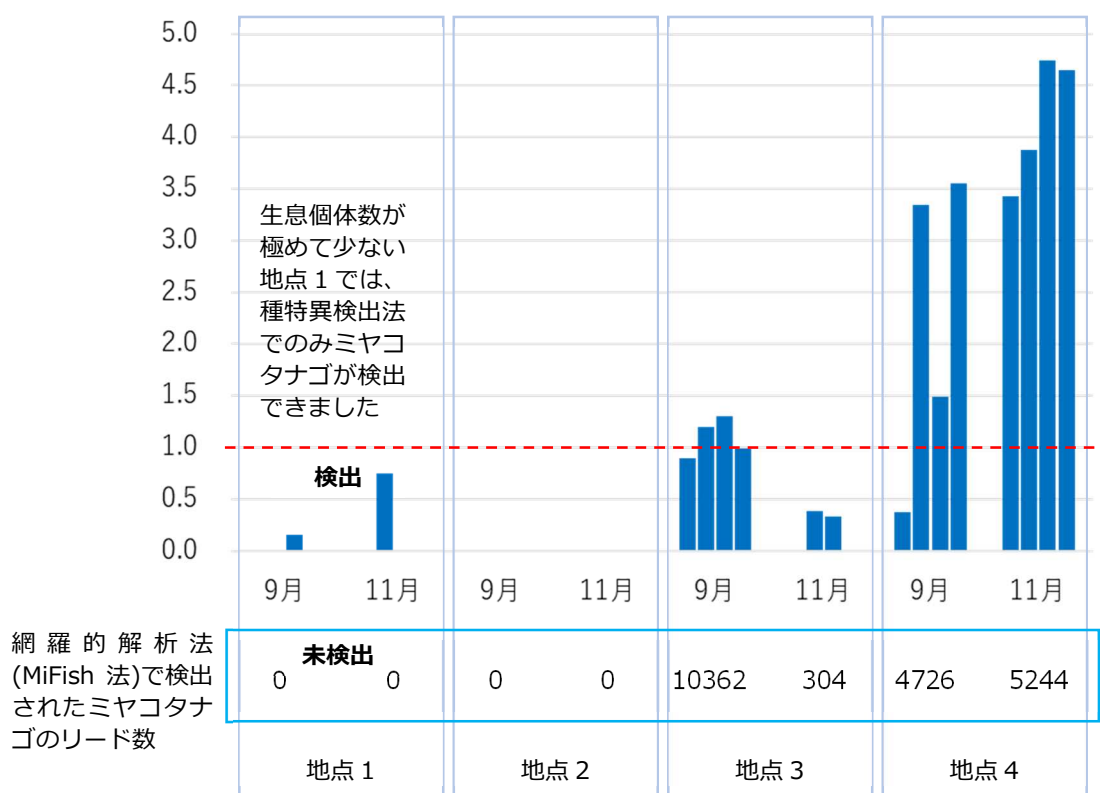
とで、検出する種を任意に変えることができます。種特異的検出法のための PCR プライマーがすでに設計されている種の一覧は、参考資料 1 で確認してください。

網羅的解析法（MiFish 法）は、分析原理の特性上、サンプル中の存在比率が非常に低い種の DNA を検出できないことがあり、結果的に偽陰性が生じます。しかし、種特異的検出法は、サンプル中の種別の DNA 存在比率の影響を基本的には受けないため、網羅的解析法（MiFish 法）と比べて偽陰性が生じにくい可能性が考えられました。

そこで、種特異的検出法と網羅的解析法（MiFish 法）の検出感度の違いを検証するため、絶滅危惧種のミヤコタナゴが生息する調査地において、同一の採水サンプルを 2 つの方法で分析し、その結果を比較しました。サンプルは、9 月と 11 月に 4 地点から 1 検体ずつ採水し、そこから抽出した環境 DNA 溶液を網羅的解析法（MiFish 法）（1st PCR は 8 反復）とミヤコタナゴ種特異的検出法（PCR は 4 反復）でそれぞれ分析しました。

その結果、過去に生息していて近年は確認できていない地点 2 では、どちらの手法でも検出されず、地点生息個体数が比較的安定している地点 3 や 4 では、どちらの手法でも検出できました。しかし、生息が確認できていないものの、その個体数が極めて少ない地点 1 においては、種特異的検出法では、定量下限以下のごく微量な濃度ですがミヤコタナゴが検出されたのに対し、網羅的解析法（MiFish 法）では検出されませんでした（図-参 6- 4）。このように、定量性までは求められない場合があるものの、在/不在情報を得る方法としては、種特異的解析法の方が網羅的解析法（MiFish 法）よりも検出感度が高い傾向があり、偽陰性が生じにくい手法であると考えられます。

種特異的検出法で検出された
環境 DNA 濃度 (copies/2μl)



※ 図中の赤い点線は、種特異的検出法の定量下限（1.0 copy/2μl）を示します。

図-参 6- 4 種特異的検出法と網羅的解析法（MiFish 法）の検出感度の比較（ミヤコタナゴの事例）

(3) データ解析

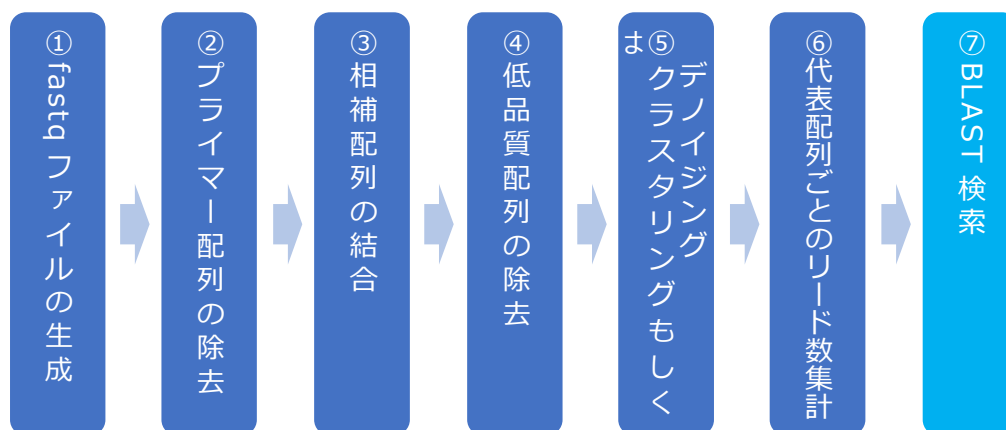
網羅的解析法（MiFish 法）では、超並列シーケンサーから取得した環境 DNA の配列情報データから分析結果（一致率が高い生物種リスト）を得るまでの間に、不要な配列を取り除いたり、読み取り時のエラーを補正するなどのデータ処理が必要になります。データ処理の工程は、いくつかのソフトウェアを組み合わせて、流れ作業のように実行されるため、「パイプライン」とも呼ばれます。

網羅的解析法に使用されるパイプラインには、複数の種類があり、それぞれ操作性やアルゴリズムの違いなどにより一長一短があります。また、パイプラインに組み込まれるソフトウェアも、頻繁に新しいものが開発され続けているため、どのソフトウェアを組み合わせてパイプラインを構築するかは、分析者によって任意に選択されています。したがって、本手引きでは、現状においてどれか一つのパイプラインに統一することは難しいと考え、表-参 6- 2 にその代表的なソフトウェアを紹介するととどめます。解析パイプラインや解析条件等に関する情報は、必要に応じて、分析を委託した機関から入手してください。

表-参 6- 2 網羅的解析法に使用される代表的なソフトウェア

ソフトウェア名	ソフトウェアが紹介されている文献やサイト
BLAST+ (blastn)	Camacho C. et al. (2009) BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics, 10: 421. (ソフトウェアの入手先) https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/ (マニュアルの入手先) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279690/
Claident	Tanabe A.S. and Toju H. (2013) Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A Benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants. PLOS ONE, 8(10): e76910. (ソフトウェアの入手先) https://github.com/astanabe/Claident (マニュアルの入手先) https://www.fifthdimension.jp/products/claident/
DADA2	Callahan B. et al. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods 13: 581–583. (ソフトウェアの入手先) https://github.com/benjjneb/dada2
MiFish Pipeline	Sato Y. et al. (2018) MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1553–1555. (WEB 上で解析できるサイト) http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/
QIIME2	Bolyen E. et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37: 852–857. (ソフトウェアの入手先) https://github.com/qiime2
USEARCH	Edgar R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 26(19): 2460–2461. (ソフトウェアの入手先) http://drive5.com/usearch/
PMiFish ver. 2.4	Miya M. et al. (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. Fisheries Science 86: 939–970. (ソフトウェアの入手先) https://github.com/rogoth/PMiFish.git

解析パイプラインの基本的な流れを、以下に示します。超並列シーケンサーから出力されたデータは、実際にはサンプルから読み取られた塩基の信号データ（蛍光強度等）であるため、人が認識しやすいように塩基を表す記号「A, C, G, T, N」に変換します。その変換の際には、それぞれの塩基の読み取りクオリティを示す値も付与され、さらに分析の前処理操作の段階でサンプルに付けられたタグを参照して、サンプルごとに配列がまとめられます。この操作により生成されるファイルが、fastq ファイルと呼ばれる生データのファイルです。



その後は、クラスタリングもしくはデノイジングと呼ばれる補正処理を行うことによって、読み取られた膨大な数の配列を集約し、代表配列としてまとめます。代表配列は、サンプルごとにその数がカウントされ、「リード数」として集計されます。

最後に、サンプルから検出された個々の代表配列（検出配列）が、国際塩基配列データベースに登録されている配列のうち、どの配列とよく似ているかをソフトウェア上で検索し（この操作を BLAST 検索と呼びます）、最も一致するもの、すなわち検索の最上位に来た登録配列に付与されている学名を、検出配列に付与すべき学名として暫定的に採用することで種同定を行います。この時に登録配列（参照配列）と検出配列の一致率が高いほど、種同定の精度が高いものと判定します。

種同定の結果を採用するか判断については、代表配列ごとの一致率を基準に行うこととなりますが、専門家の意見や試行調査の結果等を踏まえた上で、環境省が実施した調査では、その基準として「98.5%以上」という値を用いました。一致率が 98.5%以上で一致する配列は、塩基の違いに換算すると、網羅的解析法（MiFish 法）では 2 塩基対（2bp）程度の差異に該当します。より厳しく（より間違いがないように）種同定を行いたい場合は、さらに一致率の採用基準を 99%やそれ以上とし、基準値以下で一致した代表配列の同定結果は不採用とするか、参考データに留めておくという方法もあります。また逆に、98.5%以下（例えば 97%）に緩めた基準を採用することで、参照配列が登録されていない種などを検出できる可能性が高まる場合があります。いずれの場合であつても、種同定結果の採用/不採用を判断した一致率の基準は、必要に応じて、分析を委託した機関から入手してください。加えて、参照配列と検出配列を両方用いて「科レベル」の分子系統樹を作成し、視覚化して確認することで、同定結果の正確性がさらに増します。

サンプルごとにカウントされた代表配列の数を表すリード数については、環境省が実施した調査では、検出された代表配列の採用判断の基準として、「3 リード以下」で検出されたものはノイズの可能性が高いと判断し、一律にカットする（不採用とする）処理を行いました。代表配列の採用判断の基準に関する情報等は、必要に応じて、分析を委託した機関から入手してください。

以上のように、データ解析では、設定するソフトウェアのパラメータが多く、工程も複雑で自由度が高いのが現状ですが、サンプルから得られた生データは、異なるパイプラインで処理された場

合でも、環境省が行った調査では基本的には得られる分析結果に大きな違いはありませんでした。しかし、サンプルによっては、エラー配列を正解配列として読み取ることによる偽陽性や、正解配列をエラー配列として除去することによる偽陰性が生じることがあります。特に、塩基配列が非常によく似ている近縁の種（もしくは亜種）が2種以上含まれているサンプルでは、前述のようなデータ解析に由来する偽陽性もしくは偽陰性が生じることがあります。そのため、得られた分析結果から、特定の種（もしくは亜種）が抜け落ちている状況などが疑われる場合には、別のパイプラインを使って再解析を行い、データを比較検討することで、偽陰性を確認できる可能性があります。

(4) 誤同定が生じる要因（精査の必要性について）

一致率が高い生物種リストには、BLAST 検索によって代表配列に付与された種名（学名、和名、もしくはその両方）が、種同定結果として記載されています。しかし、BLAST 検索の最上位に来た登録配列に付与されている学名をそのまま採用した場合、その種同定結果は、以下に示す主に 3 つの要因により、間違ったものになってしまうことがあります。この種同定の誤りの有無を確認し、正しい学名に修正する操作のことを、本手引きでは「精査」と呼びます。

環境 DNA 分析を外部機関に委託した場合は、入手した一致率が高い生物種リストに記載された種名が、この精査を行ったものであるか否かを確認するとともに、精査が行われていない場合は、7 章を参考にして精査を実施するよう推奨します。

① データベースの登録情報が間違っている

国際塩基配列データベースには、誰でも塩基配列情報を登録することが可能です。また、登録の際は、登録上のルールに則ってさえいけば、速やかに登録が受理され、登録内容の間違いの有無については、データベースの管理者側は特に確認しません。そのため、ごく一部ではありますが、登録者のミスにより、データベースの登録内容が間違っていることがあります。特に、実際に登録された配列の由来となった生物の学名と登録情報に付与されている学名が一致していない場合、BLAST 検索によって代表配列に付与された種名は、間違った種名となってしまいます（図-参 6- 5）。

このタイプの誤同定は、検出された種が調査地に生息する可能性が極めて低い場合は、気付ける可能性があります、一致率が高い生物種リストをみただけでは判断ができません。

検索最上位		Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	一致率 Per. Ident	Accession
☒		Pseudorasbora parva mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	KJ1135626.1
☒		Cyprinus carpio mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	KF856965.1
☒		Cyprinus carpio 'wananensis' mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	KF856964.1
☒		Cyprinus carpio color mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JX188253.1
☒		Cyprinus carpio wuyuanensis mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105357.1
☒		Cyprinus carpio wuyuanensis x Carassius auratus mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105356.1
☒		Cyprinus carpio haematopterus mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105354.1
☒		Cyprinus carpio xingguonensis mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105353.1
☒		Cyprinus carpio carpio mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105352.1
☒		Cyprinus carpio var. baisenensis mitochondrion complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	MT780875.1
☒		Cyprinus carpio complete mitochondrial genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	X61010.1
☒		Carassius sp. 'Ginbuna' CBM ZF-19573 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552369.1
☒		Carassius sp. 'Ginbuna' CBM ZF-19573 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552368.1
☒		Carassius sp. 'Ginbuna' CBM ZF-19573 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552367.1
☒		Carassius sp. 'Ginbuna' CBM ZF-19573 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552366.1
☒		Carassius sp. 'Ginbuna' CBM ZF-19573 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552365.1

この例の場合、正解は「コイ」であるが、間違っ「モツゴ」の学名が付けられている配列と 100%一致し、それが検索最上位に来ているため、精査を行わないと「モツゴ」として誤同定されることになります。

図-参 6- 5 BLAST 検索で誤同定が生じた例①

② 網羅的解析法（MiFish 法）で用いる配列情報では、種レベルの識別が難しい分類群がある

魚類の網羅的解析法（MiFish 法）では、サンプルに含まれる環境 DNA のうち、ミトコンドリア DNA 中の 12S リボソーム RNA 遺伝子領域（ここでは 12SrRNA と略記します）の一部分の配列情報から、種同定を行っています。魚類の 12SrRNA は、全長は 1000bp 程度の塩基の長さがありますが、網羅的解析法（MiFish 法）では、12SrRNA の前半部 160-180bp 程度の長さの配列情報（ここでは MiFish 領域と呼びます）を用いています。この MiFish 領域の塩基の違いが、ちょうど種の違いを反映するかのような関係性をもつために、配列情報から種を推定することが可能となっています。

しかし、分子系統学的に近縁な関係にある種間では、MiFish 領域において塩基の違いがない場合があります。結果的に種レベルの識別ができません（図-参 6- 6）。そのため、網羅的解析法（MiFish 法）では、すべての魚種の違いを識別できるわけではありません。網羅的解析法（MiFish 法）において識別に必要な分類群が検出された場合は、参考資料 1 及び 10 を参考にして精査を行い、種同定結果を修正する必要があります。

一致率

検索最上位	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Rhinogobius fluvialis CBM.ZF.18425 mitochondrial gene for 12S rRNA	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC385178.1
✓	Rhinogobius sp. CBM.ZF.18431 CBM.ZF.18431 mitochondrial gene	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC385135.1
✓	Rhinogobius sp. KZ mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278232.1
✓	Rhinogobius sp. BF mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278226.1
✓	Rhinogobius fluvialis mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278211.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193445.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193444.1
✓	Rhinogobius sp. CO mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193346.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193300.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193280.1
✓	Rhinogobius sp. OM mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193279.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193165.1
✓	Rhinogobius sp. CBM.ZF.15797 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC092051.1
✓	Rhinogobius brunneus mitochondrion, complete genome	306	306	100%	3e-79	100.00%	KT601096.1
✓	Rhinogobius brunneus note CO type 12S ribosomal RNA gene, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	KM030473.1
✓	Rhinogobius brunneus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	KM030471.1
✓	Rhinogobius sp. KZ mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.17575	301	301	100%	1e-77	99.41%	LC278231.1
✓	Rhinogobius brunneus mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher KAI181164774	301	301	100%	1e-77	99.41%	LC040760.1

この例の場合、代表配列との一致率が 100%となる種が複数該当しており、近縁種間で塩基配列の違いがないために、網羅的解析法（MiFish 法）では種レベルの識別ができないと推定されます。したがって、種同定結果としては「ヨシノボリ属」と表記するべきですが、精査を行わないと、検索最上位に来た「オオヨシノボリ」として誤同定されることとなります。

図-参 6- 6 BLAST 検索で誤同定が生じた例②

③ 雑種個体が生息している可能性がある

脊椎動物の DNA には、核 DNA とミトコンドリア DNA の 2 種類があり、網羅的解析法（MiFish 法）では、このうちミトコンドリア DNA を分析対象としています。一般的に、脊椎動物の核 DNA は、父親（精子）由来の DNA と母親（卵子）由来の DNA の両方が子供に受け継がれるので、「両性遺伝」と呼ばれます。しかし、脊椎動物のミトコンドリア DNA は、「母系遺伝」と言って、母親（卵子）由来のミトコンドリア DNA だけがその子供に受け継がれます。そのため、異なる 2 種が交配して生まれた雑種個体は、その 2 種のうち、母親となった種のミトコンドリア DNA だけを持つことになります。

そのため、図-参 6- 7 に示すように、種 A と種 B から生まれた雑種個体が生息している調査地で採水し、そのサンプルを環境 DNA 分析した場合、もし純系の種 B が調査地に生息していなくても、種 B の環境 DNA が検出されてしまう可能性があります。

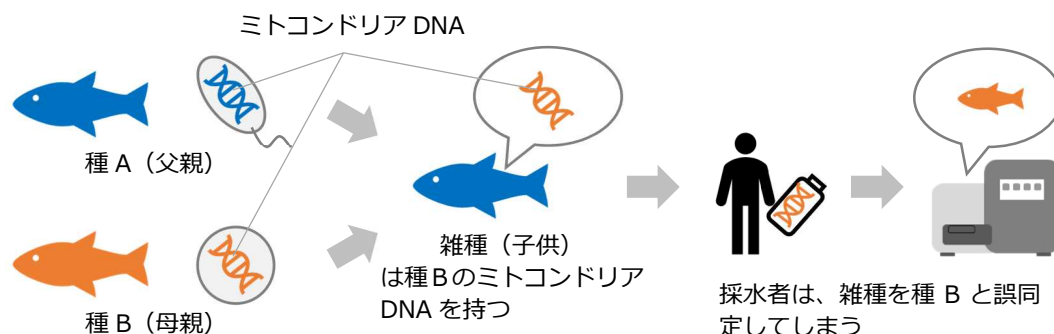


図-参 6- 7 雑種個体が生息している調査地で採水を行ったときに生じる可能性のある誤同定の例

このタイプの誤同定は、前述の①のタイプと同様に、検出された種が調査地に生息する可能性が極めて低い場合は、気付くことができるかもしれませんが、一致率が高い生物種リストを見ただけでは判断できません。

環境省が行ったこれまでの環境 DNA 調査では、タイリクバラタナゴの生息が確認される地点において、絶滅危惧種であるニッポンバラタナゴのミトコンドリア DNA を持ったタイリクバラタナゴとの雑種個体由来と推定される「ニッポンバラタナゴの環境 DNA」が、本種の本来の生息地ではない場所から高頻度に検出されています。一方で、過去にニッポンバラタナゴが生息していたものの現在は絶滅している可能性が高いと考えられているような場所では、わずかに残っていたニッポンバラタナゴを検出できている可能性もあり、ニッポンバラタナゴが検出されたからと言って単純に「雑種由来の検出である」と判断することは危険と考えられます。

したがって、環境 DNA 調査の分析結果（一致率が高い生物種リスト）を見る際は、既存の知見（分類、生態、分布、国内外来種としての状況、雑種形成に関する事例など）や専門家の意見等を基に、検出された種ごとにその妥当性を判断する精査を必ず行うことが重要です。

(1) 絶滅危惧種ゼニタナゴの調査事例

[出典] Sakata M.K. *et al.* (2017) Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *The Science of Nature* 104, 100.

(Abstract 和訳) 近年、淡水域の生物多様性は著しく脅かされており、絶滅危惧種を保全するためには、その分布や繁殖地を明らかにしておく必要があります。しかし、広大な調査エリアの中から繁殖地を特定することは、一般的に困難なことです。そこで、環境 DNA 分析と従来の採集調査を組み合わせることで、絶滅が危惧される淡水魚類ゼニタナゴの生息地である秋田県の雄物川本流において、本種の繁殖地を特定することに成功しました。

ゼニタナゴ及びその近縁種のコナギタナゴのミトコンドリア DNA のチトクローム b 配列を基に、リアルタイム PCR によりゼニタナゴの環境 DNA を検出するために用いる種特異的プライマーとプローブを開発しました。本種が人為的に導入された生息地の水を使って、このプライマーとプローブの特異性と適用性を確認した後、雄物川沿いの 99 地点で採水したサンプルを用いて環境 DNA 分析を行いました。そのうち 2 つのサンプルでゼニタナゴの環境 DNA が検出されたため、小型定置網とボトル型トラップを用いた成魚の捕獲と、本種の産卵基質である二枚貝への産卵の確認を試みました。

その結果、環境 DNA が検出された地点の一つにおいて、雌雄の成魚と本種の卵が入った二枚貝が採取されました。これは、雄物川におけるゼニタナゴ成魚の 11 年ぶりの記録となります。本研究は、従来のモニタリング調査に対する指針となる環境 DNA 分析の実用性を証明するものであり、両方の方法を組み合わせることで、種の保全に不可欠な繁殖地に関する重要な情報を提供できることを示しています。

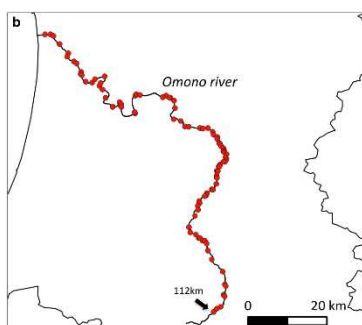


図 環境 DNA 調査が行われた雄物川沿いの 99 地点

※論文 Fig. 1b より転載

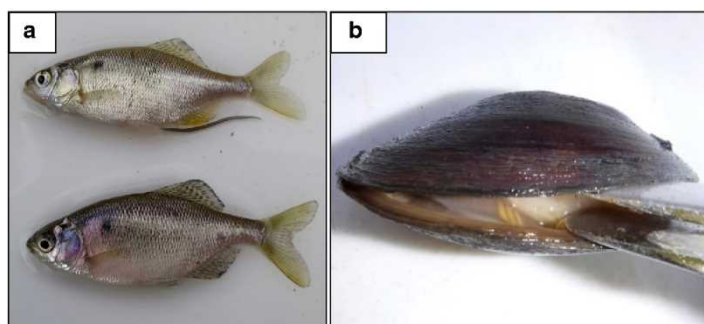


図 環境 DNA が検出された地点で捕獲されたゼニタナゴの成魚と産卵された二枚貝

※論文 Fig. 3 より転載

(2) 絶滅危惧種アユモドキの調査事例

[出典] Sugiura K. *et al.* (2020) Characterizing the spatial and temporal occurrence patterns of the endangered botiid loach *Parabotia curtus* by environmental DNA analysis using a newly developed species-specific primer set. *Ichthyological Research*, 68:152-157.

(Abstract 和訳) 本研究では、絶滅危惧種アユモドキを環境水中から検出するための新しい種特異的プライマーセットを開発しました。アユモドキの組織から抽出した DNA を用いて行ったプライマーの性能テストにより、同所的に生息する他の 4 種のドジョウ類（ドジョウ、チュウガタスジシマドジョウ、オオシマドジョウ、ニシシマドジョウ）に対して高い特異性を持つことが示されました。在来の生息地において年間を通して現地採水したサンプルにこのプライマーセットを適用することで、濁水域に生息するため調査がしにくいアユモドキについて、その空間的・時間的な出現パターンを把握できることが確認されました。

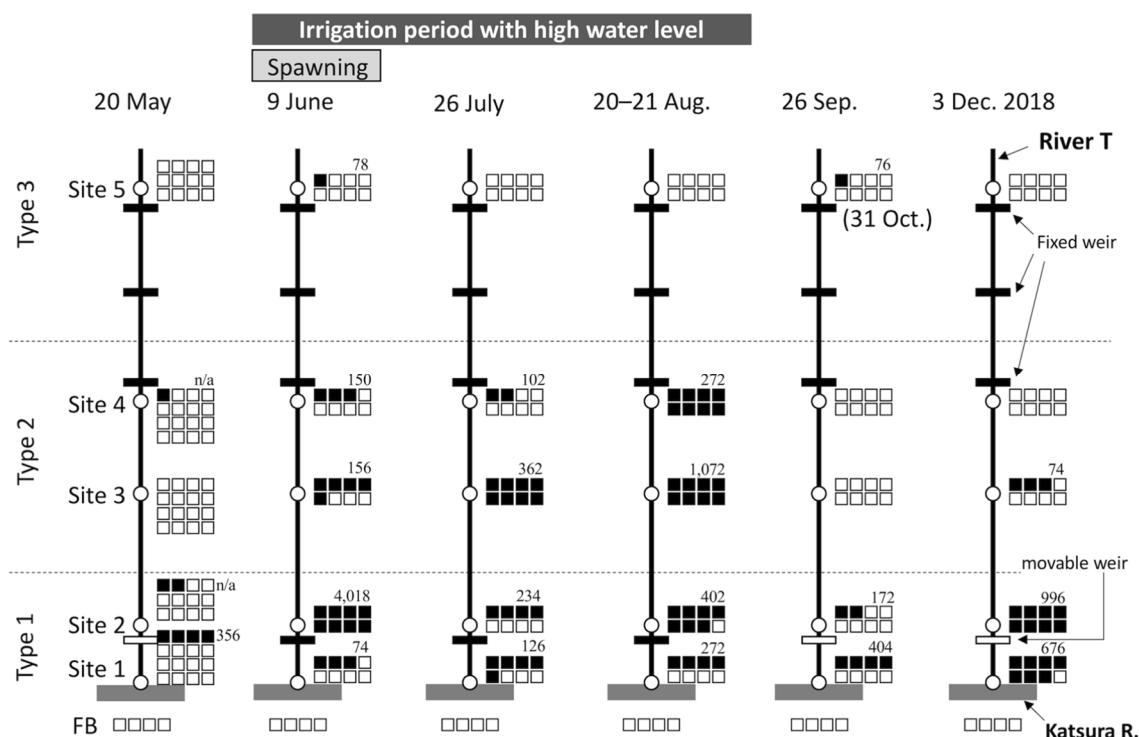


図 京都府亀岡市の生息地で採水したサンプルからのアユモドキの環境 DNA 検出結果

図中の□は未検出、■は検出されたことを、四角の右肩の数字は平均コピー数 (copies/L) を示します。また、水平のバーは川を横切る堰 (Weir) であり、黒いバーは平水時に上流への魚の移動を妨げる堰を、白い棒はリフトアップされていない可動式ダムを示します。

※論文 Fig. 3 より転載

(3) 琵琶湖に流入する 51 河川 102 地点における調査事例

[出典] Nakagawa H. *et al.* (2018) Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology* 63(6):569-580.

(Abstract 和訳) 本研究では、MiFish-U/E プライマーを用いた環境 DNA メタバーコーディングの性能評価を行い、河川性魚類の局所的及び地域的な多様性を調査し、大規模モニタリングにおけるこの手法の潜在的な有効性、限界、将来の改善策を検討しました。本研究では、環境 DNA の検出結果は、河川水の流れの方向性から、下流側よりも上流側で観察される群集とより一致していると仮定しました。

琵琶湖周辺の 51 河川 102 地点において 10 日間で河川水を採取し、環境 DNA から推定される魚種組成と既存の観測データを比較しました。観測地点は、河川の流れに沿った採水取地点から一定の距離（緩衝範囲）内にある観測データから選択し、環境 DNA の検出バイアスが上流の群集に向かうという仮説は、すべての観測データ、標高の高いところからのデータ、標高の低いところからのデータと結果を比較することによって検証しました。

環境 DNA の検出結果は観測データとの整合性は、環境 DNA サンプルの採水地点の上流 6km 以内の既存の観測データを用いた場合に最も高く、過去に報告されている種の 86.4% (38/44 種) と新しく追加された 2 種が検出されました。

メタバーコーディング技術を用いた 10 日間調査では、上流側に偏った環境 DNA 検出の仮説パターンを含む地域の魚類多様性データを、より多くの時間、費用、労力をかけて得られた観測データと同程度の結果を得ることができました。今回の調査では、偽陽性・偽陰性の問題点が指摘されましたが、将来的にはサンプリング方法や実験手順の変更により、これらの問題点は減らす、もしくは、無くす必要があると考えられます。

環境 DNA というこの新しいツールは、これまで実施されてこなかったモニタリング、例えば国をまたいだモニタリングや、さらには年単位、季節単位のほか、より細かい時間スケールのデータを用いた地球全体のモニタリングを可能にすると考えられます。

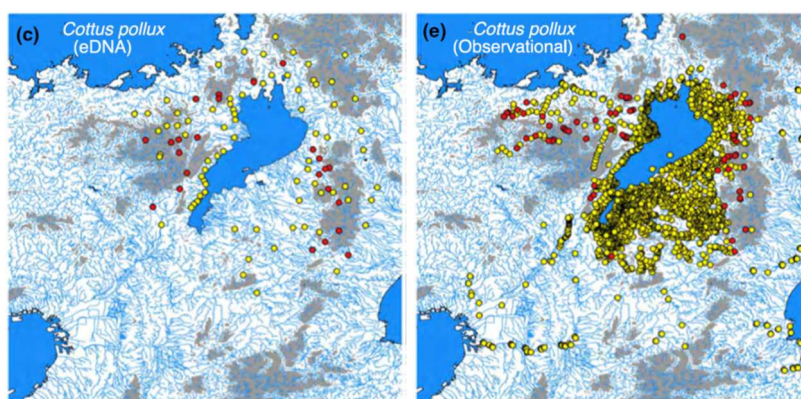


図 カジカの検出結果

左は環境 DNA、右は過去の観測データで、赤い丸は検出/確認を、黄色い丸は未検出/未確認を示します。

※論文 Fig.5 より転載

(4) 河川水辺の国勢調査（魚類）における試行事例分析

[出典] 北川ら（2020）河川水辺の国勢調査（魚類）における環境 DNA メタバーコーディング解析の試行事例分析．河川技術論文集，26:319-324.

（論文概要）国土交通省が全ての一級河川の直轄管理区間、ダム等で実施している河川水辺の国勢調査において、より経済性に優れ、かつ、効率的な調査技術として環境 DNA 分析に着目し、これまでの河川水辺の国勢調査における試行事例の収集・整理に基づき、魚類環境 DNA 分析技術（メタバーコーディング解析）の利用性および課題について検討しました。

集計対象とした 188 種（taxa）について、総種数に対するそれぞれの検出・確認率を地区別に求めたところ、環境 DNA 分析では $76.9 \pm 17.1\%$ （平均±標準偏差）、直接採捕では $74.2 \pm 16.5\%$ で、環境 DNA の方がやや検出率が高くなりました。また、両手法で得られた魚類リストの一致率は $51.1 \pm 16.4\%$ で、完全な一致が見られた地区はありませんでしたが、全 76 地区のうち 67 地区で、有意な正の相関関係が確かめられ、魚類相の把握という観点においては、環境 DNA 分析は直接採捕に劣らない精度を持った調査手法であると考えられました。

一方で、感潮域など特定の環境下において検出率の低下が確認されるなど、調査計画を策定する上で配慮すべき課題が抽出されることから、現状としては直接採捕や環境 DNA 種特異的分析と組み合わせた活用手法を検討していくべきであると考えられました。

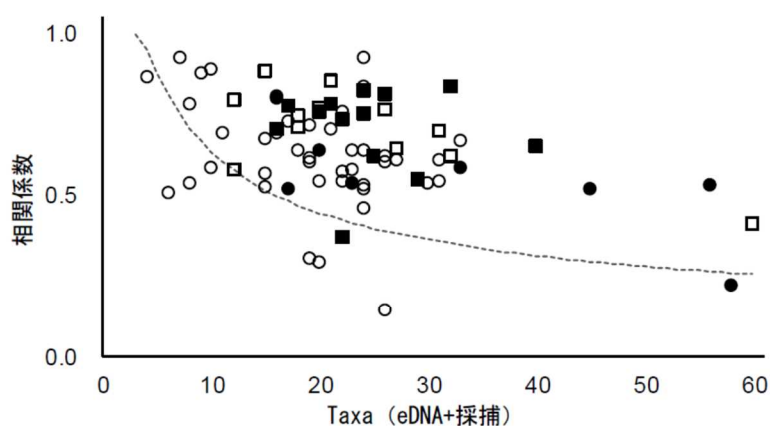


図-1 メタバーコーディング解析と直接採捕の結果に見られた相関．点線以上には有意な正の相関関係(○:1 検体/1 季, ●:複数検体/1 季, □:1 検体/2 季合算, ■:複数検体/2 季合算．破線: $p < 0.05$, cor-2 test).

※論文の図-1 より転載

(5) 河川におけるコイの環境 DNA の拡散と減衰に関するシミュレーション

[出典] Nukazawa, K., Hamasuna, Y., & Suzuki, Y. (2018). Simulating the advection and degradation of the environmental DNA of common carp along a river. Environmental science & technology, 52(18), 10562-10570.

(Abstract 和訳) 環境 DNA 分析法は、精密で、効率的な生物監視のための新しい技術です。環境 DNA を用いた調査は、様々な淡水生物のモニタリングに広く利用されていますが、河川における環境 DNA の動態については、まだ十分に理解されていません。そこで、本研究では、養鯉場からの排水が流れ込んでいる河川源流域において、コイ (*Cyprinus carpio*) の環境 DNA の動態を実験的に調べました。

まず、養鯉場の下流に沿って地点を設定し、コイの環境 DNA の縦断的な変化を評価するために、デジタル PCR 法を用いて環境 DNA の時間的な減衰を調べる実験を行いました。得られた減衰定数を基に、調査対象河川に沿った環境 DNA の拡散と分解をシミュレーションするためのモデルを構築しました。

観測された環境 DNA フラックス（定量された環境 DNA 濃度に流量を乗じた値）は、養殖場から下流に行くほど指数関数的に減少しましたが、養殖場から 3km 下流でも環境 DNA が検出されました。調査河川の水温は、各地点とも同程度でしたが、環境 DNA の減衰定数は夏季よりも秋季の方が小さくなりました。シミュレーションで得られた環境 DNA 濃度の推定値は、観測された環境 DNA 濃度よりも明らかに大きく（10 倍以上）、実際の河川環境では、従来の実験的環境に比べて、環境 DNA の減衰が促進されることが示唆されました。

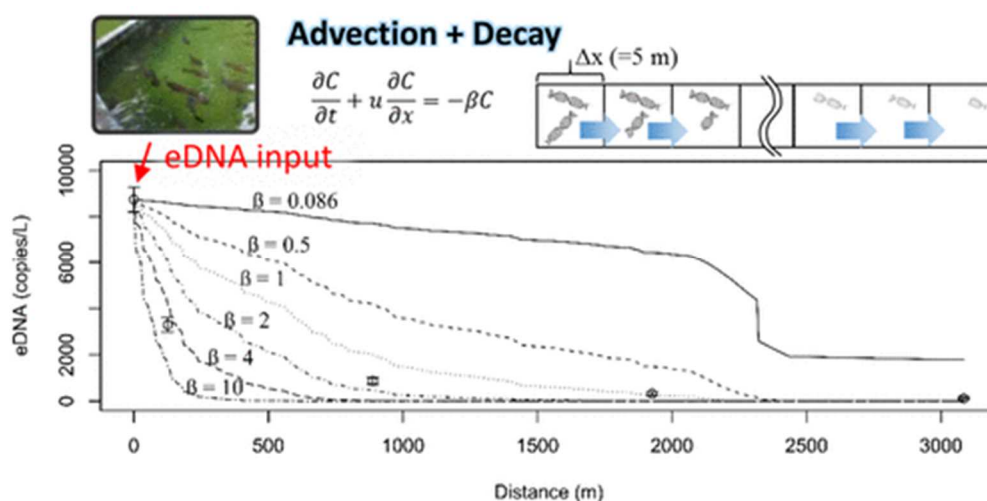


図 様々な減衰パラメータを用いて調査対象河川に沿ってシミュレーションされた環境 DNA ダイナミクス

※論文より転載

(1) 両生類用ユニバーサルプライマー（Amph16S）の開発と有用性の検証

[出典] Sakata et al. (2022) Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. Metabarcoding and Metagenomics, 6 : 15-26.

(要約) 本研究では、環境中に生息する両生類を網羅的に解析するために、ユニバーサルプライマーセット (Amph16S) を開発しました。開発した環境 DNA 分析技術の有用性を検証するため、Amph16S と捕獲・目視調査の検出種数の比較を国内 10 地点で行いました。その結果、開発した環境 DNA 分析技術では合計 16 種が検出されましたが、捕獲・目視調査では合計 8 種の検出に留まりました。以上の結果より、両生類の網羅的な検出に Amph16S が有用であることが実証されました。

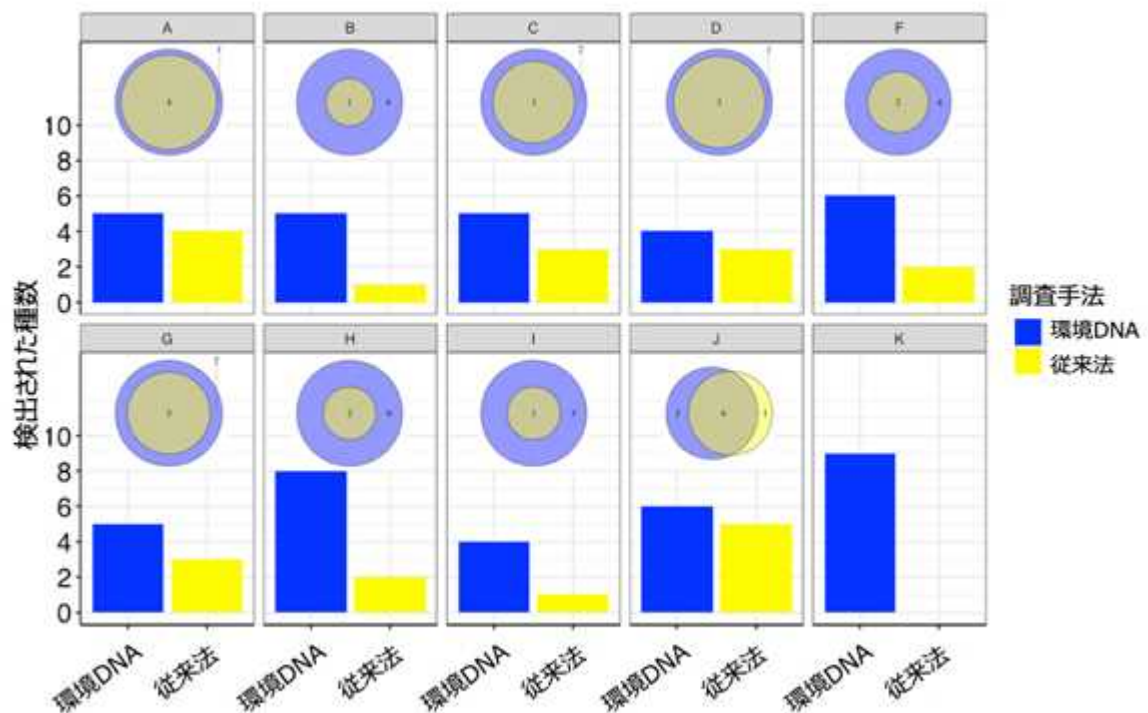


図 各地点（A-K）における環境 DNA 分析技術と捕獲・目視調査（従来法）により検出した種数の比較

図中の棒グラフはそれぞれの手法で検出した種数を、ベン図はそれぞれの手法で共通して検出した種および単一の手法のみで検出した種数を示しています。

※神戸大学プレスリリース (https://www.kobe-u.ac.jp/ja/news/article/2022_02_21_01/) より転載

(2) 湿原環境に生息するキタサンショウウオの調査事例

[出典] Takeshita et al. (2020) Projection range of eDNA analysis in marshes: a suggestion from the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii*) inhabiting the Kushiro marsh, Japan. PeerJ, 8: e9764.

(要約) 本研究では、湿原環境（釧路湿原）におけるキタサンショウウオの分布情報や産卵場所の特定に環境 DNA 分析技術が有用か検証しました。まず、卵囊、幼生、成体をそれぞれ水槽内に入れ、それらが環境 DNA を放出するかを分析しました。その結果、全ての水槽中の水から本種の環境 DNA を検出しました。また、産卵時および孵化直後に環境 DNA が多量に放出されること、卵囊期は環境 DNA の放出が少ないことが示唆されました。

次に、釧路湿原において、本種の繁殖期後期から幼生期にかけて採水および産卵場所の特定を行いました。環境 DNA 分析の結果、卵囊あるいは幼生に由来すると思われる本種の環境 DNA を野外でも検出することができました。また、野外観察の結果から、環境 DNA 濃度は採水地点から 7～10 m の範囲の卵囊量を示すことが明らかとなりました。以上の結果より、環境 DNA 分析技術は湿地に生息する種のモニタリングに有効であることが明らかとなりました。

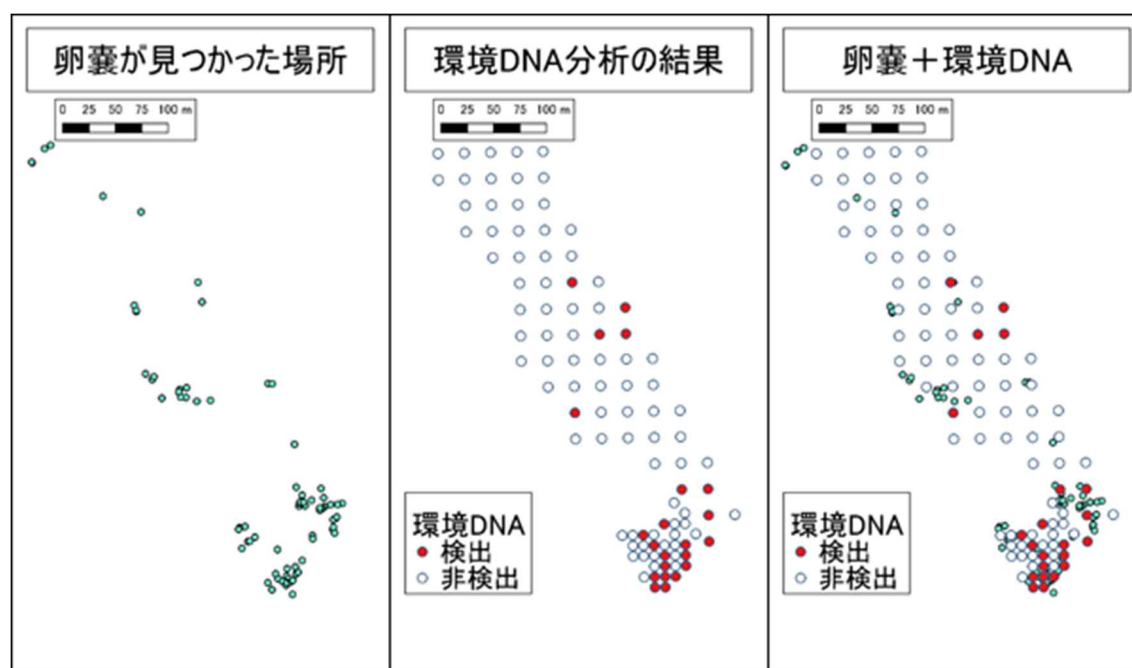


図 野外観察（卵囊量）と環境 DNA 分析の結果

※神戸大学プレスリリース (https://www.kobe-u.ac.jp/ja/news/article/2020_09_04_01/) より転載

(3) 絶滅危惧種ヤマトサンショウウオの調査事例

[出典] Sakai et al. (2019) Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis. Environmental DNA, 1: 281-289.

(要約) 本研究では、GIS 技術と環境 DNA 分析技術を用いて岐阜県内におけるヤマトサンショウウオの新たな生息地の発見を試みました。GIS を用いてヤマトサンショウウオの生息適地を 5 地点推定し、それらの地点で採水したサンプル中の環境 DNA を分析した結果、3 地点で本種の環境 DNA を検出しました。次に、GIS で推定された生息適地で野外調査を行ったところ、環境 DNA が検出された 1 地点でヤマトサンショウウオの卵囊を発見することができました。以上の結果は、GIS 技術と環境 DNA 分析技術を組み合わせることで、絶滅が危惧される両生類の生息地の発見が可能であることを示すものです。

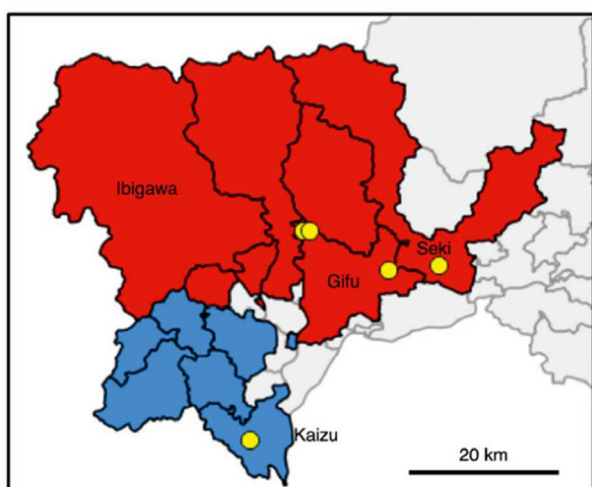


図 調査エリアの地図（赤色：岐阜県西部、青色：岐阜県南西部）

図中の黄色丸は、GIS により推定されたヤマトサンショウウオの生息適地を示しています。

※論文 FIGURE 2(b) より転載



図 ヤマトサンショウウオの環境 DNA が検出された地点で発見された本種の卵囊

※論文 FIGURE4 より転載

(4) 河川源流部に生息するハコネサンショウウオの調査事例

[出典] Katano et al. (2017) Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. PLoS One, 12: e0176541.

(要約) 本研究では、兵庫県の河川源流部に生息するハコネサンショウウオの分布情報の推定のために、捕獲調査と環境 DNA 分析を用いた調査を行いました。調査の結果、捕獲調査で本種が発見された 8 地点のうち、7 地点で本種の環境 DNA が検出されました。また、捕獲調査で本種を発見できなかった 2 地点で、本種の環境 DNA が検出されました。また、河川の表層と本種が観察される石の下からそれぞれ採水して環境 DNA 分析を行ったところ、環境 DNA 濃度および検出頻度に有意な差は認められませんでした。以上の結果は、河川源流部に生息する本種の分布調査に、採水が容易な河川表層水中の環境 DNA 分析が有効であることを示すものです。

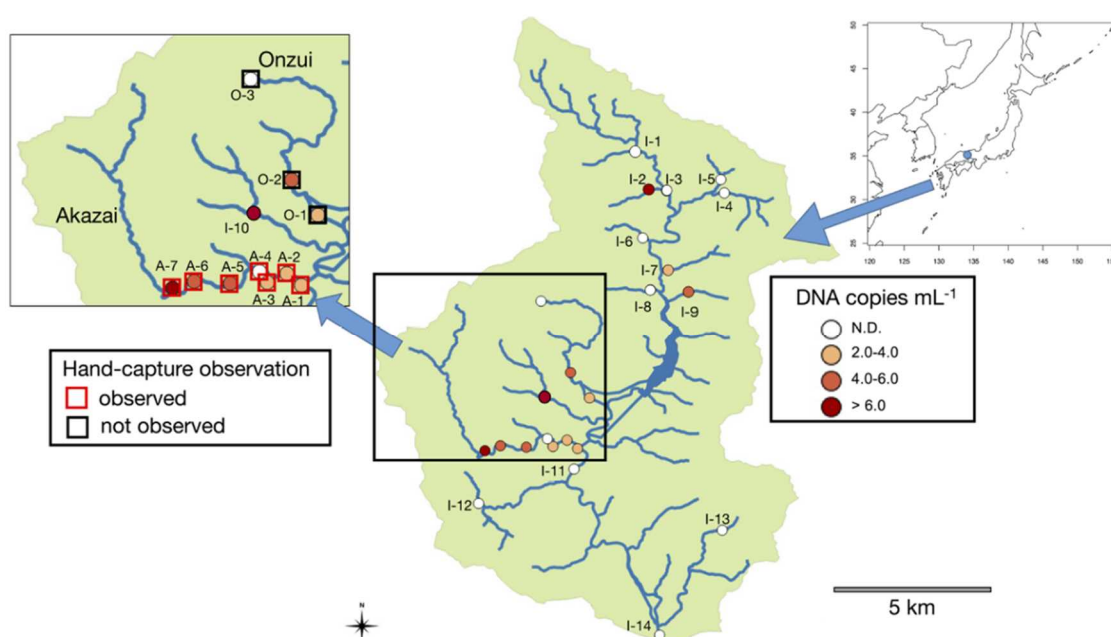


図 調査エリアの地図および各調査地点の環境 DNA 濃度

拡大した図中の調査地点 (A1-A7、O1-O3) では捕獲調査も実施しました。N.D. は環境 DNA が検出されなかったことを示しています。

※論文 Fig 1. より転載

(5) 地下水に生息する伏流性のプレソドン科 *Eurycea* 属 3 種の調査事例

[出典] Adcock et al. (2023) Development and validation of an environmental DNA assay to detect federally threatened groundwater salamanders in central Texas. PloS One, 18: e0288282.

(要約) 本研究では、調査が困難である北米の帯水層に生息するプレソドン科 *Eurycea* 属 3 種の分布を把握するため、これらの種を対象とした環境 DNA 分析技術の開発に着手しました。本技術を用いて、*Eurycea* 属 3 種の生息が報告されている 10 地点の湧水中の環境 DNA を分析した結果、全ての地点から本種群の環境 DNA を検出することができました。なお、低密度に生育する本種群を検出するためには 7L の水を採水する必要があることが分かりました。本論文では、今回開発した技術を運用していくための今後の展望についても議論しています。

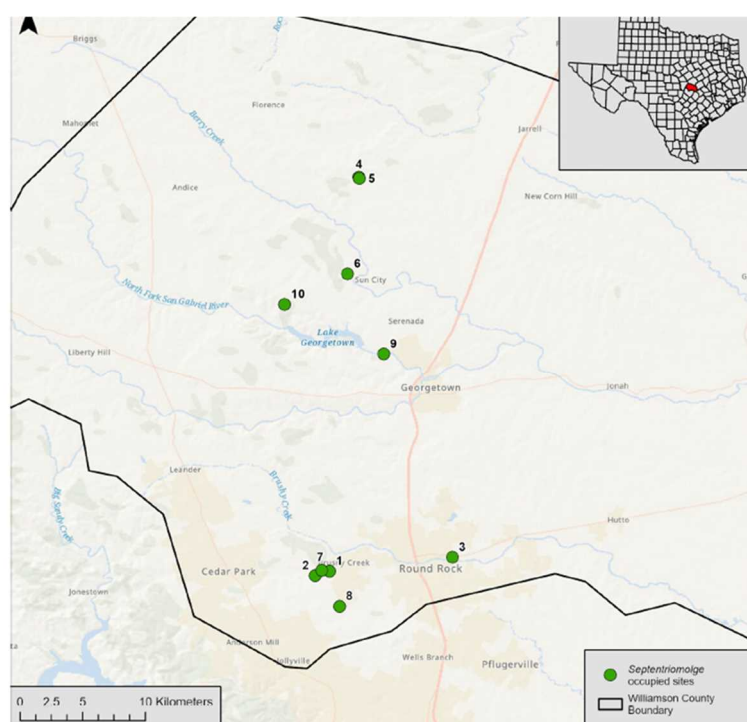


図 調査エリアの地図 (アメリカ合衆国テキサス州ウィリアムソン郡)

図中の緑丸は環境 DNA 分析のための採水地点 (対象種の生息が確認されている地点) を示しています。

論文 Fig 1. より転載

(6) 北海道における国内外来種アズマヒキガエルの調査事例

[出典] Mizumoto et al. (2022) Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan. *Biological Invasions*, 24: 1199-1211.

(要約) 本研究では、ヒキガエル属に特異的な環境 DNA 分析技術を開発しました。本技術を北海道のアズマヒキガエル生息域で検証した結果、河川水中の環境 DNA 分析により、その上流に位置する繁殖池の分布情報を推定可能であることが分かりました。そこで、本技術を石狩川流域に適用した結果、採水した 73 地点のうち 32 地点で本種の環境 DNA が検出されました。なお、この 32 地点のうち 21 地点は既存の観察事例がない地点でした。以上の結果は、本種の新しい繁殖池の発見や分布拡大の理解に本技術が有効であることを示唆するものです。

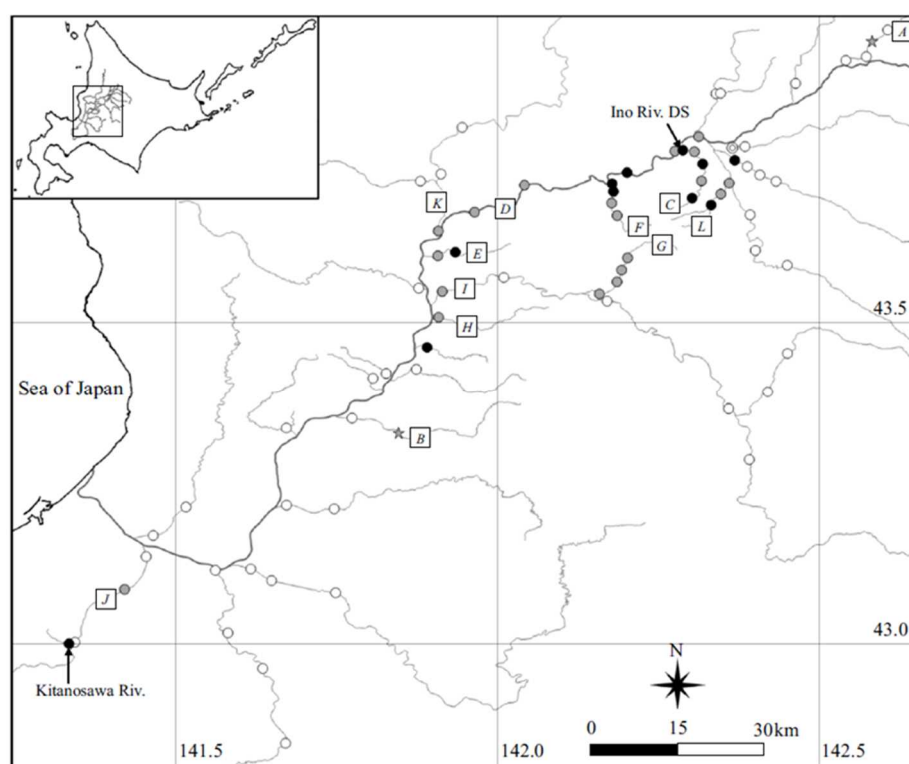


図 調査エリアの地図（石狩川流域および採水地点）

図中の黒丸は本種の環境 DNA が検出されかつ今までに観察事例がある地点、灰色丸は本種の環境 DNA が検出されたが半径 500 m 以内で観察事例がない地点、灰色星は本種の環境 DNA が検出されたがその河川で観察事例がない地点、白丸は本種の環境 DNA が検出されず観察事例もない地点、アルファベットは灰色丸あるいは灰色星の地点を含む河川を示しています。

※論文 Fig. 2 より転載

(7) 3 季節における絶滅危惧種カエル3 種の環境 DNA 検出法と鳴き声調査法による検出の比較

[出典] Takahara, T., Iwai, N., Yasumiba, K., & Igawa, T. (2020). Comparison of the detection of 3 endangered frog species by eDNA and acoustic surveys across 3 seasons. *Freshwater Science*, 39(1), 18–27.

(Abstract 和訳) 絶滅危惧種の保全には、基本的な生態情報が欠かせないものです。カエルのような水生生物の存在を推定するために、環境 DNA (eDNA) 分析技術を用いた調査が増えています。しかし、環境 DNA の検出効率は、調査対象となるカエルの種ごとの生態特性に依存する可能性があります。そこで、絶滅が危惧される日本産カエル類 3 種 (*Babina subaspera*, *Odorrana splendida*, *O. amamiensis*) の検出に環境 DNA 検出法を適用しました。また、3 つの異なる季節において、環境 DNA 検出法による検出結果と従来の鳴き声調査法による検出結果を比較しました。

その結果、種の検出精度は、2 つの調査方法間で必ずしも一致しませんでした。これは、鳴き声調査法では、鳴いているオスの成体のみを検出対象としているのに対し、環境 DNA 検出法では性別を問わず、また水中のあらゆる生活史段階の個体を検出できるためと考えられました。さらに、2 つの調査方法による種間の検出パターンの違いは、交尾行動の特徴 (鳴き声の大きさなど) やオタマジャクシの生活史の特徴 (移動能力など) の違いと相関している可能性が考えられました。また、環境 DNA 検出法による検出に最適な季節は、3 つの種間で異なりましたが、これは繁殖期や幼生の生態特性の違いに起因するものと考えられました。

このように、環境 DNA 検出法と鳴き声調査を含む従来の野外観察法で得られた結果は、必ずしも一致するものではなく、むしろそれぞれの対象種の生態特性に依存することが示されました。したがって、環境 DNA 検出法を分布調査に適用する際には、繁殖期やオタマジャクシの存在量の季節的な変化など、カエルの種ごとの生態特性を十分に考慮する必要があると考えられます。

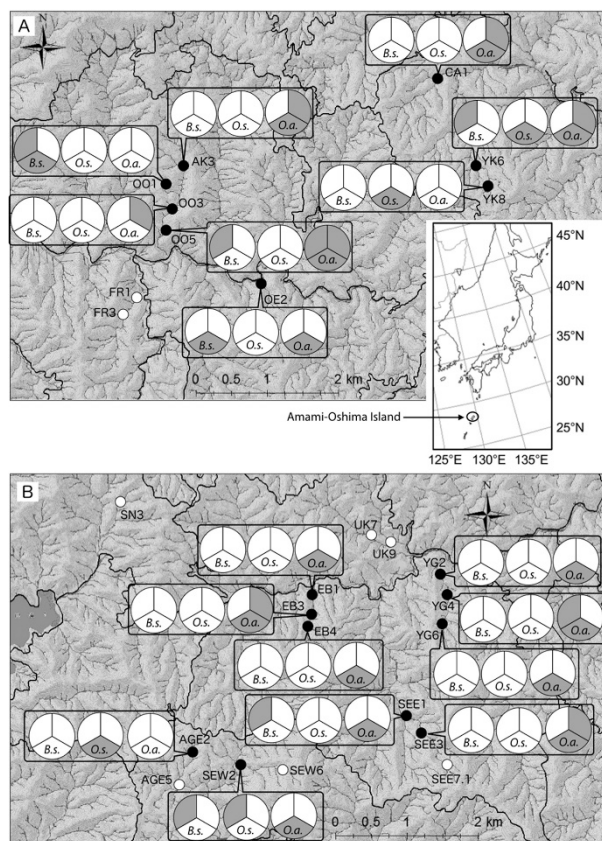


図 調査エリアの地図 (A 北部エリア、B 南部エリア)

それぞれの地図で、調査地点名の横にある黒丸は環境 DNA の検出を、白丸は非検出を示します。

円グラフは、季節、調査地点、カエルの種類ごとの環境 DNA の検出 (灰色) と非検出 (白) を示します。

B. s. はオットンガエル、O. s. はアマミイシカワガエル、O. a. はアマミハナサキガエルを示します。

円グラフ内の右上、下、左上は、それぞれ 12 月、5 月～6 月、8 月の環境 DNA の検出結果を示しています。

※論文 Fig. 2 より転載

(1) 情報公開をふまえた入力項目フォーマットについて

生物多様性の保全に対して環境 DNA 調査の結果を広く活用するためには、種の検出に関する生物情報の他に、調査地点や分析に関する情報も含めた上で、一元的に管理されていることが望ましいと考えられます。環境省では、環境 DNA 調査の結果を公表する際の様式として、GBIF（地球規模生物多様性情報機構）プロジェクトで採用されている生物多様性情報の国際的な標準データ形式「ダーウィンコア（Darwin Core）」との互換性を想定した入力項目フォーマットの検討を進めてきました。

ダーウィンコアについては、以下の WEB サイトで詳しく解説されています。

GBIF（日本語サイト）：<https://www.gbif.org/ja/>

JBIF（地球規模生物多様性情報機構日本ノード）：<http://www.gbif.jp/v2/>

入力項目フォーマットは、調査の基礎的な情報となる「調査情報（コアファイル）」を記載するものと、調査ごとの生物情報となる「コアファイルに付随する生物情報の入力項目」を記載するものの2つに分かれています。入力項目フォーマットの詳細については、参考資料 4 を参照してください。

(2) 絶滅危惧種の情報公開について

生物情報には、希少種の位置情報やその特定を容易にする情報が含まれるため、情報の管理は特に慎重に行う必要があります。絶滅危惧種の詳細な生息・生育地の情報が明らかになることで、乱獲等を招くおそれがあります。一方で、絶滅危惧種の生息・生育が知られないまま生息地等が開発圧等を受けるおそれもあります。また、環境 DNA 調査の網羅的解析法（MiFish 法）は、1つのサンプルから、複数の種の在情報が得られ、絶滅危惧種とそれ以外の種の両方が含まれることが想定されます。

そのため、環境省生物多様性センターでは、環境 DNA 調査の情報公開は、全ての種の情報に対して位置情報を特定させないことを基本方針とし、位置情報公開レベルとしては、『10km メッシュまたは緯度・経度情報を十進法で小数点第 1 位まで』としています。また、位置情報が推定できる調査地点名等の情報については非公開とし、市町村名までの公開としています。MiFish 配列のリファレンス情報は、サンプル提供者と調整の上、誰でも利用可能な国際塩基配列データベース（DDBJ、GenBank、NCBI 等）に登録し公開しています。絶滅危惧種の種特異的プライマー情報については個別に判断を行うこととし、著しく保全に影響が生じると判断される場合は非公開とする可能性があります。ただし、行政機関や研究者等には、申請により条件付で詳細な情報を提供できることとしています。

以上のことから、参考資料 4 の入力項目のうち、位置情報が推察される、「試料名」、「地点名」、「緯度（十進）」、「経度（十進）」の 4 項目を非公開としています。また、位置情報の公開レベルである、『10km メッシュまたは緯度・経度情報を十進法で小数点第 1 位まで』を調査情報（コアファイル）の「地理情報 No. 31 地域メッシュコード（2 次）」に記載することとしています。

(1) 本参考資料について

環境省では、二次的自然環境に生息する淡水魚類の分布情報の拡充や希少種の保全推進、外来種の対策強化、環境影響評価における生物調査の効率化などに環境 DNA 分析技術を有効に活用するため、「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査のための手引き」を作成し、公開しています。

手引きでは、魚類相を調べるための環境 DNA 分析手法として、魚類特異的ユニバーサルプライマーを用いた網羅的解析（以降、MiFish 解析と言います）を推奨しています。MiFish 解析では、種を同定する際に、形態分類学的手法により種が同定された標本から得られた DNA 配列（以降、リファレンスと言います）が登録された国際塩基配列データベースの情報に対し、サンプルから取得した DNA 配列と最も相溶性が高い配列を専用ソフトウェアにより検索し、その登録情報に付けられた学名を同定結果として採用するという方法がとられます。この操作は、一般的に、相溶性検索や BLAST 検索などと呼ばれます。

BLAST 検索では、検索の最上位にきた登録配列に付与されている学名をそのまま採用した場合、その種同定結果は、以下に示す主に 3 つの要因により、間違っただけになってしまうことがあります。この誤同定の有無を確認し、正しい学名に修正する操作のことを、手引きでは「精査」と呼んでいます。

MiFish 解析で誤同定が生じる主な要因

- ① 国際塩基配列データベースの登録情報が間違っている（魚類分類学の進展により、登録された種の学名が変更され、登録時と現時点で学名に相違があるもの等を含む）。
- ② MiFish 解析で用いる配列情報では、種レベルの識別が難しい分類群がある。
- ③ 雑種個体が生息している可能性があり、ミトコンドリア DNA を対象とした分析（MiFish 解析を含む）では、正確な種同定ができない。

環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査において、調査結果の正確性を担保するためには、この「精査」がされていることが重要です。特に、要因①と②による誤同定は、環境 DNA 分析技術を標準化する場合の大きな課題であることが分かってきました。この課題を解決するためには、国際塩基配列データベースの登録情報の間違いを修正し、さらに可能な限り最新の学名を反映した新しいデータベースを構築し、かつ、MiFish 解析では種レベルの識別が難しい分類群に関する情報が整理されていることが望ましいと考えられます。

そこで、環境省では、MiFish 解析で用いる 12S リボゾーム RNA 遺伝子の一部領域（以降、MiFish 配列と言います）を対象に、国際塩基配列データベースに登録されている配列情報を取得した上で再整理し、学名以外の付帯情報を参考に「データベース上の学名」を修正し、環境省版の MiFish リファレンスデータベースを整備しました。

また、整備したデータベースの MiFish 配列を基に、科レベルもしくは属レベルで分子系統樹を作成し、「環境 DNA 分析を用いた魚類相網羅的解析（MiFish 解析）における種の識別性を確認するための分子系統樹」としてまとめました。この分子系統樹の情報を参考に、MiFish 配列では種レベルの識別が難しい分類群を抽出した上で、さらに淡水魚類各分野の専門家に対して、種の識別性や学名等に関する

る確認や助言（エキスパートチェック）を依頼し、その結果を前述の MiFish リファレンスデータベースに反映させました。

こうした作業をふまえて完成した環境省版 MiFish リファレンスデータベースの情報を利用し、手引きで推奨する「精査」を誰でも簡単に行えるものを目指して作成されたツールが、「MiFish 法に係る誤同定チェックシート」です。このチェックシートでは、アクセッション番号を基に精査を行います。アクセッション番号とは、国際塩基配列データベースに登録されたすべての配列に付けられている配列固有の識別番号です。環境 DNA 分析を民間の分析受託会社や大学等に委託すると、分析結果表（環境省の手引きでは「一致率が高い生物種リスト」と呼んでいます）が提供されます。この分析結果表には、「サンプルから検出されたこの環境 DNA 配列は、このアクセッション番号の登録情報と一致したので、この種に同定しました」という情報が一般的には記載されています。MiFish 法に係る誤同定チェックシートでは、この分析結果表に記載されたアクセッション番号をチェックシートに入力することで、誤同定の有無を精査することができます。

本資料は、環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査を行う際に、精度の高い調査結果を取得するために必要な「精査」を簡易的に行うツールである「MiFish 法に係る誤同定チェックシート」の使い方と、その基盤となる環境省版 MiFish リファレンスデータベースに関して解説するものです。

(2) MiFish リファレンスデータベースの整備対象種

国際塩基配列データベースから登録情報を取得する際に検索対象とした種は、表-参 10- 1 の各リストに掲載されている種から重複を除いた 1917 種を基本としました。さらに、MiFish 解析による種の識別性をより明確にするため、表-参 10- 1 のリストには未掲載の情報のうち、二次的自然環境に生息する淡水魚類の同属近縁他種（主に海外産の種）も、必要に応じて整備の対象種に追加しました。

表-参 10- 1 MiFish リファレンスデータベースの整備対象種

リスト名	対象種数	備考
①環境省二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト	475 種	④及びそれ以降に追加された種内系統 101 系統を含む
②環境省レッドリスト 2020 (汽水・淡水魚類)	260 種	絶滅のおそれのある地域個体群 (LP) 15 種を含む
③生態系被害防止外来種リスト	83 種	ガー科 7 種、パイク科 5 種、国内外来種 4 種を含む
④Watanabe et al. (2017) による琉球列島を除いた日本産在来淡水魚類リスト	288 種	明確な種内系統 100 系統を含む
⑤河川水辺の国勢調査のための生物リスト (令和 4 年度版)	1044 種	魚類版の掲載種全種
⑥日本産魚類全種リスト ver. 18 (2022 年 11 月 21 日版)	1155 種	登録 4723 種のうち、①②⑤に含まれる汽水・淡水魚類のみを抜粋
⑦二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト掲載種の「同属他種」や「過去に使われていた学名 (シノニム)」	699 種	中坊 (2013) 掲載の 4321 種のうち①②に含まれる汽水・淡水魚類のみを抜粋
⑧国際塩基配列データベース上で使用されている固有の学名など必要性に応じて任意に追加されたもの	259 種	種間雑種標本由来や sp. のあとに固有の識別名が付けられているもの等
整備対象種	計 1917 種	和名と学名の組み合わせが重複しているものを除いた種及び系統の合計数

※リスト④の Watanabe et al. (2017) とは、以下の文献を示します。

Appendix 4 in Watanabe, K., K. Tominaga, J. Nakajima, R. Kakioka and R. Tabata. (2017) Chapter 7. Japanese freshwater fishes: biogeography and cryptic diversity. In: Motokawa, M. and H. Kajihara (eds.) Species Diversity of Animals in Japan, Diversity and Commonality in Animals. Springer. pp. 183-227.

(日本語補足追記：上記文献の付録 4「日本列島（琉球列島を含まない）に生息する淡水魚類の種、亜種、種内の深い分岐群のリスト」を示します)

(3) MiFish リファレンスデータベースの整備内容

環境省版 MiFish リファレンスデータベースの整備に用いたリファレンスは、2023 年 2 月 7 日時点に国際塩基配列データベースからダウンロードした情報を元としています。ダウンロードの際は、前述の 1913 種を対象に「学名」と「12S」というキーワードで検索を行い、国際塩基配列データベースから 12S リボゾーム RNA 遺伝子配列が含まれるデータを取得しました。そこからさらに、MiFish ユニバーサルプライマーの配列の一部を検索キーとして、MiFish 配列を完全に含む登録情報のみを抽出し、アクセッション番号ごとに整理しました。

さらに、アクセッション番号ごとに整理した登録情報の中から、複数の注釈（特に note や ecotype、strain 欄に記載された情報）を参考に、データベースに登録された学名の妥当性を確認した上で、作成した MiFish リファレンスデータベースの登録学名を修正しました。

また、登録情報に標本管理施設及び標本番号があるが、採集地の記載がないデータのうち、表-参 10-2 の 5 つの施設で管理されている標本に関しては、国立科学博物館が管理運営するサイエンスミュージアムネット (<http://science-net.kahaku.go.jp/>) から 2020 年 1 月 20 日にダウンロードした各施設の登録データを利用し、転記しました。

表-参 10-2 標本番号から採集地の情報を入手した標本管理施設のリスト

施設名略号	標本管理施設名
NSMT	国立科学博物館
FRLM	三重大学大学院生物資源学研究科附属水産実験所
KAUM	鹿児島大学総合研究博物館
CBM	千葉県立中央博物館
HUMZ	北海道大学総合博物館水産科学館

続いて、作成した MiFish リファレンスデータベースに対して、個々の登録情報の信頼性を簡易的に把握できるように、専門家からの助言をふまえて定めた基準に従って、信頼度のランク分けを行いました（表-参 10-3）。

表-参 10-3 信頼度のランク分け基準

ランク分けの基準項目				信頼度 ランク
標本の採集地		標本管理施設 と標本番号	分子系統樹による チェック	
(国名)	(県名)			
○	○	○	問題なし	AA
○	×	○	問題なし	A
○	○ or ×	×	問題なし	B_Loc
×	×	○	問題なし	B_Spe
×	×	×	問題なし	C
○ or ×	○ or ×	○ or ×	誤同定の疑いあり	D
エキスパートチェックにより修正された情報				Ex

また、MiFish 解析による種の識別性を確認するため、MiFish 配列が得られた種について、科レベルもしくは属レベルで暫定的にグループ化し、分子系統樹を作成しました。分子系統樹から、同じ枝の同じ位置に 2 種以上の配列が入れ子状に並んだ場合（すなわち種間で MiFish 配列に違いがないことが示された場合）、そこに該当する種は、MiFish 解析では種レベルでの識別が困難であるとみなしました。

さらに、作成した MiFish リファレンスデータベース及び分子系統樹は、淡水魚類各分野の専門家から、種の識別性や学名等に関する確認や助言（エキスパートチェック）を受けています。エキスパートチェックにより、誤同定の疑いがある（もしくは登録情報の信頼性に疑問が残る）と判断された登録情報については、信頼度ランクを「D」としました。また、エキスパートチェックにより、魚類分類学の最新知見や分子系統樹から登録上の学名を変更することが望ましい等の指摘がされた登録情報については、信頼度ランクを「Ex」とし、学名とそれに付与される和名を修正しました。

MiFish 法に係る誤同定チェックシートを使った精査の結果、信頼度ランクに「AA、A、B Loc、B Spe、C、Ex」のいずれかが表示された登録情報については、「MiFish 解析の結果として採用を推奨する学名・和名」の欄に表示された情報を分析結果表に採用します。しかし、信頼度ランクが「D」と表示された登録情報については、「MiFish 解析の結果として採用を推奨する学名・和名」の欄に表示された情報に対する信頼度が低いため、分析結果として採用せず、別途、サンプルから検出された環境 DNA 配列を用いて個別に分子系統樹を作成し、再精査を行うことが推奨されます。

なお、環境省版 MiFish リファレンスデータベース及び MiFish 法に係る誤同定チェックシートは、作成時点における種の識別性を示したものであり、この識別性は確定したものではありません。今後、国際塩基配列データベース上に登録されるリファレンスが増えることで、種の識別性に対する判断が変更される可能性があります。

(4) MiFish 法に係る誤同定チェックシートの使い方

環境 DNA 分析は、多くの場合、民間の分析受託会社や大学等に委託することが想定されます。分析完了後は、委託先から分析結果表（環境省の手引きでは「一致率が高い生物種リスト」と呼んでいます）を入手することになります。

表-参 10- 4 は、環境 DNA 分析結果表の例です。一般的に、分析結果表には、依頼したサンプルから得られた環境 DNA 配列と最も相同性（一致率）が高かった配列の「アクセッション番号」が記載されています。なお、分析受託会社によっては、アクセッション番号（バージョン番号付き）の出力が標準仕様になっていない場合があるので、分析を依頼する際に確認してください。また、参考資料 6 の表-参 6- 2 にある解析ソフトウェア MiFish Pipeline を使った場合は、ソフトウェアの仕様上、アクセッション番号が出力されないため（2023 年 3 月時点）、この MiFish 法に係る誤同定チェックシートを使った精査を行うことができません。

表-参 10- 4 環境 DNA 分析結果表の一例

No.	アクセッション番号	一致率	科名	和名	学名	採水日	2020/4/30	2020/5/30	2020/6/29
						調査地	二次的自然		
							No.1	No.2	No.4
					確認種類数	14	8	10	11
					総リード数	240,540	63,128	90,381	87,031
1	LC552361.1	100	コイ科	コイ(飼育型)	<i>Cyprinus carpio</i>	13,192	1,488	3,842	7,862
2	LC552360.1	100	コイ科	コイ(野生型)	<i>Cyprinus carpio</i>	1,299	0	865	434
3	LC049911.1	100	コイ科	フナ属	<i>Carassius</i> sp.	22,489	21,525	964	0
4	LC494269.1	100	コイ科	キタノアカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira tohokuensis</i>	13,247	2,449	10,798	0
5	LC193307.1	100	コイ科	ゼニタナゴ	<i>Acheilognathus typus</i>	728	0	0	728
6	AP012986.1	100	コイ科	タイリクバラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	26,548	0	26,548	0
7	LC552399.1	100	コイ科	カワムツ	<i>Nipponocypris temminckii</i>	2,167	0	0	2,167
8	LC552387.1	100	コイ科	モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>	33,728	6,804	6,414	20,510
9	LC552383.1	100	コイ科	タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	119	0	0	119
10	LC492322.1	100	ドジョウ科	ドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	15,086	2,919	5,487	6,680
11	LC069457.1	100	ドジョウ科	キタドジョウ	<i>Misgurnus</i> sp. (Clade A)	245	0	0	245
12	LC552443.1	100	サンフィッシュ科	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus macrochirus</i>	16,947	1,178	6,863	8,906
13	LC474183.1	100	サンフィッシュ科	オオクチバス	<i>Micropterus salmoides</i>	9,081	2,682	2,121	4,278
14	LC385178.1	100	ハゼ科	ヨシノボリ属	<i>Rhinogobius</i> sp.	85,664	24,083	26,479	35,102

精査を行う分析結果表が準備できたら、MiFish 法に係る誤同定チェックシート（以降、チェックシートとします）の「アクセッション番号」と表記された黄色いセルに、分析結果表のアクセッション番号（バージョン番号付き）を入力します。精査を行う分析結果表が Excel ファイルの場合は、分析結果表のアクセッション番号を、チェックシートの「アクセッション番号」と表記された黄色いセルにコピー&貼り付けをします。

チェックシートの各セルには、Excel の vlookup 関数が入力されているため、MiFish リファレンスデータベースから、入力されたアクセッション番号に対する該当情報が自動的に参照出力される仕様となっています。なお、チェックシートでは、最初の状態では非表示になっていますが、1 行目と 2 行目に引用するシート名（デフォルトは MiFish リファレンスデータベース）と引用する列番号が指定されています。チェックシートに出力される情報をカスタマイズしたい場合は、この行を変更するか、セルに入力されている関数自体を直接書き換えてください。

図-参 10- 1 は、チェックシートの出力結果（一部のみ抜粋）の例です。チェックシートでは、以下の4種類の学名と和名と信頼度ランクを出力します。

- 出力名① 国際塩基配列データベース上の登録学名とそれに対応する和名
 出力名② 国際塩基配列データベース上の付帯情報を基に修正した学名とそれに対応する和名
 出力名③ 日本産全魚種リストの学名・和名（下の図では省略）
 出力名④ MiFish 解析の結果として採用を推奨する学名・和名

出力名①				出力名②		出力名④		
No.	アクセッション 番号	D列の学名に対応する 和名	国際塩基配列データ ベース上の登録学名	F列の学名に対応する 和名	国際塩基配列データ ベース上の付帯情報を 基に修正した学名	MiFish解析の結果と して採用を推奨する和 名	MiFish解析の結果と して採用を推奨する学 名	信頼度ラ ンク
1	LC552361.1	コイ	Cyprinus carpio	コイ	Cyprinus carpio	コイ（飼育型）	Cyprinus carpio	AA
2	LC552360.1	コイ	Cyprinus carpio	コイ	Cyprinus carpio	コイ（野生型）	Cyprinus carpio	Ex
3	LC049911.1	ギンブナ	Carassius langsdorfii	ギンブナ	Carassius langsdorfii	ギンブナ / キンブナ / オオキンブナ / ニゴ ロブナ / キンギョ / フナ属の一種（琉球列 島）	Carassius sp. / Carassius buergeri subsp. 2 / Carassius buergeri buergeri / Carassius buergeri grandoculis / Carassius auratus / Carassius sp.	AA
4	LC494269.1	キタノアカヒレタビラ	Acheilognathus tabira tohokuensis	キタノアカヒレタビラ	Acheilognathus tabira tohokuensis	キタノアカヒレタビラ	Acheilognathus tabira tohokuensis	B_Loc
5	LC193307.1	ゼニタナゴ	Acheilognathus typus	ゼニタナゴ	Acheilognathus typus	ゼニタナゴ	Acheilognathus typus	AA
6	AP012986.1	0	Acheilognathus chankaensis	Acheilognathus chankaensis	Acheilognathus chankaensis	タイリクバラタナゴ	Rhodeus ocellatus ocellatus	Ex
7	LC552399.1	カワムツ	Nipponocypris temminckii	カワムツ	Nipponocypris temminckii	カワムツ	Nipponocypris temminckii	AA
8	LC552387.1	モツゴ	Pseudorasbora parva	モツゴ	Pseudorasbora parva	モツゴ / モツゴ属の 一種[海外]	Pseudorasbora parva / Pseudorasbora interrupta[海外]	AA
9	LC552383.1	タモロコ	Gnathopogon elongatus elongatus	タモロコE1（西日本 型）	Gnathopogon elongatus elongatus	タモロコ / ホンモロ コ	Gnathopogon elongatus elongatus / Gnathopogon caerulescens	AA
10	LC492322.1	ドジョウ	Misgurnus anguillicaudatus	ドジョウ	Misgurnus anguillicaudatus	ドジョウ（大陸系統）	Misgurnus anguillicaudatus	Ex
11	LC069457.1	キタドジョウ	Misgurnus sp. Clade A	キタドジョウ	Misgurnus sp. Clade A	キタドジョウ	Misgurnus sp. (Clade A)	AA
12	LC552443.1	ブルーギル	Lepomis macrochirus	ブルーギル	Lepomis macrochirus	ブルーギル	Lepomis macrochirus macrochirus	AA
13	LC474183.1	オオクチバス	Micropterus salmoides	オオクチバス	Micropterus salmoides	オオクチバス	Micropterus salmoides	AA
14	LC385178.1	オオヨシノボリ	Rhinogobius fluviatilis	オオヨシノボリ	Rhinogobius fluviatilis	トウヨシノボリ / ク ロヨシノボリ / オオ ヨシノボリ / カズサ ヨシノボリ / オウミ ヨシノボリ / シマヒ レヨシノボリ / ルリ ヨシノボリ / クロダ ハゼ	Rhinogobius sp. / Rhinogobius brunneus / Rhinogobius fluviatilis / Rhinogobius sp. KZ / Rhinogobius sp. OM / Rhinogobius tyoni / Rhinogobius mizunoi / Rhinogobius kurodai	AA

図-参 10- 1 MiFish 法に係る誤同定チェックシートの出力結果の例（一部のみ抜粋）

出力名①のセル（チェックシートの C,D 列）には、国際塩基配列データベース上の登録学名とそれに対応する和名が出力されます。分析結果表の精査が行われていない場合は、この出力結果が結果表に表示されている可能性があります。

出力名②のセル（チェックシートの E,F 列）には、国際塩基配列データベース上の付帯情報（特に note や ecotype、strain 欄に記載された情報）を基に修正した学名が表示されます。また、一部の種については、種内系統の情報も付与されて出力される場合があります。

出力名③のセル（チェックシートの G,H 列）には、日本産全魚種リスト（JAF リスト）に対応する学名・和名が出力されます。

出力名④のセル（チェックシートの I,J 列）には、出力名③の情報を基本としつつ、分子系統樹による確認結果やエキスパートチェックの結果を反映した MiFish 解析の結果として採用を推奨する学名・和名が出力されます。例えば、先ほどのチェックシートの出力結果例では、「ギンブナ」の学名で登録されている配列（アクセッション番号 LC049911.1）と 100%一致した環境 DNA 配列が検出されていますが、ギンブナは他の多くのフナ属魚類と種レベルの識別が困難であると判断されるため、「ギンブナ / キンブナ / オオキンブナ / ニゴロブナ・・・」として、入力されたアクセッション番号の MiFish 配列と一致したときに**該当する可能性のあるすべての種**が出力されています。

また、チェックシートの出力結果の例の 6 行目には、出力名②に「*Acheilognathus chankaensis*」というタナゴ属の外国産種が出力されています。しかし、このアクセッション番号の配列は、エキスパートチェックにより「タイリクバラタナゴ」の配列として修正されたため、この環境 DNA 配列は「*Acheilognathus chankaensis*」ではなく、「タイリクバラタナゴ」の環境 DNA を検出したと判断されます。

出力結果例の 8 行目では、出力名②に「モツゴ」と出力されていますが、出力名④では「モツゴ / モツゴ属の一種[海外]」となっています。これはモツゴとして登録されている MiFish 配列の一部が、海外産のモツゴ属の一種「*Pseudorasbora interrupta*」とも 100%一致することから、MiFish 解析上は両者が識別できないことを示す意味で、該当する可能性のあるすべての種が出力されています。すなわち、この結果はモツゴ とモツゴ属の一種（*Pseudorasbora interrupta*）が両方生息していることを示すものではありません。国外移入種・国内移入種の最新状況等を考慮した上で、モツゴ属の一種（*Pseudorasbora interrupta*）の生息が完全に否定できると判断される場合は、「モツゴ」として単一種で表記することを制限するものではありません。なお、これと類似した出力名④として、「モツゴ / モツゴ属の一種[海外]」の他に以下の 3 つで、海外産の種を含んだ上で、該当する可能性のあるすべての種が出力されます

イチモンジタナゴ / オオイチモンジタナゴ(俗称)[海外]

ナマズ / イワトコナマズ / タニガワナマズ / ナマズ属の一種[海外]

サクラマス（ヤマメ） / サツキマス（アマゴ） / タイワンマス[海外]

※和名の後ろに[海外]とあるものは、海外産の種であることを示します。

出力結果例の 10 行目には、出力名②の「ドジョウ」が出力名④では「ドジョウ（大陸系統）」として出力されています。これは、エキスパートチェックの結果から、松井・中島(2020)で報告されているドジョウの在来系統と大陸系統が MiFish 解析から判別できる可能性が高いと考えられることから、系統情報が付与された和名として修正されたものが出力されています。なお、系統を識別する必要がない場合は、「ドジョウ」として表記することを制限するものではありません。

14 行目のヨシノボリ類のように、そのアクセッション番号の MiFish 配列と一致したときに該当す

る可能性のある種が、非常に多い場合があります。そうした場合、表記上の工夫として、例えば分析結果表内では「ヨシノボリ属」として簡略的に表記し、分析結果表の欄外の注釈欄に、「ヨシノボリ属」に該当する出力名④で出力されたすべての和名（もしくは学名）を明記する方法も考えられます。

引用文献

- 1) 本村浩之（2022）日本産魚類全種目録. これまでに記録された日本産魚類全種の現在の標準和名と学名, Online ver.13.
<https://www.museum.kagoshima-u.ac.jp/staff/motomura/jaf.html>
- 2) 松井彰子・中島淳（2020）大阪府におけるドジョウの在来および外来系統の分布と形態的特徴にもとづく系統判別法の検討.
大阪市立自然史博物館研究報告, 74:1-15.

(5) MiFish リファレンスデータベースのその他の活用方法

MiFish リファレンスデータベースは、MiFish 法に係る誤同定チェックシートの参照データベースとしてだけでなく、その他にも活用方法が考えられます。

1 つは、相同性検索（BLAST 検索）用のデータベースとして利用する方法です。この MiFish リファレンスデータベースは、個別の登録情報に対して、専門家のチェックによる信頼度ランクが付与されています。したがって、例えば AA や Ex ランクの配列情報だけを別途抜き出して、独自にデータベース化し、そのデータセットに対して BLAST 検索を行うことで、より簡単に正確な同定結果が得られる可能性があります。ただし、この活用方法は、自身で BLAST 検索を行う技術と知識をお持ちの方に限定されます。

もう 1 つの活用方法としては、MiFish 解析で使用されているユニバーサルプライマーのミスマッチの有無やミスマッチ数の確認を行うために必要な情報を取得することができます。MiFish リファレンスデータベースの EC 列には、プライマーのアニーリング領域を含んだ MiFish 配列を出力しています。この情報を抜き出すことで、個別の種や分類群に対するミスマッチの有無やミスマッチ数の確認を行うことができます。そのため、環境 DNA 調査の際に問題となることがある「プライマーのミスマッチに起因する偽陰性」の検討に活用することが可能となります。なお、EC 列が「0」となっているアクセッション番号は、その登録情報自体にプライマーのアニーリング領域が含まれていないことを示しています。

(6) 免責事項

本資料及び MiFish リファレンスデータベースの情報は、細心の注意を払い作成したのですが、その正確性や内容等について、環境省が保証するものではありません。環境省は、利用者が本資料の情報をを用いて行う一切の行為（資料の一部を編集・加工等した情報を利用することを含む）について、何ら責任を負うものではありません。

(7) 著作権

本資料の著作権は、下記ホームページの「生物多様性センター ウェブサイト利用規約」に準じます。
環境省自然環境局生物多様性センターホームページ URL :

http://www.biodic.go.jp/copyright/terms_of_service.html

環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）

第 1 版

発行日 令和 6（2024）年 5 月

編集・発行

環境省自然環境局生物多様性センター

〒403-0005 山梨県富士吉田市上吉田剣丸尾 5597-1

Tel : 0555-72-6033

URL: <https://www.biodic.go.jp/>

制作

■環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 1 版（2020 年 6 月公表）

一般財団法人九州環境管理協会

〒813-0004 福岡県福岡市東区松香台 1-10-1

Tel : 092-662-0410（代表） Fax : 092-662-0424

URL: <http://www.keea.or.jp/>

株式会社地域環境計画東京支社

〒154-0015 東京都世田谷区桜新町 2-22-3 NDS ビル

Tel : 03-5450-3700 Fax : 03-5450-3701

URL: <http://www.chiikan.co.jp>

■環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き

第 2 版（2021 年 7 月公表）、改訂第 2 版（2022 年 6 月公表）、第 3 版（2023 年 6 月公表）

いであ株式会社

〒154-8585 東京都世田谷区駒沢 3-15-1

Tel : 03-4544-7600 Fax : 03-4544-7700

URL : <https://ideacon.jp/>

■環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）

第 1 版（2024 年 5 月公表）

一般財団法人自然環境研究センター

〒130-8606 東京都墨田区江東橋 3-3-7

Tel : 03-6659-6310 Fax : 03-6659-6320

URL : <http://www.jwrc.or.jp/>

※「環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）第 1 版」は「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 3 版」の「3. 調査計画」に「3-3-2.両生類編」を加え、その他の箇所に両生類についての内容を追記、一部用語の統一化、一部構成の微修正をしたものであり、淡水魚類に関する内容は「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第 3 版」と同様のものになります。

＜特集＞環境DNAを用いた環境調査の現状と展望

マクロ生物調査のための環境DNA分析

—種の検出と定量およびその他の応用における可能性と課題—

深谷 肇一

(国立環境研究所 生物多様性領域)

1. はじめに

水や土壌、空気などの環境中から抽出されるDNAのことを環境DNAと呼ぶ¹⁾。その実態は、様々な生物に由来する、多様な状態で存在するDNAが混ざったものである。環境中に生息する微生物そのものや、マクロ生物の体から環境中に遊離した組織の一部や細胞など、または細胞から遊離した状態で存在するDNA分子などが含まれる。環境DNA分析は、こうした環境DNAを集めて分析することで、生物の分布や遺伝情報、生理状態などの手がかりを得るための手法である。環境DNA分析はもともと、環境中の微生物や、安定環境下で長期保存された古生物のDNAを対象に行われていたが、近年は現生のマクロ生物への応用が大きく発展した。フランスのウシガエル個体群を対象に環境DNA分析の適用可能性を示した研究²⁾が発表されて以降、魚類や哺乳類、昆虫などの無脊椎動物、植物などを含む幅広い分類群に環境DNA分析が応用されている³⁻⁴⁾。マクロ生物の環境DNA分析は、対象種の目視や捕獲などによって行われてきた従来の生物調査に比べて、簡便で感度の高い、また生態系への影響が少ない新たな調査方法として、その利用が急速に拡大している。ここでは、現生のマクロ生物を対象とした、主に水域での環境DNA分析の応用に焦点を当て、その現状と課題を述べる。環境DNA分析の技術的な詳細については他の解説やマニュアルなど(例えば文献 5-6))を参照してほしい。

2. 環境DNA分析の手順とアプローチ

環境DNA分析を行うためには、まず水などの環境試料を収集し、試料に含まれるDNAを抽出して分析用のサンプルを生成する必要がある。手順の詳細は試料の種類などによって異なるが、例えば河川水を対象とする場合は、1L程度の水をフィルターでろ過した後、フィルターからDNAを抽出して精製する。こうして得られるサンプルの中には、河川水に含まれていた環境DNAが濃縮され、純度が高められた状態で存在するため、遺伝子実験によるDNA分析に供することができる。

サンプル中のDNAの分析方法として、PCRを用いて短いDNA配列を増幅するアプローチが広く用いられている。増幅の標的となるDNA配列はミトコンドリアDNAや葉緑体DNAの特定の遺伝子領域(例えばミトコンドリアの場合は、COIやcytb, 12S rRNAなど)に含まれる100~400bp程度であることが多いが、核DNAの配列を標的とする場合もある。PCRを用いた環境DNAの分析手法は、単一の種のDNA配列のみを増幅して検出する種特異的的手法と、多数の種のDNA配列を同時に増幅してその配列を決定する網羅的手法の2つに大別される。

種特異的手法では、対象種のDNA配列のみを選択的に増幅するように設計された種特異的プライマーを用いてPCRを行うことで、サンプルに含まれる対象種のDNA配列を検出する。リアルタイムPCRやデジタルPCRなどの定量性の高いPCR法が利用されることが多く、しばしば対象種のDNA配列の濃度(単位試料体積当たりの配列コピー数など)が定量的に計測される。

網羅的手法では、対象の分類群のDNA配列をまとめて増幅するように設計されたユニバーサルプライマーを用いてPCRを行う。増幅されたDNAの配列を次世代シーケンサーを用いて決定し、データベースに登録された既知の種のDNA配列と照合することで、DNA配列がサンプルに含まれる種を特定する。環境DNAとして存在する特定の遺伝子領域のDNA配列(DNAバーコード)を一度に多数読み取ることから、このアプローチは環境DNAメタバーコーディングと呼ばれている⁷⁾。ただしこの方法では、データベースに配列が登録されていないなどの理由により、検出されたDNA配列を種に割り当てられない場合も生じうる。

2つの手法は一般に、目的などに応じて使い分けられる。種特異的手法は、簡便かつ迅速な分析手順によって対象種のDNAを感度良く検出・定量でき、少数の種に着目した個体群レベルの研究やモニタリングに適している。一方、網羅的手法は、少ない労力で生息種の一覧を作成でき、群集レベルの研究やモニタリングに適している。

3. 環境DNA分析の応用

3.1 種の分布と多様性の評価

環境DNA分析は、周辺環境における種の生息（在・不在）を確認する目的で広く利用されている。環境DNA分析は種を高い感度で検出できることから、特に個体密度の低い種の調査において従来手法より有効である。この特徴は希少種の生息地の把握や外来生物の分布拡大の監視などにおいて重要であり、生物多様性保全や生態系管理の取り組みを効率化できる⁸⁻⁹⁾。また環境DNA分析は、生息環境へのアクセスが困難であるなどの理由により発見や観察が難しい種の調査においても高い効果を発揮し、研究の進んでいない種の生態の解明にも役立つと考えられる¹⁰⁻¹¹⁾。さらに環境DNA分析は、野外で求められる作業が簡便で広域・多地点での調査も比較的容易に実施できることから、種の分布評価や生物多様性モニタリングの規模や密度を向上できる。

環境DNA分析によって示唆される種の分布や多様性は、一般に、捕獲などの従来手法による調査の結果と大きくは矛盾しないと考えられ（例えば文献 12)）、環境DNA分析による種検出の有効性や妥当性は現在では広く受け入れられている。しかし、環境DNA分析では、種の生息について誤った認識につながる可能性のある検出誤差が生じうることには注意が必要である。種の検出誤差には、生息する種（の環境DNA）が検出されない偽陰性と、生息しない種（の環境DNA）が検出される偽陽性がある。偽陰性と偽陽性は環境DNA分析の様々な段階で生じる可能性がある¹³⁻¹⁴⁾。例えば、野外での試料収集の段階では、DNA濃度の不均一性が原因で偽陰性が生じることや、上流からのDNAの輸送や生活排水などによるDNAの流入が原因で偽陽性が生じることなどが考えられる。遺伝子実験の段階では、サンプルにPCR阻害物質が含まれることが原因で偽陰性が生じることや、サンプル処理の過程におけるコンタミネーションが原因で偽陽性が生じることなどが考えられる。次世代シーケンサーによる配列決定を行う網羅的手法では、PCR増幅効率の種間不均一性や、シーケンスエラー、不十分なシーケンス深度、塩基配列データベースの不完全性などが検出誤差の要因となりうる。

検出誤差は必ずしも環境DNA分析に固有の問題ではないが、対象種の生息を直接確認しない環境DNA分析では、検出誤差の発生を最小限に抑えることに加えて、データに誤差が含まれる可能性を考慮して注意深く結果を解釈することが重要である。検出誤差の発生を最小化するための取り組みとして、環境DNA分析の手順やバイオインフォマティクス解析の高度化と最適化が進められている¹⁵⁻¹⁶⁾。検出誤差を含むデータから種の分布を確実に評価するための方法として、検出誤差を考慮した統計解析手法が提案されている¹⁷⁻¹⁸⁾。

3.2 種の個体群サイズの評価

種の個体数や個体密度、または生物量（これらは種個体群の異なる特性であるが、以下ではまとめて個体群サイズと呼ぶ）の評価に環境DNA分析を利用する試みも進められている。種特異的手法を用いた研究では、環境DNAの濃度と種の個体群サイズの間に正の相関関係が広く見出されており¹⁹⁻²⁰⁾、環境DNAの濃度は周辺環境に生息する種の個体群サイズを大まかには反映するものと考えられる。しかし、この相関関係は、制御された実験環境に比べて、自然環境ではより不明瞭である¹⁹⁾。これは、環境DNAの放出や分解、輸送の過程が野外では様々に異なり、環境DNA濃度と個体群サイズの関係がより複雑であるためと考えられる¹⁹⁻²⁰⁾。そのため、自然環境で種の個体群サイズを確実に評価するためには、環境DNAの濃度を規定する要因として、水の流れ、種の空間分布や体サイズ分布、温度などの環境因子の影響を（それが重要な場合には）明示的に考慮したサンプリングと解析を行う必要がある²¹⁾。これらの要因を考慮せず、計測された環境DNA濃度を単純に個体群サイズの指標とみなすと、誤った結論に至る可能性がある。

一部の先行研究では、種特異的手法によって定量された環境DNA濃度から魚類の個体群サイズが推定されている。文献 22)は、個体群サイズと環境DNA濃度の相関関係（ただし体サイズの違いによる個体のDNA放出率の不均一性を考慮したもの）に基づき、カナダにある12 haほどの広さの湖に生息するカワマス（*Salvelinus fontinalis*）の個体数を3,286匹、その全体の生物量を143kgとそれぞれ推定した。文献 23)は、水の流れ、DNAの個体当たり放出率、分解率などを考慮した統計モデルを用いて、舞鶴湾に生息するマアジ（*Trachurus japonicus*）の個体数を2,230万匹と推定した。これらの応用では、環境DNA濃度のデータに加えて、体サイズ分布や、対象水域における水の流れ、放出率、分解率などに関する情報が推定のために追加で取得されている。少なくとも現在のところ、個体群サイズの絶対的な定量を目的とした用途では、環境DNA分析は従来の資源評価手法と比較して必ずしも性能や利便性が高いわけではない。

網羅的手法では、次世代シーケンサーで読み取られた種ごとのDNA配列の数（リード数と呼ばれる）がデータとして得られる。リード数は環境DNA分子の濃度を定量するものではない。また、ユニバーサルプライマーによるPCRの増幅効率は一般に種によって異なるため、各種のリード数の多寡をもって種の個体群サイズの大小を比較できるとも限らない。しかし経験的には、種の配列のリード数は群集における種の相対個体群サイズと相関することが多いようである²⁰⁾。また、最近では網羅的手法におい

てもDNA配列の濃度を定量可能な新しい技術がいくつか提案されている²⁴⁻²⁵⁾。こうした技術は同時に多数の種の環境DNAを定量できるため、種の個体群サイズを評価するための効果的で新しいアプローチとなるかもしれない。しかし、上で述べたように、環境DNAの濃度計測に基づき種の個体群サイズを確実に推定するためには、野外における様々な生物的・非生物的要因を考慮することが重要であり、これは多くの種が関係する場合には一層難しい問題となることが予想される。網羅的手法による種の個体群サイズの評価は今後の課題である。

4. 関連する技術発展と応用の広がり

4.1 水以外の環境試料の分析

水環境中の堆積物からは、水中の環境DNAの一部が沈降したものと考えられるDNAが検出される。堆積物中の環境DNAは、水中の環境DNAに比べて高濃度で存在し、また分解が制限されることで長期間に渡り検出可能な状態で残存する²⁶⁻²⁷⁾。堆積物コアの環境DNA分析では、異なる年代の試料を連続的に分析することで過去の個体群動態や生物相の変化を復元できる。例えば、別府湾の海底堆積物コアを分析した研究では、カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*)、マイワシ (*Sardinops melanostictus*)、マアジの各種について、過去300年間におよび資源量の変化が推定されている²⁸⁾。古生物学の研究では、極地で収集された湖底堆積物コアの環境DNA分析により、過去数万年におよぶ生態系の変化が推測されている²⁹⁾。

空気中の環境DNAを分析した研究では、脊椎動物³⁰⁻³¹⁾、昆虫³²⁾、植物³³⁾などが検出されている。現在のところ空気中の環境DNAを分析した事例は限られているが、今後、手法の最適化が進むことで陸域での環境DNA分析の活用が広がるかもしれない。花や葉の食痕に付着した節足動物の環境DNAを分析することで、送粉や植食など、植物と昆虫の相互作用の手がかりが得られる³⁴⁻³⁵⁾。

4.2 遺伝的多様性の評価

環境DNA分析で種内の遺伝的変異を検出することもできる。例えば、日本のコイ (*Cyprinus carpio*) の個体群では、在来集団とユーラシア大陸産外来集団それぞれの遺伝子型の存在比を定量する手法が開発され、外来集団の侵入状況の広域評価や集団ごとの季節移動パターンの解明に利用されている³⁶⁻³⁷⁾。また、次世代シーケンサーを用いた集団のハプロタイプ多様性の評価も行われている³⁸⁻⁴⁰⁾。正確な評価のためにはPCRエラーやシーケンスエラーにより生じる偽陽性ハプロタイプを除去することが重要であるが、陽性対照の設定、デノイジング手法の適用、分子バーコードの利用など、いくつかの対処法が提案さ

れている^{38, 41-42)}。解決すべき技術的課題も多いが⁴³⁻⁴⁴⁾、組織サンプルの取得を必要としない簡便さは環境DNA分析の大きな利点と考えられる。将来的に、系統地理学研究や野生生物集団の遺伝的多様性モニタリングなどにおいて環境DNA分析が活用されるかもしれない。

4.3 環境RNA分析

マクロ生物の体からは、DNA分子に加えて、メッセンジャーRNAなどのRNA分子も周辺環境に放出されていると考えられる⁴⁵⁾。環境DNAと同様に、環境中に遊離したRNA分子（環境RNA）を対象とした分析も行うことができる。死んだ個体から放出される可能性があるDNAとは対照的に、RNAは代謝活性の高い生きた個体からのみ放出され、また環境中では速やかに分解されると考えられる。そのため、環境RNA分析を用いることで、環境DNA分析よりも種の検出を正確に行えるようになることが期待される⁴⁵⁾。河川における魚類のメタバーコーディングの事例では、調査地に生息しないはずの海水魚や汽水魚の検出が、環境RNA分析を用いることで効果的に抑制されることが示されている⁴⁶⁾。また、環境RNAは周辺環境に生息する個体の遺伝子発現に関する情報を与えることから、環境試料に基づき生物の代謝や生理を非侵襲的に評価する新しい手法の開発も期待される^{45, 47-48)}。環境DNAと環境RNAを総称して環境核酸と呼ぶ。

4.4 環境DNA分析を活用した生態系モニタリング

環境DNA分析の簡便さや感度の高さは、大きな費用や労力が必要な、広域または長期の生態系モニタリングの可能性を大きく広げている。日本では環境DNA分析を用いた生物多様性観測ネットワークであるANEMONEが組織され、研究者だけでなく企業や市民ボランティアも参加して全国規模での観測が行われている⁴⁹⁾。専門家でなくとも比較的容易にサンプリングを行えることは環境DNA分析の大きな利点である。ANEMONEではこの利点を活かして非常に多くの地点（文献 49）によれば、2022年10月時点で1000地点以上）での観測を実現している。収集されたデータはオープンデータとして公開されており、生態系保全や自然教育などへの活用が期待される。国土交通省では、全国で行われている河川・ダム生物調査（河川水辺の国勢調査）における環境DNAメタバーコーディングの適用可能性が検討されている⁵⁰⁾。今後、国や自治体による生態系モニタリングにおいても環境DNA分析の活用が進み、従来の生物調査手法による評価を補うことが期待される。また、環境DNAの収集や分析を遠隔・自動で行うための機器の開発が進められており⁵¹⁻⁵²⁾、環境DNA分析による自動化された生態系モニタリングも近い将来に実現するかも

しれない。

5. 今後の課題

現生のマクロ生物を対象とした近年の環境DNA分析の発展は目覚ましく、生態系の研究やモニタリングのための有望な手法の1つとなっている。しかし、環境DNA分析は依然として発展途上の技術であり、その応用の可能性を最大限に引き出すためには一層の研究や基盤整備が不可欠である。最後に、今後のさらなる取り組みが望まれる3つの課題を強調する。

第一に、自然環境下での環境DNAの動態について基礎的な理解を深めることが重要である。具体的には、環境DNAの生成や分解、輸送、状態について、関連する要因やメカニズムを明らかにすることが求められる⁵³⁻⁵⁴⁾。環境DNAの性質や振る舞いがよく分からないために、環境DNA分析の結果の解釈に大きな不確実性が残ることは少なくない。環境DNAそのものに対する基礎知識は、環境DNA分析の結果を背景にある生態学的過程と適切に関連付け、信頼性の高い生物多様性評価を実現する上で不可欠である。環境DNAの性質を深く理解することはまた、環境DNA分析の新しい応用にもつながるだろう。しかし、関連する研究事例は比較的少ないのが現状である⁵⁴⁾。

第二に、環境DNAの動態や、環境DNA分析に固有の誤差要因などを考慮した、環境DNA分析のためのデータ解析手法の開発が求められる^{14, 55)}。例えば、環境DNAの濃度分布に水の流れが強く影響する河川や海では、種の分布や個体群サイズを評価するためにDNAの輸送過程を組み込んだ解析が必要になるかもしれない^{23, 56)}。種の分布や多様性の評価において偽陰性や偽陽性の影響が無視できない場合には、環境DNA分析の異なる段階で生じる検出誤差を説明する統計モデルが必要だろう¹⁷⁻¹⁸⁾。こうしたモデルは、種を効率的に検出できる研究デザインの特長にも役立てられる¹⁸⁾。また、環境DNA分析と従来の調査手法の欠点を互いに補うために、両者のデータを組み合わせで解析することも有効だろう。これら2種類のデータを組み合わせた解析は、複数の異なるデータセットを同時にモデル化する枠組みを用いることで効果的に実現できる可能性がある⁹⁾。

最後に、環境DNA分析の基盤となる配列データの充実化が必要である。塩基配列データベースに登録された配列データの豊富さは、地域や分類群、バーコード領域によって大きく異なり⁵⁷⁾、配列データの登録が限られた地域や分類群では環境DNA分析の可能性を十分に活かさない可能性がある。例えば、次世代シーケンサーで決定された環境DNAの配列を既知のDNA配列と照合する環境DNAメタバーコーディングでは、既知の配列情報の利用可能性

が結果に大きく影響する。実際、日本の水生昆虫では、公共のデータベースにおけるバーコード配列データの不足によって、環境DNAメタバーコーディングの性能が著しく制限されている⁵⁸⁾。また、環境RNA分析では、マクロ生物のメッセンジャーRNA配列やトランスクリプトームデータが不足していることが、手法の開発と応用における重大な制約となっている⁴⁷⁾。生態系モニタリングなどで環境DNA分析を活用するためには、適用を目指す地域や分類群ごとに配列データの不足を戦略的に解消していくことが重要だろう。

6. 引用文献

- 1) Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg L. H : Environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**, 1789–1793, 2012
- 2) Ficetola G. F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P : Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**, 423–425, 2008
- 3) Bohmann K, Evans A, Gilbert M. T. P, Carvalho G. R, Creer S, Knapp M, Yu D. W, de Bruyn M : Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, **29**, 358–367, 2014
- 4) Thomsen P. F, Willerslev E : Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, **183**, 4–18, 2015
- 5) 土居秀幸, 近藤倫生 : 環境DNA—生態系の真の姿を読み解く—, p. 300, 共立出版, 東京, 2021
- 6) Minamoto T, Miya M, Sado T, Seino S, Doi H, Kondoh M, Nakamura K, Takahara T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Iwasaki W, Kasai A, Masuda R, Uchii K : An illustrated manual for environmental DNA research : water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, **3**, 8–13, 2021
- 7) Miya M : Environmental DNA metabarcoding : a novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. *Annual Review of Marine Science*, **14**, 161–185, 2022
- 8) Mizumoto H, Mitsuzuka T, Araki H : An environmental DNA survey on distribution of an endangered salmonid species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**, 569425, 2020
- 9) Keller A. G, Grason E. W, McDonald P. S, Ramón-Laca A, Kelly R. P : Tracking an invasion front with

- environmental DNA. *Ecological Applications*, **32**, e2561, 2022
- 10) Wada T, Doi H, Togaki D, Kaida R, Nagano M, Katano I, Suzuki M, Ohtani T, Mitsuhashi H: Exploring a legendary giant squid: an environmental DNA approach. *Marine Biology*, **167**, 160, 2020
- 11) Fujiwara Y, Tsuchida S, Kawato M, Masuda K, Sakaguchi S.O, Sado T, Miya M, Yoshida T: Detection of the largest deep-sea-endemic teleost fish at depths of over 2,000 m through a combination of eDNA metabarcoding and baited camera observations. *Frontiers in Marine Science*, **9**, 945758, 2022
- 12) Nakagawa H, Yamamoto S, Sato Y, Sado T, Minamoto T, Miya M: Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology*, **63**, 569–580, 2018
- 13) Zhan A, MacIsaac H. J.: Rare biosphere exploration using high-throughput sequencing: research progress and perspectives. *Conservation Genetics*, **16**, 513–522, 2015
- 14) Burian A, Mauvisseau Q, Bulling M, Domisch S, Qian S, Sweet M: Improving the reliability of eDNA data interpretation. *Molecular Ecology Resources*, **21**, 1422–1433, 2021
- 15) Tsuji S, Takahara T, Doi H, Shibata N, Yamanaka H: The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—a review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, **1**, 99–108, 2019
- 16) Mathon L, Valentini A, Guérin P.-E, Normandeau E, Noel C, Lionnet C, Boulanger E, Thuiller W, Bernatchez L, Mouillot D, Dejean T, Manel S: Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification. *Molecular Ecology Resources*, **21**, 2565–2579, 2021
- 17) Guillera-Arroita G, Lahoz-Monfort J. J., van Rooyen A. R., Weeks A. R., Tingley R: Dealing with false-positive and false-negative errors about species occurrence at multiple levels. *Methods in Ecology and Evolution*, **8**, 1081–1091, 2017
- 18) Fukaya K, Kondo N. I., Matsuzaki S.-I. S., Kadoya T: Multispecies site occupancy modelling and study design for spatially replicated environmental DNA metabarcoding. *Methods in Ecology and Evolution*, **13**, 183–193, 2022
- 19) Yates M. C., Fraser D. J., Derry A. M.: Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, **1**, 5–13, 2019
- 20) Rourke M. L., Fowler A. M., Hughes J. M., Broadhurst M. K., DiBattista J. D., Fielder S., Wilkes Walburn J., Furlan E. M.: Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: a review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, **4**, 9–33, 2022
- 21) Yates M. C., Cristescu M. E., Derry A. M.: Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a means to monitor freshwater macro-organism abundance. *Molecular Ecology*, **30**, 6531–6550, 2021
- 22) Yates M. C., Glaser D. M., Post J. R., Cristescu M. E., Fraser D. J., Derry A. M.: The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, **30**, 3068–3082, 2021
- 23) Fukaya K, Murakami H, Yoon S, Minami K, Osada Y, Yamamoto S, Masuda R, Kasai A, Miyashita K, Minamoto T, Kondoh M: Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, **30**, 3057–3067, 2021
- 24) Hoshino T, Inagaki F: Application of stochastic labeling with random-sequence barcodes for simultaneous quantification and sequencing of environmental 16S rRNA genes. *PLoS ONE*, **12**, e0169431, 2017
- 25) Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M: Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, **2**, e23297, 2018
- 26) Turner C. R., Uy K. L., Everhart R. C.: Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, **183**, 93–102, 2015
- 27) Sakata M. K., Yamamoto S., Gotoh R. O., Miya M, Yamanaka H, Minamoto T: Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, **2**, 505–518, 2020
- 28) Kuwae M, Tamai H, Doi H, Sakata M. K., Minamoto T, Suzuki Y: Sedimentary DNA tracks decadal-centennial changes in fish abundance. *Communications Biology*,

- 3, 558, 2020
- 29) Wang Y, Pedersen M.W, Alsos I.G, De Sanctis B, Racimo F, Prohaska A, Coissac E, Owens H.L, Merkel M.K.F, Fernandez-Guerra A, Rouillard A, Lammers Y, Alberti A, Denoeud F, Money D, Ruter A.H, McColl H, Larsen N.K, Cherezova A.A, Edwards M.E, Fedorov G.B, Haile J, Orlando L, Vinner L, Korneliussen T.S, Beilman D.W, Bjørk A.A, Cao J, Dockter C, Esdale J, Gusarova G, Kjeldsen K.K, Mangerud J, Rasic J.T, Skadhauge B, Svendsen J.I, Tikhonov A, Wincker P, Xing Y, Zhang Y, Froese D.G, Rahbek C, Nogues Bravo D, Holden P.B, Edwards N.R, Durbin R, Meltzer D.J, Kjær K.H, Möller P, Willerslev E : Late Quaternary dynamics of Arctic biota from ancient environmental genomics. *Nature*, **600**, 86-92, 2021
- 30) Clare E.L, Economou C.K, Bennett F.J, Dyer C.E, Adams K, McRobie B, Drinkwater R, Littlefair J.E : Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, **32**, 693-700, 2022
- 31) Lynggaard C, Bertelsen M.F, Jensen C.V, Johnson M.S, Frøslev T.G, Olsen M.T, Bohmann K : Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology*, **32**, 701-707, 2022
- 32) Roger F, Ghanavi H.R, Danielsson N, Wahlberg N, Löndahl J, Pettersson L.B, Andersson G.K.S, Boke Olén N, Clough Y : Airborne environmental DNA metabarcoding for the monitoring of terrestrial insects—a proof of concept from the field. *Environmental DNA*, **4**, 790-807, 2022
- 33) Johnson M.D, Fokar M, Cox R.D, Barnes M.A : Airborne environmental DNA metabarcoding detects more diversity, with less sampling effort, than a traditional plant community survey. *BMC Ecology and Evolution*, **21**, 218, 2021
- 34) Thomsen P.F, Sigsgaard E.E : Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution*, **9**, 1665-1679, 2019
- 35) Kudoh A, Minamoto T, Yamamoto S : Detection of herbivory : eDNA detection from feeding marks on leaves. *Environmental DNA*, **2**, 627-634, 2020
- 36) Uchii K, Doi H, Minamoto T : A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources*, **16**, 415-422, 2016
- 37) Uchii K, Doi H, Yamanaka H, Minamoto T : Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA. *Ecology and Evolution*, **7**, 8515-8522, 2017
- 38) Parsons K.M, Everett M, Dahlheim M, Park L : Water, water everywhere : environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *Royal Society Open Science*, **5**, 180537, 2018
- 39) Sigsgaard E.E, Nielsen I.B, Bach S.S, Lorenzen E.D, Robinson D.P, Knudsen S.W, Pedersen M.W, Jaidah M.A, Orlando L, Willerslev E, Möller P.R, Thomsen P.F : Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology and Evolution*, **1**, 4, 2016
- 40) Tsuji S, Maruyama A, Miya M, Ushio M, Sato H, Minamoto T, Yamanaka H : Environmental DNA analysis shows high potential as a tool for estimating intraspecific genetic diversity in a wild fish population. *Molecular Ecology Resources*, **20**, 1248-1258, 2020
- 41) Tsuji S, Miya M, Ushio M, Sato H, Minamoto T, Yamanaka H : Evaluating intraspecific genetic diversity using environmental DNA and denoising approach : a case study using tank water. *Environmental DNA*, **2**, 42-52, 2020
- 42) Yoshitake K, Fujiwara A, Matsuura A, Sekino M, Yasuie M, Nakamura Y, Nakamichi R, Kodama M, Takahama Y, Takasuka A, Asakawa S, Nishikiori K, Kobayashi T, Watabe S : Estimation of tuna population by the improved analytical pipeline of unique molecular identifier-assisted HaCeD-Seq (haplotype count from eDNA). *Scientific Reports*, **11**, 7031, 2021
- 43) Adams C.I.M, Knapp M, Gemmell N.J, Jeunen G.-J, Bunce M, Lamare M.D, Taylor H.R : Beyond biodiversity : can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool?. *Genes*, **10**, 192, 2019
- 44) Sigsgaard E.E, Jensen M.R, Winkelmann I.E, Möller P.R, Hansen M.M, Thomsen P.F : Population-level inferences from environmental DNA—current status and future perspectives. *Evolutionary Applications*, **13**, 245-262, 2020
- 45) Cristescu M.E : Can environmental RNA revolutionize biodiversity science?. *Trends in Ecology and Evolution*, **34**, 694-697, 2019
- 46) Miyata K, Inoue Y, Amano Y, Nishioka T, Yamane M, Kawaguchi T, Morita O, Honda H : Fish environmental

- RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, **128**, 107796, 2021
- 47) Tsuru K, Ikeda S, Hirohara T, Shimada Y, Minamoto T, Yamanaka H: Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): a case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates. *Environmental DNA*, **3**, 14–21, 2021
- 48) Yates M. C, Derry A. M, Cristescu M. E: Environmental RNA: a revolution in ecological resolution?. *Trends in Ecology and Evolution*, **36**, 601–609, 2021
- 49) ANEMONE: ANEMONE, <https://anemone.bio/> (2022. 11. 22アクセス)
- 50) 北川哲郎, 村岡敬子, 山田拓也, 中村圭吾: 河川水辺の国勢調査(魚類)における環境DNAメタバーコーディング解析の試行事例分析. 河川技術論文集, **26**, 319–324, 2020
- 51) Yamahara K. M, Preston C. M, Birch J, Walz K, Marin III R, Jensen S, Pargett D, Roman B, Ussler III W, Zhang Y, Ryan J, Hobson B, Kieft B, Raanan B, Goodwin K. D, Chavez F. P, Scholin C: In situ autonomous acquisition and preservation of marine environmental DNA using an autonomous underwater vehicle. *Frontiers in Marine Science*, **6**, 373, 2019
- 52) Hansen B. K, Jacobsen M. W, Middelboe A. L, Preston C. M, Marin III R, Bekkevold D, Knudsen S. W, Møller P. R, Nielsen E. E: Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific Reports*, **10**, 13272, 2020
- 53) Barnes M. A, Turner C. R: The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, **17**, 1–17, 2016
- 54) Jo T, Takao K, Minamoto T: Linking the state of environmental DNA to its application for biomonitoring and stock assessment: targeting mitochondrial/nuclear genes, and different DNA fragment lengths and particle sizes. *Environmental DNA*, **4**, 271–283, 2022
- 55) Harrison J. B, Sunday J. M, Rogers S. M: Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **286**, 20191409, 2019
- 56) Carraro L, Hartikainen H, Jokela J, Bertuzzo E, Rinaldo A: Estimating species distribution and abundance in river networks using environmental DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, 11724–11729, 2018
- 57) Weigand H, Beermann A. J, Čiampor F, Costa F. O, Csabai Z, Duarte S, Geiger M. F, Grabowski M, Rimet F, Rulik B, Strand M, Szucsich N, Weigand A. M, Willassen E, Wyler S. A, Bouchez A, Borja A, Čiamporová-Zaťovičová Z, Ferreira S, Dijkstra K. -D. B, Eisendle U, Freyhof J, Gadawski P, Graf W, Haegerbaeumer A, van der Hoorn B. B, Japoshvili B, Keresztes L, Keskin E, Leese F, Macher J. N, Mamos T, Paz G, Pešić V, Pfannkuchen D. M, Pfannkuchen M. A, Price B. W, Rinkevich B, Teixeira M. A. L, Várбірó G, Ekrem T: DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: gap-analysis and recommendations for future work. *The Science of the Total Environment*, **678**, 499–524, 2019
- 58) Miyata K, Inoue Y, Amano Y, Nishioka T, Nagaike T, Kawaguchi T, Morita O, Yamane M, Honda H: Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis of river algae and arthropods for ecological surveys and water quality assessment. *Scientific Reports*, **12**, 19828, 2022

環境 DNA 調査・実験マニュアル

Ver. 2.2 (2020 年 4 月 3 日発行)

一般社団法人環境 DNA 学会

© 2020 一般社団法人環境 DNA 学会

© 2020 The eDNA Society

目次

1. はじめに	3
2. 調査地点の選定	6
2-1. 河川における調査地点の選定	6
2-2. 池や湖沼における調査地点の選定	8
2-3. 海岸における調査地点の選定	9
3. 採水および濾過	12
3-1. 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過	13
3-1-1. フィールドデータの記録	15
3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過	15
3-1-3. アスピレーターを用いた現場濾過	17
3-2. 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過	26
3-2-1. フィールドデータの記録	27
3-2-2. 採水および実験室への輸送	28
3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過	29
4. DNA の抽出	33
4-1. カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出	34
4-1-1. 実験の準備	35
4-1-2. RNAlater の吸引	35
4-1-3. DNA の抽出	36
4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kit を用いた DNA の精製	37
4-2. グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出	47
4-2-1. 実験の準備	47

4-2-2. タンパク質の分解処理	48
4-2-3. DNeasy カラムを用いた DNA の精製	48
5. DNA の分析	57
5-1. リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的な検出・定量	57
5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計	57
5-1-2. リアルタイム PCR 実験	58
5-2. MiFish メタバーコーディング	61
5-2-1. ライブラリーの調整ー 1 : 1st PCR	61
5-2-1-1. 1st PCR	64
5-2-1-2. 1st PCR 産物の精製と濃縮	65
5-2-1-3. 精製・濃縮済み 1st PCR 産物の定量と希釈	67
5-2-2. ライブラリーの調整ー 2 : 2nd PCR	69
5-2-2-1. 2nd PCR	71
5-2-2-2. 2nd PCR 産物の切り出し	73
5-2-2-3. 切り出した 2nd PCR 産物の定量	75
5-2-2-4. インデクス関連情報	76
5-2-3. MiSeq を用いた超並列シーケンス	77
5-2-3-1. MiSeq のメンテナンス	78
5-2-3-2. シーケンスの下準備	81
5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整	82
5-2-3-4. シーケンス開始前後の操作	83

1. はじめに

本マニュアルは環境 DNA 分析手法の普及と標準化を目的として作成された。ここに記された内容は 2020 年（令和 2）年 4 月現在の最新情報であるが、環境 DNA 分析技術は日進月歩のため、常に最新のマニュアル（本マニュアルのアップデート版）を参照することが重要となる。最新のマニュアルは環境 DNA 学会の web ページ（<http://ednasociety.org/>）からダウンロードできる。

環境 DNA 分析は一般的に採水、濾過による環境 DNA の濃縮および抽出、分子生物学的な検出実験といった流れで行われる。環境 DNA の濃縮および抽出法には主として二種類の手法が用いられている。ひとつはカートリッジ式のフィルターを用いた手法、もうひとつはグラスファイバーフィルターを用いた手法である。本マニュアルでは両手法を併記する。また、環境 DNA 検出のための分子生物学的な実験手法としては、リアルタイム PCR を用いた種特異的な「単一種検出法」と、環境 DNA メタバーコーディング手法と呼ばれる特定の分類群（例えば魚類）の次世代シーケンサーを用いた超並列的な「多種同時検出法」がよく用いられる。単一種検出法では特定の対象種を精度良く安価に検出できると考えられる一方で、対象種ごとに検出系を設計する手間がかかる。多種同時検出法では単一種検出法に比べると手間と費用がかかるものの、多種の情報をまとめて得られるという利点がある。このように、単一種検出法と多種同時検出法は相互補完的に用いられる技術である。本マニュアルでは、単一種検出法に関する一般的な事項を記述するとともに、MiFish プライマーを用いた魚類の網羅的検出法に関する具体的な分析法について詳細に記述する。

なお、本マニュアルには標準的な手法を記載しているが、各分析者による感度改善や手間の削減などを目的とした工夫を妨げるものではない。

環境 DNA 分析全体の注意事項

環境 DNA 分析は、環境中の極微量な対象 DNA をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で分析可能な量に増幅して検出・定量する技術である。そのため、組織サンプルに由来する DNA や PCR によって得られた増幅産物のような高濃度の DNA によるコンタミネーション（汚染）は結果に取り返しのつかない影響を及ぼすことが多々ある。確度の高い環境 DNA 分析の実施は、コンタミネーションとの戦いであると言っても良い。そのために、以下のような点に

特に注意する必要がある。

- 1) 実験環境の整備：環境サンプルのような「薄い」DNA を扱う部屋と、PCR 産物のような「濃い」DNA を扱う部屋を物理的に隔離することが重要である。また、実験実施日において作業者は「薄い」DNA を扱う部屋から「濃い」DNA を扱う部屋へと一方通行で作業を行うことを厳守し、コンタミネーションの危険性を可能な限り低減するべきである。
- 2) DNA フリー器具の使用：実験に使う器機は未使用の新品、または残留 DNA を完全にデコンタミネーション（除染）したものを用いる。デコンタミネーションには次亜塩素酸ナトリウム溶液（例えば、0.1%濃度）への浸漬が有効である。ピペットやチューブラックなどについては、紫外線照射による除染も有効である。オートクレーブは有効であるが、廃液や廃棄物などと同じ機器を用いることは避けたほうが良い。
- 3) 手袋の着用：作業時に触れるあらゆるものからコンタミネーションの危険性があるため、清浄な表面を保つために医療用ゴム手袋などの手袋を着用する必要がある。野外サンプルの採取から DNA 測定までの全工程にわたって手袋を着用し、自らの DNA あるいは手についた食品等に由来する DNA によるコンタミネーションを防ぐ。作業中に手袋にサンプルや試薬等が付着したときにはこまめに交換する。
- 4) フィルターチップの使用：マイクロピペットを介したコンタミネーションを防ぐために、フィルター付きチップの使用が必須である。
- 5) DNA 低吸着製品の使用：DNA は通常のプラスチック製品に吸着する性質があるため、特に保存などには低吸着のマイクロチューブ（Eppendorf 社の DNA LoBind Tube など）などの製品を使用することを推奨する。
- 6) 部屋や機器の清浄：マイクロピペットなどの実験器具、遠心機などの機器類を介したコンタミネーションがありうるので、定期的な洗浄を行うことを推奨する。実験室の掃除も重要である。

本マニュアルに関わる権利と責任の所属について

本マニュアルは一般社団法人環境 DNA 学会の標準化委員会委員および環境 DNA 技術の専門家が参集して作成した。本マニュアルの著作権は一般社団法人環境 DNA 学会に、記載内容に関する責任は、環境 DNA 学会および環境 DNA 技術標準化委員会にある。

環境 DNA 技術標準化委員会（括弧内は担当内容）

委員長 源 利文 神戸大学大学院人間発達環境学研究科（全体の編集、および
1 章、2-2 項、3-1 項、4-2 項、5-2 項の執筆）

委員 近藤 倫生 東北大学大学院生命科学研究科（査読）

（五十音順） 清野 聡子 九州大学大学院工学研究院（2-1 項、2-3 項の執筆）

高原 輝彦 島根大学生物資源科学部（査読）

土居 秀幸 兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科（査読）

中村 圭吾 土木研究所水環境研究グループ（査読）

宮 正樹 千葉県立中央博物館 生態・環境部（3-1 項、4-1 項、5-2 項
の執筆）

山中 裕樹 龍谷大学理工学部（査読）

委員外執筆者 佐土 哲也 千葉県立中央博物館（3-1 項、4-1 項、5-2 項の執筆）

（五十音順） 山本 哲史 京都大学大学院理学研究科（査読）

なお、本マニュアルは環境 DNA 学会の資金により作成された。本委員会は本文の作成について独立した権限を有する。

2. 調査地点の選定

全般的な注意事項

魚市場、店舗、食堂などの産業系の排水には、魚類をはじめとする水生生物の DNA が含まれている可能性が高く、環境 DNA 分析結果の解釈を困難にする原因となる。住宅からの生活排水も同様である。したがって、用排水路、下水処理場、導水路からの流入の影響を受けにくい地点を選ぶことが重要である。特に、下水処理施設は放流量が大きいいため、調査結果への影響が懸念される。処理水の放流口（処理施設と離れていることもある）を確認し、その近傍を避けるようにする。調査地点の選定の際、商業施設や市街地、住宅地は、予め地図や、国土地理院や民間のウェブサイトなどの空中写真からも判別できることが多い。また現地についてからも目視で判断が可能である。

一方、地図や現地の概観的な目視では検出できない施設も要注意である。排水口は堤防下や護岸壁に開口しているため、作業従事者が立っている岸側から見えないことも多い。採水前に水際を歩きながらその存在の有無を確認する。

また、海面や陸上での養殖や蓄養の施設の付近も避けるべきである。そこで飼育している魚類などの DNA を含んだ排水が水域に直接放出されている場合が多い。また、餌は地域外で採取された魚類のミンチなどを含む場合も多いため、その水域に生息しない生物を検出してしまう可能性がある。

釣り人とのトラブルもあり得るので、釣り人から離れて採水を行うと良い。また、釣り人による撒き餌の影響も考えられるため、（河川の場合）釣り人の上流側で採水するなど撒き餌の影響を受けないように注意する必要がある。

また、調査に際しては漁業権などの権利関係に配慮し、管理者（場合によっては所有者）と連絡をとって、各種の許認可について確認するべきである。

2-1. 河川における調査地点の選定

環境 DNA が生物分布を反映する距離は、数百 m 程度と見積もられている。そのため、調査地において数百 m おきに調査地点を設定することが理想的である。しかし、それだけの労力を割くことができない場合も多いので、予算規模や目的に応じて適宜調整する必要がある。

河川の合流点付近においては、合流点の上流側で採水を行うとそれぞれの支流における分布を理解する助けとなる。

河川での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境 DNA の流れによる拡散は、さまざまなスケールの地形に影響されるため、マイクロハビタットというスケールでの留意が必要である。また、調査地点の周辺環境もふくめた写真記録も重要である。

- 1) 河川地形：河道の形状により、河川流の流速や土砂の堆積が異なる。河川の蛇行部では、カーブの外側では流速が速く、河岸は侵食的であり、淵が形成され、河畔林の木々がオーバーハングする。また内側では流速が遅く、堆積的で、堆砂により砂州の形成が進み、植生が定着しやすい。その結果、カーブの左右岸で異なる微地形が形成され、それに応じた生態系が存在するので、調査地点の設定時に地形も判断に入れる。例えば、調査地点を距離で河口から〇〇km 地点と設定した場合、直線距離なのか、蛇行を含む流程に沿った距離なのかなども考慮すべきである。
- 2) 河川の流れ：河川の流れは、河道内で一様の流向や流速ではない。中心部を直線的に流れる流心、止水域、渦流発生域とでは、物質のトラップの状態が異なるため、それに応じて水質や生物も異なる。ある地点から放出された環境 DNA は、流速に応じて拡散距離が異なる。
- 3) 河岸構造：自然の植生は、上述のとおり蛇行の左右岸の地形の差異により形成や繁茂状況が異なる。河畔林の下や葦原などの河岸植生の中は良好なハビタットとなっている。一方、護岸や堤防などの人工構造物の場合は、自然のハビタットの改変の度合いに着目する必要がある。特に、コンクリートで隙間なく固められた護岸の場合には、背後地からの地下水の浸出や間隙生物の生息地が失われているなどの影響がありうる。石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が着目点である。コンクリートなどで隙間を埋めると、透水性や地下水湧出を前提としたマイクロハビタットが破壊される（例 ミミズハゼ）。堤防の場合も、材料が過去から積まれた粘土か、地中に基礎部分を打設したコンクリートかで透水性が異なる。
- 4) 河床の底質：河床の底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。例えば、サケ類の産卵場では、堆積した礫の下から水が噴出している。採水作業では、河床材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要である。バケツなどの採水器が河床に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁って濾過が困難となる。また、河床や河岸が岩の場合には、採水器が岩の突起などに引っかかって回収できなくなる可能性がある。そこで作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する

危険性があるので注意する必要がある。

- 5) 河川工事などの人為改変：河川管理者（土木行政）の工事による攪乱には注意が必要である。河川流が流下しやすくするための河道掘削では、ハビタットの地形や底質、植生が大きく改変される。特に砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影しておくのは、これらの攪乱の検知のためもある。工事の最中には、濁水が発生する。河川水の濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。
- 6) 河口域・汽水域・河川感潮域：河川水と海水の混合の状態に留意すること。同じ地点でも、潮汐により時々刻々環境条件が変化するため、気象庁の公表する潮位表を参考にし、状況に応じた調査時刻を設定する。採水時に、地点の位置に加え、潮汐の影響を判断するために、時間、水深、表層・中層・底層なども記載するのが望ましい。塩水遡上や混合のパターンは、河床勾配や河川流量により異なる。海からの河口に向けての強い外力の影響としては、潮位上昇や強波浪による河川への海水流入量の増加と、それに伴う河川水の海への拡散の抑制がある。

2-2. 池や湖沼等における調査地点の選定

流水域である河川に比べると、注意すべきポイントが特段多いわけではないが、その水域を代表する水サンプルを取ることに留意すべきである。小規模な定形の池の場合、どこで採水しても検出率に大きな違いはないと考えられる。任意の地点で、アクセスしやすい岸際から表層水を採取する。複雑な形状をした、あるいは規模の大きな池や湖沼の場合の適切な採水数については知見が不足しているが、できるだけ複数地点で採水することが望ましい。岸の構造や底質の影響、人為改変の影響などについては河川の場合と同様の注意が必要である。

農業用水路で調査を行う場合には下記の点に注意する。下流からのポンプアップや他の地域からのパイプラインによる送水などがありうるため、水がどこからきているのかを確認する。また、灌漑期に水があり、非灌漑期に水がなくなるなど、季節によって水量が異なる場合がある。さらにコンクリート水路は滑りやすく、水の流れも速い場合があるので、事故が起きないように注意する。水路は土地改良区等の団体によって管理されていることから、トラブルを回避するため、調査する場合には了解を得る必要がある。水田や畑からの排水が混ざるので、PCR 阻害要因を含む可能性があることにも留意が必要である。

2-3. 海岸における調査地点の選定

海岸での調査地点の設定時の留意点を挙げる。環境 DNA の流れによる拡散は、さまざまなスケールの地形に影響されるため、マイクロハビタットを考慮したスケールでの留意が必要である。調査地点の周辺環境もふくめた写真記録が重要である。

1) 海岸地形と底質：海岸地形により汀線付近の波浪条件が異なり、水際での底質の粒径や波による巻き上がりが異なる。また、バケツなどの採水器が底質に接触すると、砂や泥を水中に巻き上げる。水サンプルの質や濾過作業の効率に影響するため、巻き上げの少ない環境を選ぶのが望ましい。

① 磯や岩場：波による底質の巻き上げが少ないために採水しやすい。波浪が高く、足元が滑りやすいため、落失を防ぐ安全管理がことさら重要になる。

② 砂浜：アクセスは比較的容易だが、汀線（波打際）付近は常に底質を巻き上げているために砂が混入する。

③ 干潟：底質が潮汐により水塊が常時広範囲に移動するために濁水である場合が多い。また、河口や一次生産の高い海域であると、植物プランクトンや懸濁物などが多く含まれているため、採水後の濾過の作業効率が低下し濾過水量が減少することが懸念される。

2) 沿岸流と水質：沿岸流は、沿岸地形により流向流速が一樣ではない。波浪に曝される磯や砂浜中心部、岬や構造物の周辺の止水域や渦流発生域とでは、水中に存在する物質のトラップの状態が異なるため、それに応じて水質や生物も異なる。ある地点から放出された環境 DNA は、流速に応じて拡散距離が異なることが考えられる。沿岸では、潮汐の影響で水塊が移動、停滞する。河川のように一方向に流下・拡散するのではないことに注意が必要となる。また出水による淡水の影響、停滞の持続、濁度の上昇などの影響にも注意を払う必要がある。

3) 海岸生態系構造：海岸の調査地点における周辺の生態系の状態の把握が重要である。とくに海藻・海草の藻場は水生生物が高密度で生息する。これらの繁茂状況は、潜水調査、衛星画像判読で行うことができる。

① 海岸植生は、背後地の環境が、砂浜、砂丘、崖、人工空間（工業用地、市街地、住宅地）により異なる。調査地点付近の広域的な状態の把握は空中写真判読で行える。

- ② 護岸や堤防などの人工構造物の場合は、自然のハビタットの改変の度合いに着目する必要がある。とくに、コンクリートで隙間なく固めた護岸の場合には、背後地からの地下水の浸出や間隙生物の生息地が失われている。
 - ③ 石やブロックを積み上げた護岸の場合、隙間の透水性が着目点である。コンクリートなどで隙間を埋めると、透水性や地下水湧出を前提としたマイクロハビタットが破壊される。堤防の場合も、材料が過去から積まれた粘土か、地中に基礎部分を打設したコンクリートかで透水性が異なる。
- 4) 底質：底質（材料）は、岩、礫、砂、粘土により水の透過性が異なる。採水作業では、干潟や細砂の砂浜など、海岸材料が粘土など細粒分の多い箇所では細心の注意が必要となる。バケツなどの採水器が底に接触すると、底質の巻き上げが発生し、水が濁り、濾過が困難となる。また、磯の岩場の場合には、採水器が岩の突起などに引っかかると回収できなくなる可能性がある。作業従事者が採水器を回収するために無理な動作をすると落水する危険性があるので、安全管理には注意する必要がある。
- 5) 海岸工事など人為改変：海岸管理者（土木行政）や開発事業者などによる工事による攪乱には注意する必要がある。攪乱の規模、継続性など、影響の時空間スケールの把握が必要である。モニタリング時に周辺の環境の記録写真を撮影するのは、これらの攪乱の検知と記録のためである。
- ① 埋め立て工事では、水域自体が消滅するため、モニタリング地点の変更を余儀なくされる場合もある。また、防波堤、突堤など、海中に突き出す構造物では、周辺の流向流速への影響があるため、予め地図で、また、現地で確認する必要がある。このような構造物は、現地に赴いたときに工事が始まっている場合もある。工事の予定は海岸・港湾・漁港管理者に事前に確認は可能である。
 - ② 航路などの海底掘削では、ハビタットの地形や底質、植生が大きく改変される。とくに砂州の除去では、潜砂性魚類のハビタットごと消滅する。
 - ③ 工事の最中には、濁水が発生する。濁度が上昇すると、採水後の濾過作業に影響する。
- 6) 人工構造物（護岸、堤防、防波堤など）：消波や構造維持のための施設は種々あるが、構造物の材料と、岸との距離により留意する必要がある。岸との距離では、構造物の水中にある根固め、水面付近の消波、沖で波浪を軽減する離岸堤がある。材質としてはコン

クリート・ブロックと自然石がある。自然海岸の岩礁と微地形と異なる点は、隙間が多く、時折、透過性が高い点である。打ち寄せた波による水塊がフィルターされる状態となる。離岸堤は沖の小島のような存在である。そのため局所的に岩礁生態系に近い環境が形成される。

3. 採水および濾過

採水の季節

採水の季節について、冬場には環境 DNA の検出率が下がることが報告されているので、採水調査は春～秋に行うと検出率が向上する可能性がある。一方で、季節移動など対象生物種の生態によっては検出しやすい季節や場所があると考えられるので、対象生物の生態情報を把握しておくことは重要である。また、体外受精の生物の場合は繁殖期に環境 DNA 量が著しく増加するため、種特異的検出では対象種の繁殖期を選ぶ、網羅的検出では優占種の繁殖期を避けるなど、対象生物の繁殖期を考慮する必要がある。赤潮やアオコなどの影響で採水サンプル中に高濃度の PCR 阻害物質が混入する場合があるので、このような時期を避けることが望ましい。

安全に採水を行うために

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

器材、材料、物資の調達（特に保冷）

調査の器材や物資などの現地調達は出来る限り避ける。沿岸部の人口が少ない地域は、コンビニエンスストアやホームセンターがほとんど無く、品揃えが悪い場合も多い。「氷」が必要な場合は、スーパーマーケット、釣具店、鮮魚店、コンビニエンスストアで調達することになる。このような施設は、魚介類を販売しているため、氷の袋などへの付着などコンタミネーションには十分注意する。瞬間保冷剤の準備があると安心である。「保冷材」をフィールドで保冷、冷凍するために、宿泊施設の冷凍庫を借用、冷蔵庫を利用する場合がある。冷凍庫は食品がストックされていることが多いため、保冷材への付着を回避するためにビニール袋などで覆う必要がある。冷凍のためにドライアイスを用いることもできる。

濾過手法について

水サンプルの濾過については現場で行う場合と、実験室に持ち帰って行う場合がある。濾過のための機材にもカートリッジ式フィルターと、グラスファイバーフィルターがある。ここでは、採水後現場でカートリッジ式フィルターを用いて濾過する手法（3-1）と実験室に持ち帰ってからグラスファイバーフィルターで濾過する手法（3-2）について述べる。

3-1. 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過

安全に採水を行うために（再掲）

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

フィールドデータの記録に必要な道具（例）

- ・ 測量野帳レベルブック（セ-Y11, コクヨ社など）
- ・ 耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B, パイロットなど）
- ・ ハンドヘルド GPS（eTrex20xJ, ガーミン社など）
- ・ データロガー導電率計（CD-4307SD, マザーツール社など）
- ・ 防水デジタルカメラ（RICOH WG-30, リコー社など）

シリンジを用いた現場濾過に必要な道具（例）

- ・ カートリッジ式フィルター（ステリベクス, 孔径 0.45 μ m, SVHV010RS, メルク・ミリポア社）
- ・ 50ml ロックタイプシリンジ（SS-50LZ, テルモ社）
- ・ パラフィルム（エルエムエス社）
- ・ ルアーフィッティング（VRMP6, 株式会社アイシス, 注入口用）
- ・ ルアーフィッティング（VRSP6, 株式会社アイシス, 排出口用）

- ・ バケツ (Soft Bucket 8 型 I-484, ISETO 社など)
- ・ ロープ (クレモナ金剛打ロープ直径 6mm, ユタカメイク社など)
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)
- ・ 分子実験用ペーパータオル (61440, 日本製紙クレシア社など)
- ・ RNAlater Solution (Ambion 社)
- ・ 小型スポイト (E-243, 日本メディカルサイエンス)
- ・ 2.0mL チューブ (DNA 低吸着 ; ザルスタット社)
- ・ 医療施設用泡洗浄ハイター1000 400mL (花王)
- ・ 精製水 (精製水 P ワンタッチ式キャップ 500mL, 健栄製薬社など)
- ・ チャック付ポリ袋 140mm × 200mm (ユニパック G-8, 生産日本社)
- ・ チャック付ポリ袋 100mm × 140mm (ユニパック E-4, 生産日本社)
- ・ チャック付ポリ袋 17.7cm × 20.3cm (イーजीジッパーM, ジップロック社)
- ・ カウンター (数取器, プラス社など)
- ・ 筆記具 (サインペン) (MO-150-MCBK3, ゼブラなど)
- ・ クーラー (ハイパー氷点下クーラーM, ロゴス社など)
- ・ 保冷剤 (倍速凍結・氷点下パック M, ロゴス社など)
- ・ 保冷袋 S サイズ (保冷平袋 S, モロフジなど)

アスピレーターを用いた現場濾過に必要な道具 (例)

- ・ カートリッジ式フィルター (ステリベクス, 孔径 0.45μm, SVHV010RS, メルク・ミリポア社)
- ・ パラフィルム (エルエムエス社)
- ・ ルアーフィッティング (VRMP6, 株式会社アイシス, 注入口用)
- ・ ルアーフィッティング (VRSP6, 株式会社アイシス, 排出口用)
- ・ 手提げ平角瓶コック付ポリタンク 10L (1-2169-01, アズワン)
- ・ epTIPS スタンダード 1~10mL (30000765, エッペンドルフ社)
- ・ ルアーフィッティング オスルアーロック 4.0mm (VPRM406, 株式会社アイシス)
- ・ ルアーフィッティング メステーパー5.0mm (VRF506, 株式会社アイシス)
- ・ 排気用ゴム管 (6-590-01, アズワン)
- ・ チューブ I 型ジョイント (6-663-02, アズワン)
- ・ 穴付きシリコン栓 (1-7650-07, アズワン)
- ・ アスピレーター (GAS-1, アズワン)
- ・ フィルターホルダーマニホールド (2-258-01, アズワン)
- ・ 液体塩素系漂白剤 (病院用ハイター、花王)

3-1-1. フィールドデータの記録

測量野帳レベルブックに記入する主な項目として以下のようなものがあげられる。これらは調査の目的などに応じて加減して良い。耐水性の野帳に耐水性のボールペンで記録するとよい。

- ・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）
- ・日時（YYYY-MM-DD の形式で記録）
- ・測点番号と採水地点の地名（プロジェクト略称+調査番号+測点番号）
- ・緯度経度（35.101252N, 139.293012E のような 10 進法が取り扱いやすい）
- ・河岸・湖岸・海岸・底質の分類：砂浜・砂利浜・岩礁・サンゴ・護岸（コンクリート・テトラ・捨て石など）
- ・気象・海象（風向・風力・波高を含む）
- ・水温（℃）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・（海～河川感潮域では）潮汐（大潮・中潮・小潮・若潮・長潮）と干満（満潮・干潮・上げ潮・下げ潮）
- ・（海～河川感潮域では）塩分濃度（‰）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・透明度（透明・ササ濁り・濁り）
- ・河川で行う場合、わかる場合はダムや発電所の放流量も記録する。
- ・濾過水量（mL）：必ず記入すること。
- ・目視の範囲内で魚影やその他の生物：抽出した環境 DNA には魚類以外の生物が含まれているので、クラゲやその他の目立つ生物に関する記録が後々に重要となる。
- ・写真（撮影の有無）
- ・その他：環境水に影響を与えそうなものの記録（釣り人の有無；排水や流れ込みの有無；周囲の水田地域の水管理状況など）

3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過

本項では、シリンジにステリベクスを装填して行う現場濾過法について記す。以下の作業では、コンタミネーション防止のため、常に使い捨ての実験用ゴム手袋を着用すること。手袋は採水地点ごとに取り替える。ここではバケツで採水するケースを説明するが、直接ボトルを用いた採水や、シリンジを用いた直接採水を行っても良い。

- 1) 濾過キットの作成：例えば 1 採水地点で 2 本のステリベクスを用いて濾過を行う場合（最大 1L x 2 本 = 2L）、2 組を 1 セットとしてキットを作成する。ユニパック G-8 を用意し、その中に、ステリベクス 2 本とシリンジ 2 本を入れる。さらに、RNAlater が入った 2.0mL チューブ 2 本と小型スポイト 2 本を小さなユニパック（E-4）にまとめて入れておく。これに、ステリベクスの注入孔と排出孔を閉じるためのルアーフィッティング 2 個もしくはパラフィルム（1cm×5cm を 6 枚ほど）をユニパック E-4 に

まとめて入れる。なお、濾過後のステリベクス 2 本を入れるユニパック E-4 を 1 枚キットに入れる (図 3-1-2-1, 2)。

- 2) 採水道具の作成：突堤や防波堤、護岸など水面よりも高い所から採水するため、ロープを 15m ほど切り出しバケツにしっかりと結びつける。Soft Bucket 8 型 I-484 を使用する場合は、取手が抜けることがあるため、本体縁にある穴と取手の 2 箇所にロープを結びつける (図 3-1-2-3)。
- 3) バケツの除染：ゴム手袋を着用し、バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付ける (図 3-1-2-4)。数分間放置した後、ハイターを分子実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る (図 3-1-2-5)。その後、バケツとロープ先端を環境水で 2 回共洗いする。ハイターによる洗浄が不十分だとクロスコンタミネーションの恐れがあり、共洗いが不十分でハイターが余分に残っているとサンプル中の DNA が分解されるので注意すること。
- 4) バケツ採水：ロープの末端を岩や橋の欄干などに結びつけバケツの逸失を防ぐ。バケツを投げ (図 3-1-2-6)、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する (図 3-1-2-7)。データのばらつきを防ぐため、1 回のサンプリングで 10 回のバケツ採水を行いその都度シリンジを用いて 100mL の環境水を濾過する。この操作でシリンジ 1 本あたり 1 L の水を濾過することになる。ただし、環境水の濁度が高い場合は数 100mL で目詰まりが起これ、それ以上濾過できなくなることがある。そのような場合は、濾過水量を記録しておくことが重要になる。
- 5) ステリベクスを用いた現場濾過：バケツに汲んだ環境水を 50mL シリンジで吸引する (図 3-1-2-8)。シリンジには 50mL よりも多めに環境水を吸引させ、シリンジを上向きにしてシリンジ内の空気や余分の水を押し出す。環境水の量を 50mL に調整したらステリベクスを装着して加圧濾過を行う (図 3-1-2-9)。ステリベクスとシリンジの着脱を繰り返すので、その際にルアーロックを締め過ぎないように注意する。同じバケツ採水から濾過を 2 回 (50mL x 2 回 = 100mL) 繰り返したらバケツの水を捨てる。新たに環境水を汲み上げ、濾過総量が 1L に達するまで、この操作を 10 回繰り返す (シリンジでの濾過作業は合計 20 回となる)。単調な作業のため、カウンター (数取り器) を用いて採水回数を間違えないようにする。
- 6) ステリベクス内の水分除去：上記の濾過がすべて終了したら、ステリベクスを取り外してシリンジ内に空気を満たす。再度シリンジにステリベクスを取りつけ、カートリッジ内の水分を押し出す (図 3-1-2-10)。この操作を数回繰り返し、水分をできるだけ除去する。
- 7) ステリベクス排出孔の密閉：ステリベクス内部の水分がほぼなくなったら、ステリベ

クスをシリンジに取りつけたまま、その排出孔をルアーフィッティングかパラフィルムを使って密閉する（図 3-1-2-11）。

- 8) RNAlater の充填：ステリベクスをシリンジから取り外し、小型スポイト（図 3-1-2-12）を使って注入孔から RNAlater を 1-2mL 注入する（図 3-1-2-13）。ステリベクスの注入孔と本体の間に段差があるため、小型スポイトの先端がそれに引っかかると RNAlater がうまく入らない。段差を避けるように奥まで小型スポイト先端を入れるとスムーズに RNAlater を注入できる。
- 9) ステリベクス注入孔の密閉：RNAlater をステリベクスに充填したら、注入孔をルアーフィッティングかパラフィルムを使って密閉する（図 3-1-1-14）。ルアーフィッティングを使用する場合は、固く締め過ぎないように注意する。ステリベクス内のフィルター上に集められた DNA の劣化を防ぐために、この作業までを採水現場で行うのが望ましい。
- 10) 必要事項の記入：濾過が終了後、ステリベクス表面の水分をキムタオルでよく拭う。水分を取り除いた後、サインペンでステリベクスの本体に日付や測点番号など必要事項を記入する（図 3-1-2-15）。
- 11) 濾過済みステリベクスの保管：必要事項の記入が終わった濾過済みステリベクスをユニパック E-4 に入れる。ステリベクスが入ったユニパックをジップロックに入れ、保冷剤が入ったクーラーボックスに入れて冷暗条件で保管し持ち帰る（図 3-1-2-16）。ラボに持ち帰ったステリベクスは-20℃以下で保存する。
- 12) ブランクの作成：フィールドブランクとして、精製水を用いて上記と同様の作業を行ってフィールドブランクを作成する。フィールドブランクの必要性、頻度については各事業主体が慎重に判断するべきである。

3-1-3. アスピレーターを用いた現場濾過

本項では、AC100V の電源がある実験室や船上で大量の水を濾過する場合に有効な方法を記す。濾過には 10L の活栓付きポリタンクを用い、活栓に 10mL のピペットチップを取りつけ、その先端にステリベクスの注入孔をねじ込む。さらに、ステリベクスの排出孔にルアーフィッティングを介してアスピレーターに接続し、吸引濾過により大量の水を濾過する。以下の作業では、コンタミ防止のため、常に実験用ゴム手袋を着用する。

- 1) ポリタンクの除染：ポリタンクの内部に市販の塩素系漂白剤（ハイター）を入れ、実行塩素濃度 0.1%以上になるように現場海水か水道水を入れて調整する（図 3-1-3-1）。ポリタンクをよく振り、その後に濾過する現場海水で 3 回共洗いして漂白剤を除く。

- 2) 濾過装置の組み立て：ポリタンクの活栓に 10mL のピペットチップを連結する（図 3-1-3-2）。ステリベクス排出口にルアーフィッティング（オスルアーロック）を装着する（図 3-1-3-3）。ゴム管をチューブ I 型ジョイントとつなぎ、穴付きシリコン栓を取り付ける（図 3-1-3-4）。フィルターホルダーマニホールドの排出孔とアスピレーターをゴム管でつなぐ（図 3-1-3-5, 6）。フィルターホルダーマニホールドの吸入孔に前述のゴム管を装着する（図 3-1-3-7）。最後にポリタンクとつなげたチップの先端をステリベクス注入孔に強く押し込む（図 3-1-3-8）と大量濾過システムが完成する（図 3-1-3-9, 10）。
- 3) 濾過：アスピレーターのタンクに水を入れる。除染したバケツなどを使って環境水を採取してポリタンクに入れる。アスピレーターのスイッチを ON にするとポリタンクからアスピレーターに向かって水が流れ、ステリベクスのフィルター上に DNA が吸着・濃縮される。事前にポリタンクに 1L ごとにラインを入れていくと、吸引濾過した水の量を確認しやすい。
- 4) ステリベクス内の水分除去：濾過が終了したら、ステリベクスをピペットチップから取り外し、そのまま吸引濾過を継続すると、ステリベクス内部の水分を除去できる。
- 5) 濾過後のステリベクスの処理：前項の 7) 以降の操作を続けてステリベクスを保管する。

図 3-1-2-1

現場濾過キットの内容：50mL シリンジ 2 本, ステリベクス 2 本, 小型スポイト 2 本, RNAlater が入った 2mL チューブ 2 本, パラフィルム 6 枚, ユニパック (E-4) 1 枚, ユニパック (G-8) 1 枚。



図 3-1-2-2

現場濾過キットをユニパック (G-8) に詰めた状態。このように 1 袋にまとめておくと現場での使い勝手がよい。



図 3-1-2-3

クレモナ金剛打ロープを 15m ほど切り出して折りたたみバケツ (Soft Bucket 8 型 I-484) にしっかりと結びつけたところ。取っ手がとれやすいので、かならずバケツの縁にある小穴にロープの先端をくくりつけておくこと。



図 3-1-2-4

バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付けて除染する。

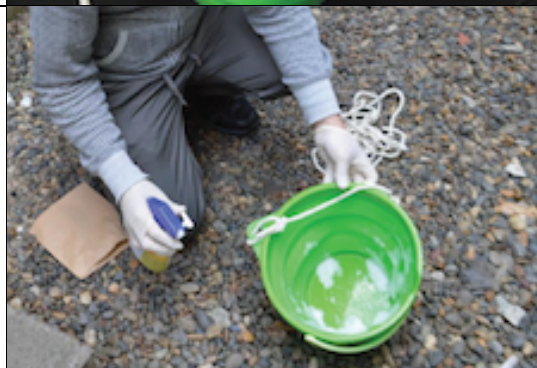


図 3-1-2-5

ハイターを分子実験用ペーパータオルで
きれいに拭き取る。きれいに拭き取らない
と、採水の際に泡が出て環境水を汚染して
しまうので注意すること。



図 3-1-2-6

バケツを投げたところ。



図 3-1-2-7

ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバ
ケツを回収する。



図 3-1-2-8

50mL シリンジを用いてバケツで汲んだ
環境水を吸引する。

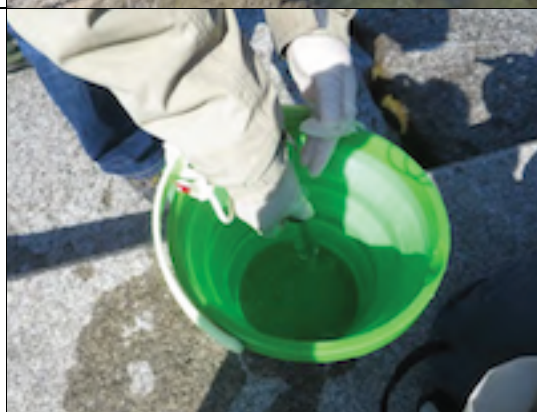


図 3-1-2-9

ステリベクスを装填して加圧濾過を行う。



図 3-1-2-10

濾過が終わったら、ステリベクスを取り外してシリンジ内に空気を満たし、シリンジにステリベクスを再装着し、カートリッジ内の水分を押し出す。この操作をカートリッジから水が出なくなるまで数回繰り返す。



図 3-1-2-11

ステリベクスをシリンジに装着した状態で、排出孔をルアーフィッティングかパラフィルムを使って密閉する。



図 3-1-2-12

小型スポイトをつかい、2.0mL チューブから2～3回に分けて RNAlater を吸引する。



図 3-1-2-13

吸引した RNAlater を注入孔から小型スポイトをつかって注入する。



図 3-1-2-14

注入孔をルアーフィッティングかパラフィルムで密閉する。



図 3-1-2-15

ステリベクスの表面の水分をキムワイプで拭きとり、サインペンでステリベクスの本体に日付や測点番号など必要事項を記入する。



図 3-1-2-16

同じ測点から得られた2本のステリベクスをユニパックに入れ、それをさらにジップロックに入れて、保冷剤が入ったクーラーボックスで保管する。



図 3-1-3-1

ポリタンクの内部に市販の塩素系漂白剤（ハイター）を入れ、実行塩素濃度 0.1% 以上になるように現場海水か水道水を入れて調整する。



図 3-1-3-2

ポリタンクの活栓の先端に 10mL のピペットチップを押し込む。



図 3-1-3-3

ステリベクス排出孔にルアーフィッティング（オスルアーロック）を取りつける。



図 3-1-3-4

ゴム管と穴付きシリコンをチューブ I 型ジョイント（白いジョイント）を介してつなぐ。



図 3-1-3-5

フィルターホルダーマニホールドの排出孔とゴム管をつなぐ。



図 3-1-3-6

ゴム管とアスピレーターをつなぐ。



図 3-1-3-7

フィルターホルダーマニホールドの吸水孔に前述のゴム管を装着する。



図 3-1-3-8

ポリタンクの活栓に取りつけた 10mL ピペットチップの先端をステリベクス挿入口に強く差し込む。



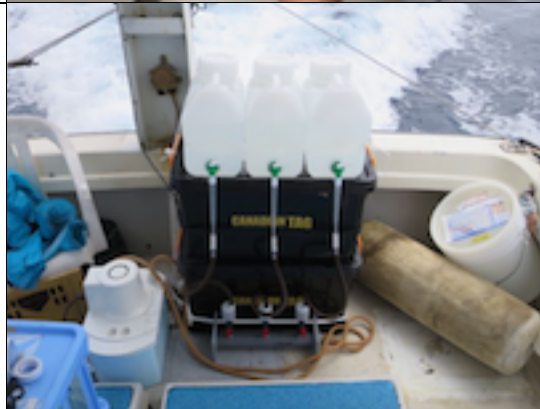
図 3-1-3-9

ステリベクスをつかった大量濾過システムの完成。



図 3-1-3-10

AC100V の電源があれば、写真のように漁船の上でも容易に大量濾過ができる。



3-2. 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過

安全に採水を行うために（再掲）

環境 DNA のサンプリング（＝採水）は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ 110 番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118 番に速やかに通報する。

フィールドデータの記録に必要な道具（例）

- ・ 測量野帳レベルブック（セ-Y11, コクヨ社など）
- ・ 耐水加圧ボールペン（BDWR-40F-B, パイロットなど）
- ・ ハンドヘルド GPS（eTrex20xJ, ガーミン社など）
- ・ データロガー導電率計（CD-4307SD, マザーツール社など）
- ・ 防水デジタルカメラ（RICOH WG-30, リコー社など）

採水および研究室への輸送に必要な道具（例）

- | | |
|----------------------------------|------------|
| ・ 採水用ボトル（1L 以上：事前に塩素消毒したもの） | サンプル数 + α |
| ・ 採水用ボトル（1L の純水を入れたもの） | 1 日につき 1 本 |
| ・ 10%塩化ベンザルコニウム溶液（1mL ずつに分注したもの） | サンプル数 + α |
| ・ 使い捨て手袋 | サンプル数 + α |
| ・ 採水用バケツおよびロープ | 1 式 |
| ・ スプレー式塩素系漂白剤 | 1 本 |
| ・ ペーパータオル | 適宜 |
| ・ ゴミ袋 | 適宜 |
| ・ 長靴・胴長等 | |
| ・ 水質計（必要に応じて） | |
| ・ マジック、ガムテープ等 | |
| ・ クーラーボックス | |

- ・保冷剤

グラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過に必要な道具（例）

・フィルターホルダー（事前に塩素消毒したもの[図 3-2-2-1]）	適宜
・アスピレーターまたは真空ポンプ	適宜
・グラスファイバーフィルター（平均孔径 0.7μm）	濾過数の 2 倍
・ピンセット（事前に塩素消毒したもの）	適宜
・アルミホイル	適宜
・チャック袋	適宜
・塩素処理用バケツ	適宜
・塩素系漂白剤	適宜
・純水	適宜
・使い捨て手袋	適宜
・冷凍庫（-20 度以下）	

3-2-1. フィールドデータの記録

測量野帳レベルブックに記入する主な項目として以下のようなものがあげられる。耐水性の野帳に耐水性のボールペンで記録するとよい。

- ・採水者（サンプリングに同行した全員の名前を記録）
- ・日時（YYYY-MM-DD の形式で記録）
- ・測点番号と採水地点の地名（プロジェクト略称+調査番号+測点番号）
- ・緯度経度（35.101252N, 139.293012E のような 10 進法が取り扱いやすい）
- ・河岸・湖岸・海岸・底質の分類：砂浜・砂利浜・岩礁・サンゴ・護岸（コンクリート・テトラ・捨て石など）
- ・気象・海象（風向・風力・波高を含む）
- ・水温（℃）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・（海では）潮汐（大潮・中潮・小潮・若潮・長潮）と干満（満潮・干潮・上げ潮・下げ潮）
- ・（海では）塩分濃度（‰）：携帯用の水質計を用いて計測する。
- ・透明度（透明・ササ濁り・濁り）
- ・濾過水量（mL）：1000mL 未満の場合には必ず記入すること。
- ・目視の範囲内で魚影やその他の生物：抽出した環境 DNA には魚類以外の生物が含まれているので、クラゲやその他の目立つ生物に関する記録が後々に重要となる。
- ・写真（撮影の有無）
- ・その他：環境水に影響を与えそうなものの記録（釣り人の有無；排水や流れ込みの有無な

ど)

3-2-2. 採水および実験室への輸送

- 1) 水辺からの直接採水：直接水辺にアクセスできる場合は、採水ボトルを直接水につけて採水を行う。現場の環境水でボトルを2回、共洗いした後、サンプルを1リットルより少し多めに採取する。コンタミネーション防止のため、共洗いした水は、河川の場合下流側に捨てるなど、共洗いした水がサンプルに混入しないよう注意する（図3-2-2-2）。作業時には底泥を巻き上げないように注意する。採取した水に、DNAの分解抑制のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる（図3-2-2-3）。
- 2) バケツを用いる場合：水辺への直接のアクセスが困難な場合には、バケツを用いて河川水を採取する

(ア)バケツの除染：ゴム手袋を着用し、バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付ける（図3-2-2-4）。数分間放置した後、ハイターを分子実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る（図3-2-2-5）。その後、バケツとロープ先端を環境水で2回共洗いをする。ハイターが余分に残っているとサンプル中のDNAが分解されるので注意すること。

(イ)バケツ採水：バケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する（図3-2-2-6）。採水した水でバケツを2回、共洗いをする。その後採水した水でボトルを2回、共洗いした後、サンプルを1リットルより少し多めに採取する。コンタミネーション防止のため、共洗いした水は、河川の場合下流側に捨てるなど、共洗いした水がサンプルに混入しないよう注意する。採取した水に、DNAの分解防止のために10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる（図3-2-2-3）。
- 3) フィールドブランク：実験室から運んだ純水が入ったボトルをフィールドで開封し、サンプルと同様に10%塩化ベンザルコニウム溶液を1mL添加し（終濃度0.01%）、転倒混和を行ってしっかりと混ぜる。
- 4) 実験室への輸送：採水後のサンプルは直射日光および高温をさけて実験室に輸送する。塩化ベンザルコニウムの添加により、常温下でも数日程度はDNAが保存されるが、できるだけ低温での管理が望ましい（ただし、現在のところ、塩化ベンザルコニウムを添加すれば、水サンプルは冷凍させない方が良く考えられている）。また、紫外線はDNAを分解するので、直射日光を避けて輸送する。輸送後、速やかに以下の濾過作業を行う。

3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過

実験室に持ち帰ったサンプルはできるだけ早期に（採水後 48 時間以内を推奨）濾過を行う。濾過を行う者は作業を通じて手袋を着用する。

- 1) 塩素処理の準備：塩素処理用バケツに水道水を入れ、市販の塩素系漂白剤を実行塩素濃度 0.1%以上になるように添加する。
- 2) 道具の塩素処理：フィルターホルダーおよびピンセットは使用前に 5 分以上塩素処理バケツに漬け（図 3-2-3-1）、水道水ですすいだ後、蒸留水ですすいでから使用する。この塩素処理はサンプルが変わるごとに行う必要がある。使用後のボトルはボトル表面も含めて全体を除染する必要があるので、塩素処理バケツに全体を沈めて 5 分以上の塩素除染を行い、次回以降の調査に用いる。
- 3) 濾過：水サンプルの濾過にはグラスファイバー製のフィルター（平均孔径 0.7 μ m）を、1 サンプルにつき 2 枚用いる。サンプル水を 500mL ずつ 1 枚のフィルターで濾過する（図 3-2-3-2 ~ -4）。なお、サンプル水によっては 500mL の濾過が困難な場合がある。そのようなときには、フィルター 1 枚あたりの濾過水量を減らし、複数枚に分けて濾過をし、濾過水量を記録する。濾過水量を減らした場合でもサンプルあたりのフィルター枚数は 2 枚とする。未使用フィルターにサンプル水がかかることによるコンタミネーションを防ぐため、フィルターの容器を開け放しにしないことやサンプル水より高いところにおいておくことなどの注意が必要である。
- 4) フィルターの保存：濾過が終わったフィルターは濾過面を内側にして半分におり、2 枚のフィルターをあわせてアルミホイルで包む（図 3-2-3-5）。アルミホイルにサンプル名などを記入し、ユニパックなどの袋に入れて冷凍庫（-20℃以下）で保存する（図 3-2-3-6）。この状態で数ヶ月程度は安定して保存可能である。
- 5) 濾過ブランク：濾過時以降のコンタミネーションの有無を評価するため、1 日の作業につき 1 回、純水 1 リットルに 10%塩化ベンザルコニウム溶液 1mL を添加（終濃度 0.01%）した「濾過ブランク」を用意し、サンプルと同様に扱う。ただし、「フィールドブランク」で濾過ブランクの代用としても良い。

図 3-2-2-1

採水ボトルは使用前に塩素により除染する。



図 3-2-2-2

共洗い後の環境水は下流側など、サンプルに影響しないところに捨てる。



図 3-2-2-3

採水後、10%塩化ベンザルコニウム溶液を 1mL 添加する。



図 3-2-2-4

バケツの内部とバケツにくくりつけたロープ先端部に泡洗浄ハイターを吹き付けて除染する。

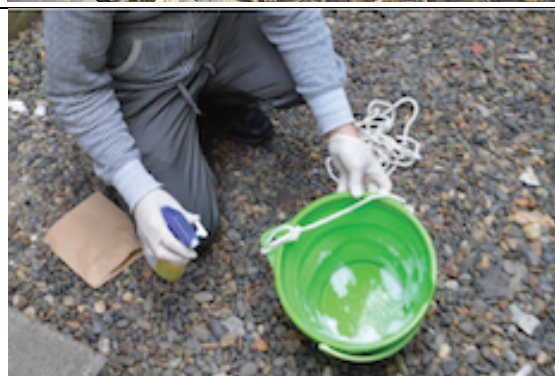


図 3-2-2-5

ハイターを分子実験用ペーパータオルなどできれいに拭き取る。きれいに拭き取らないと、採水の際に泡が出て環境水を汚染してしまうので注意すること。

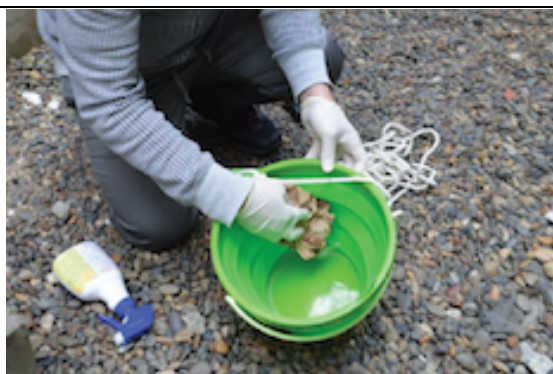


図 3-2-2-6

バケツを投げ、ロープを手繰り寄せて環境水の入ったバケツを回収する。



図 3-2-3-1

濾過に使用する器材は使用前に塩素により除染する。



図 3-2-3-2

濾過の様子。



図 3-2-3-3

濾過後のフィルターの状態。



図 3-2-3-4

濾過後のフィルターの状態

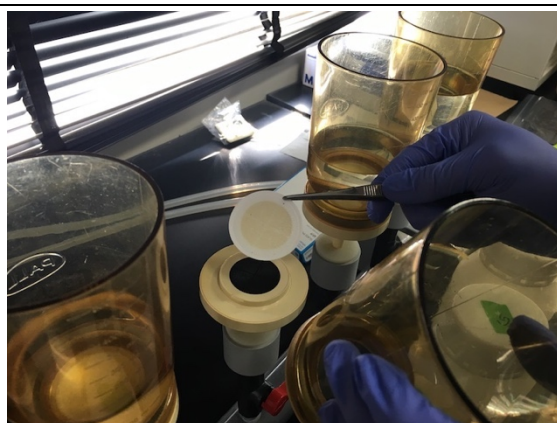


図 3-2-3-5

濾過後のフィルターをアルミホイルで遮光する。



図 3-2-3-6

アルミホイルにサンプル情報等を書き込み、ユニパックなどの袋で冷凍保存する。



4. DNA の抽出

サンプル保管上の注意

カートリッジフィルターまたはグラスファイバーフィルターを用いた濾過の後、サンプルは冷凍庫に保管される。冷凍庫の温度管理には十分な注意を払い、凍結融解を繰り返すことのないように注意する。

DNA 抽出に共通の注意点

以下にカートリッジフィルターからの DNA 抽出（4-1）およびグラスファイバーフィルターからの DNA 抽出（4-2）について記す。コンタミネーションのリスクを軽減するために、どちらの作業も、PCR 以降の装置やサンプルと物理的に隔離すること、PCR 以降の操作を行った作業者が同じ日に DNA 抽出以前の操作を行うことのないように、1 日の作業内容・順序を事前に確認することが重要である。

4-1. カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出

DNA 抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策

本項では、ステリバクスフィルターから DNA を抽出する方法を記す。なお、本手法はビデオジャーナルである Journal of Visualized Science (Miya et al. 2016) に発表した手法を若干改変したもので、一連の技法は動画に収められているので参考にされたい。

また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来 DNA の混入）には十分注意を払わなくてはならない。とくに、この段階でコンタミネーションが起これば、以降の実験（リアルタイム PCR や次世代シーケンス用ライブラリーの調整）が台無しになってしまう。そうならないように、DNA 抽出のみの専用の実験室（DNA 抽出室）を設けるべきである。また、DNA 抽出室は PCR 関連の部屋とは空間的に十分隔離しなければならない。さらに、組織からの抽出 DNA や PCR 産物を扱った当日は DNA 抽出室に入らないなどの細心の注意が必要となる。

DNA 抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ 乾熱滅菌器（56℃に設定）
- ・ ミニローテーター（ACR-100, アズワン）と付属の 10mL/15mL チューブホルダー
- ・ QIAVac Connecting System（QIAvac 24 Plus マニホールドと QIAGEN Vacuum Pump, キアゲン社）¹
- ・ 卓上超遠心機（PZ5557-A000, クボタ社）
- ・ 微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMY 社）
- ・ 微量高速冷却遠心機用ローターラック（AR015-24, TOMY 社）
- ・ 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン）
- ・ ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器株式会社）と 3 インチプラットホーム
- ・ ルアーフィッティング（VPRM406 オスルアーロック 4mmID 用, 株式会社アイシス）
- ・ 50mL コニカルチューブ
- ・ DNeasy Blood and Tissue kit（キアゲン社）
- ・ エタノール（分子生物学用）
- ・ 2.0mL チューブ（DNA 低吸着；ザルスタット社）
- ・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着；ザルスタット社）
- ・ PBS（-）（マグネシウムとカルシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水，細胞科学研究所）²
- ・ パラフィルム

- ・ ゴム手袋（パウダーフリー）
- ・ マイクロピペット P-5000, P-1000, P-200, P-100（ピペットマン, ギルソン社）
- ・ フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- ・ ハサミ（パラフィルムを切るためのもの）
- ・ 標準型ピンセット 1 本（IPT-12, アズワン）
- ・ 1.5mL/2mL 用チューブラック

¹ QIAVac を使うかわりに、50mL コニカルチューブと 2.0mL チューブを組み合わせ、卓上超遠心機で RNeasy を抜き取ってもよい（Miya et al. 2016 が参考になる）。

² 本プロトコルでは、DNeasy キットに付属のバッファ ATL は使用しない。

4-1-1. 実験の準備

実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。

- 1) 乾熱滅菌器を 56℃ に設定する（温まるのに時間がかかるので事前に準備しておく；図 4-1-1-1）。
- 2) RNeasy が充填された濾過済みのステリベクスを準備する（凍結している RNeasy は常温で比較的すぐに解凍できる；図 4-1-1-2）。

4-1-2. RNeasy の吸引

- 1) ステリベクスの排出孔をふさいでいたキャップもしくはパラフィルムを外し、ルアーフィッティング（VPRM406）を取りつける。
- 2) ルアーフィッティングを介して QIAvac 24 Plus マニホールドとステリベクスを接続する（図 4-1-2-1）。
- 3) QIAvac のポンプのスイッチを入れ、注入孔側から排出孔側に向かって RNeasy を吸引する（ステリベクスのカートリッジ内には、構造上の問題で若干の RNeasy が残るが、これ以降の DNA 抽出で問題は生じない）。
- 4) パラフィルムを 1cm × 5cm 程度の大きさに切り、ステリベクスの数だけ用意する（ルアーフィッティング [VRSP6] を使用した場合はパラフィルムは不要）。
- 5) RNeasy を吸引したステリベクスをマニホールドから外し、パラフィルムもしくはルアーフィッティングで排出孔に封をする（図 4-1-2-2；パラフィルムを使用する場合

は、乾熱滅菌器で温めた際にステリベクス内の空気が膨張し、パラフィルムが破れて液漏れすることがあるので、排出孔の部分をフィルムで数回重ねて封をすること)。

4-1-3. DNA の抽出

- 1) DNeasy Blood and Tissue kit と PBS (-) を使って抽出液（プレミックス）の準備をする(図 4-1-3-1)。1本のステリベクスあたり 20 μ L の Proteinase-K(600mAU/ml)、200 μ L の AL、220 μ L の PBS (-) の割合でプレミックスを調整する。これには、DNA 抽出中のコンタミネーションを検知するための「抽出ブランク」用の 1 本分も含める。
- 2) ステリベクスの注入孔を開封し、マイクロピペット (P-1000) と 1000 μ L 用のフィルターチップを用いて上記のプレミックスを充填する（注意：注入孔とカートリッジの接合部に段差があるため、チップ先端の挿入具合によって液が溢れ出ることがある；図 4-1-3-2）。
- 3) パラフィルムを 1cm $\times$ 5cm 程度の大きさに切り出し、ステリベクスの注入孔側にしっかりと封をする（注意：ルアーフィッティング [VRMP6] を使用の場合はパラフィルムは不要；図 4-1-3-3）。
- 4) ミニローテーターの 10mL/15mL チューブホルダーにステリベクスを差し込み、ステリベクスが地面と平行になるようにチューブホルダーをローテーター本体に取り付ける。
- 5) ステリベクスを取り付けたローテーターを乾熱滅菌器内に置き、10rpm で回転させ 56℃で 20 分間加温する（注意：ミニローテーターの耐久温度は 60℃；図 4-1-3-4）。
- 6) ステリベクスを加温中に DNA 回収用の 2.0mL チューブ（DNA 低吸着）と 50mL コニカルチューブを用意し（図 4-1-3-5）、2.0mL チューブを 50mL コニカルチューブに入れる（注意：2.0mL のチューブにはキャップに番号など必要事項を記入、コニカルチューブの奥まで押し込まない；図 4-1-3-6）。
- 7) ステリベクスの加温が終了後、注入孔側のパラフィルムもしくはルアーフィッティングを内部の液が漏れないように注意深く取り外す。
- 8) ステリベクスの注入孔を、コニカルチューブ内に入れた 2.0mL チューブ内に挿入し、そのまま 50mL コニカルチューブの底まで押し込む（図 4-1-3-7）。その後しっかりとコニカルチューブのキャップを閉める（図 4-1-3-8）。
- 9) ステリベクスを入れたコニカルチューブを 6,000g で 1 分間遠心し（図 4-1-3-9）、抽出 DNA を 2mL チューブに回収する（図 4-1-3-10）。

- 10) 50mL コニカルチューブを遠心機から取り出し、ピンセットを使ってステリベクス (図 4-1-3-11)、2.0mL チューブの順に取り出す (図 4-1-3-12 ; 注意 : 2.0mL チューブはキャップが開いた状態なので注意深く扱うこと)。
- 11) 使用済みステリベクスを廃棄し、2.0mL チューブのキャップをしっかりと閉じる。

4-1-4. DNeasy Blood and Tissue kit を用いた DNA の精製

- 1) ステリベクスの本数に抽出ブランク 1 本を加えた本数の DNeasy Blood and Tissue kit (以下 DNeasy) 付属のカラムを用意する (図 4-1-4-1 ; 注意 : カラムのキャップに必要事項を記入すること)。
- 2) 抽出 DNA が入った 2.0mL チューブに 200 μ L の 96~100%エタノールを入れピペットでよく混和する (図 4-1-4-2)。
- 3) マイクロピペット (P1000) の吸引量を 700 μ L にセットし、カラムに抽出 DNA を入れる (注意 : RNAlater が少量残っているため溶液は 640 μ L より多くなることがある ; 図 4-1-4-3)。抽出ブランクには、4-1-3 で用意した混合溶液 440 μ L に 200 μ L の 96~100%エタノールを加えてピペットで混和したものを用いる。
- 4) 溶液が入ったカラムを 6,000g で 1 分間遠心する (図 4-1-4-4)。
- 5) 遠心を終了後、カラムのコレクションチューブを外して新しい 2mL コレクションチューブにカラムに載せ替える (図 4-1-4-5)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する (図 4-1-4-6)。
- 6) カラムに 500 μ L の Buffer AW1 を入れ (図 4-1-4-7)、6,000g で 1 分間遠心する。
- 7) 遠心を終了後、カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替える (図 4-1-4-8)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。
- 8) カラムに 500 μ L の Buffer AW2 を入れ (図 4-1-4-9)、20,000g で 3 分間遠心する。
- 9) 新しい DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、キャップに必要事項を記入する (図 4-1-4-10)。
- 10) 遠心を終了後、カラムを 9) で用意した 1.5mL チューブに載せ替える (図 4-1-4-11)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。
- 11) 200 μ L の溶出 Buffer AE (溶出バッファー) をカラムのメンブレン上に注ぎ (図 4-1-4-12)、室温で 1 分間インキュベートした後に 6,000g で 1 分間遠心する。なお、回

収 DNA 濃度が希薄となることが予想される場合には、溶出バッファー量を 50 μ L 程度まで減じることにも可能である。その際は溶出バッファー量を記録しておくこと。

12) 遠心を終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる（図 4-1-4-13）。使用済みカラムを廃棄する。

13) この状態で -20°C で安定的に保存可能である。

参考文献

Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T. & Doi, H. 2016. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized Experiments*, (117):e54741. doi: 10.3791/54741

なお、本論文のビデオについては

<https://sites.google.com/site/masakimiyalab/publications-1>

から低解像度版の視聴が可能である。

図 4-1-1-1

乾熱滅菌器を 56℃にセットする。指定の温度に達するまで時間がかかるので、抽出前に余裕をもってセットすること。



図 4-1-1-2

-20℃に凍結してあったステリベクスを解凍する。冷蔵の場合はそのままよい（図 4-1-1-2）。



図 4-1-2-1

ステリベクスの排出孔を開封し、ルアーフィッティングを介して QIAvac と接続し、ステリベクス内に充填した RNAlater を抜き取る。

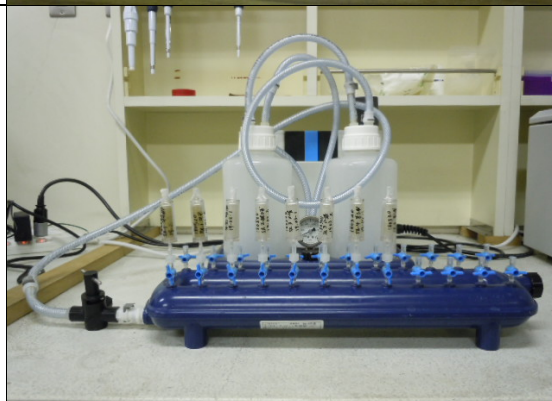


図 4-1-2-2

再度、パラフィルムでステリベクスの排出孔を閉じる。

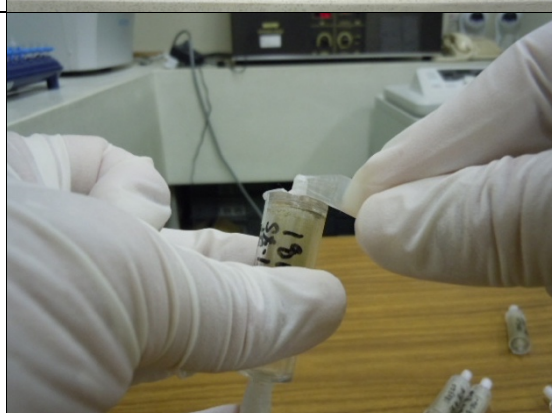


図 4-1-3-1

抽出に必要な試薬を準備する。



図 4-1-3-2

ステリベクスの注入孔を開封し、マイクロピペット (P-1000) と 1000 μ L 用のフィルターチップを用いて上記のプレミックスを充填する。



図 4-1-3-3

パラフィルムでステリベクスの注入孔に封をする。ステリベクスを 56 $^{\circ}$ C に加熱する際、液が膨張するのでしっかり封をすること。



図 4-1-3-4

ステリベクスを取り付けたローターを乾熱滅菌器内に置き、10rpm で回転させ 56 $^{\circ}$ C で 20 分間加温する。



図 4-1-3-5

ステリベクスを加温中に DNA 回収用の 2.0mL チューブ（DNA 低吸着）と 50mL コニカルチューブを用意する。

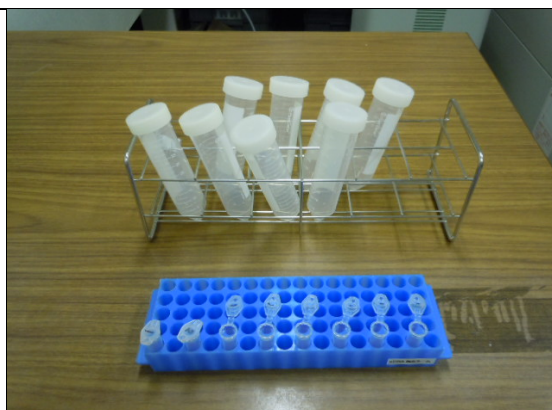


図 4-1-3-6

2.0mL チューブを 50mL コニカルチューブに挿入したところ。



図 4-1-3-7

ステリベクスの注入孔を 2.0mL チューブ内に挿入し、そのまま 50mL コニカルチューブの底まで押し込む。



図 4-1-3-8

ステリベクスと 2.0mL チューブをコニカルチューブの底に押し込んだら、しっかりとコニカルチューブのキャップを閉める。



図 4-1-3-9

ステリベクスを入れたコニカルチューブを
6,000g で 1 分間遠心する。



図 4-1-3-10

コニカルチューブ内で 2.0mL チューブに
回収された抽出 DNA。



図 4-1-3-11

ピンセットを使ってコニカルチューブから
ステリベクスを取り出す。

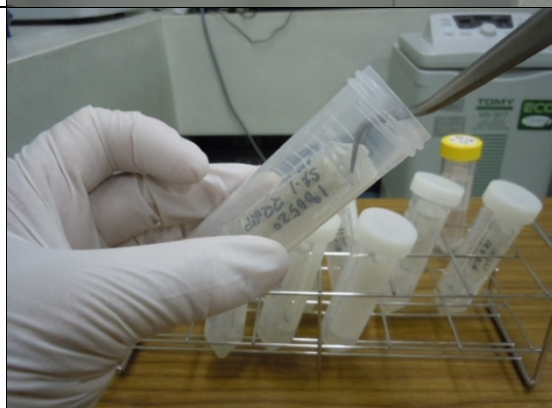


図 4-1-3-12

次いでピンセットを使ってコニカルチューブ
から 2.0mL チューブを取り出す。キャ
ップが開いたままなので注意深く取り出す
こと。

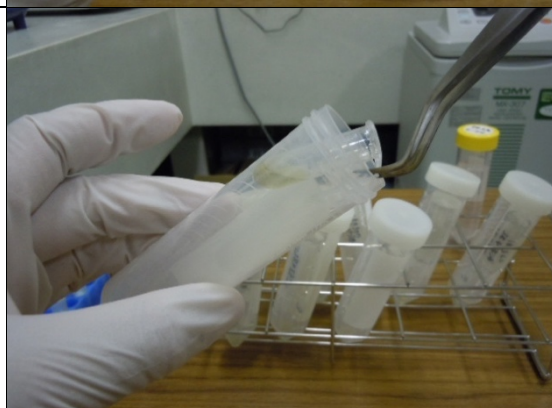


図 4-1-4-1

DNeasy Blood and Tissue kit 付属のカラム（コレクションチューブ付き）を開封してチューブラックに並べる。

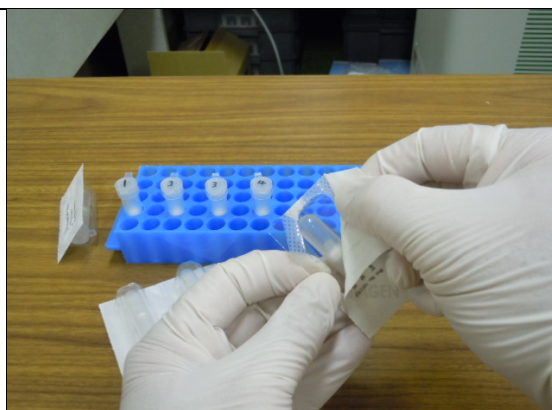


図 4-1-4-2

抽出 DNA が入った 2.0mL チューブに 200 μ L の 96~100%エタノールを入れピペットでよく混和する。

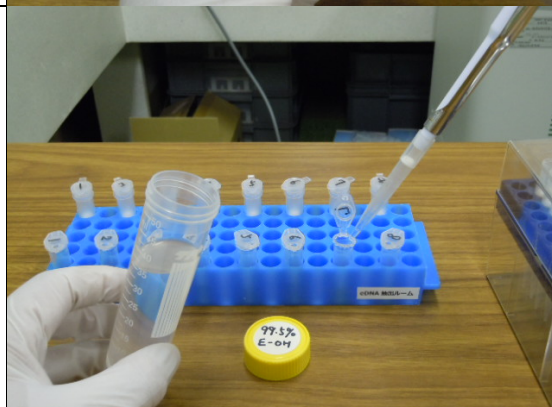


図 4-1-4-3

カラムに抽出 DNA を入れる。

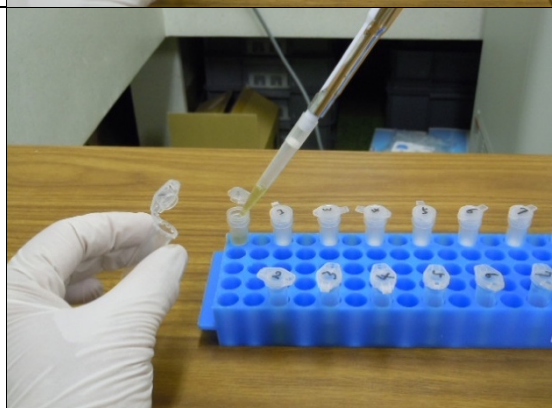


図 4-1-4-4

抽出 DNA が入ったカラムを 6,000g で 1 分間遠心する。



図 4-1-4-5

遠心を終了後、カラムのコレクションチューブを外して新しい2mL コレクションチューブにカラムに載せ替える。

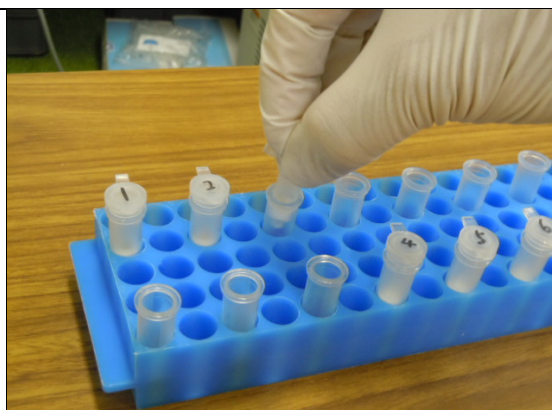


図 4-1-4-6

使用済みのコレクションチューブは廃棄する。



図 4-1-4-7

カラムに 500 μ L の Buffer AW1 を入れる。



図 4-1-4-8

遠心を終了後、カラムを新しい2mL コレクションチューブに載せ替える。



図 4-1-4-9

カラムに 500 μ L の Buffer AW2 を入れる。



図 4-1-4-10

DNA 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、
キャップに必要事項を記入する。



図 4-1-4-11

遠心を終了後、カラムを図 4-1-4-10
で用意した 1.5mL チューブに載せ替える。

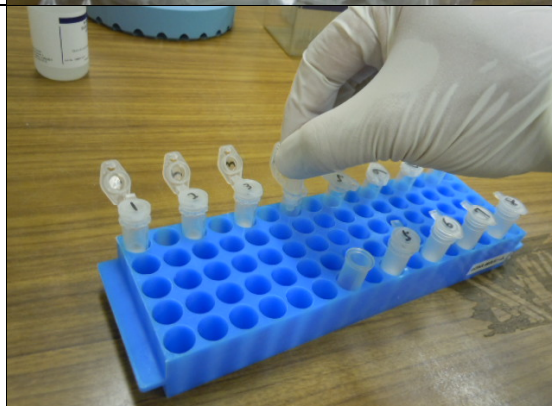


図 4-1-4-12

200 μ L の溶出 Buffer AE（溶出バッファ
ー）をカラムのメンブレン上に注ぐ。



図 4-1-4-13

室温で 1 分間インキュベートした後に
6,000g で 1 分間遠心する。



図 4-1-4-13

遠心を終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる。

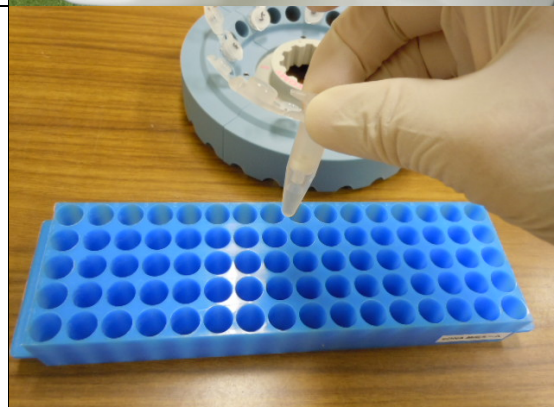


図 4-1-4-14

この状態で-20℃で安定的に保存可能である。



4-2. グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出

DNA 抽出を始める前に：コンタミネーションのリスクを減らす方策

本項では、グラスファイバーフィルターから DNA を抽出する方法を記す。なお、本手法は Uchii et al. 2016 に発表した手法を若干改変したものである。

また、ここからが実験室での工程となるので、コンタミネーション（外来 DNA の混入）には十分注意を払わなくてはならない。とくに、この段階でコンタミネーションが起こると、以降の実験（ライブラリーの調整）が台無しになってしまう。そうならないように、DNA 抽出だけの専用の実験室（DNA 抽出室）を設けるべきである。また、DNA 抽出室は PCR 関連の部屋とは空間的に十分隔離しなければならない。さらに、組織からの抽出 DNA や PCR 産物を扱った当日は DNA 抽出室に入らないなどの細心の注意が必要となる。

DNA 抽出に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

・遠心分離機（サリベットチューブが回せるもの）	
・遠心分離機（1.5mL チューブが回せるもの）	
・ヒートブロックまたは恒温器（56℃に設定）	
・サリベットチューブ	サンプル数分
・ピンセット	サンプル数分
・DNeasy Blood & Tissue Kit	サンプル数分
・Buffer AL および Proteinase K ¹	
・1.5mL エッペンドルフチューブ（低吸着）	サンプル数分
・エタノール（分子生物学用）	適宜
・TE バッファ（pH8.0: 分子生物学用）	適宜
・ゴム手袋（パウダーフリー）	
・マイクロピペット各種	
・フィルターチップ各種	
・1.5mL/2mL 用チューブラック	

¹ 本プロトコルでは、DNeasy キットに付属のバッファ ATL は使用しない。

4-2-1. 実験の準備

実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降の作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。

- 1) 56℃の恒温槽を準備する（温まるのに時間がかかるので、事前に準備しておく）。

- 2) 水サンプルを濾過したフィルターをサリベットに入れる (図 4-2-1-1、-2)。1 サンプルに 2 枚のフィルターを用いた場合は 2 枚まとめて一つのサリベットに入れる。
- 3) サリベットの上部および下部に、サンプル番号を振っておく (図 4-2-1-3)。

4-2-2. タンパク質の分解処理

- 1) サンプルあたり、400 μ L の Buffer AL、40 μ L の Proteinase-K (600mAU/ml) を添加する (4-2-2-1)。サンプルが n 個であればそれぞれ試薬を n + 1 倍まとめて調整してから分注すると良い。
- 2) 恒温槽で 56℃、30 分間保温処理する (図 4-2-2-2)。恒温槽で加熱するとサリベットのキャップが飛ぶ場合があるため、バスケット部分と下のチューブの部分との間を少し緩め、立てて高温槽に入れる。
- 3) その後、3,000g で 3 分間遠心分離する (図 4-2-2-3)。この時点でサリベットの下部に濾液が 800~1,000 μ L となる (図 4-2-2-4)。
- 4) サリベット内のフィルターにまだ DNA が残っているのでこれをさらに回収するため、220 μ L の TE を添加後 (図 4-2-2-5)、1 分間静置する。その後、3,000g で 3 分間遠心分離する。実験中は必ずゴム手袋を着用する。

4-2-3. DNeasy カラムを用いた DNA の精製

- 1) フィルターの入ったサリベットの上部を外して捨て、下部の DNA 溶液 (図 4-2-3-1) に、400 μ L のエタノールを添加する (図 4-2-3-2)。
- 2) ピペッティング (図 4-2-3-3) で混ぜてから DNeasy のカラム (図 4-2-3-4) へ 650 μ L 程度 (半分程度) 移し (図 4-2-3-5)、6,000g で 1 分間遠心する (図 4-2-3-6)。
- 3) 下の 2mL コレクションチューブにたまった濾液を捨て (図 4-2-3-7、-8)、サリベット下部に残っている DNA 溶液を再びカラムに移し (図 4-2-3-9)、6,000g で 1 分間遠心する。この作業を DNA 溶液がなくなるまで繰り返す。
- 4) カラムを新しい 2mL コレクションチューブに載せ替え (図 4-2-3-10)、500 μ L の Buffer AW1 を添加後 (図 4-2-3-11)、6,000g で 1 分間遠心する。
- 5) カラムを新しい 2mL チューブに載せ替え (図 4-2-3-12)、500 μ L の Buffer AW2 を添加後 (図 4-2-3-13)、使用している遠心分離機の最大遠心速度で 2 分間遠心する。

- 6) 遠心機から取り外すときや移動させるときなどは、ゆらして下部の液を上部のカラム部分の先に付着させることのないように注意する。
- 7) 低吸着の 1.5mL チューブを用意し、サンプル名等を記載する (図 4-2-3-14)。
- 8) カラムを低吸着の 1.5mL チューブに載せ替える (図 4-2-3-15, -16)。
- 9) 100~200 μ L の Buffer AE を添加し (図 4-2-3-17)、1 分間静置する。6,000g で 1 分間遠心分離後 (図 4-2-3-18)、カラムの出口部分が抽出溶液に付着しないように気をつけながらカラムを取り外し、1.5mL チューブの蓋をしっかりとしめる (図 4-2-3-19)。この状態で-20℃で安定的に保存可能である。なお、回収 DNA 濃度が希薄となることが予想される場合には、溶出バッファー量を 50 μ L 程度まで減じることも可能である。その際は溶出バッファー量を記録しておくこと。

補足事項

サリベットを遠心できるサイズの遠心機がない場合は、サリベットの代わりに小型スピンのカラムを用いた抽出法を用いることもできる。詳細は Yamanaka et al. 2016 を参考にするとよい。

参考文献

- Uchii, K., Doi, H., & Minamoto, T. 2016. A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16 (2): 415-422. Doi: 10.1111/1755-0998.12460
- Yamanaka, H., Motozawa, H., Tsuji, S., Miyazawa, R. C., Takahara, T., Minamoto, T. 2016. On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research* 31 (6): 963-967. Doi: 10.1007/s11284-016-1400-9

図 4-2-1-1

冷凍庫から取り出したフィルターをサリベットに移し替える。

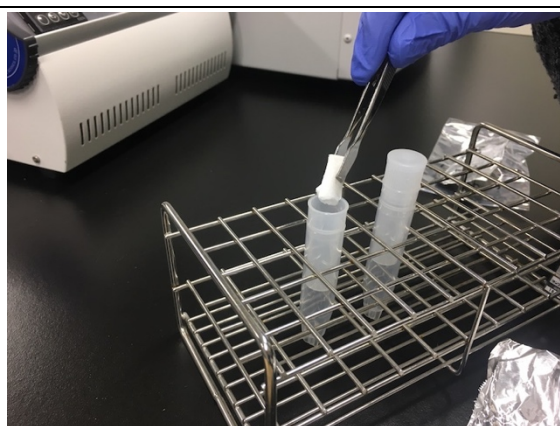


図 4-2-1-2

サリベットに入ったフィルター。



図 4-2-1-3

サリベットの上部と下部にサンプル番号を書く。



図 4-2-2-1

Buffer AL と Proteinase K の混合液を加える。

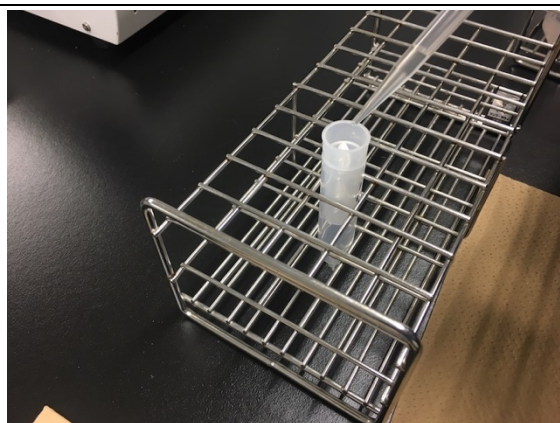


図 4-2-2-2 56℃で 30 分間保温する。	
図 4-2-2-3 遠心機で遠心し、フィルター上の液体を サリベット下部に落とす。	
図 4-2-2-4 遠心後の様子。サリベット下部に液体が 800～1,000μL 程度回収される。	
図 4-2-2-5 フィルターに TE バッファを加える。	

図 4-2-3-1

二度目の遠心後の様子。

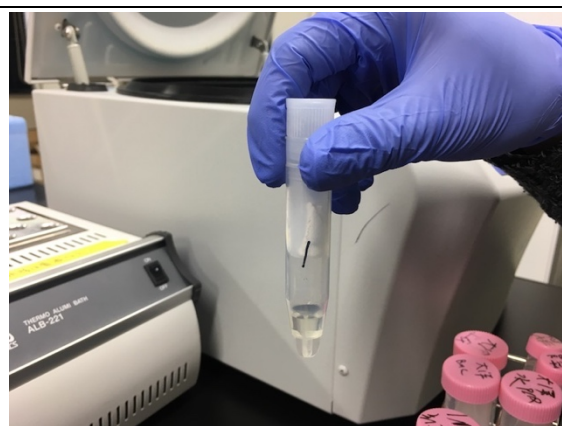


図 4-2-3-2

サリベット上部を取り外し、下部にエタノールを添加する。



図 4-2-3-3

エタノール添加後、ピペッティングでよく混ぜる。



図 4-2-3-4

DNeasy カラム。



図 4-2-3-5

サリベット下部の液を DNeasy カラムに移す。

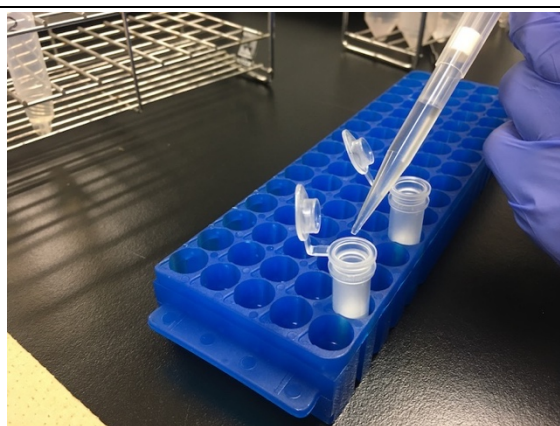


図 4-2-3-6

遠心で、カラムを通過させる。



図 4-2-3-7

DNA がカラム部分にトラップされるため、下部の液体は廃液である。

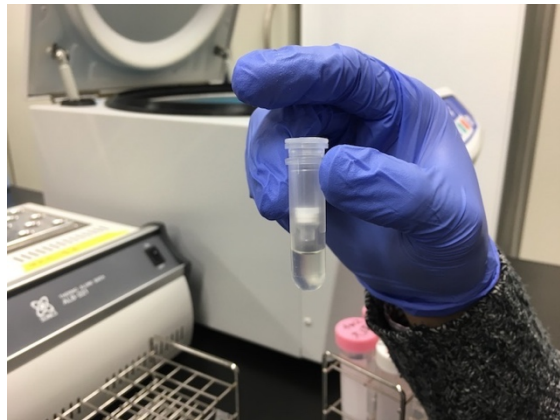


図 4-2-3-8

廃液を捨てる。

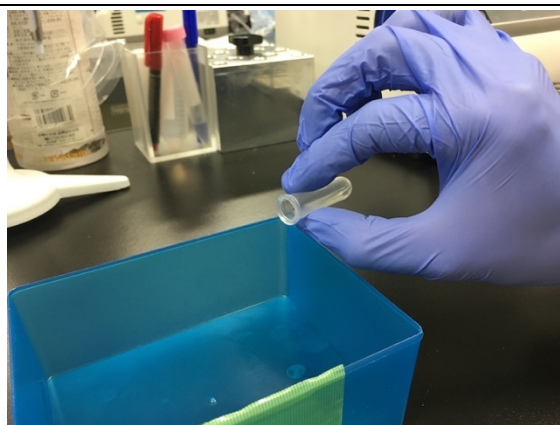


図 4-2-3-9

再びサリベットからカラムに DNA 溶液
を移し、遠心する。

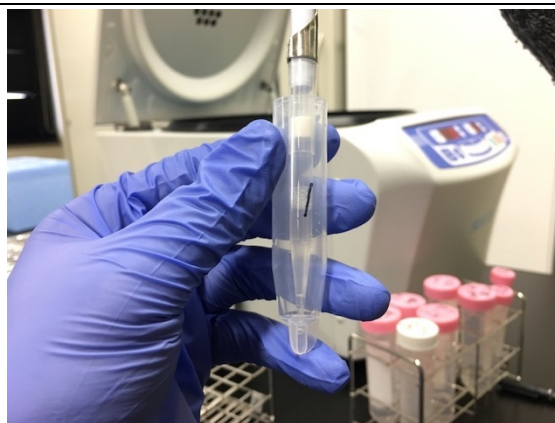


図 4-2-3-10

遠心後、カラムを新しい 2mL チューブ
に載せ替える。

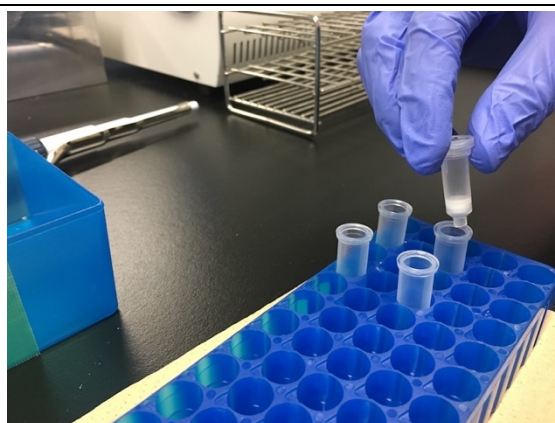


図 4-2-3-11

バッファー AW1 を注ぐ。

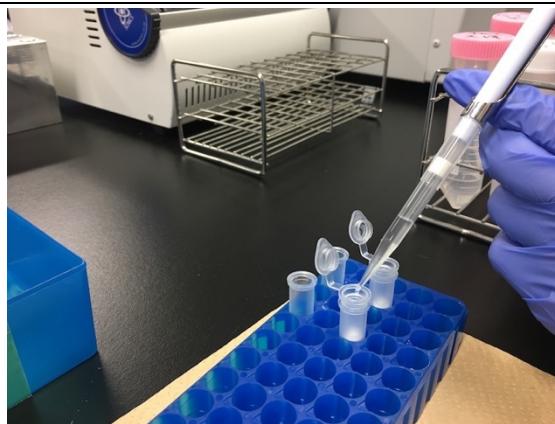


図 4-2-3-12

遠心後、カラムを新しい 2mL チューブ
に載せ替える。

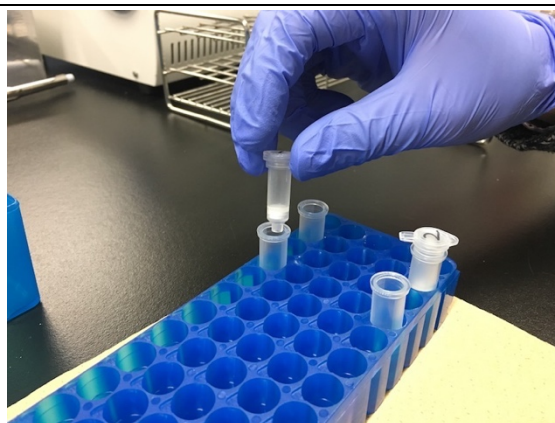


図 4-2-3-13

バッファーAW2 を注ぎ、遠心する。

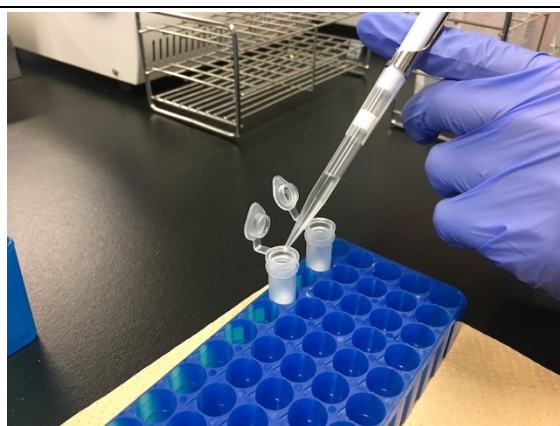


図 4-2-3-14

低吸着の 1.5mL チューブを用意し、サンプル番号を書く。

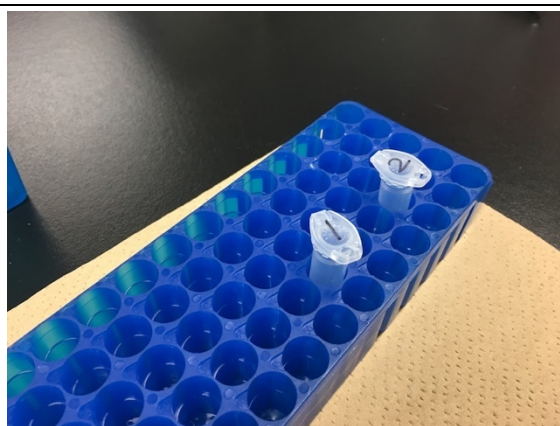


図 4-2-3-15

1.5mL チューブに遠心を終えたカラムを載せ替える。

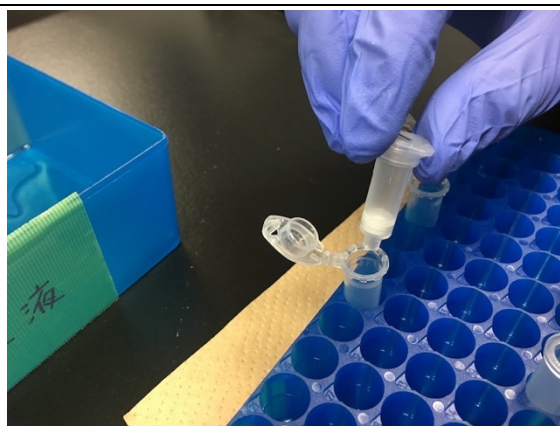


図 4-2-3-16

1.5mL チューブにカラムを載せ替えた状態。



図 4-2-3-17

バッファーAE を注ぎ、1 分静置の後、
遠心する。

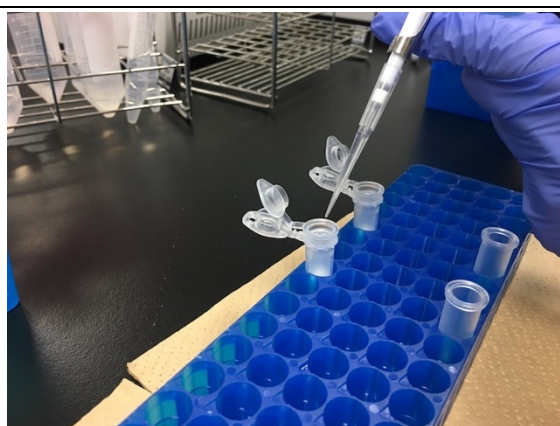


図 4-2-3-18

遠心後の状態。この時点では下部に落ち
た溶液が DNA サンプルであるので、捨
てないように注意する。

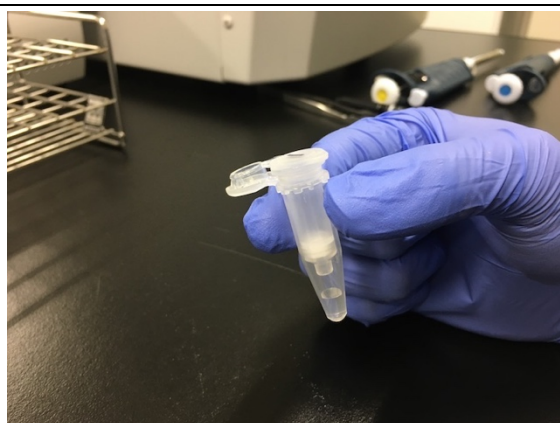
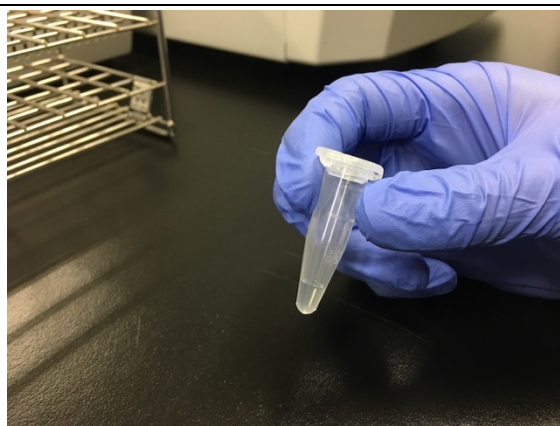


図 4-2-3-19

カラムを外し、蓋をしっかりと締め、冷
凍保存する。



5. DNA の分析

5-1. リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的な検出・定量

はじめに

本項では、リアルタイム PCR を用いた環境 DNA の種特異的な検出および DNA 量の定量について記す。種特異的な検出には対象種ごとに検出系を設計する必要があるため、ここで記すのは一例にすぎない。実験条件などについてはそれぞれの系について十分な検討が必要である。

5-1-1. 種特異的プライマー（およびプローブ）の設計

種特異的なプライマーに求められる条件は、対象種の DNA を効率よく増幅することと、同所的に生息する近縁種の DNA を誤増幅しないことである。そのためのプライマー設計の手順は以下のとおりである。

- 1) 塩基配列情報の入手：対象種および同所的近縁種の塩基配列情報をダウンロードする。NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) や BOLD (<http://www.barcodinglife.org>) 等のデータベースを適宜利用する。ただし、データベース上の情報には誤りが含まれていることに留意し、複数のシーケンス情報を元に検討することが望ましい。
- 2) プライマーの設計：対象種と近縁種の間に変異のある領域を探し、プライマーを設計する（図 5-1-1-2）。プライマーの 3' 末端付近に対象種に特異的な塩基があると良い。プライマーの設計に際しては T_m 値が適切な範囲にあるかなど、プライマー設計の一般的な注意点を参考にすると良い。必要に応じて TaqMan プローブも作成する。
- 3) In silico でのチェック：Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) などを用いて、プライマーの特異性を確認する。同所的に生息する他の生物種が増幅されないことの確認を行う。
- 4) In vitro でのチェック：対象種および近縁種の組織などから抽出した DNA サンプルを用いて PCR 実験を行い、DNA 増幅の有無をチェックして特異性を確認する（図 5-1-1-4）。
- 5) 環境 DNA のシーケンスチェック：環境サンプルに由来する DNA 増幅が確認された場

合には、PCR 増幅産物（アンプリコン）をシーケンスし、対象種の DNA が間違いなく増幅していることを確認する。

5-1-2. リアルタイム PCR 実験

以下は一例である。器材や試薬、対象種によってプロトコールの調整が必要である。

リアルタイム PCR 実験に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・リアルタイム PCR 装置（96 穴）
- ・PCR 試薬（2×Environmental Master Mix 2.0 : サーマフィッシャー）
- ・UNG 酵素（AmpErase Uracil N-Glycosylase : サーマフィッシャー）
- ・Assay Mix（各 18μM のプライマー、2.5μM の TaqMan プローブ ^{*1}）
- ・96 穴 PCR プレートおよびシール
- ・ゴム手袋（パウダーフリー）
- ・マイクロピペット（各種）
- ・フィルターチップ（各種）

^{*1} 対象種毎にプライマーおよびプローブを設計する必要がある。

PCR1 反応あたりの試薬組成（例）

・ 2×Environmental Master Mix 2.0	10.0μL
・ AmpErase Uracil N-Glycosylase	0.1μL
・ Assay Mix	1.0μL
・ DNA	2.0～5.0μL
・ ミリ Q 水（超純水）	適量
・ 合計	20.0μL

全ての PCR 反応（ポジティブコントロール[定量スタンダード]、環境 DNA サンプル、フィールドブランク、濾過ブランク、PCR ブランクを含む）を 3 繰返し以上で行う。なお、定量を行う際には、定量スタンダードとして、人工合成遺伝子を用意し、4 段階以上の希釈系列を用いて定量する。

PCR 反応の条件は様々であるのでここでは一例として上記の試薬組成でプライマーの Tm 値が 60℃前後、2 ステップ PCR を行う場合について以下に記載する。

50℃で 2 分、95℃で 10 分の初期ステップの後、95℃で 15 秒、60℃で 1 分から

なるサイクルを 50-55 回程度繰り返す。

PCR プレートごとにポジティブコントロール（あるいは定量スタンダード）と PCR ブランク 3 繰り返しを載せるので、一度に解析できるサンプル（フィールドブランク、濾過ブランクを含む）数は 27（定量の場合）または 30 サンプル（在不在検出の場合）である。

3 繰り返しのうち、ひとつでもポジティブであったものを陽性と判断する（図 5-1-2）。定量測定の場合は定量スタンダードのデータを用いて DNA 量を測定する。陽性であったサンプルの少なくとも一部は PCR 増幅産物をシーケンスして確かに対象の DNA であることを確認する。特に、リアルタイム PCR 時の Cq 値（Ct 値）が大きいサンプルについてはシーケンスを確認することが望ましい。

PCR 阻害による陰性に対する対応

環境 DNA サンプルには腐植酸など PCR 阻害物質が含まれる事がある。ここで紹介した PCR の反応系は比較的 PCR 阻害の影響を受けにくいものであるが、時として PCR 阻害による偽陰性の結果が得られることがある。PCR 阻害による偽陰性が疑われる場合、インターナショナルポジティブコントロールとして増幅実績のある DNA をスパイクインする方法で阻害の影響の有無を確認することができる。阻害が確認された場合には DNA 溶液を希釈して PCR を行くと結果が改善する場合がある。

参考文献

福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文 2016 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立. 日本生態学会誌 66 (3): 613-620.

図 5-1-1-2

プライマーの設計。カワバタモロコのプライマー設計の例。(福岡ら 2016 より)

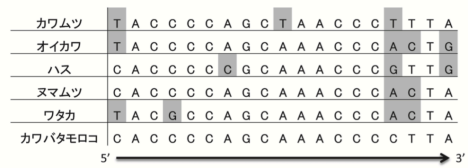


図 5-1-1-4

In vitro の増幅チェック。対象種の DNA が増幅し（赤線）、近縁種の DNA が増幅しない（その他の色）ことを確認する。

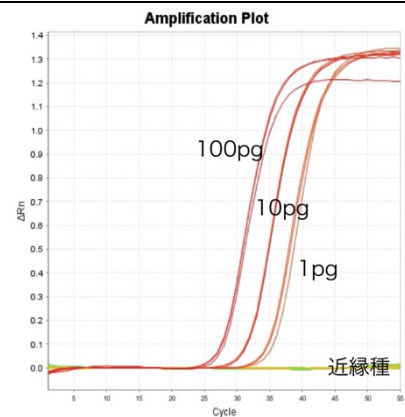
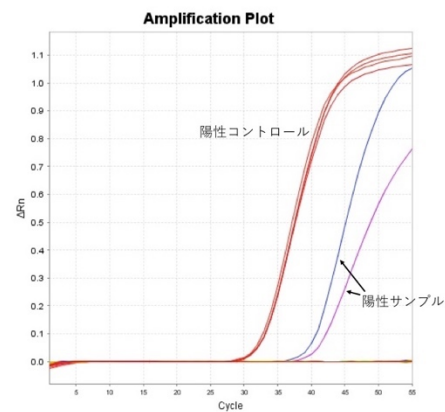


図 5-1-2

リアルタイム PCR の結果の一例。



5-2. MiFish メタバーコーディング

5-2-1. ライブラリーの調整ー 1 : 1st PCR

実験を始める前に：コンタミのリスクを減らす方策

MiFish メタバーコーディングでは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いてターゲットとなる環境 DNA を分析可能な量に増幅すると同時に、PCR 産物の両端に各種のアダプターを付加することによって次世代シーケンサーで分析可能な分子に加工する（ライブラリーの調整）。一方、PCR は大量の DNA 断片を合成するため、実験の汚染源となりやすい。したがって、PCR の準備（試薬の調合等）を行う実験室（プレ PCR ルーム）と、PCR を行ったり PCR 産物そのものを扱う実験室（ポスト PCR ルーム）は空間的に隔離すべきである。また、PCR 産物を扱った当日には DNA 抽出やその他の実験を行わないなど、コンタミのリスクを減らす工夫も必要となる。さらには、MiFish メタバーコーディングでは二段階 PCR を行うため、最初の PCR（1st PCR）産物を希釈して二回目の PCR（2nd PCR）のテンプレートにする操作が必要となる。そのため、後者の実験室（ポスト PCR ルーム）には、この操作の際に生じるコンタミを防ぐためのクリーンベンチや、クリーンなオープンスペースをつくるテーブルコート（KOACH T 500, KOKEN）等を設置する必要がある。また、あらかじめマイクロピペット、チップ、チューブ、チューブラック、ミリ Q 水は殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日販工業株式会社など）を使って除染を行い（図 5-2-1-1）、実験机も泡ハイター等を使用して除染すべきである。

1st PCR に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など）
- ・ 殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日販工業株式会社など）
- ・ KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems 社）¹
- ・ MiFish プライマー 原液（TE バッファーで 100μM に希釈済みのものを注文すると便利）

板鰐類用（サメ・エイ類に最適化したプライマー）

MiFish-E-F-v2 (5'-3'; 61 mer):
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNRGTTGGTAAATCTCGTGCCAGC
MiFish-E-R-v2 (5'-3'; 68 mer):
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCATAGTGGGGTATCTAATCCTAG
TTTG

硬骨魚類用 ①（硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー）

MiFish-U-F (5'-3'; 60 mer):
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGTCGGTAAACTCGTGCCAGC
MiFish-U-R (5'-3'; 67 mer):
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGT
TTG

硬骨魚類用 ② (温帯の沿岸域で一般的なアナハゼ類に最適化したプライマー)

MiFish-U2-F (5'-3'; 60 mer):
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNGCCGGTAAACTCGTGCCAGC
MiFish-U2-R (5'-3'; 67 mer):
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNCATAGGAGGGTGTCTAATCCCCGT
TTG

- ・ ミリ Q 水 (または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水)³
- ・ TE バッファー (分子生物学実験用のハイグレードなもの)
- ・ 8 連チューブ
- ・ 1.5mL チューブ (DNA 低吸着)
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)
- ・ フィルターチップ (マイクロピペットの容量に合わせて各種)
- ・ 電動マイクロピペット 0.5~10μL, 5~100μL (Xplorer Plus, エッペンドルフ社など)
- ・ 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- ・ 8 連チューブ用チューブラック
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

¹ 陸水のような PCR 阻害物質 (たとえば腐植酸) を含むことが多い環境水や泥試料から抽出した DNA では、KAPA HiFi HS で 1st PCR 産物が得られないことがある。このような場合、KOD FX Neo や KOD One (東洋紡) を用いることで良好な増幅が得られることがある。ただし、酵素によって非特異的増幅の起きやすさなどの特性が異なるので、使用の際には特性の違いを理解する必要がある。プロトコールについては、メーカーが提供するものをそのまま利用している。PCR 阻害物質の影響で増幅がうまくいかない場合には、サンプルを希釈するとうまく増幅する場合もあるが、その場合には 1st PCR 時の PCR サイクル数を増やすことも検討すると良い。ただし、40 サイクル以下とすること (5-2-1-1.参照)。

² アユ、ワカサギ、スナヤツメなど魚種によって、プライマー部分に変異があるために増幅効率が低下するものがある。これらの魚種が生息する環境で用いる場合、配列を修正したプライマーを少量混合すると検出可能である。

³ 実験室共用でミリ Q 水を使っているとコンタミの原因となりやすい。ミリ Q 水を使う場合は殺菌灯で実験のたびに除染するか、そうでない場合は分子生物学実験用の滅菌水を購入した方がよい。

1st PCR 産物の精製と濃縮に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ 微量高速冷却遠心機（MX-307, TOMY など）
- ・ ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2, エムエス機器など）
- ・ 8 連チューブ用卓上遠心機（マイクロ PCR スピナー MS-PCR, アズワンなど）
- ・ 1.5mL/2.0mL 用卓上遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワンなど）
- ・ GeneRead Size Selection Kit (180514, キアゲン)¹
- ・ 2.0mL コレクションチューブ (19201, キアゲン; キットの不足分を補うために別途購入)
- ・ 1.5mL チューブ (DNA 低吸着)
- ・ 80%エタノール (適量)
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2 (ピペットマン, ギルソン社など)
- ・ フィルターチップ (マイクロピペットの容量に合わせて各種)
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

¹ DNA 精製試薬キット Agencourt AMPure XP や SPRIselect（両者共にベックマン・コーラルター社）等のビーズで精製しても良好な結果が得られている。この場合、それぞれの試薬は PCR 産物と等量をもちいて、プロトコールはメーカーが提供するものをそのまま利用している。

精製・濃縮した 1st PCR 産物の定量に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ TapeStation 2200 (アジレント・テクノロジー)¹
- ・ High Sensitivity D1000 Screen Tape (5067-5584, アジレント・テクノロジー)
- ・ High Sensitivity D1000 Reagents (5067-5585, アジレント・テクノロジー)
- ・ TapeStation 用ピペットチップ (5067-5153, アジレント・テクノロジー)
- ・ 卓上攪拌器 (ボルテックス MS3 ベーシック, イカジャパン)
- ・ 8 連チューブ用卓上遠心機 (マイクロ PCR スピナー MS-PCR, アズワンなど)
- ・ 1.5mL/2.0mL 用卓上遠心機 (マイクロシックス MS-1, アズワンなど)
- ・ 電動マイクロピペット 0.5~10 μ L (Xplorer plus, エッペンドルフ)
- ・ マイクロピペット P-2 (ピペットマン, ギルソンなど)
- ・ フィルターチップ 10 μ L
- ・ 8 連チューブ
- ・ 8 連チューブラック
- ・ ゴム手袋 (パウダーフリー)

- ・ ミリ Q 水（超純水）

¹ 同社が販売するの BioAnalyzer でも良好な結果が得られている。この場合、プロトコールはメーカーが提供するものをそのまま利用している。

5-2-1-1. 1st PCR

環境水中から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行う場合、抽出 DNA に含まれる魚類由来の DNA 量は事前にわかっていない。したがって、本番実験を行う前に予備実験を行うことで、PCR のサイクル数など至適な実験条件を探索することが重要になる。なお、実験中は必ずゴム手袋を着用すること（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。

- 1) 実験を始める前にサーマルサイクラーの電源を入れる。
- 2) プライマーの希釈：市販の TE バッファーを用いて、プライマーの原液（100 μ M）を 20 倍に希釈する。希釈済みプライマーを以下の比率で混合してプライマーミックスを作る。MiFish-E-F/R-v2：MiFish-U-F/R：MiFish-U2-F/R=1:2:1（淡水魚だけの場合は MiFish-U-F/R のみでよい）
- 3) 試薬の組成：全容量 12 μ L（DNA 量 2 μ L を含む）で PCR を行う場合に、チューブ 1 本あたりのプレミックスの組成は以下のようになる。（注意：試薬は必要量の 1.1～1.2 倍程度の量を調合しないと、電動ピペットで分注する際に不足することがある）。

KAPA HiFi HS ReadyMix	6.0 μ L
プライマーミックス	2.8 μ L
ミリ Q 水	1.2 μ L

- 4) PCR の繰り返し数：PCR での取りこぼし（PCR dropouts）を最小限に抑えるために、同一のサンプル（環境 DNA）に対して 8 連チューブ 1 本をつかった繰り返し数 8 回の PCR を行う。なお、1st PCR を実施する際に生じるコンタミネーションをモニターするために、1st PCR に必ず 1 本以上のブランクを入れること（繰り返し数は 1 回で抽出 DNA の代わりにミリ Q 水をテンプレートとして入れる）。濾過ブランクと抽出ブランクも同時に実験する場合でも、1st PCR の段階で必ず PCR ブランクは含める（図 5-2-1-1-1）。
- 5) 上記試薬を必要量の 1.1 倍程度調合してプレミックスを作成し、これを電動ピペットで 8 連チューブに 10 μ L ずつ分注する。その後、個々のチューブに抽出済みの環境 DNA を 2 μ L ずつ電動ピペットで分注する。PCR の繰り返し数が 8 回の場合、抽出 DNA を

$2\mu\text{L} \times 8 = 16\mu\text{L}$ 使うことになる。

- 6) サーマルサイクラーの設定は以下のようになる：

最初に 95℃の DNA 変性を 3 分間を挿入	
98℃の DNA 変性を 20 秒	} 35 サイクル
65℃のアニーリングを 15 秒	
72℃の伸長反応を 15 秒	
最後に 72℃の伸長反応を 5 分間を挿入	

注意：アニーリング温度は KAPA HiFi Ready Mix の特性（少なくとも 60℃以上）によりかなり高めに設定してある。これより高いとプライマー配列とのマッチングが低い魚種が検出漏れとなり、逆にこれより低いと非特異的な産物（微生物の 16S rRNA 由来と推定される産物）が多くなる。両者のトレードオフを考えるとこのくらいのアニーリング温度が適正と思われるが、今後さらなる検討が必要である。

- 7) 1st PCR のサイクル数について：冬期のような魚の活性が低いときには 35 サイクルだと十分な増幅が見られないことがあるため調整が必要となる。そのような時は、40 回以下の範囲でサイクル数を増やすことで DNA の回収量を確保する。例えば房総半島沿岸では、冬期以外の暖かい時期では 35 サイクルで十分量の 1st PCR 産物（海水 1 L を濾過）が得られたが、水温が下がると同じ量の 1st PCR 産物を得るためには 38 サイクルが必要となった。また、PCR 産物が確認できないからといってサイクル数を 40 回より多くすると、ブランクにも明瞭な PCR 産物ができてしまうなど誤検出の原因となる。このようにサイクル数によってデータの質が変わりうるので、慎重に検討する必要がある。

5-2-1-2. 1st PCR 産物の精製と濃縮

本項ではスピнкаラム（GeneRead Size Selection Kit；以下「カラム」と記す：図 5-2-1-2-1）を用いた精製・濃縮法について記す。環境 DNA メタバーコーディングでは、事前に濃度が不明な微量の DNA を分析可能な量まで増幅させるため、それ以降の実験を阻害するプライマーダイマーやアダプターダイマーが残りやすい。これらを取り除くことが良質のライブラリーを作成するための必須条件となるため、以下のプロトコルでは同じ精製を 2 回繰り返している。1 回の精製でも十分な場合もあるが、精製を 2 回繰り返すことにより、ゲル上で検出できないレベルまでダイマー類を除去することができる。

- 1) 8 繰り返しした 1st PCR 産物を 1 本の 1.5mL チューブにまとめる（図 5-2-1-2-2）。8 連チューブ 1 本あたりの反応系が 12.0μL なので、すべて合わせると 96.0μL になる。ブランクについては 1 繰り返しのため 12.0μL のまま。

- 2) 各 1.5mL チューブに 4 倍量の SB1 溶液 (384 μ L ; ブランクの SB1 溶液量は 48 μ L) を入れ (図 5-2-1-2-3)、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で 1 分間静置。
- 3) GeneRead Size Selection Kit に付属する専用のカラム (コレクションチューブ付き) を必要分用意し、キャップに必要事項を記入する (図 5-2-1-2-4)。
- 4) コレクションチューブにセットされたカラムに SB1 を混合した PCR 産物を入れ (図 5-2-1-2-5)、20,000g で 1 分間遠心する (図 5-2-1-2-6)。
- 5) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える (図 5-2-1-2-7)。使用済みのコレクションチューブは廃棄する (図 5-2-1-2-8)。
- 6) カラムに 700 μ L の 80%エタノールを添加し (図 5-2-1-2-9) 20,000g で 1 分間遠心する (図 5-2-1-2-10)。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作 (80%エタノールによる精製) を 2 回繰り返す。
- 7) GeneRead Size Selection Kit に付属する 1.5mL のチューブを用意し、キャップに必要事項を記入する。カラムをその 1.5mL チューブに載せ替える (図 5-2-1-2-11)。
- 8) キットに付属の TE バッファー 90 μ L をカラムに注ぎ (図 5-2-1-2-12)、室温で 1 分間静置する。
- 9) カラムを 1 分間静置した後、20,000g で 1 分間遠心する。
- 10) 1.5mL のチューブに回収された産物 90 μ L に対して 2 回目の精製を行う。TE バッファーで溶出した抽出 DNA (90 μ L) の 4 倍量の SB1 溶液 (360 μ L) を 1.5mL チューブに入れ (図 5-2-1-2-13)、よく攪拌してから軽く遠心する。室温で 1 分間静置する。
- 11) カラムを新たなコレクションチューブに載せ、4 倍量の SB1 溶液を加えた 1 回目の精製済み産物をカラムに注ぐ (図 5-2-1-2-14)。20,000g で 1 分間遠心する。
- 12) 遠心後、コレクションチューブを外し、新しいコレクションチューブにカラムを載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。
- 13) カラムに 700 μ L の 80%エタノールを加えて 20,000g で 1 分間遠心する。終了後、カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。使用済みのコレクションチューブは廃棄する。この操作 (80%エタノールによる精製) を 2 回繰り返す。
- 14) DNA 低吸着の 1.5mL チューブ を用意し、必要事項をキャップに記入する。キャップを開けたままその上にカラムを装着する。

- 15) キットに付属する EB バッファー 17 μ L を、カラムのメンブレンの中心に注意深くピペットで注ぎ入れ (図 5-2-1-2-15)、室温で 1 分間静置。
- 16) 1 分間静置したカラムを 20,000g で 1 分間遠心。終了後、カラムを取り外してチューブのキャップをしっかりと閉じる (図 5-2-1-2-16)。カラムは廃棄する。この状態で -20℃で安定的に保存が可能 (図 5-2-1-2-17)。

5-2-1-3. 精製・濃縮済み 1st PCR 産物の定量と希釈

精製によってプライマーダイマー等が除かれているかを確認すると同時に PCR 産物の量を測定する。ここでは、アジレント社の TapeStation 2200 を用いたプロトコルを記す。ちなみに、TapeStation 以外にも同社の BioAnalyzer、あるいは他社の同等の機器でも同様の分析が可能である。用いるキットは High Sensitivity D1000 ScreenTape System になる。ScreenTape には予めゲルが充填されており、一度に最大 16 本の 1st PCR 産物を定量できる。DNA ラダーを使用する場合は 15 本の産物が定量できる。

- 1) 30 分前に試薬を室温に戻しておく (図 5-2-1-3-1)。
- 2) TapeStation 2200 付属のコンピューターを起動する。起動完了後に TapeStation 2200 の本体の電源を入れる (図 5-2-1-3-2)。
- 3) TapeStation とコンピューターの接続が確認できたら、TapeStation 2200 コントローラーを起動し、ScreenTape と必要な数のチップをセットする (図 5-2-1-3-3)。
- 4) 8 連チューブを用意し、DNA ラダー (1 本) とサンプル数を合計した本数の High Sensitivity D1000 Sample Buffer 2 μ L を分注する (図 5-2-1-3-4)。
- 5) 分注した 2 μ L のバッファーに、ラダーもしくは精製濃縮済み 1st PCR 産物を 2 μ L ずつ入れ (図 5-2-1-3-5, 6) キャップをする。軽く遠心後、ボルテックスを使用し 2000rpm で 1 分間攪拌する (図 5-2-1-3-7)。攪拌後に再度軽く遠心し、溶液をチューブの底に集める。
- 6) 遠心後、溶液が飛び散らないように注意深くキャップを開け、TapeStation 2200 のカセットにセットする (図 5-2-1-3-8)。
- 7) TapeStation 2200 コントローラーの指示に従って (図 5-2-1-3-9, 10) 泳動を開始すると、20 分ほどでターゲットのバンド (約 310bp) がフェログラムと共に表示される (図 5-2-1-3-11)。
- 8) ターゲットバンドの濃度を読み取り、ミリ Q 水で 0.1ng/ μ L に希釈する。ブランクに

については、ポジティブサンプルの平均希釈率を便宜的に用いて希釈する。ただし、非特異的増幅が顕著である場合などは 2nd PCR 後に濃度を調整したほうが良い場合もある。その場合は 5-2-2-1 の 18) のステップでサンプルを 1 つのチューブにまとめずに、精製と DNA 濃度の測定を行う必要がある。

注意：精製・濃縮済み 1st PCR 産物の希釈にあたっては、PCR 準備室で個々のサンプルの希釈に必要なミリ Q 水を予め 1.5mL チューブに分注しておき、それを PCR 室に持ち込むとよい。精製・濃縮した 1st PCR 産物を PCR 準備室に持ち込むと、クロスコンタミの大きな原因となるので注意すること。また、希釈に必要なミリ Q 水の量を計算する際には、精製濃縮済み 1st PCR 産物の全量ではなくその一部（例えば 10.0 μ L）に対して行うと希釈の精度が上がる。こうすることで、2nd PCR 産物の量（リード数）がほぼ一定になる。また、所定の濃度に達しないときは、0.05ng/ μ L に希釈して 2nd PCR のサイクル数を増やすなど工夫する。

9) 希釈後の 1st PCR 産物と、残った希釈前の 1st PCR 産物は -20°C で保存する。

5-2-2. ライブラリーの調整－2：2nd PCR

実験を始める前に

本項では、定量済みの 1st PCR 産物をテンプレートに用いて 2nd PCR を行う方法について記す。2nd PCR は、シークエンスプライマーが付加したテンプレート（定量済み 1st PCR 産物）に、インデクス配列とフローセル結合配列を付加することが主な目的となる。テンプレートを増幅することが目的ではないので、サイクル数は通常 10 回にとどめているが、1st PCR 産物が十分量得られなかった場合（0.1ng/μL 未満にしか調整できない場合）は、濃度に応じて 2nd PCR のサイクル数を増やすなどの工夫が必要になる。また、ラン間のキャリーオーバー（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリー）の影響を最小限にするために、1 回使ったインデクス配列の組み合わせはその後の数回（2～3 回）のランでは使うべきではない。

2nd PCR に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems など）
- ・ 殺菌灯式電気消毒器（NB-5, 日販工業株式会社など）
- ・ 定量済み 1st PCR 産物（0.1ng/μL）
- ・ KAPA HiFi HS ReadyMix（KK2602, KAPA Biosystems 社）
- ・ インデクス付きプライマー原液（TE バッファーで 100μM に希釈されたものを注文すると便利；インデクス配列については本項末尾に関連情報を記す）

フォワードプライマーの一例（青の部分が 8 塩基からなるインデクス配列）

2nd PCR F D501 (5′-3′; 70 mer)
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC**TATAGCCT**TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

リバースプライマーの一例（赤の部分が 8 塩基からなるインデクス配列）

2nd PCR R D701 (5′-3′; 66 mer)
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGAGTAAT**GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

- ・ ミリ Q 水（または分子生物学実験用のハイグレードな滅菌水）
- ・ TE バッファー（分子生物学実験用のハイグレードなもの）
- ・ 8 連チューブ
- ・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）

- ・ フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- ・ 電動マイクロピペット 0.5～10μL, 5～100μL（Xplorer Plus, エッペンドルフ社）
- ・ 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- ・ 8 連チューブ用チューブラック
- ・ 実験用ゴム手袋（パウダーフリー）

2nd PCR 産物の切り出しに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ E-Gel iBase Power System（G6400, Invitrogen）
- ・ E-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator（G6500, Invitrogen）
- ・ E-gel SizeSelect II 2%（G661012, Invitrogen）
- ・ 分子サイズマーカー：50bp DNA Ladder（10416014, Invitrogen）
- ・ 2nd PCR 産物（1 本あるいはライブラリーごとに複数本のチューブにまとめたもの）
- ・ ミリ Q 水
- ・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- ・ マイクロピペット P-100（ピペットマン, ギルソン社など）
- ・ フィルターチップ 100μL
- ・ 1.5mL/2.0mL チューブ用チューブラック
- ・ ゴム手袋（パウダーフリー）

切り出した 2nd PCR 産物の定量に必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- ・ Qubit 2.0 Fluorometer（Life Technologies）
- ・ Qubit dsDNA HS Assay（Q32851 [100 サンプル用], Life Technologies）（Q32854 [500 サンプル用], Life Technologies）
- ・ Qubit 測定用 500μL 専用チューブ（Q32856, Life Technologies）
- ・ 500μL チューブ用チューブラック
- ・ 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン社など）
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）
- ・ フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- ・ E-Gel で回収した 2nd PCR 産物
- ・ ゴム手袋（パウダーフリー）

5-2-2-1. 2nd PCR

実験中は必ずゴム手袋を着用する（これ以降作業中に手袋の汚染を感じた場合は速やかに交換する）。事前にピペットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で 20 分程度照射して除染しておく（図 5-2-1-1-1）。なお、以下に記す方法は、使用する試薬の量を減らすと同時に、2nd PCR で得られる各ライブラリーのリード数ができるだけ均一になるように工夫したものである。

注意：PCR の準備は必ず PCR 準備室（プレ PCR ルーム）で行うこと。また、希釈したとはいえテンプレートは PCR 産物を含む。したがって、テンプレートを PCR 準備室に持ち込むではない。テンプレートの分注は PCR 室（ポスト PCR ルーム）内のクリーンベンチ内（あるいはそれに相当するスペース）で行うこと。PCR 室でテンプレートを分注する際には、部屋のファンを停めて実験室内のチリが舞い上がらないように注意する。

- 1) 実験を始める前にサーマルサイクラーの電源を入れる。
- 2) プライマーの希釈：市販の TE バッファーを用いて、プライマーの原液を 5 μ M に希釈する。
- 3) 試薬の組成：全容量 15 μ L（DNA 量 1.86 μ L を含む）で PCR を行う場合に、チューブ 1 本当たりの組成は以下になる。（注意：試薬は必要量の 1.2 倍程度の量を調合しないと、電動ピペットで分注する際に不足することがある）。

KAPA HiFi HS ReadyMix	7.5 μ L
プライマー	各 0.88 μ L
ミリ Q 水	3.88 μ L
定量済み 1st PCR 産物	1.86 μ L

注意：2nd PCR では、フォワードプライマーとリバースプライマーに含まれるインデクス配列の組み合わせをサンプルごとに変える。こうすることによって、シークエンス後に異なるサンプルの識別が可能になる。インデクス配列の組み合わせ方にはいろいろな方法があるが、ここでは 8 連チューブをチューブラックに並べたときの「行」と「列」でインデクス配列を変える方法を採用する。8 連チューブの場合、行数は 8 に固定されている一方で、列数は使用する 8 連チューブの本数で調整できる。以下に、8 種のフォワードプライマー（インデクス配列は D501～508）と 4 種のリバースプライマー（インデクス配列は A701～704）を用いることで、32 ライブラリー（＝サンプル）の並列シークエンスを可能にする組み合わせを示す。また、冒頭に記したように、ラン間のキャリーオーバー（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリー）の影響を最小限にするために、1 回使ったインデクス配列の組み合わせはその後の数回（2～3 回）のランに使うべきではない。

D501/A701	D501/A702	D501/A703	D501/A704
D502/A701	D502/A702	D502/A703	D502/A704
D503/A701	D503/A702	D503/A703	D503/A704
D504/A701	D504/A702	D504/A703	D504/A704
D505/A701	D505/A702	D505/A703	D505/A704
D506/A701	D506/A702	D506/A703	D506/A704
D507/A701	D507/A702	D507/A703	D507/A704
D508/A701	D508/A702	D508/A703	D508/A704

上記のような組み合わせの場合、行方向（横方向）には標記のフォワードプライマー（D501～508）を含むチューブ 4 本分のプレミックスを 8 種類、列方向（縦方向）には標記のリバースプライマー（A701～704）を含むチューブ 8 本分のプレミックスを 4 種類作成すればよい（図 5-2-2-1-2）。このように（プライマーのみを 1 本 1 本分注するのではなく）プライマーを含むプレミックスを作成することで、PCR 反応の総量が小さくても（ここでは 15 μ L）正確な反応溶液の調整が可能になる。

- 4) 全体に必要なプレミックス（KAPA+ミリ Q 水のためのプレミックス）を必要量の 1.2 倍作成する。上記の 32 ライブラリーの場合であれば、 $KAPA\ 7.5\mu L \times 32 \times 1.2 = 288\mu L$ にミリ Q 水 $3.88\mu L \times 32 \times 1.2 = 149\mu L$ を加える（総量 437 μ L）。
- 5) フォワードプライマー 8 種+リバースプライマー 4 種に用いる計 12 本の 1.5mL チューブを用意してキャップに必要事項を記入する。
- 6) 上記のフォワードプライマー 8 種のチューブに必要なプレミックス ($7.5\mu L + 3.88\mu L$) $\times 4 \times 1.12 / 2 = 25.5\mu L$ を 8 本のチューブに分注する（1.12 倍量）。
- 7) 上記のリバースプライマー 4 種のチューブに必要なプレミックス ($7.5\mu L + 3.88\mu L$) $\times 8 \times 1.12 / 2 = 51\mu L$ を 4 本のチューブに分注する（1.12 倍量）。
- 8) 6) の各チューブに必要な 8 種のフォワードプライマーを $0.88\mu L \times 4 \times 1.12 = 3.94\mu L$ ずつ分注する。
- 9) 7) の各チューブに必要な 4 種のリバースプライマーを $0.88\mu L \times 8 \times 1.12 = 7.88\mu L$ ずつ分注する。
- 10) 各フォワードプライマーを含むプレミックスを横方向に 6.57 μ L ずつ分注する。
- 11) 各リバースプライマーを含むプレミックスを縦方向に 6.57 μ L ずつ分注する。
- 12) 分注が終了した 8 連チューブのキャップを軽く閉じ、卓上小型遠心機で遠心して溶液をチューブの底に振り落とす。

- 13) 8 連チューブをチューブラックごと PCR 室のクリーンベンチ（あるいはそれに相当する空間）に持って行く。
- 14) 8 連チューブのキャップをプレミックスが飛散しないように注意深く開け、希釈済み 1st PCR 産物を所定のチューブに 1.86 μ L ずつ入れる。
- 15) 8 連チューブのキャップをしっかりと閉じ、卓上小型遠心機で溶液をチューブの底に落とす。
- 16) 2nd PCR では、アニーリングと伸長反応を合わせたシャトル PCR を行う。サーマルサイクラーを以下のように設定する。

最初に 95℃の DNA 変性を 3 分間を挿入	} 10 サイクル
98℃の DNA 変性を 20 秒	
72℃のアニーリング+伸長反応を 15 秒	
最後に 72℃の伸長反応を 5 分間を挿入	

- 17) 8 連チューブをサーマルサイクラーにセットし 2nd PCR を開始する。
- 18) 2nd PCR が終了すると、サンプルごとに固有のインデックスが付加されているので 1 本のチューブにまとめることができる。まとめて分析したいサンプル（たとえば 1 回の調査でとられた 10 サンプル）ごとに 1 本のチューブにまとめる（図 5-2-2-1-2）。1st PCR 後に希釈を行っている場合、特に濃度調整などは不要である。

5-2-2-2. 2nd PCR 産物の切り出し

2nd PCR 産物には、MiSeq を用いた超並列シークエンスに必要なフローセル結合配列（計 53bp）とインデックス配列（計 16bp）が 1st PCR 産物（約 300bp）の両端に付加されている。1st PCR 産物には、ターゲットとなる魚類由来の産物に加えて 70bp ほど大きな非特異的産物（微生物の 16S rRNA 由来の産物と推定されている）が含まれることが多い。本項では、魚類由来の 2nd PCR 産物（約 370bp）のみを E-Gel を用いたゲル泳動で切り出す方法（実際にはピペットで吸い出す方法）を記す。

- 1) 分子サイズマーカー（50bp DNA Ladder）原液 80 μ L にミリ Q 水 920 μ L を加えて希釈する。
- 2) E-Gel iBase Power System（以下 iBase）を E-Gel Safe Imager E-Gel Real-Time Transilluminator（以下 Safe Imager）の上にのせ、両者を付属のケーブルで接続してスイッチを ON にする。

- 3) E-gel SizeSelect II 2% (プラスチックケースに封入されたゲルで以下「ゲル」と呼ぶ)が入ったパッケージを開封し、ゲルのウェルに挿入されたコーム 2 個を注意深く取り外す (図 5-2-2-2-1)。
- 4) ゲルの右側から iBase に挿入する (図 5-2-2-2-2)。ゲルが正しく差し込まれると iBase のライトが点灯する。
- 5) 2nd PCR 産物と付属の Loading Buffer を混合し、上段の各ウェルに 20~25 μ L ローディングする。DNA マーカ―をサンプルと別のウェルに 20~25 μ L ローディングする。未使用のウェルにはミリ Q 水を同じ分量ローディングする (図 5-2-2-2-3)。
- 6) 中段のウェル (回収用のウェル) の全てにミリ Q 水を満たす。回収ウェルにミリ Q 水を入れ忘れると、泳動が正常に進行しないので注意すること。
- 7) iBase に観察用プレートユニット (オレンジ色のフィルター付きユニット) をセットし (図 5-2-2-2-4)、モードボタンを何回か押して Run SizeSelect 2% (No. 9) モードにセットする。泳動時間はとりあえず 15 分にセットする。
- 8) 慣れないうちは、LED 照射ボタンを泳動中に押して産物の状態をチェックするとよい。本マニュアルで指定した分子サイズマーカ―は 350bp が他のサイズより明るく光るので、約 370bp のターゲットバンドの良い目安となる。
- 9) 15 分が経過するとチャイムが鳴って泳動が一時停止する。LED 照射ボタンを押してターゲットバンドの位置を確認する。回収ウェルの直上に切り込まれたサイズマーカ― (基準線) に達していなければ、さらに泳動を数分間追加する。
- 10) 基準線にターゲットバンドが達したら泳動を一時停止する。
- 11) 回収ウェルのミリ Q 水が泳動中に減少するので、減少した分を補充する。
- 12) 泳動を再開する。回収ウェルにバンド全体が入ったところで泳動を停止する。
- 13) ピペットを用いて回収ウェルからターゲットバンドを吸い出し、ライブラリーごとに 1.5mL チューブにまとめる (図 5-2-2-2-5)。回収する際に、ウェルの底にピペット先端で穴を開けないように注意する。

注意：多くの場合、一回の回収で十分量の 2nd PCR 産物を吸い出せるが、定量後に 4nM に調整するには濃度が不足することがある。そのような場合は、回収ウェルにミリ Q 水を満たして泳動を再開し、一旦バンドを回収ウェルの下流側に出し、泳動モードを Reverse E-Gel にして回収ウェルに戻して再び吸い出すという操作を繰り返すことも可能。この場合、カラムをつかって産物を濃縮すると十分な濃度の 2nd PCR 産物が得られる。

5-2-2-3. 切り出した 2nd PCR 産物の定量

本項では、E-Gel を用いて切り出したライブラリーの濃度測定法について記す。

- 1) Qubit dsDNA HS Assay キットを冷蔵庫から取り出し 30 分以上かけて室温に戻す (図 5-2-2-3-1)。
- 2) Qubit の濃度測定に必要なチューブの本数は校正用スタンダード #1 と #2 にライブラリーの数を加えたものになる。
- 3) キットが室温に戻ったら、Qubit Reagent を 1 μ L に Qubit Buffer を 199 μ L 加えた計 200 μ L のプレミックスを必要本数分調整する (図 5-2-2-3-2, 3)。濃度を測定するライブラリーが 1 本の場合、校正用スタンダード 2 本を含めて計 3 本が必要になるので、Qubit Reagent を 3 μ L に Qubit Buffer を 597 μ L 加えたプレミックスを調整する。
- 4) Qubit 測定用 500 μ L 専用チューブを 2 本取り出し、校正用スタンダード #1 と #2 用にプレミックスを 190 μ L ずつ分注する。その後、キットに付属するスタンダード #1 と #2 をそれぞれのチューブに 10 μ L ずつ入れ (図 5-2-2-3-4)、チューブのキャップを閉めてボルテックスで 2~3 秒攪拌し軽く遠心する。
- 5) 濃度を測定するライブラリーの数だけ 500 μ L チューブを用意し、それぞれにプレミックスを 198 μ L ずつ分注する。その後、ライブラリーを 2 μ L 入れ (図 5-2-2-3-5)、チューブのキャップを閉めてボルテックスで 2~3 秒攪拌し軽く遠心する。2 分間室温で静置する (図 5-2-2-3-6)。

注意：最低でも 2 分間室温で静置しないと測定値が安定しない。

- 6) Qubit 2.0 Fluorometer の画面をタッチして起動する。画面から DNA を選択し、次いで dsDNA High Sensitivity を選択する。校正用スタンダードを用いた校正をするかどうか聞いてくるので、4) で用意したスタンダード #1 と #2 を Qubit の指示に従って順番に測定する (図 5-2-2-3-8, 9)。
- 7) 次にライブラリーの濃度測定を行う。チューブをセットし、Calculate Stock Conc をタッチし、使用するサンプルの量を 2 μ L に設定して濃度を測定する。同じサンプルの濃度測定を、計測値が安定するまで複数回行うとよい。
- 8) Qubit ではテンプレートを 100 倍希釈した計測値 (ng/mL) が表示される (図 5-2-2-3-10)。この値が 10.0 ng/mL 未満の場合には、複数ウェルから同一ライブラリー

を回収し、それをカラムで濃縮するなど工夫が必要になる。

5-2-2-4. インデクス関連情報

以下に示す表は、メタバーコーディングで広く使われているイルミナ社のインデクス配列（8塩基）である（A501～508/A701～712/D501～508/D701～712）。カスタムプライマーを注文する際には、i5 の配列をフォワードプライマーに、i7 の配列をリバースプライマーに、それぞれそのまま挿入する。以下の表では8塩基の配列が記載されている。MiSeq のランで用いるサンプルシートに記入する際には、i7 の配列は逆相補鎖に変換して記入しないとならないので、以下の表でも逆相補鎖に変換して記載している。iSeq100 など、機種によっては記入の仕方が異なるので注意が必要である。なお、これ以外のインデクスを使用したい場合は、Hamady et al. (2008) にリストアップされているインデックス配列から適当なものをピックアップすれば良い。手持ちのインデクス配列を増やすと、同時に分析できるライブラリーの数が増えると共に、ランごとにインデクスを変えることにより、ラン間のクロスコンタミ（MiSeq 内部の流路に残存する前回ランのライブラリーに由来するコンタミ）を避けることもできる。また、異なる研究室間で相乗りシーケンスを行えるようになるため、研究経費の節約にもつながる。

Hamady, M., Walker, J. J., Harris, J. K., Gold, N. J., and Knight, R. (2008) Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* 5: 235–237.

イルミナ社公認のインデクス配列に関する最新の情報については、以下のサイトから入手することができる（2018年6月現在）。

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/experiment-design/illumina-adapter-sequences-1000000002694-06.pdf

Name	i5 bases	Name	i7 bases	Name	i5 bases	Name	i7 bases
A501	TGAACCTT	A701	ATCACGAC	D501	TATAGCCT	D701	ATTACTCG
A502	TGCTAAGT	A702	ACAGTGGT	D502	ATAGAGGC	D702	TCCGGAGA
A503	TGTTCTCT	A703	CAGATCCA	D503	CCTATCCT	D703	CGCTCATT
A504	TAAGACAC	A704	ACAAACGG	D504	GGCTCTGA	D704	GAGATTCC
A505	CTAATCGA	A705	ACCCAGCA	D505	AGGCGAAG	D705	ATTCAGAA
A506	CTAGAACA	A706	AACCCCTC	D506	TAATCTTA	D706	GAATTCGT
A507	TAAGTTCC	A707	CCCAACCT	D507	CAGGACGT	D707	CTGAAGCT
A508	TAGACCTA	A708	CACCACAC	D508	GTACTGAC	D708	TAATGCGC
		A709	GAAACCCA			D709	CGGCTATG
		A710	TGTGACCA			D710	TCCGCGAA
		A711	AGGGTCAA			D711	TCTCGCGC
		A712	AGGAGTGG			D712	AGCGATAG

5-2-3. MiSeq を用いた超並列シーケンス

シーケンスを始める前に

本項では、イルミナ社の MiSeq を用いた超並列シーケンス法について記す。本手法によるシーケンスを成功に導く最も重要な点は、アダプターダイマーや非特異的産物を含まない、MiFish アンプリコンのみからなる良質のライブラリーを調整することである。このような良質のライブラリーを得ると同時に、ライブラリーごとにほぼ均等なリード数を得るため、本プロトコルでは 1st PCR 産物に対して精製・定量を行い、1st PCR 産物を一定濃度（0.1ng/μL）に調整したテンプレートを用いて 2nd PCR を行うプロトコルを採用した。また、ランを失敗しないためにも MiSeq のメンテナンスが非常に重要になるので、最初にメンテナンスに関連する情報を列記した。なお、MiSeq の他にイルミナ社の iSeq100 でもほぼ同様の解析が可能であることが確認されている。

MiSeq のメンテナンスに必要な試薬・消耗品（例）

- Tween 20 (P7949、Sigma-Aldrich)
- ミリ Q 水
- 50mL 自立式遠沈管
- 500mL 洗浄瓶
- 0.01%次亜塩素酸溶液
- 次亜塩素酸溶液用専用チューブ (MiSeq Disposable Wash Tubes: PN: MS-102-9999)
- ゴム手袋（パウダーフリー）

シーケンスに必要な実験器具と試薬・消耗品（例）

- MiSeq (イルミナ社)
- MiSeq Reagent Kit v2 (300 サイクル) (MS-102-2002, イルミナ社) : 総リード数 1500 万本が必要な場合は本品を用いる。それより少なくてよい場合は MiSeq Reagent Micro Kit v2 (MS-103-1002 ; 総リード数約 400 万本) か MiSeq Reagent Nano Kit v2 (MS-103-1001 ; 総リード数約 100 万本) を用いる。
- 濃度測定済みのライブラリー
- 0.2N NaOH (2N などの濃度の高いストックから実験のたびに調整する)
- PhiX Control v3 (FC-110-3001, イルミナ社)
- 99.5% 分子生物学用グレードエタノール (和光純薬工業)

- ・ ミリQ水
- ・ 脱イオン水
- ・ 1.5mL チューブ（DNA 低吸着）
- ・ ボルテックス・ミキサー（VORTEX-GENIE 2 Mixer, エムエス機器株式会社）と 3 インチプラットホーム
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）
- ・ フィルターチップ（マイクロピペットの容量に合わせて各種）
- ・ チップ 1000 μ L
- ・ レンズクリーニングティッシュ（2105-841, ワットマン）
- ・ 卓上小型遠心機（マイクロシックス MS-1, アズワン社など）
- ・ マイクロピペット P-1000, P-200, P-100, P-20, P-2（ピペットマン, ギルソン社など）
- ・ 試薬キット解凍用バット（W373×D273×H63 程度の大きさ）（PB-2,アズワンなど）
- ・ ゴム手袋（パウダーフリー）

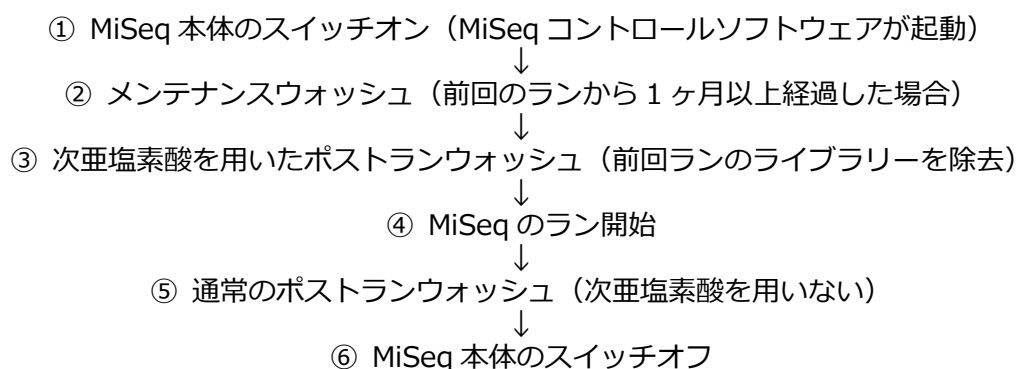
MiSeq Reagent Kit には、**冷凍保存品**として 1) HT1 チューブと 2) 試薬カートリッジ（図 5-2-3-A）が、**冷蔵保存品**として 3) PR2 ボトルと 4) フローセル（図 5-2-3-B）の 4 点が含まれる。ごくまれに、業者の勘違いですべてが冷凍状態で納品されることがあるが、PR2 ボトルとフローセルは凍結すると劣化するので、そのようなキットの使用は避けるべきである。

5-2-3-1. MiSeq のメンテナンス

MiSeq 内部には、シーケンス反応が行われるフローセルにライブラリーや試薬を送るチューブが縦横に張り巡らされている。これらチューブの流路を、前回ランの影響が残らないようにきれいに保つことがランを成功に導く大きな要因の一つになる。

MiSeq では次の 3 通りの洗浄を行う。1) メンテナンスウォッシュ：2 回のウォッシュ液交換を伴う 3 × 20 分のウォッシュで月に 1 回必ず行う（前回のランから 1 ヶ月以上経過すると、MiSeq 側から強制的にメンテナンスウォッシュを行うように要求される）；2) スタンバイウォッシュ：1 回のウォッシュ液交換を伴う 2 × 50 分のウォッシュで、1 週間以上 MiSeq をアイドル状態にすると MiSeq 側からこのウォッシュを行うように要求される；3) ポストランウォッシュ：ウォッシュ液交換のない 1 × 20 分のウォッシュでラン終了後に行う。なお、ポストランウォッシュには、イルミナが提供するアダプターを用いた次亜塩素酸ウォッシュというプロトコルがあるので、通常はこちらを用いて前回ランの持ち越しライブラリーを流路から取り除くようにする。ラン終了後、ポストランウォッシュ

を行いスイッチオフにした場合、以下のような流れで一連のウォッシュを行い、次のランに進むことになる。なお、前回ウォッシュを行なった日付はウォッシュのトップ画面に日付が表示されるので、それを参考にする。



すべてのウォッシュに共通する操作

- 1) 10% Tween 20 ウォッシュ液の作成 : Tween 20 原液 (図 5-2-3-1-1) を希釈して 10% の Tween 20 溶液 (ストック可能) をつくり、さらにそれを希釈して実際に用いる 0.5% Tween 20 ウォッシュ液とする。なお、10% に調整済みの Tween 20 を購入して使ってもよい。ゴム手袋を着用し、50mL 遠沈管に 5mL の Tween 20 を注意深く注ぐ (Tween 20 は非常に粘性が高いので入れ過ぎないように注意 ; 図 5-2-3-1-2)。この遠沈管にミリ Q 水を加えて 50mL にメスアップ。遠沈管をよく攪拌して溶液を混和する。1 回のウォッシュで 10% の Tween 20 溶液を 25mL 使用するので、これが 2 回分のウォッシュ液になる。
- 2) 0.5% Tween 20 ウォッシュ液の作成 : 上記の 10% の Tween 20 溶液 25mL を 500mL の洗浄瓶に入れ (図 5-2-3-1-3)、洗浄びんの目盛りで 500mL に達するまでミリ Q 水を加える。10 回ほど転倒混和する。
- 3) ウォッシュ液の充填 : 溶液の入った洗浄瓶を使ってウォッシュカートリッジにウォッシュ液を注入する (図 5-2-3-1-4)。ウォッシュカートリッジのポート (孔) の上から 1cm 程度までウォッシュ液を注ぐと約 6mL 入る。すべて注ぎ終えたら残りのウォッシュ液をウォッシュボトル (350mL 程度) に移し替える (図 5-2-3-1-5)。
- 4) ウォッシュの準備 : MiSeq コントロールソフトウェア (MCS) のトップ画面 (図 5-2-3-1-6) の左下にある Perform Wash ボタンを押すと 3 通りのウォッシュが表示される (図 5-2-3-1-7)。実施したいウォッシュを選択する。使用済みフローセル (前回のランで使用したフローセル) がフローセルコンパートメントにセットされていることを確認する (図 5-2-3-1-8)。画面右下の Next を押すと、ウォッシュカートリッジとウ

ウォッシュボトル、廃液ボトルの取り出し画面に変わる。

- 5) ウォッシュカートリッジのセット：しばらくすると、カートリッジやボトルが取り出される様子が画面に現れる（図 5-2-3-1-9）。MiSeq 本体の試薬コンパートメントのドアを開け、次に試薬チラーのドアを開ける。試薬チラー内に入っている前回ランのカートリッジ、もしくは前回ウォッシュに用いたウォッシュカートリッジを引き出し、用意したウォッシュカートリッジを奥まできっちり入れ（図 5-2-3-1-10）、試薬チラーのドアを閉める。
- 6) ウォッシュボトルと廃液ボトルのセット：次に試薬コンパートメントのシッパーハンドルを引き上げる。用意したウォッシュボトルをセットし（図 5-2-3-1-11）、廃液ボトルを空にして所定の位置にセットしたら、シッパーハンドルを引き下げる（図 5-2-3-1-12）。
- 7) ウォッシュの開始：ウォッシュカートリッジ、ウォッシュボトル、廃液ボトルのセットが完了したら、MiSeq の試薬コンパートメントの扉を閉じ、画面右下の Next を押すとウォッシュが始まる（図 5-2-3-1-13）。
- 8) ポストランウォッシュの終了：ウォッシュが終了すると右下に Done と表示されるので、それを押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻ってウォッシュの全工程が終了する。メンテナンスウォッシュとスタンバイウォッシュの場合は、以下に記すようにウォッシュ液の交換が必要となる。したがって、ウォッシュ中に先ほど使用した洗浄瓶を水道水でよく洗いミリ Q ですすいだ後、再度 0.5% Tween 20 ウォッシュ液を用意する。
- 9) ウォッシュ液の交換：メンテナンスウォッシュかスタンバイウォッシュの場合、最初のウォッシュが終了するとウォッシュ液を交換するメッセージが表示される。MiSeq の試薬コンパートメントにあるウォッシュカートリッジとウォッシュボトルを取り出し、両者の中に残っている溶液を廃棄する。カートリッジのポートとボトル内部を水道水でよく洗った後にミリ Q 水でよくすすぐ。新たに作成した 0.5% Tween 20 ウォッシュ液を前述と同様にポートとボトルに満たし、再度 MiSeq の試薬コンパートメントにセットする。廃液はそれほど溜まらないので、廃液ボトルはそのまま使用してもよい。
- 10) ウォッシュの終了：メンテナンスウォッシュかスタンバイウォッシュの場合、全ての工程が終わると右下に Done と表示される（図 5-2-3-1-14）。Done を押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻ってウォッシュの全工程が終了する。

次亜塩素酸を用いたウォッシュ

- 1) ウォッシュの準備：ウォッシュカートリッジを用意し、17 番ポートに次亜塩素酸溶液

用専用チューブ（図 5-2-3-1-15 ; MS-102-9999 MiSeq Disposable Wash Tubes）を入れ（図 5-2-3-1-16）、その中に 0.01%に調整した次亜塩素酸溶液を 1mL 注ぐ。17 番ポート以外は通常のポスランウォッシュと同様に 0.5% Tween 20 ウォッシュ液入れ、残りをウォッシュボトルに入れる。

- 2) 準備が終わったらトップ画面の左下にある Perform Wash ボタンを押す。3 通りのウォッシュが表示されるので Post-Run wash を選択する。画面が切り替わると次亜塩素酸溶液を使用・不使用のチェックボックスが中央やや下に現れるのでチェックを入れる。
- 3) 右下の Next を押す。これ以降は、前述のウォッシュの実施と同じ。ウォッシュが終了すると右下に Done と表記されるので、それを押すと MiSeq コントロールソフトウェアのトップ画面に戻る。

ラン終了後のポスランウォッシュ

ランが終了すると、右下に Start Wash と表示されるので押す。以降は前述のウォッシュの実施と同じ。

MiSeq 本体の起動法

MiSeq 本体の右側の後ろにあるスイッチを入れる。本体付属の OS である Windows が起動し、起動が完了すると自動的に MiSeq コントロールソフトウェア（MCS）が起動する設定になっている（図 5-2-3-1-17）。起動が完了するには 5 分程度必要になるので、ラン開始の時間を見計らって MiSeq 本体を起動すること。なお、ランの途中停止などのトラブルを避けるために、ランを開始するたびに MiSeq 本体を再起動することを勧める。

5-2-3-2. シークエンスの下準備

本項では、シーケンスを実際に開始する遅くとも 1 時間前までに終わるべき操作について記す。他の実験（とくに PCR）とは異なりこの段階でのコンタミの恐れは低いが、実験中は必ずゴム手袋を着用して事前にピペットやチューブ類は殺菌灯式電気消毒器で 20 分程度照射し除染しておく。

- 1) 冷凍品の解凍：バットを用意し、冷凍保存してある試薬カートリッジと HT1 バッファのチューブを入れ、カートリッジの側面にある最大水量線まで脱イオン水を静かに注ぐ（図 5-2-3-2-1）。そのまま約 1 時間脱イオン水に漬けたまま静置し、キット内部の試薬を十分に解凍する。

- 2) 0.2N NaOH 溶液の準備 : 0.2N NaOH 溶液は、ライブラリーの DNA を一本鎖に変性させるために用いる。毎ランごとに 2N NaOH 溶液 (ストック可) からミリ Q 水を用いて希釈し、新鮮な 0.2N NaOH 溶液を調整することが重要。使用する量は微量なので、1.5mL チューブに 1mL 調整すれば、希釈時の誤差も小さく十分量が得られる。調整した 0.2N NaOH 溶液は使用するまで冷蔵庫に保存する。
- 3) サンプルシートの作成 : MiSeq 本体に搭載されているソフトウェア Illumina Experiment Manager (以下 IEM) を起動し、画面の指示に従ってサンプルシートを作成する。サンプルシート作成に必要な試薬カートリッジの番号 (例 : MS-XXXXXXX-300V2.csv ; 図 5-2-3-2-2) がカートリッジ側面に記してあるので記録しておく。なお、保存形式が CSV 形式になっていれば、サンプルシートはエクセル等のスプレッドシートで編集可能。したがって、ベースとなるファイルを IEM で作成し、それを別途スプレッドシートで編集し直すのが効率的。作成したサンプルシートは、MiSeq 本体の Illumina/Illumina Control Software フォルダー内に保存する。

5-2-3-3. ライブラリー濃度の最終調整

本項では、シーケンス反応が行われるフローセル上において適正な密度でクラスターが形成され、同時にクラスター間の分離がよくなるような実験手法について記す。なお、以下の操作を行うことで得られることが期待されるリード数はキット記載の総リード数からスパイクインした PhiX の割合を除いた数である。

- 1) 4nM への調整 : Qubit で定量した濃度に基づきライブラリーを 4nM に調整する。モル数の計算に用いるのはライブラリー長 (平均 372bp) と 1 塩基あたりの分子量 (660g/mol) になるが、複数の単位 (micro/nano/pico) にまたがって濃度を計算しなくてはならないので、予めスプレッドシートにモル数換算式を入れておくが良い。また、サンプル数が異なる複数のライブラリーを一度にシーケンスする場合は、サンプル数 (ブランクを除いたもの) から混合比を算出し、それぞれの混合量を決定する。2nd PCR 産物をサイズセレクションしたライブラリは平均 372bp のライブラリー長となる。その溶液の重量濃度が α ng/ μ L の時、モル濃度は $\alpha * 10^6 / 372 * 660$ の計算式で求めることができる。
- 2) DNA の変性:新しい 1.5mL チューブに、4nM に調整したライブラリーを 5 μ L と 0.2N NaOH を 5 μ L 入れてピペットで混合する。その後、数秒間ボルテックスし、軽く遠心して溶液をチューブの底に集め、室温で 5 分間静置してライブラリー中の DNA を変性する。この時点での濃度は 2nM。
- 5) 20pM への調整 : 変性した DNA に HT1 バッファーを 990 μ L 加え、20pM に調整する

(100 倍希釈)。

- 6) 最終濃度 (12pM) への調整 : MiFish アンプリコンの場合、最終濃度を 12pM に調整すると $800\sim 1000\text{K}/\text{mm}^2$ のクラスター密度が得られ、メーカーのスペックにほぼ一致するリード数が得られる。最終濃度を 12pM にするには、ライブラリーを 360 μL に HT1 バッファーを 240 μL 加えればよい。ライブラリーが低品質の場合 (本来の長さである 370bp 付近よりも短い DNA が混ざっている場合)、最終濃度を 12pM に調整するとオーバークラスターとなりランを失敗するので注意すること。
- 7) PhiX のスパイクイン : フローセル上に形成されるクラスター同士のシグナル分離をよくするため、塩基バランスが良い PhiX をスパイクインとして 10-25%入れる。イルミナ社から販売されている PhiX control v3 は 10nM に調整済みのバクテリオファージに由来する既知配列に基づくライブラリーである。これをサンプル DNA と同様に 0.2N NaOH で変性し、HT1 バッファーで 20pM に調整する。その後、上記の 600 μL のライブラリーから 60 μL を抜き取り、20pM に調整した PhiX を 36 μL 、HT1 バッファーを 24 μL 加える。

以上の操作で、12pM に調整されたライブラリー600 μL ができた。後は、調整済みライブラリーを試薬カートリッジに注入し、ランを開始するにあたっての最終操作を行えばよい。

5-2-3-4. シークエンス開始前後の操作

本項では、シークエンス開始前後に必要な操作について記す。既にライブラリーは 12pM に調整されており、機器を正しく設定すればシークエンスできる段階になっている。

- 1) 試薬カートリッジ内の試薬が完全に解凍されたことを確認し、キムタオルでカートリッジ外側についた水滴を十分に拭き取る。試薬カートリッジを 10 回程度転倒攪拌し、カートリッジ内の試薬を混和する。試薬内の気泡を取り除くため、キムタオルを敷いた実験台の上にカートリッジを何回か軽く叩きつける (図 5-2-3-4-1)。
- 2) 1000 μL のピペットチップをつかってライブラリー注入ポート (オレンジ色が目印) のホイルに孔を開ける。
- 3) 1200 μL または 1000 μL のピペットチップをつかって 12pM に調整されたライブラリー600 μL を試薬カートリッジの注入ポートに入れる (図 5-2-3-4-3)。気泡が入らないようにピペット操作には注意すること。
- 4) MiSeq コントロールソフトウェア (MCS) を起動し SEQUENCE ボタンを押してランのセットアップに進む。

- 5) MiSeq をインターネットに接続していると、SEQUENCE ボタンを押した後に BaseSpace (イllumina社が提供するクラウド環境) を使用するかどうかの確認ボタンが表示される (図 5-2-3-4-4)。BaseSpace の利用にあたっては、事前に Myillumina へのユーザー登録が必要となる。
- 6) BaseSpace を使用する場合には、Use BaseSpace for storage and analysis のボックスにチェックを入れ、表示欄に Myillumina アカウント登録時に使用した情報を入力する。BaseSpace を使用しない場合はこのボックスを空欄にしておけばよい。選択が終わったら、Next ボタンを押すとフローセルのセッティング画面に切り替わる。
- 7) 冷蔵保存されていたフローセルをプラスチック製ピンセットを使って容器から取り出す。フローセルは容器内でバッファーに浸かった状態で保存されており、MiSeq にセットする前にそのバッファーを完全に洗い流す必要がある。この洗浄が十分でないと、残存したバッファーがシーケンス中にフローセル上に析出し、データが読み取れなくなる恐れがある。洗浄にあたってはゴム手袋を着用し、MiSeq にセットする前にフローセルのガラス部分とプラスチック部分をミリ Q 水でよくリンスする。とくに、フローセルのプラスチックケース内にバッファーが残りやすいので、その部分はよくリンスすると共にケース内の水分を (注意深く) 軽く振り出す。この際、ガスケット (試薬やサンプルへの流路の入り口) 部分に強く水流が当たらないように注意する。
- 8) レンズクリーニングティッシュに 99.5%エタノールを少量滴下し、フローセルのガラス部分についた水分を軽く拭き取る。ガラス部分に汚れや染みがないか目で確認し、きれいになるまでレンズクリーニングティッシュで軽く磨く。フローセルのプラスチック部分にある 2 穴のガスケットポートには触れないように注意すること。
- 9) MiSeq のフローセルコンパートメントのドアを開け、更にフローセルラッチを開けて使用済みのフローセルを取り出す。この時、中のフローセルが飛び出さないように、ラッチの上面に手を当てた状態でラッチを開ける銀色のボタンを押し、急なラッチの跳ね上がりを防ぐとよい。フローセルラッチの台座に埃や析出したバッファーがある場合には、フローセルを磨いたレンズティッシュで拭き取る。
- 10) フローセルを台座の所定の位置に載せ、カチッと音がするまでラッチを静かに押し下げ固定する。
- 11) MiSeq コントロールソフトウェア (MCS) の画面左下をチェックし、フローセルに記された ID (RFID) の読み取りがうまくいっていることを確認する。RFID が読まれていたら、フローセルコンパートメントのドアを閉め、Next ボタンを押す。
- 12) 冷蔵保存の PR2 ボトル (シーケンスバッファー) を取り出し、軽く混和してからス

クリューキャップを開ける。

- 13) MiSeq の試薬コンパートメントのドアを開け、シッパーストッパーを上げる。右側の部分に冷蔵保存の PR2 ボトルをセットし、廃液ボトルを空にする。セットが完了したらシッパーストッパーを必ず引き下げる。

注意: シッパーストッパーを下げなくてもランが始まってしまうので注意すること。引き下げないとバッファーを吸い取ることができないので（おそらくは）ランが停止してしまう。

- 14) MCS の画面左下をチェックして、RP2 のボトルに記された ID (RFID) が読み込まれていることを確認する。
- 15) 試薬チャージのドアを開け、ウォッシュカートリッジに挿入されているシッパーストッパーが完全に引き上げられるまで待つ。シッパーストッパーが上がる前にウォッシュカートリッジを引き出そうとすると、シッパーストッパーが折れてしまうので注意すること。
- 16) ライブラリーが充填された試薬カートリッジを試薬チャージに挿入する。最後まで押し込まないと試薬チャージのドアが閉まらないので注意すること。
- 17) 試薬チャージのドアを閉める。MCS の画面左下をチェックして、試薬カートリッジに記された ID (RFID) の読み取りがうまくいっているかどうか確認する。
- 18) ここまで操作が順調に進むと、画面上に実験名と解析ワークフローが表示されるので確認する。画面左下でサンプルシートのフォルダーの階層を確認して Next を押す。
- 19) プレランチェックの画面に移行する。チェック項目が表示され、全ての項目にチェックが入ると Start Run ボタンがアクティブになる。ランを開始してよければボタンを押す。
- 20) Start Run ボタンを押してからしばらくの間はシーケンスの初期トラブルが発生しやすい。試薬がフローセルに流れ込むまではランの再開が可能な場合があるので、5 分間ほどは MiSeq ランの進行を機器の前で見守るとよい。

参考文献

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2 (7): 150088. doi: 10.1098/rsos.150088

図 5-2-1-1

殺菌灯式電気消毒器で紫外線消毒中のマイクロピペット、フィルターチップ、チューブ、チューブラックなど。実験を始める前に必ず消毒する習慣をつけると、実験室由来のコンタミのリスクが減る。



図 5-2-1-1-1

同一サンプルに対して8連チューブ 1 本をつかった 8 繰り返ししの 1s tPCR をセットアップしたところ。右写真の場合、サンプル数は 5 で濾過ブランク、抽出ブランク、1st PCR ブランクの計 3 本を含む。

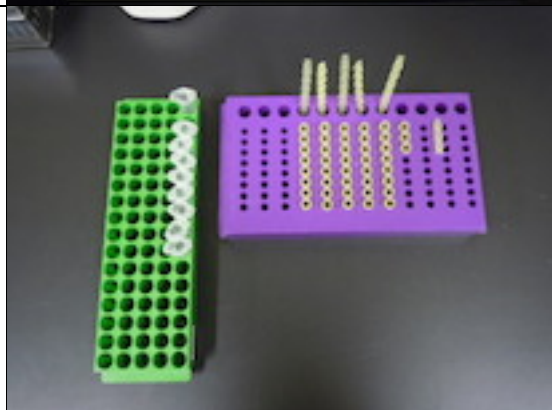


図 5-2-1-2-1

GeneRead Size Selection Kit と追加注文した 2.0mL コレクションチューブ。



図 5-2-1-2-2

8 繰り返ししの 1st PCR 産物を 1 本の 1.5mL チューブにまとめているところ。

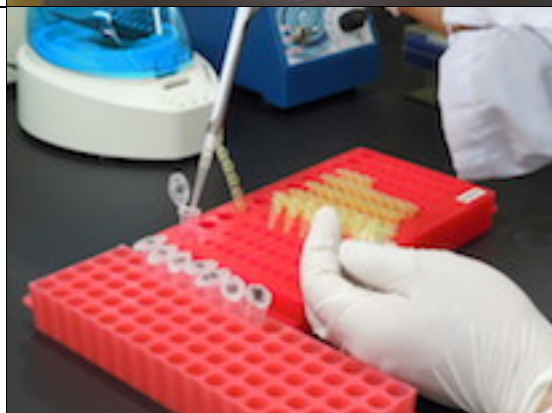


図 5-2-1-2-3

まとめた産物に対して 4 倍量の SB1 を加えてピペッティング。



図 5-2-1-2-4

スピncラムを用意しキャップに必要事項を記入する。



図 5-2-1-2-5

混和した PCR 産物 + SB1 溶液をカラムに注ぐ。



図 5-2-1-2-6

20,000g で 1 分間遠心する。



図 5-2-1-2-7

カラムを新しいコレクションチューブに載せ替える。

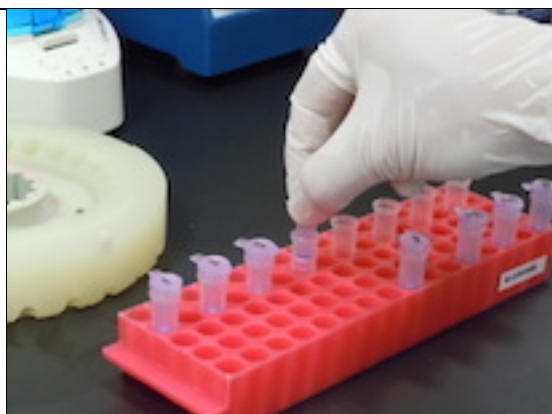


図 5-2-1-2-8

使用済みのコレクションチューブと廃液を廃棄する。



図 5-2-1-2-9

カラムに 700 μ L の 80%エタノールを注ぐ。



図 5-2-1-2-10

20,000g で 1 分間遠心する。



図 5-2-1-2-11

カラムを 1.5mL チューブに載せ替える。

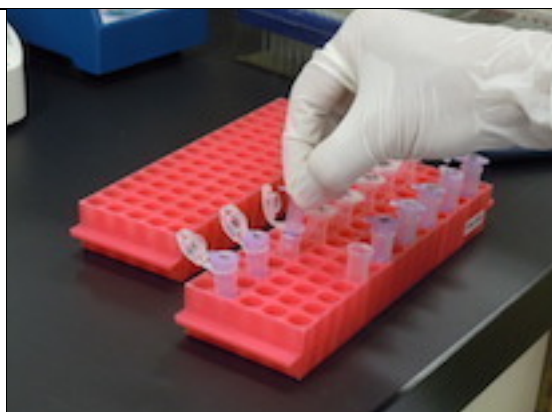


図 5-2-1-2-12

カラムのメンブレン上に 90 μ L の TE バッファーを注いで 1 分間静置し、20,000g で 1 分間遠心する。



図 5-2-1-2-13

回収した溶液（1 回目の精製を行った PCR 産物）に 4 倍量の SB1 を加えてピペッティング。



図 5-2-1-2-14

混和した溶液をカラムに注ぐ。

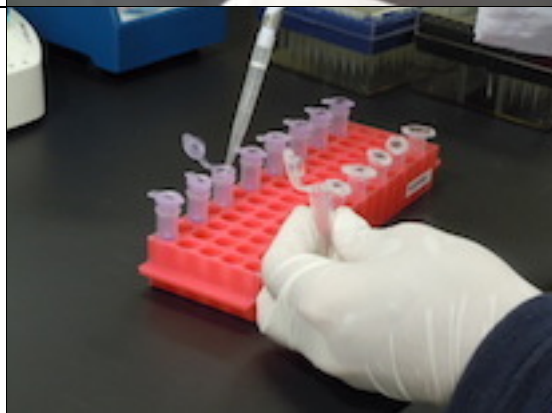


図 5-2-1-2-15

2回目の精製を終え、カラムのメンブレン上に 17 μ L の EB バッファーを注いでいるところ。1 分間静置した後、20,000g で 1 分間遠心する。

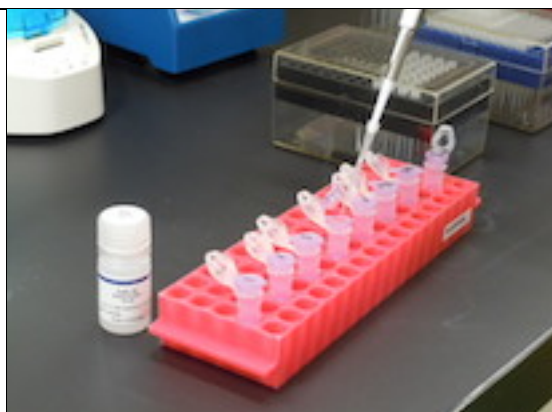


図 5-2-1-2-16

1.5mL チューブ（DNA 低吸着）に精製された 1st PCR 産物を回収したところ。



図 5-2-1-2-17

−20℃で冷凍保存する。



図 5-2-1-3-1

TapeStation 2200 用のキット。High Sensitivity D1000 Screen Tape（左）と試薬（右）。



図 5-2-1-3-2

TapeStation 2200 付属のコンピューターを起動する。

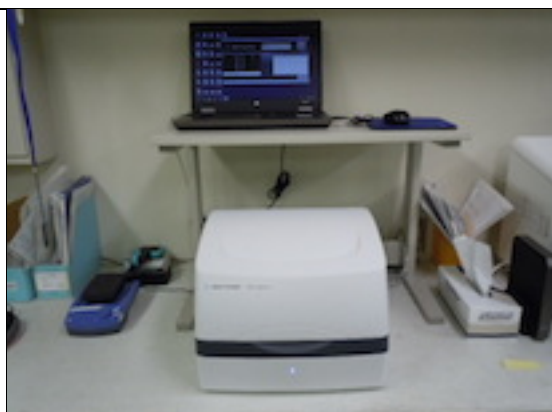


図 5-2-1-3-3

ScreenTape と必要な数のピペットチップをセットする。



図 5-2-1-3-4

Buffer 2 μ L を電動マイクロピペットを使用して分注する。

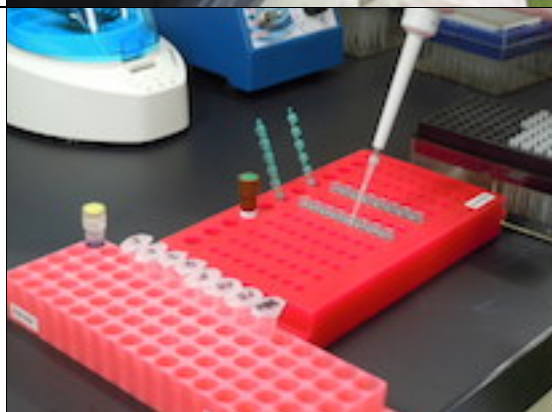


図 5-2-1-3-5

ラダーを 1 本目のチューブに 2 μ L 注ぐ。



図 5-2-1-3-6

精製濃縮済み 1st PCR 産物を 2 μ L 注ぐ。

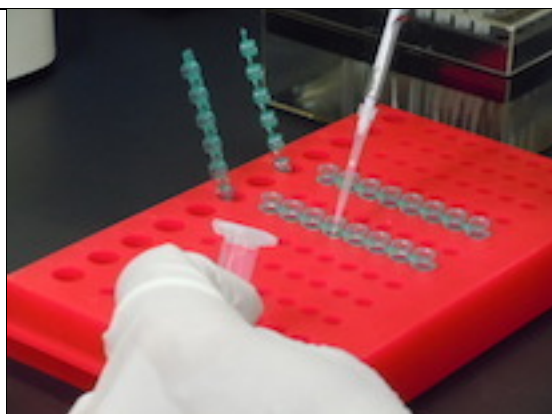


図 5-2-1-3-7

2000rpm で 1 分間攪拌した後、卓上小型遠心機で液をチューブの底に集める。



図 5-2-1-3-8

8 連チューブのキャップを中の液が飛び散らないように静かに開け、TapeStation 2200 のカセットにセットする。

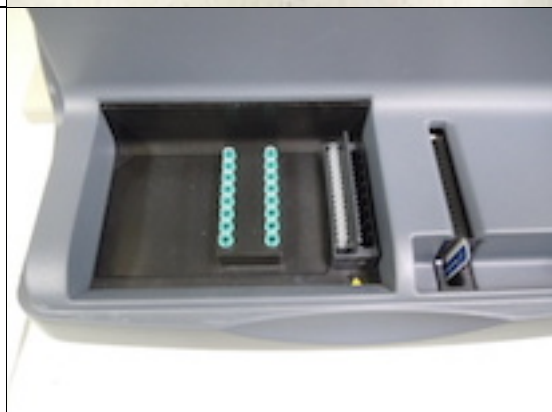


図 5-2-1-3-9

全てがセットされた状態の TapeStation 2200。



図 5-2-1-3-10

左側の 8 連チューブのイメージ像で、ラダーと測定する PCR 産物とチューブ上での並びを画面上で指定する。



図 5-2-1-3-11

ターゲットのバンド（約 310bp）がフェログラムと共に表示される。

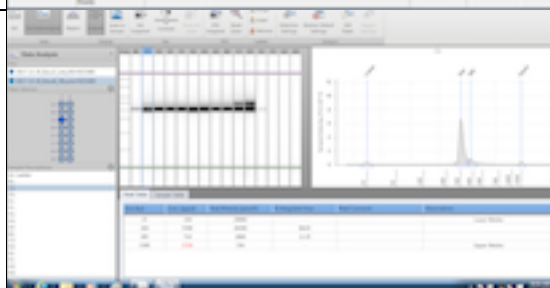


図 5-2-2-1-1

サンプル数が 40 の場合。



図 5-2-2-1-2

反応溶液を全量 1 本のチューブにまとめる。

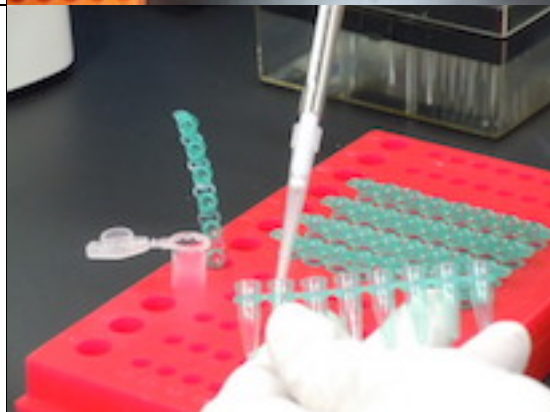


図 5-2-2-2-1

コームを注意深く取り外す。

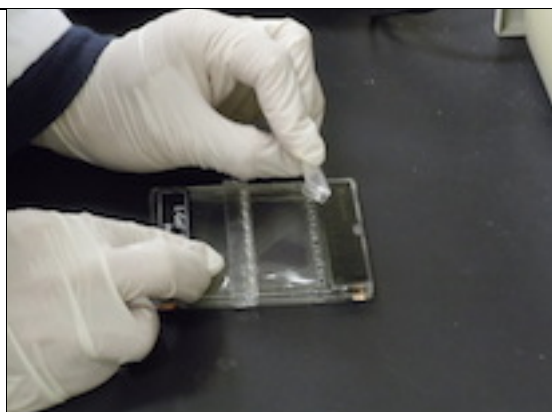


図 5-2-2-2-2

ゲルの右側から iBase に挿入する。



図 5-2-2-2-3

産物をローディングする。

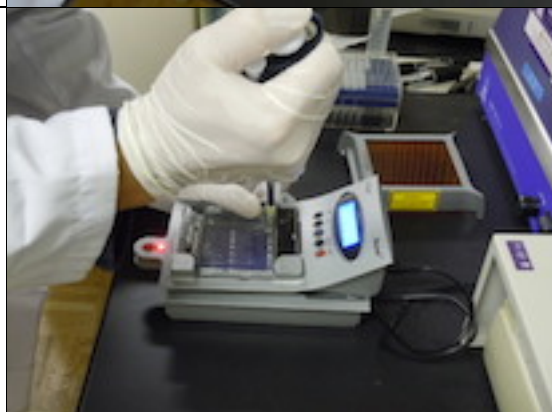


図 5-2-2-2-4

iBase に観察用プレートユニット（オレンジ色のフィルター付きユニット）をセットする。



図 5-2-2-2-5

基準線に到達したターゲット産物（約 370bp）。左から二番目がラダー（サイズマーカー）で、基準線に達している明るいラダーが 350bp になる。そのやや上にターゲット産物（370bp）があり、さらにその上にスメアと共に見られるバンドは非特異的産物なので、回収ウェルに入れないように注意する。

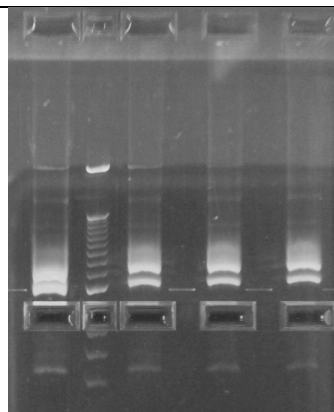


図 5-2-2-2-5

泳動した産物を回収する。

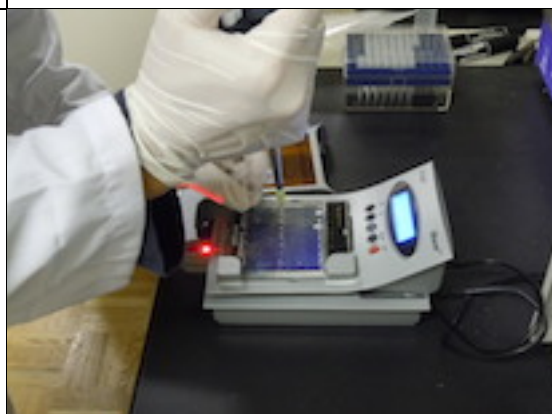


図 5-2-2-3-1

Qubit dsDNA HS Assay キットを冷蔵庫から取り出し 30 分以上かけて室温に戻す。



図 5-2-2-3-2

新しいチューブに Qubit Buffer を入れる。



図 5-2-2-3-3

Qubit Reagent を入れる。

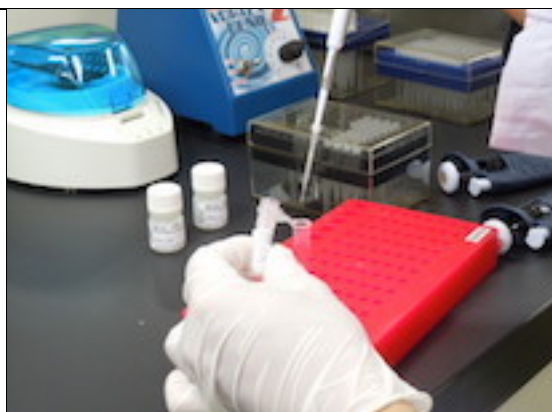


図 5-2-2-3-4

スタンダード#1 と#2 をそれぞれのチューブに 10 μ L ずつ入れる。



図 5-2-2-3-5

チューブにライブラリーを 2 μ L 入れる。

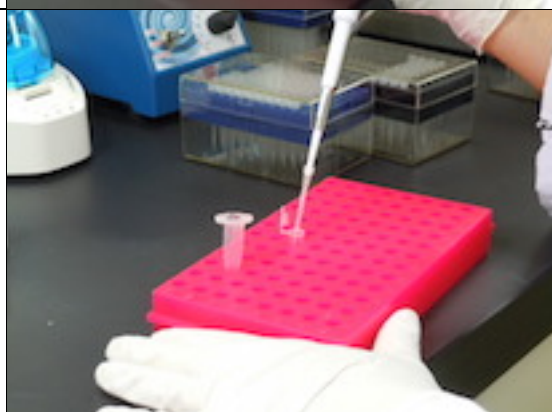


図 5-2-2-3-6

2 分間室温で静置する。この操作を怠ると計測値が安定しない。



図 5-2-2-3-7

Qubit 2.0 Fluorometer の画面をタッチして起動する。



図 5-2-2-3-8

スタンダード#1 と#2 を Qubit の指示に従って順番に測定する。



図 5-2-2-3-9

サンプルの濃度を計測しているところ。

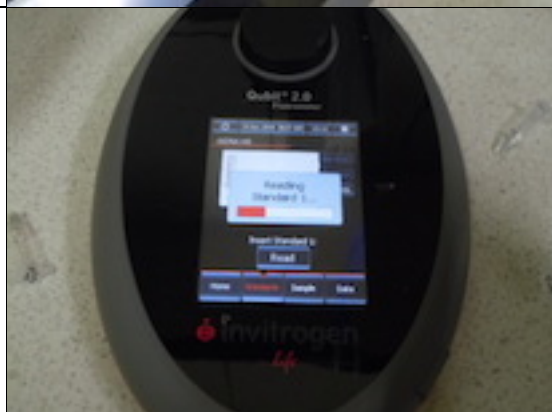


図 5-2-2-3-10

テンプレートを 100 倍希釈した計測値 (ng/mL) が表示される



図 5-2-3-A

冷凍保存品の HT1 チューブ（手前右）と
試薬カートリッジ（手前左）。このボック
スが冷蔵で解凍状態で送付されたら、納入
業者にクレームをつけてリブレース品を送
ってもらうこと。



図 5-2-3-B

冷蔵保存品の PR2 ボトル（中央）とフロ
ーセル（右）。これらが凍結されて送付さ
れたら、納入業者にクレームをつけてリブ
レース品を送ってもらうこと。



図 5-2-3-1-1

Tween 20 原液。



図 5-2-3-1-2

50mL 遠沈管に 5mL の Tween 20 を注意
深く注ぐ。Tween 原液は粘性が高いので
取り扱いに注意すること。



図 5-2-3-1-3

10%の Tween 20 溶液 25mL を 500mL
の洗浄瓶に入れる。

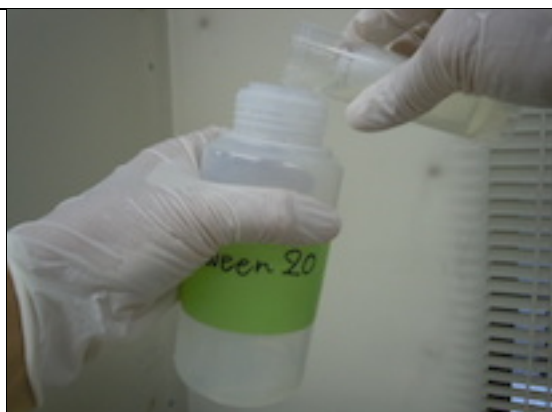


図 5-2-3-1-4

洗浄瓶を使ってウォッシュカートリッジに
ウォッシュ液を注入する。



図 5-2-3-1-5

すべて注ぎ終えたら残りのウォッシュ液を
ウォッシュボトル（350mL 程度）に移し
替える。



図 5-2-3-1-6

MiSeq コントロールソフトウェア
(MCS) のトップ画面。



図 5-2-3-1-7

Perform Wash ボタンを押と 3 通りのウォッシュが表示される。



図 5-2-3-1-8

使用済みフローセルがフローセルコンパートメントにセットされていることを確認する。



図 5-2-3-1-9

試薬カートリッジやボトルが取り出される様子が画面に現れる。



図 5-2-3-1-10

用意したウォッシュカートリッジを試薬トレーに入れる。



図 5-2-3-1-11

用意したウォッシュボトルをセットする。



図 5-2-3-1-12

セットが完了したらシッパーハンドルを引き下げる。ハンドルを引き下げるのを忘れてもランが始まってしまうので注意すること。



図 5-2-3-1-13

画面右下の Next を押すとウォッシュが始まる。



図 5-2-3-1-14

全ての工程が終わると右下に Done と表示される。



図 5-2-3-1-15

次亜塩素酸溶液用専用チューブ（イルミナ社のサポートに連絡すると無料で送付してくれる）。



図 5-2-3-1-16

17 番ポートに次亜塩素酸溶液が入った専用チューブを入れる。



図 5-2-3-1-17

MiSeq コントロールソフトウェアが起動してシークエンスの準備が始まる。



図 5-2-3-2-1

HT1 バッファのチューブを入れ、カートリッジの側面にある最大水量線まで脱イオン水を静かに注ぐ。1 時間放置して完全に試薬を解凍する。



図 5-2-3-2-2

試薬カートリッジの番号はバーコードの真下に書かれている。小さく読みにくいので転記する際に間違えないように注意すること。



図 5-2-3-4-1

キムタオルを敷いた実験台の上にカートリッジを何回か軽く叩きつけて試薬類をチューブの底に落とす。



図 5-2-3-4-2

1000 μ L のピペットチップをつかって注入ポートに大きな孔をまず開ける（オレンジ色の 17 番ポート）。その後、シッパー挿入時にチューブが折れないように各ポートの中心に小さな孔を開けておく（中の試薬にピペットの先が触れないように注意すること）。



図 5-2-3-4-3

試薬カートリッジの注入ポート（オレンジ色）に 1200 μ L のピペットチップをつかって調整済みライブラリー600 μ L を入れる。



図 5-2-3-4-4

SEQUENCE ボタンを押すと BaseSpace
の確認ボタンが表示される。



引用について

本マニュアルを引用する場合は以下のような引用方法を推奨します。

マニュアル全体

環境 DNA 学会 (2020) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2.

第2章

清野聡子, 源利文 (2020) 調査地点の選定. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 6-11 頁.

第3章

宮正樹, 佐土哲也 (2020) 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 13-25 頁.
源利文 (2020) 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 26-32 頁.

第4章

宮正樹, 佐土哲也 (2020) カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 34-46 頁.
源利文 (2020) グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 47-56 頁.

第5章

源利文 (2020) リアルタイム PCR による環境 DNA の種特異的検出・定量. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 57-60 頁.
宮正樹, 佐土哲也 (2020) MiFish メタバーコーディング. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 61-104 頁.

環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.2 (2020 年 4 月 3 日発行)

© 2020 一般社団法人環境 DNA 学会

© 2020 The eDNA Society

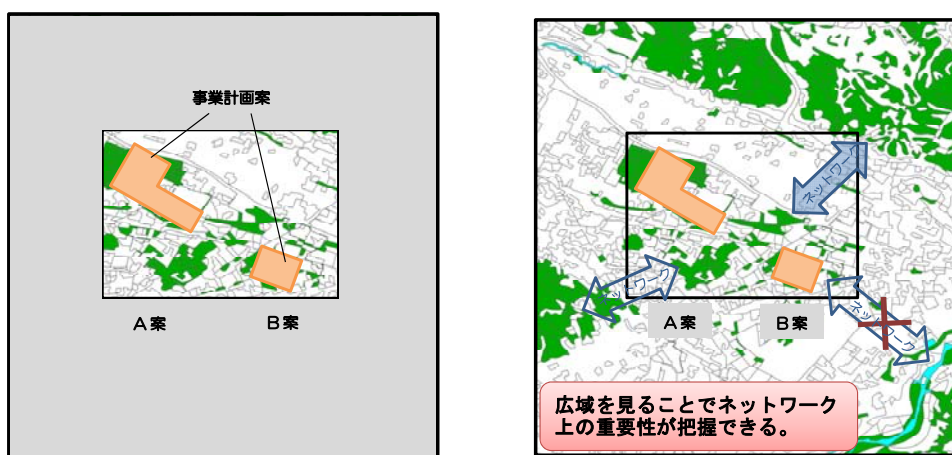
第3章 生物多様性分野の空間・地理情報の活用と留意点

本章では、生物多様性分野の空間・地理情報を活用して、「動物・植物の生息場所の推定」、「重要な自然環境のまとまりの場の抽出」、「生態系ネットワークの推定」の手法とその留意点について解説する。

1 節 調査対象範囲の設定について

第1章で示したように、ハビタットや生態系のネットワーク（以下、生態系ネットワークと称する）の分断、断片化等による影響が想定されることに對し、調査対象範囲の設定について「計画段階配慮手続に係る技術ガイド」では、「広域的な視点からではないとその状況を捉えることができない生態系ネットワーク等を考慮して、調査範囲を設定する」としている。

本書第3章3節で示すように、対象とすべき生態系ネットワークは「動物、植物」の重要な種のハビタットや、「生態系」の「重要な自然環境のまとまりの場」等の分布状況を基に検討することになる。しかしながら生態系ネットワークへの影響検討を行う範囲は、事業影響が直接的には及ばないような広い範囲まで含める必要があり、「動物、植物」の重要な種のハビタットや「生態系」の「重要な自然環境のまとまりの場」の分布状況の検討範囲を、そのまま生態系ネットワークの検討範囲とすることが不適切な場合も考えられる（図 3-1）。



「動物、植物」や「生態系」の検討範囲

生態系ネットワークの検討に適切な範囲

図 3-1 生態系ネットワークの検討に必要な範囲の考え方

左図は「動物、植物」のハビタットや「生態系」の重要なまとまりの場の直接的な影響評価の検討範囲の例を示している。こうした範囲は事業予定地から数百 m の範囲に設定されることが多い。A 案は B 案に比べ、緑地の改変面積が大きい計画となっている。一方、生態系ネットワークの検討では、ハビタットやまとまりの場の相互のつながりを、より広い範囲で把握することが必要となる。右図では、「動物、植物」や「生態系」の検討範囲の緑地が、周辺の緑地と緑地をつなぐ生態系ネットワーク上重要な位置にあり、ネットワークを分断する影響の立場から見れば、改変面積の少ない B 案の方が、より大きな影響を生じる可能性があることを示している。

現在、生物多様性分野の調査対象範囲を決める適当な手法は存在しないが、事前に適切な調査対象範囲を設定し、検討の手戻りを防ぐためにも、①重要種リストとこれらの一般的なハビタット、②地域で考えるべき生態系の重要性の視点や湿地、干潟、遊水地といった具体的な対象を念頭に、地域の自然環境の状況（植生、地形、地質、流域界等）を俯瞰し、事業計画の複数案の平面的な広がりとの関係から、必要十分と考えられる範囲を設定することが望ましい。



ボックス 3-1

調査対象範囲について

生態系の境界を決める問題は生態学上の課題でもある。研究サイドでの生態系の境界に関する視点を以下に示した。

対象範囲を生態学的に決定するためには、Addicott *et al.*(1987)が経験的に定義した、対象としている生物（群）の、①特定の生態的プロセス（採餌、繁殖など）、②プロセス特有の時間スケール（日、週、季節、年など）、③この期間中の生物の活動あるいは影響に基づく、生態学的近隣圏(Ecological neighborhoods)の考え方によって、時空間スケールを設定することが理想的であるが、対象とする生態系のすべての構成種について検討することは不可能であろう。

Cousins(1990)は対象とする生物群集の境界が体の最も大きい捕食者の個体等の採餌エリアと一致する場合、その空間単位を ETM (ecotrophic module) と定義した (Holt 1996) が、ランドスケープでのエネルギーや物質の流れと関連した境界問題を解決するには不十分とされている (Post *et al.* 2007)。

このように、生態学上の生態系の境界の考え方を、環境影響評価の調査対象範囲に適用するにはまだ問題があるが、生態系や生物群集の境界を定量的に決定する手法が検討されてきている (Fagan *et al.* 2003, Cadenasso *et al.* 2003, Baker & King 2010) ことから、これらの手法の適用可能性について留意しておく必要がある。

2 節 動物・植物の生息場所の推定

2.1 推定の対象

ここでは、表 3-1 に示すような動物、植物の重要な種等の生息場所を対象とし、これらへの影響を予測するために必要となる種の分布の推定範囲（あるいは潜在的な推定域）を推定する手法について解説する。

なお、表 3-1 ①、③の対象については、第 2 章 2 節示す生物多様性地域戦略等から地域により注目されている具体的な対象を確認するとともに、対象地域の専門家や保護団体にヒアリングを実施し、把握することが望ましい。

表 3-1 動物、植物の重要な対象の区分

特性 環境要素	事業計画の 特性	地域特性（重要な種等の分布状況）		
		①環境影響を受けやすい種等＊）	②環境保全の観点から法令等により指定された種等（重要種、重要な群落等）	③法令等により指定されていないが地域により注目されている種等
動物・植物	・重要な種の生息生育環境の改変 ・長大構造物による生息場所やネットワークの分断、断片化 ・重要な種が特別に利用する地域での障害（渡りルート等）	・個体数が少ない、分布域が限られる、利用する生息・生育環境が限られる、移動能力が小さい種等 ・環境の変化に対し、個体数や繁殖率等が変動しやすい種等 ・自然林、湿原、藻場、干潟、サンゴ群集、自然海岸等の人為的な改変をほとんど受けていない自然環境又は内湾・湖沼等の事業の影響による変化が生じやすい環境に依存する種等	・文化財保護法に基づき指定された天然記念物及び特別天然記念物、地方自治体の文化財保護条例に基づき指定された天然記念物 ・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に基づき定められた国内希少野生動植物種及び緊急指定種 ・環境省レッドリスト掲載種 ・地方自治体のレッドデータブック掲載種 ・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に基づき定められた生息地等保護区 ・ラムサール条約に基づく登録簿に掲載された湿地 ・「植物群落レッドデータブック（財団法人 日本自然保護協会 平成 8 年 4 月）」に掲載されている群落	・地域により注目されている種、集団繁殖地 等

＊）環境影響を受けやすい種等のほとんどは②のレッドリストやレッドデータブックに掲載されているものと考えられる。

2.2 推定の流れ

重要種等の分布の推定の流れを以下に示した（図 3-2 も参照）

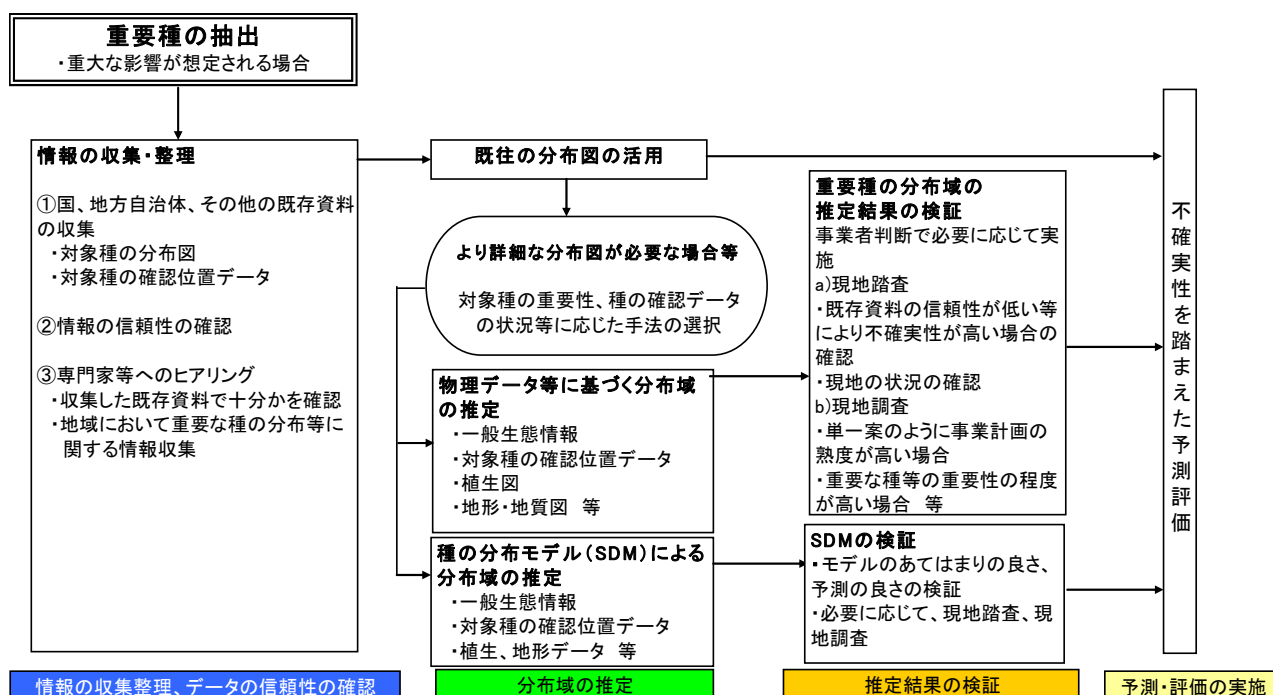


図 3-2 重要な種の分布の推定の流れ(例)

(1)情報の収集整理、データの信頼性の確認

調査対象範囲を設定し、範囲内の動物、植物の重要種等に関わる既往文献から、当該対象地域において出現する可能性のある重要種を整理し、リスト化する。

なお、重要な種の分布域の情報は、盗掘等の恐れからそもそも公表されていないか、公表されているとしても空間スケールを大きくし分布箇所を特定できないようにしている場合が多く、関係者以外に対して詳細な位置情報が公開されることは少ない。

従って、これらのデータを用いて環境影響評価を実施するためには、各データの管理者に申請するなど、非公開データへのアクセスの手続の手順を踏んで分布図やデータを入手する必要がある。

得られた情報に関してはその信頼性について確認しておく（第3章3節参照）。

(2)分布域の推定

これらの情報が入手できた後、得られた情報の内容（量、質、信頼性）に応じて適切な手法を用いて分布域を推定する。

まずは、抽出された種に対して、収集した既往資料等で分布図等が存在すれば、その活用を検討する。既往の分布図が存在せず、かつ対象種の確認データが無い、あるいは非常に少ない場合、対象種のハビタットに関する既往知見及び対象地域の植生、地形、地質などの情報から推定する手法によって推定することを検討する。

対象種の確認状況に関するデータの収集状況によっては、種の分布モデルを用いた定量的な手法（Species Distribution Modeling。以下、「SDM」という）による推定が可能な場合がある。例えば、確認できた位置情報（以下、在データという）だけで分布域を推定する手法などがある。

(3) 推定結果の検証

既往の分布図は、専門家がその作成に関わっているか等、どのようにして作成されたものなのかを確認することが望ましい。また、SDM ではモデルの「あてはまりの良さ」だけでなく、「予測（再現性）の良さ」を検証する必要がある。更に推定結果の不確実性が高い場合など、必要に応じて現地踏査、現地調査によって推定結果を確かめることも考えられる。

(4) 予測・評価の実施

重要な対象の重要性の程度、地域における分布状況と事業の実施が想定される範囲との重なり、不可逆的な変化が生じるかどうか等から、事業による重大な影響の有無を予測評価する。

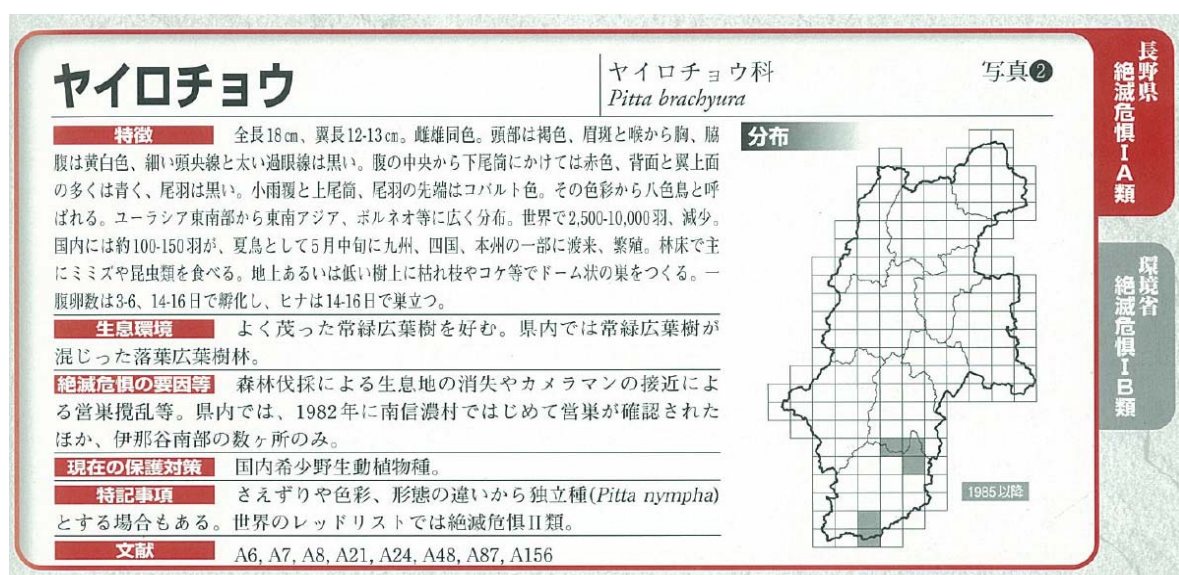
予測評価にあたっては、一般的に重要な種の生息・生育環境や生活史等の生態特性が普通にみられる種よりも特異的であることが多いため、事業計画の特性や既存資料の内容にもよるが、複数の重要な種等を一括して植生等の地理的な情報に基づいて予測するのではなく、個々の種等を対象として予測、評価を実施することを基本とする。

2.3 推定の手法

2.3.1 既往の分布情報の活用

地方自治体ではレッドデータブック等で重要種等の分布図を作成している場合がある（図 3-3）。こうした図は盗掘や密猟を防ぐために大まかな確認範囲を示す場合がほとんどであるが、そのスケールで事業計画区域との重なるかどうかを確認することができる。

分布域が事業計画区域と重なる可能性があり、より詳細に推定する必要がある場合には、以下に示す物理データ等に基づく方法や SDM で推定することを検討する。



長野県レッドデータブック 2004 より

図 3-3 重要な種の分布図例

2.3.2 物理データ等に基づく分布の推定

既往の分布図等がなく、対象種の SDM の構築に必要なデータがないような場合、地域の博物館等で整備されているデータベース等による個々の種の確認位置データ、対象種の生息環境条件等に関する生態情報、植生、林齢、地形、地質などの情報から対象種の分布域を推定する。湧水地のように、より詳細な生息条件が関わる場合にその生息範囲を推定するには、専門家等にヒアリングを実施することが望ましい。

出現状況に関する情報が無い場合、最も単純な場合には、「対象種は落葉広葉林の生息場所としている」などといった図鑑の記述と対象範囲における植生図からハビタットを推定する方法があげられる。更に対象範囲全域で把握可能な環境条件に関する知見があれば、これも重ね合わせてハビタットを推定する。例えば蛇紋岩地帯にしか出現しないということが分かっているならば、地質条件を考慮してハビタットを推定する。

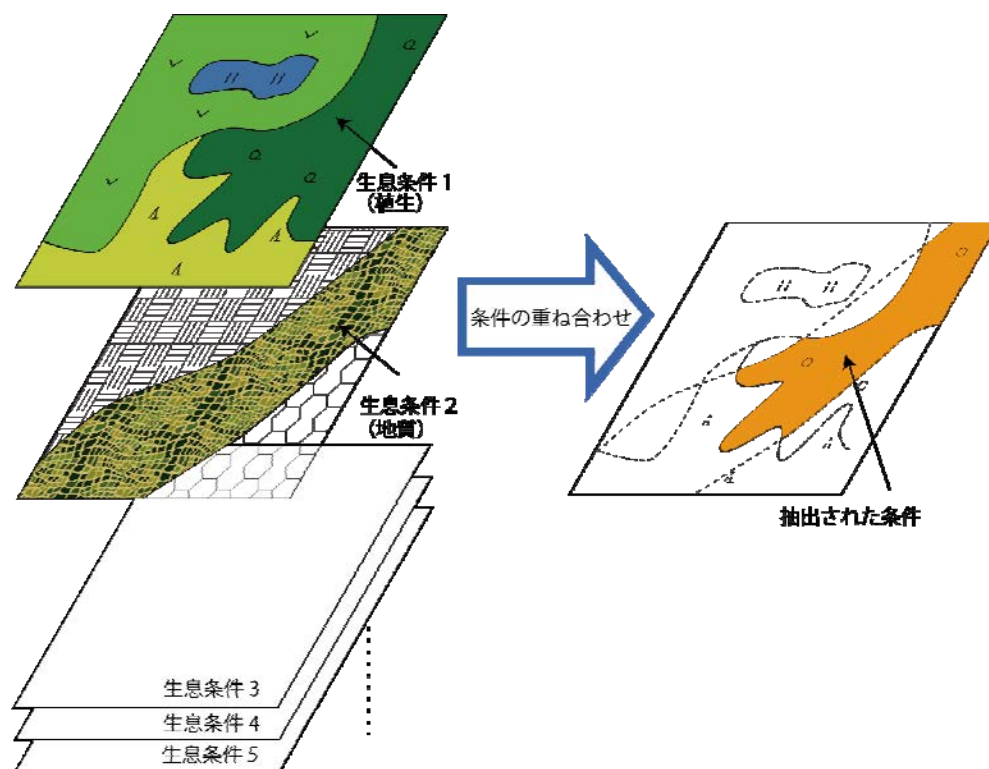


図 3-4 既往知見や物理データ等による推定イメージ

生息条件に関する既知の情報を基に定性的に推定を行う手法のイメージを示している。左上側は植生図を、左下側は地質図を示している。既存の情報で特定の植生や地質に生息・生育することが分かっている場合、これらの情報を重ね合わせることによって、種の分布域を定性的に推定することができる。

洞窟、湧水のような特殊な環境に生息する種の生息場所を推定する場合、これらの場所に関する既往の分布図の有無を確認する。あるいは地形図、地質図等から推定することが考えられる。

海域であれば、漁業データから生息している群集を推定し、どのような場なのかを推測することも考えられる。

2.3.3 種の分布モデル（SDM）による推定

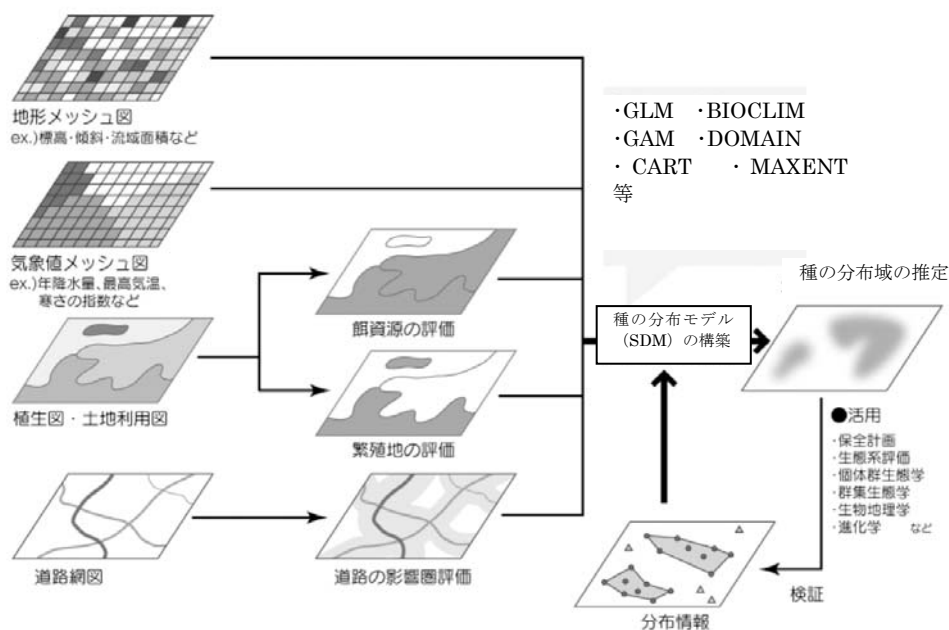
(1) SDM とは

種の確認位置情報と確認位置の環境条件を統計的にあるいは機械学習等で関係づけ（モデリング）、対象種の分布状況が不明な場所の環境条件から対象種が分布している範囲を推定する手法を「種の分布モデルによる推定」と称する。ただし、各確認地点での対象種の繁殖地としての適性等を区別せずに用いる場合には、繁殖に適していないあるいは偶然確認された場所の条件も含んだ推定であることに留意しておく必要がある（ボックス 3-2 参照）。

(2) SDM を活用する場合

SDM の手法を適用するかどうかは事業者の判断に基づくが、特に以下のような場合に適用することが望ましい。

- ・ 重要性の高い種への影響が想定される場合（ボックス 3-3 参照）
- ・ 事業影響との関係で重大な影響になりそうな場合（対象種の重要性はそれほど高くないが、生息場所が広く改変されるような場合）
- ・ 地域特性によって影響が重大となる場合（対象種の重要性はそれほど高くないが、地域で残された生息場所が改変されてしまうような場合）



三橋(2009)を一部改変

図 3-5 SDM による種の分布域の推定イメージ



ボックス 3-2

種の分布モデルの呼称

生物は競争や物理的障壁等による制約が無ければ、その適応能力の許す範囲で分布する(基本ニッチ)と考えられるが、実際には種間競争によって本来は生息可能な場所に分布できずに分布域が限られる場合(実現ニッチ)、あるいは本来は繁殖できない場所に追いやられることで、見かけ上でその種の分布域となっている場合、歴史的な経緯と分布能力から、実際には分布可能な範囲(ポテンシャル・ニッチ)でも分布していない場合がある(Sillero 2011)。このようなことから Soberon and Peterson (2005)は、種の分布を予測する場合を SDMs、種のニッチの近似を予測する場合を *ecological niche models* として区別しているが、本書では Franklin(2009)に従い、これらを一括して種の分布モデル SDM と称している。

なお、対象種がいないことも意識して記録された不在データと在データを用いて構築されたモデルを実分布推定モデル *realized model*、在データだけを用いたモデルをポテンシャルモデルと称する場合もある (Soberon and Peterson 2005、Jimenez-Valverde *et al.* 2008。図 3-6 参照)。

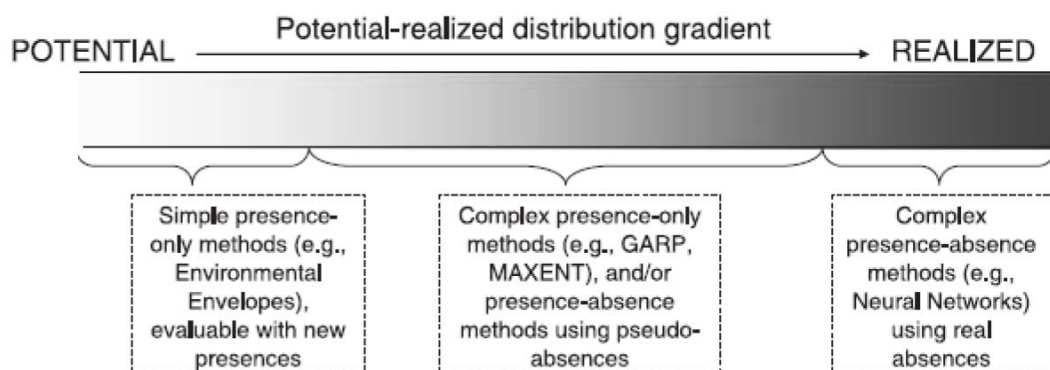


図 3-6 推定される分布の質 (realized- potential) の傾度と対応させた種の分布推定法の例
(Jimenez-Valverde *et al.* 2008 を一部改変)



ボックス 3-3

重要な種の優先的な種選定の考え方について

「我が国の絶滅のおそれのある野生生物の保全に関する点検とりまとめ報告書」（平成 24 年 3 月）では、重要な種の保全対策等にあたっての優先的な種選定の考え方を以下のように示している（一部記載を改変）。

これらすべての視点が、対象地域の環境影響評価の際の種選定に当てはまるものではないが、地域特性、事業特性に応じて優先的に保全すべき種（より重要な種）の選定の参考になる。

<保全対策を優先的に講じるための種選定の視点>

① 種の存続の困難さによる視点

我が国の生息・生育状況に基づいて個々の種の絶滅の危険度を評価している環境省レッドリストのランクを基本とし、絶滅危惧ⅠA類（CR）または絶滅危惧Ⅰ類（CR+EN）の中でも、特に絶滅のおそれの高い種。

上記以外にも、急激な生息・生育環境の悪化や減少要因の増大等により、緊急の対策を要すると判断される種。

②保全対策効果による視点

生態学的に重要性が高く（例えばアンブレラ種やキーストーン種のような機能）、その保全によって分布域内の生態系全体の保全にも効果がある種（ツシマヤマネコ（CR）、オガサワラオオコウモリ（CR）など）。

認知度又は地域住民等の関心が高く国や地域の象徴となり（フラッグシップ種）、多くの主体の保全への参画又は協力を促進させる効果が期待される種（トキ（EW）、コウノトリ（CR）など）。

絶滅危惧種が集中する地域（ホットスポット）に生息・生育し、その取組が他の絶滅危惧種の保全にも効果がある種（ハナシノブ（CR）など）。

<その他の種選定の視点>

レッドリストのランクは高くなくとも、かつては広域的に里地里山地域等でごく普通に見られていたが、近年、全国的に減少傾向にある種（タガメ（VU）、オキナグサ（VU）など）や海浜、河口等に生息・生育し、その環境変化に伴って全国的に減少傾向にある種（スナヤツメ（VU）、カワラハンミョウ（VU）など）

分布範囲や個体の行動範囲が都道府県境をまたいで広域に及ぶ種（イヌワシ（EN）など）

固有種が多く生物多様性が豊かな島嶼等、我が国の中でも特に重要な生態系がみられる地域に分布する種（アマミノクロウサギ（EN）、ヤンバルクイナ（CR）など）

(3)SDM の主な手法例

SDM に適用される手法は様々あり、いろいろな区分の方法があるが、ここでは使用するデータのタイプを主として整理した例を表 3-2 に示した。

Wintle ら(2005)によれば、SDM s の手法に用いられる種の確認データには4タイプが区分できる(以下の①~⑤)。

①在・不在データ

対象種を確認した地点、確認しなかった地点に対し、確認を1、未確認を0としたデータ。生物がある地点にいないと判断することは出来ないため、生息地であっても確認されなかった場合、その地点の環境条件は不適として処理されることで誤差が生じる。

Lobo(2008)は、特に対象地域が狭い場合には、「不在」データをランダムに抽出した場合よりも、「不在」であることが確からしい地点データを用いた方がモデルの再現性が高いことを示した。

不在データがない場合、対象範囲の中からランダムに”absence”データを選ぶよりも、調査は実施されているが、対象種が見つからない地点をランダムに抽出して”偽不在 pseudo absence”データとした方が良いという意見もある(Reese ら 2005)。

在・不在データを用いる手法としては Logistic 回帰、決定木(CART)、ニューラルネットワーク(ANN) 等がある。

②在のみデータ

対象種の確認地点だけのデータ。確認されたことは確実であるものの、対象種には不適であるが、偶然出現した種を確認した地点の環境条件を適と処理することで誤差が生じる。

在データだけでは在不在データよりも精度が落ちるという報告もある(Reese ら 2005)。

在のみデータを用いる手法としては MAXENT、DOMAIN、ENFA、BIOCLIM 等がある。

③カテゴリカルデータ

出現の程度をおおよそのランクに区分したデータ。GLM などで解析が可能である。

④アバundanceデータ

対象種の確認個体数等のデータ。データ取得時の個体数のカウントや密度推定の誤差がそのまま反映される。GLM などで解析が可能である。

⑤データが無い、または、ほとんど無い

以上のように、対象種に対してどのようなデータがあるのかによって手法が異なる。また、データをこれから取得する場合には、使用しようとしている解析手法を念頭に決定する必要がある。

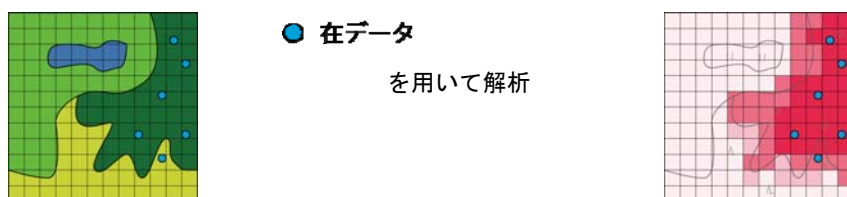
なお、これまでに様々なモデルのパフォーマンスに関する比較研究がなされている。急激な発展を遂げている分野のため、モデルの一般的精度や必要なデータ数等について一致した意見が得られていない面もあることから、最新の情報を収集し適切な手法を利用することが重要である。

表 3-2 データタイプ別の種の分布域の推定に適用可能な手法例

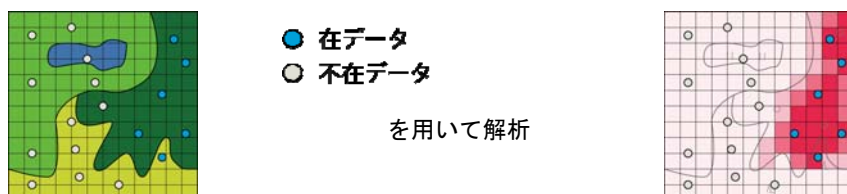
データのタイプ		適用可能な手法例
在データのみ		DOMAIN、ENFA 等
在データ・偽不在データ	在データ・不在データ	一般化線形モデル(GLM)、一般化加法モデル(GAM) 等
	カテゴリーカルデータ	
	アバンダンスデータ	

注：入れ子構造になっているデータタイプは、より上位のデータタイプに変換すれば利用可能であることを示している。最大エントロピー法は在データのみの場合だけでなく、偽不在データも用いた推定が可能であることを示す。

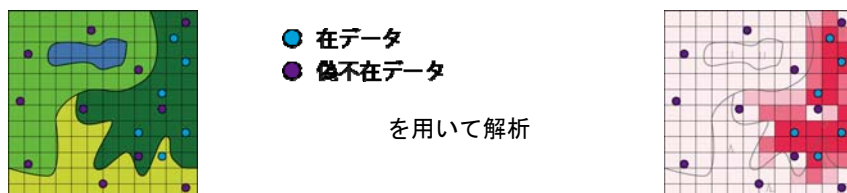
対応例① 少数の在データのみを使ったSDMの手法で出現ポテンシャルを推定



対応例② 在データ、不在データで分布域を推定



対応例③ 在データ、偽不在データで分布域を推定



対応例④ 在データ、不在データで推定（不在データも記録しながら新たな在データを追加）

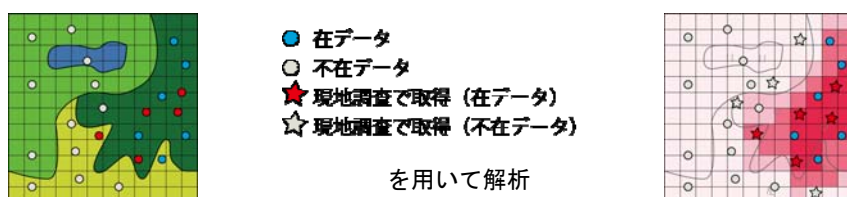


図 3-7 重要な種の分布の推定方法例（在データ、不在データを用いる場合）

用いるデータを変えることで、SDMによる種の分布域の推定結果が変わる事を示している。一般に、既存の確認位置（在データ）のみを用いるよりも、調査をしたが見つからなかった場所（不在データ）や無作為抽出による不在データ（偽不在データ）、追加で実施した現地調査のデータを加えることで推定精度が高くなると考えられる。

(4) モデル構築に当たっての留意点

1) 手法選定にあたっての留意点

モデルを構築するに当たっては、入手したデータの質・量等を考慮し、適切な手法を選定することに留意する必要がある。

① 環境影響評価での活用することを考慮

環境影響評価の下で利用する場合には、手法を用いる者や住民説明会において地域の住民が理解しやすいこと等も重要な要素である。同等レベルの精度で結果が得られるのであれば、理解しやすい手法を採用する方が良いといったことも念頭に手法を選択することが好ましい。

表 3-3 環境影響評価への各種手法の適用にあたっての視点

視点	趣旨
A) 解析が容易であるか	・ 誰にでも行うことができる方が受け入れられ易い。
B) 汎用性があるか	・ 事業毎に解析に必要な条件等を考える必要がない。 ・ 他の事例との比較が可能になる。
C) 統計的な制限が多くないか	・ 制限が多い場合に比べ、調査結果の解析が容易である。
D) 結果が理解がし易いか	・ 対外的に受け容れやすく、説明し易い。
E) 現況把握・予測・評価の精度が高いか	・ 現況把握・予測・評価の精度の高い方が、より良い環境影響評価となる。
F) 複数の環境条件をパラメータとして設定することが可能か	・ 自然環境の変化は多くの要因が関わっている。
G) カテゴリカルデータを用いることができるか	・ 連続量として表せない要因がある場合も多い。
H) 使用例が多く、実績がある	・ 信頼性のひとつの指標となる。
I) モデルに組み込む仮定が多くないか。あるいはその仮定が専門的に見て許容できるか	・ 結果の信頼性に関わる。 ・ 仮定を満たすデータの取得は困難であることも多い。
J) 既往のフリーのソフトウェアがあるか	・ 普及し易い

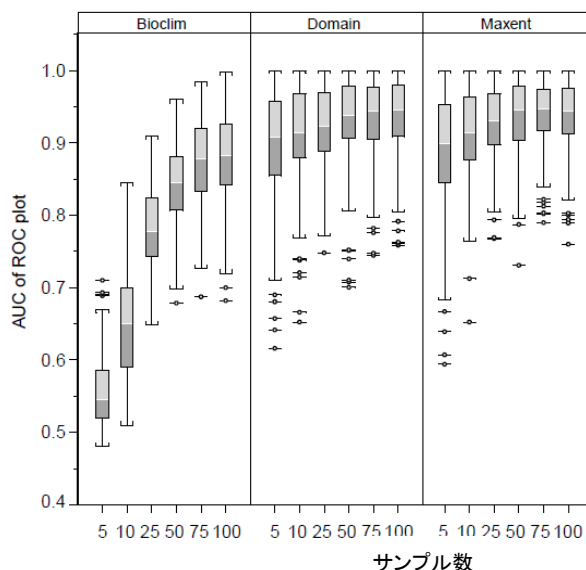
②生物の分布に関するデータの内容（質、量）

先に示したようにデータの質と量は推定手法の選択に大きく関わり、得られるデータがどのようなタイプなのかによって適用可能な手法を選択する必要がある。

データの質には、在データ、不在データ、カテゴリーに区分されたデータ（カテゴリカルデータ）、連続量データがあり、表 3-2 のように適用可能な手法が異なる。

また、データ数によっても適用が望ましい手法が異なってくる。しかし、各種手法に使用可能な最低限のデータ数の規定は無い。既往の報告から適用する手法において精度が確保できるおおよそのデータ数を、図 3-8 のような結果から経験的に把握しておくしかない（例えばロジスティック回帰モデルでは、経験的には独立変数の数の 10 倍程度のデータが必要などと言われている（Roberts 2000））。

参考として、わが国及び海外事例において SDM の対象生物、用いた手法、変数、データ数等をボックス 3-4 に整理した。



（Hernandez ら 2006 を改変）

図 3-8 サンプル数と予測の成功度合いとの関係

このほかにもモデル構築にあたって留意すべきことがあり、例えば Jimenez-Valverde ら (2009) は、活用するデータ内容について以下のような留意点を挙げている。

- （ア）できるだけ多数のデータを利用する。
- （イ）トレーニングデータ⁴における出現率（全データに対する在データの割合）が 0.01 を下回らない程度で、できるだけ多くの不在データを含める。
- （ウ）分布データが対象範囲のすべての環境傾度をカバーしていることを確認する（つまり外挿にならないこと）。

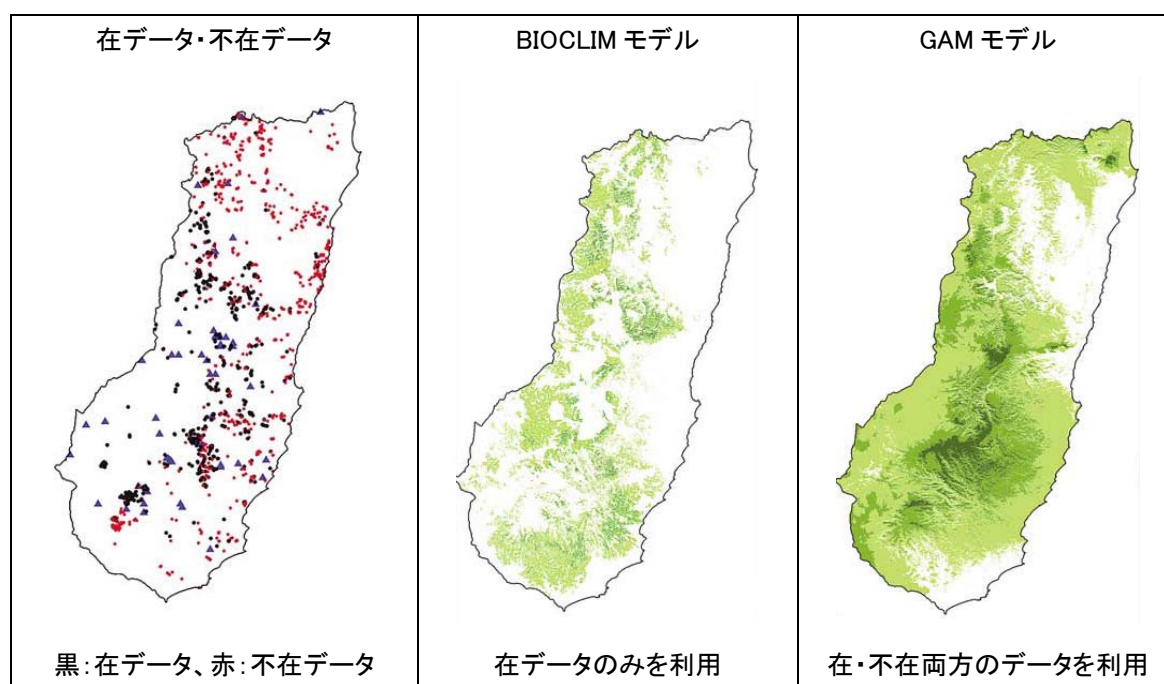
⁴ トレーニングデータ：モデルを構築するために用いるデータ。なお、作ったモデルの検証に用いるデータをテストデータという。

2) 結果に関わる留意点

① データの内容（質、量）

前述のように、データの質、量によって適用可能な手法が異なるため、結果が異なってくることに留意する必要がある。また、データ取得時の偏りによる影響は大きく、データのサンプリング方法がランダムサンプリングなのか、偏りのあるデータなのかなどによって結果に関わってくる。このため、データ取得時のサンプリング方法がデータとともに整理できている場合は少ないものと考えられるが、既往データを用いる際にはサンプリング時の記録がないものか常に考慮すべきである。

図 3-9 に示したように、同じ手法を用いてもアバンダンスデータとそれを在、不在データに変換して求めた結果は異なってくる（結果の選択に関しては「第3章 2.4 推定結果の確からしさを検証する」を参照）。



Elith ら(2006)を改変

図 3-9 不在データの扱い方によって異なる結果が得られた事例

この研究では、調査データに基づいて *Poa sieberiana*（スズメノカタビラの近縁種）の分布を推定している。左は現地調査結果を示している。黒点は生育が確認された場所、赤点は調査をしたが確認されなかった場所を示している。BIOCLIM モデル（中央）では「在データ」のみを用いて生育地を推定しており、GAM（右）は「在データ」と「不在データ」の両方の結果を用いて推定を行っている。BIOCLIM モデルに比べ、GAM モデルではより広い範囲に生育地が広がっているという推定結果となった。このように同一の調査結果を用いても、用いるデータの種類や解析の手法によって得られる結果は大きく異なる。

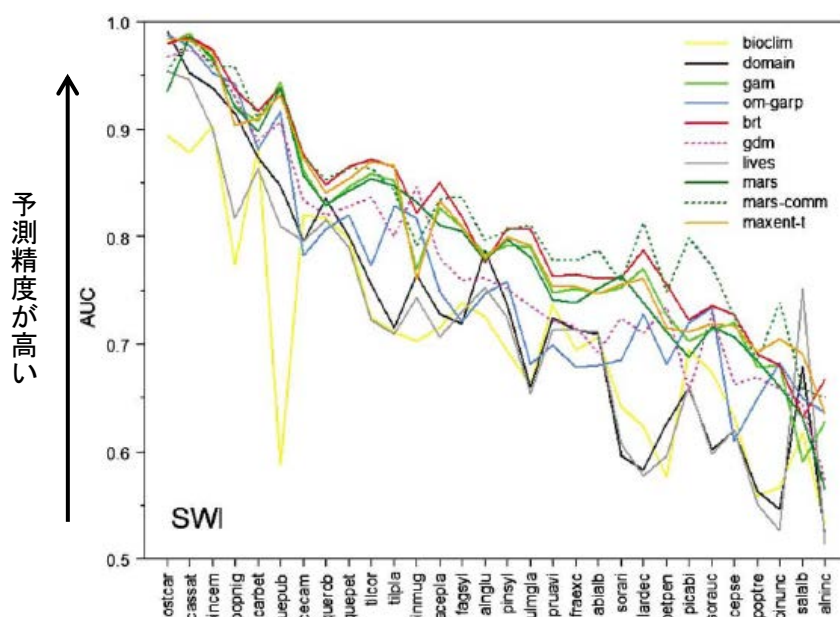
② 対象生物の分布データと環境条件データの取得時期のずれ

過去の確認地点を現在の環境条件でモデルを構築してしまうと、植生遷移の進行や攪乱などにより、確認時点の環境条件とは異なる条件に基づくモデルによって間違った範囲を分布域としてしまう場合があることから、生物の分布データと環境条件データの取得時期が大きくずれないように注意する必要がある。

③種の違い

SDM の「予測の良さ（予測精度）」は、同じ種でも手法によって異なる結果が得られており（Elith ら 2006、図 3-10）、対象種の生態的特徴により影響を受けると言われている（Hernandez ら 2006）。

また、広域分布種の予測精度が悪い傾向にあるが、これは様々な環境条件が入り込むことで在地点と不在地点の環境条件の区別が付きにくくなるためと考えられている（Stockwell & Peterson 2002）。一方、広域分布種よりも生息する環境条件が限られる生態的に特化した種のモデリングは広域に分布する種よりも容易であると言われている（Hernandez ら 2006）。このようなことを念頭に、モデルとして許容できるかどうかを既往の同一種などのモデルの結果から判断することも必要である。



（Elith ら 2006 に加筆）

図 3-10 種別手法別の「モデルのあてはまりの良さ」の違い（スイス産の樹木 30 種）

上図は横軸に示した 30 種の樹木に対して、10 種類の手法を用いて構築した SDM の AUC 値（「第 3 章 3.4 推定した結果を確かめる」参照）を示している。同じデータを用いたとしても、SDM の手法によって AUC 値が大きく異なる場合があることが分かる（例えば左から 6 番目の quepub (*Quercus pubescens*) は GAM と BIOCLIM を用いた場合には大きく異なっている）。



ボックス 3-4

モデルの適用事例について

i. 日本における SDM の適用種

日本における SDM64 件の事例の対象種を表 3-4 に整理した。

表 3-4 日本国内における SDM の対象種等

区分	種・群集名（事例数）
哺乳類	アライグマ（5） ツキノワグマ（1） ニホンジカ（6） ホンドタヌキ（5）
鳥類	オオタカ（1） クマタカ（6） タンチョウ（1） ヒバリ（2） ヒヨドリ（1） ライチョウ（1）
両生類	モリアオガエル（1）
魚類	アカヒレタビラ（1） イトウ（1） オイカワ（1） サクラマス（1） タイリクバラタナゴ（1） タナゴ（1） ハナカジカ（1） メダカ（2） ヤリタナゴ（1）
昆虫類	ヒメタイコウチ（2）
植物	アレチウリ（1） オオブタクサ（1） シナダレスズメガヤ（1） ハリエンジュ（1） 竹林（1） ササ類（1）
生物群集	サギ類（1） 鳥類（6） 絶滅危惧淡水魚（1） 魚類（1） チョウ類（3） トンボ類（2） 絶滅危惧植物（1） 植生（1）
合計：64 事例	



ボックス 3-4 (続き)

ii. 日本における SDM の作成状況について

我が国におけるいくつかの事例を整理した。

表 3-5 日本国内におけるSDMの手法別対象、説明変数の数、説明変数の解像度

区分	No.	対象種	手法群名	手法名	目的変数	予測精度		文献 No.
						評価手法	評価結果	
哺乳類	1	アライグマ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	検証用データとの相関	$r=0.898$	28
	2	アライグマ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	検証用データとの相関	$r=0.898$	28
	3	シカ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	判別基準50%、38%とした場合の正判別率	50%:63%、38%:79.3%	25
	4	ツキノワグマ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	AUC、Kappa	AUC=0.95、Kappa=0.69	6
	5	ホンドタヌキ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	モデルの高利用域と痕跡発見率、カメラの撮影頻度と比較	高利用域で高い値	17
	6	ホンドタヌキ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	モデルの高利用域と痕跡発見率、カメラの撮影頻度と比較	高利用域で高い値	24
	7	アライグマ	一般化線形	一般化線形	連続	モデルの予測結果と現地データとの分布比較	地域レベルで見ると予測可	9
	8	アライグマ	一般化線形	一般化線形	連続	モデルの予測結果と現地データとの分布比較	地域レベルで見ると予測可	9
	9	ニホンジカ	一般化線形	一般化線形	連続	AUC	0.75	7
	10		一般化線形		連続	AUC	0.89	7
	11		一般化線形		連続	記載なし	記載なし	8
	12		一般化線形		連続	記載なし	記載なし	8
	13	アライグマ	一般化線形	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	8
	14	アライグマ	多変量データ分類	判別分析	在、不在	記載なし	記載なし	31
	15	ホンドタヌキ	多変量データ分類	判別分析	在、不在	モデルの高利用域と痕跡発見率、カメラの撮影頻度と比較	高利用域で高い値	17
	16	ホンドタヌキ	多変量データ分類	判別分析	在、不在	モデルの高利用域と痕跡発見率、カメラの撮影頻度と比較	高利用域で高い値	24
	17	ホンドタヌキ	樹形モデル	回帰木	在、不在	モデルの高利用域と痕跡発見率、カメラの撮影頻度と比較	高利用域で高い値	17
鳥類	1	クマタカ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	検証用データとの相関	$R^2=0.96$	1
	2		一般化線形		在、不在	AUC、Kappa	AUC=0.97、Kappa=0.83	3
	3		一般化線形		在、不在	判別基準50%とした場合の正判別率	0.01%	26
	4		一般化線形		在、不在	判別基準50%とした場合の正判別率	23.40%	26
	5	タンチョウ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	判別基準50%とした場合の正判別率	64.10%	26
	6		一般化線形		在、不在	判別基準50%とした場合の正判別率	81.50%	29
	7	ヒバリ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	AUC	0.886	36
	8		一般化線形		在、不在	AUC	0.897	36
	9	オオタカ	一般化線形	一般化線形	連続	判別基準50%の営巣地の数	全ての営巣地が50%に含まれた。	2
	10	ヒヨドリ	一般化線形	一般化線形	連続	検証用データとの相関	$r=0.16\sim0.88$	27
	11	ライチョウ	Jacobの選好度指数	選好度地図オーバーレイ	在、不在	記載なし	記載なし	5
両生類	1	モリアオガエル	樹形モデル	CART	在	総確認地点からのランダムサンプリングとモデルによる感度の有意性検定	1.1 (現在の分布を75%説明)	33
魚類	1	イトウ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	kappa	0.149	12
	2	サクラマス	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	kappa	0.536	12
	3	メダカ	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	正判別率 (判別基準は記載なし)	34.2~98.2%	19
	4	アカヒレタビラ	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	記載なし	20
	5	タイリクバラタナゴ	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	記載なし	20
	6	タナゴ	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	記載なし	20
	7	ヤリタナゴ	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	記載なし	20
	8	オイカワ	樹形モデル	回帰木	在	記載なし	記載なし	11
	9	ハナカサガ	演繹的手法	HSIモデル	不明	記載なし	記載なし	13
	10	メダカ	生態ニッチ要素解析	ENFA	在、不在	交差検定	$\chi^2=24.395$, $p=0.0037$	32
昆虫類	1	ヒメタイコウチ	樹木モデル	CT	在、不在	正分類率	86.40%	18,39
	2							
植物	6	竹林	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	AUC	0.815	23
	1	アレチウリ	樹形モデル	CART	在、不在	正答率、AUC	AUC0.784正答率0.543	35
	2	オオバクサ	樹形モデル	CART	在、不在	正答率、AUC	AUC0.802正答率0.708	35
	3	シナダレスズメガヤ	樹形モデル	CART	在、不在	正答率、AUC	AUC0.803正答率0.751	35
	4	ハリエンジュ	樹形モデル	CART	在、不在	正答率、AUC	AUC0.840正答率0.770	35
	5	ササ類	樹形モデル	CT	在	正答率	53.3%~92.3%(ノード1~5)	30
	1	サギ類	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	記載なし	記載なし	4
	2	鳥類	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	記載なし	記載なし	22
	3	鳥類	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	kappa (繁殖期:59種、越冬期:58種対象)	0~0.8未満	21
	4	鳥類	樹形モデル	CT	連続	正判別率	37調査区中32調査区を正しく判別	38
群集	5	鳥類	序列化	多変量解析 (CCA)	在、不在	記載なし	記載なし	18
	6	鳥類	一般線形	重回帰モデル	連続	R^2	繁殖期=0.561、越冬期=0.567	21
	7	鳥類	多変量データ分類	判別分析	連続	正判別率	繁殖期=0.656、越冬期=0.659	21
	8	絶滅危惧淡水魚	一般化線形	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	14
	9	魚類	一般化線形	一般化線形	連続	記載なし	記載なし	16
	10	チョウ類	一般化線形	ロジスティック回帰	在、不在	記載なし	記載なし	22
	11	チョウ類	序列化	多変量解析 (CCA)	在、不在	記載なし	記載なし	18
	12	チョウ類	一般線形	重回帰モデル	連続	R^2	0.62	10
	13	トンボ類	樹形モデル	CART	連続	誤判別率	12.50%	40
	14	トンボ類	序列化	多変量解析 (CCA)	在、不在	記載なし	記載なし	18
	15	絶滅危惧植物	Jacobの選好度指数	選好度地図オーバーレイ	在	感度、特異度	感度0.67~0.90特異度0.33~0.72	34
	16	植生	樹形モデル	CART	カテゴリカル	正判別率	69.40%	37

※1 相関係数 (r) は-1~1の値をとり、-1に近づくほど負の相関が高く、1に近づくほど正の相関が強いことを示す。

※2 AUC は0.5~1の値をとり、1に近づくほど精度の高いモデルであることを示す。

※3 Kappa は0~1の値をとり、1に近づくほど精度の高いモデルであることを示す。

※4 R2 は0~1の値をとり、1に近づくほど精度の高いモデルであることを示す。



ボックス 3-4 (続き)

iii. 海外における SDM の作成状況事例

Franklin (2009)は表 3-6 の事例を系統だって事例を収集・整理したものではないことを前置きしたうえで、モデルの説明変数には様々なスケールの説明変数が用いられていること、気候、地形といった変数がほとんどの場合選択されていること、動物の場合にはパッチの特徴に関係する変数、基質に関する変数は植物で多く選択されている傾向にあるとしている。

表 3-6 海外におけるモデル作成状況

分類群	対象地	解像度 (Km)	解像度 1辺 (m)	サンプル数	対象種数	説明変数の総数	気候	標高	基質、土壌	位置	土地利用	リモートセンシングデータ	文献名
灌木	Southern California, USA	0.0009	30	906	20	8	3	3		2			Franklin, 1998
樹木	Eastern USA	2124の郡		2500	80	33	7	3	18		5		Iverson & Prasad, 1998
カシ類	California, USA	不明		4010	3	25	16	1	8				Vayssières et al., 2000
ダニ類	Southern Africa	648	25456	4020	74	49	36	1				12	Cumming, 2000b
樹木	Europe	2500	50000	4419	174	6	5	1					Araujo & Williams, 2000
ナンキョクブナ属の種	New Zealand	不明		14540	4	8	6	1	1				Leathwick & Austin, 2001
樹上性有袋類、爬虫類、鳥類	New South Wales, Australia	0.04	200	4572	5,964	24	3	3	3	1	14		Pearce et al., 2001
樹冠植物	New South Wales, Australia	0.04	200	2223	75	10	3	3	3	1			Pearce et al., 2001
植物	Victoria, Australia	0.0625	250	3522	8	35	23	7	2	2	1		Elith & Burgman, 2002
鳥類	Southern Appalachia, USA	不明		215	6	26		13			13		Dettmers et al., 2002
鳥類	Mexico	25	5000	1-100	103	8	2	1		3	2		Stockwell & Peterson, 2002
植物群落	Mojave desert, California, USA	0.0009	30	3819	11	12	4	6	2				Miller & Franklin, 2002
鳥類	Maine, USA	0.0081	90	8-541	30	24	21	3					Peterson et al., 2003
樹木	Catalonia, Spain	0.0324	180	ホルガル全土のメッシュデータ	4	19	16	2	1				Thuiller et al., 2003
樹木	Portugal	100	10000	933	4	9	2	7					Thuiller et al., 2003
樹木	Europe	2500	50000	4419	4	7	6	1					Thuiller et al., 2003
鳥類	Catalan, Spain	1	1000	1500	30	34	3	2		2	27		Brotons et al., 2004
爬虫類	Portugal	100	10000	993	44	16	5		2		9		Segurado & Araujo, 2004
鳥類	Southern Africa	648	25456	4275	32	61		1				60	McPherson et al., 2004
植物、昆虫類、鳥類	Europe	2500	50000	欧州全土の50kmメッシュデータ	306	3	3						Huntley et al., 2004
地衣類	Oregon Washington, USA	0.0081	90	299	4	9	2	3			4		Edwards et al., 2005
樹木、灌木	Switzerland	0.000625	25	550	106	5	3	2					Drake et al., 2006
植物、鳥類	Wet tropics, Australia	0.0064	80	9-74, 32-265	20, 20	13	10	3					Elith et al., 2006
樹木	Switzerland	0.01	100	36-5822	30	13	7	2	2		2		Elith et al., 2006
植物	New Zealand	0.01	100	18-211	52	13	8	3	2				Elith et al., 2006
植物、鳥類、爬虫類、哺乳類	New South Wales, Australia	0.01	100	2-426	54	13	5	4	2		2		Elith et al., 2006
鳥類	Ontario, Canada	1	1000	16-749	20	11	6	3		1	1		Elith et al., 2006
樹木	Eastern USA	400	20000	9782	4	36	5	6	22		3		Prasad et al., 2006

Franklin(2009)を一部改変して作成

2.4 推定結果の確からしさを検証する

これまでに重要な種の分布を推定する手法として、既往の情報（分布図）を利用する方法、対象種の確認位置情報がない、あるいは非常に少ない場合に物理環境データ等に基づく推定方法、生物の位置情報を利用し、SDM によって推定する手法について示した。

しかし、推定した結果がどの程度確からしいかを検証しないまま、予測評価を行っては重大な過誤を生じさせてしまう恐れがある（ボックス 3-5 参照）。

そこで、本節では推定結果の確からしさの検証について示した。

2.4.1 既往の分布情報に対する確認

地域の状況によっては既往の重要な種の分布図、あるいは市町村史等に記載される分布情報によって分布状況が把握できることが考えられる。このような場合、その利用に当たっては、分布図の作成や市町村史の編纂がいかに行われたか、例えば専門家のかかわりの程度、情報の新しさの程度等を確認し、情報の確からしさを把握することが必要である。種の確認位置のデータが地域の博物館等のデータベースにあるような場合には、これらのデータとの分布図等との重なり具合を見ておくことも有効である。

2.4.2 物理データ等に基づく分布の推定

物理データ等に基づく分布の推定結果では対象種の細かい分布状況は把握できない。従って、種の確認位置のデータが多少なりとも存在する場合には、これらのデータとの重なり具合を確認する、あるいは専門家による助言を受けることも考えられる。

なお、このような不確実性の大きいことが想定される場合、方法書以降の手続では現地調査によって分布状況を確認するとともに、モデルによる分布範囲の推定に向けて、より確実性が増すような調査計画を立てる必要がある。

2.4.3 SDM による分布の推定

(1) 「良いモデル」の構築

種の分布を推定するモデルに対して「良いモデル」と判断する一定の基準値があるわけではなく、最終的には実施者が目的とする結果（ここでは重大な環境影響が生じるかどうかを予測できること）が得られる程度の推定がなされているかどうか、モデルに生態学的な現実味があるかどうかなどで判断される（Franklin 2009）。

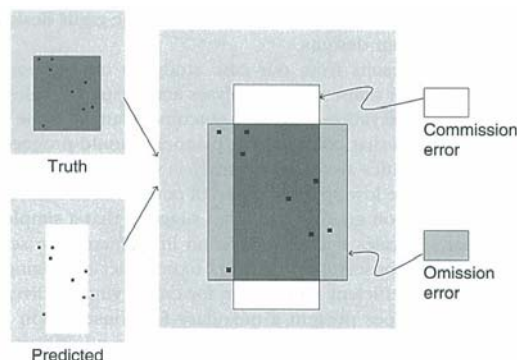
しかしながらモデルの良さを主観的に判断するだけでは、客観的に受け入れられないことから、数値的に表現する様々な手法を用いて併記しておくことが重要である。

良いモデルであるかどうかを客観的に評価するためには、モデルの「あてはまりの良さ」だけでなく、「予測（再現性）の良さ」を検証しておく必要がある。

モデルの「あてはまりの良さ」は、例えば図 3-9 において予測した分布範囲（白枠）にどれだけ実際の確認地点が位置しているかで判断される。モデルの「予測（再現性）の良さ」は同じモ

デルを使って、別地域の実際の確認地点（あるいはモデル構築に使用していない確認地点）をどれだけ再現できているかで判断される。

なお、図 3-11 の実際に確認されている地点が予測範囲に入っていない場合を **Omission error**（偽陰性。表 3-7 の c）、確認されていない範囲を分布している範囲と予測している場合を **Commission error**（偽陽性。表 3-7 の b）と称している。



(Flather ら 2009)

図 3-11 在データによる分布推定に関する予測とエラーの関係模式図

左図の黒い枠の範囲が本当の分布域であるのに対して、予測した範囲が左図の白枠の範囲とする。これを重ねた右図において本当の分布域に位置している種の確認地点（黒い点）が予測した分布域が外れていることを **Omission error** といい、実際には対象種の分布域ではないのに、分布域だと予測してしまっている白い範囲を **Commission error** と称している。

表 3-7 に示すように、実際の出現状況に対して、モデルによる分布状況を対応させた行列を混同行列 (**confusion matrix**) と言い、各セルの値を用いて推定データの精度を検証する様々な指標が挙げられている (表 3-8)。

表 3-7 種の在・不在に対する混同行列

	現地での確認状況			
		在	不在	計
	在	a	b	a+b
	不在	c	d	c+d
予測結果	計	a+c	b+d	a+b+c+d=n

表 3-8 混同行列から派生した指標例

指標	計算法
感度 sensitivity	$a/(a+c)$
特異度 specificity	$d/(b+d)$
TSS (True Skill Statistic)	$\text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$
OPS (Overall prediction success) CCR (Correct classification rate) PCC (Percent correct classification)	$(a+d)/n$
カッパ指数 κ	$\kappa = (Io - Ie) / (1 - Ie)$ $Io = (a+d)/n, Ie = (a+c)/n \times (a+b)/n + (b+d)/n \times (c+d)/n$
オッズ比	ad/cb

Allouche et al.(2007)等を参考に作成

現在までのところ、モデルの精度を評価する最も良い方法についてコンセンサスは得られていない (Reese ら 2005) もの、特にモデルがどれほど実際の分布状況と一致しているかを捉える指標としてはカッパ係数が良く用いられており、その一致程度は表 3-9 に示す範囲等で判断されている。カッパ係数は 0～1 の値をとるが、表 3-6 に示す他の指標同様にサンプル数に左右されやすいことに留意すべきである。

表 3-9 カッパ係数による一致程度

カッパ係数による一致程度の判断	備考
$\kappa > 0.8$: ほぼ完璧な一致 (almost perfect) $0.6 < \kappa \leq 0.8$: 高度の一致 (substantial) $0.4 < \kappa \leq 0.6$: 中等度の一致 (moderate) $0.2 < \kappa \leq 0.4$: 軽度の一致 (fair) $0 \leq \kappa \leq 0.2$: ごく軽度の一致 (slight agreement)	Landis and Koch ら (1977)
$\kappa \geq 0.75$: 高度の一致 (excellent) $0.4 \leq \kappa < 0.75$: 中等度の一致 (fair to good) $0 \leq \kappa < 0.4$: 軽度の一致 (poor)	Fleiss (1981)

表 3-8 の指標以外によく用いられているモデルの評価指標として AUC が挙げられる。

SDM による分布推定結果は出現確率の予測結果の正答とするカットオフ点を徐々にずらし、横軸に 1－特異度 (不在地点を在地点と誤って予測してしまう率)、縦軸に感度 (在地点を在地点と正しく予測する率) をプロットして表した曲線を ROC 曲線 (receiver operating characteristic curve) と称している (図 3-12)。

ROC 曲線が図 3-12 の左上に近いほど精度の高いモデルと評価できるが、そのままでは定性的な判断となることから、確認地点がまったくのランダム分布である線 (図 3-12 の左下～右上を結ぶ直線) よりも左側の ROC 曲線に囲まれる面積割合を AUC (Area Under the Curve) と称した評価指標が考案されている。

AUC は 1 (完全一致の場合) ～0.5 (ランダムの場合) の範囲を示し、0.5～0.7 は精度が低い、0.7～0.9 は中程度の精度、0.9 より大で精度が高いモデルと一般的に評価されている (実際には AUC が 0.5 以下の値として計算される場合があるが、0.5 と同様と考えてよい)。

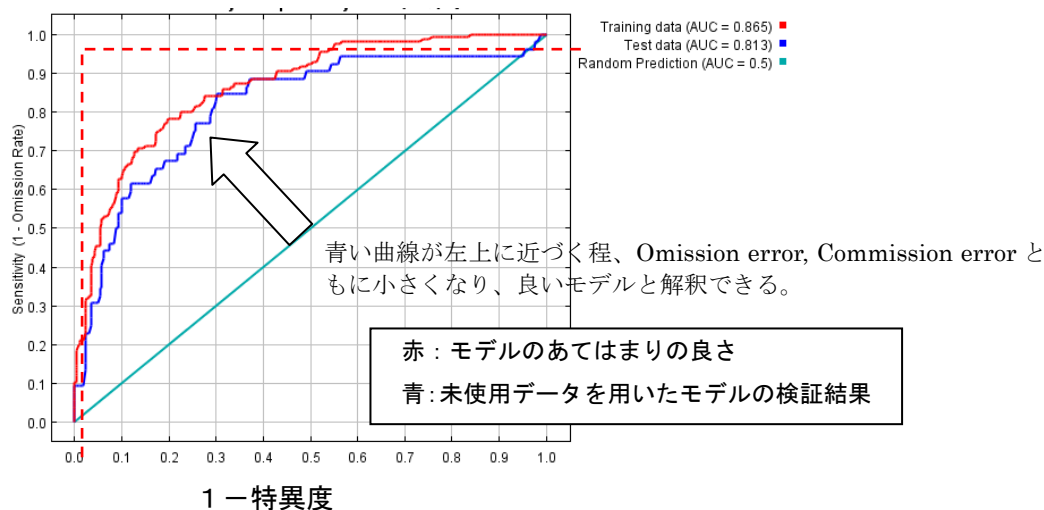


図 3-12 ROC 曲線の概念図



ボックス 3-5

推定結果の確からしさの評価の重要性(1)

下図の左側には、ある種にとっての環境条件と生息適性（利用指数）についての仮想のデータを示した。最も適正が高い場合を 1.0、まったく利用しない場合を 0 に変換して示している。この時、環境条件と利用指数との関係を、HEP の HSI モデルでよく実行されているように直線回帰すれば右上図のような関係性があると考えられる（1 に達した値以降の環境条件は 1 であるとしている）。

しかし、実際には環境条件と生物の利用指数が直線的な関係でないことも多い。仮に、真の関係が単峰型だとすると、直線回帰を用いることで全く不適な環境を最適な環境と間違った判定してしまう。下の例で、青斜線部分が事業実施後に残存する環境であると想定すると、直線回帰を用いれば適切な環境は残存するという結果となるが、単峰型を用いると適切な環境はほとんど消滅するという結果となる。

こうした重大な過誤を防ぐためにも、推定結果の確からしさを評価することが重要であり、対象生物の生息条件に関する知識が必要である。

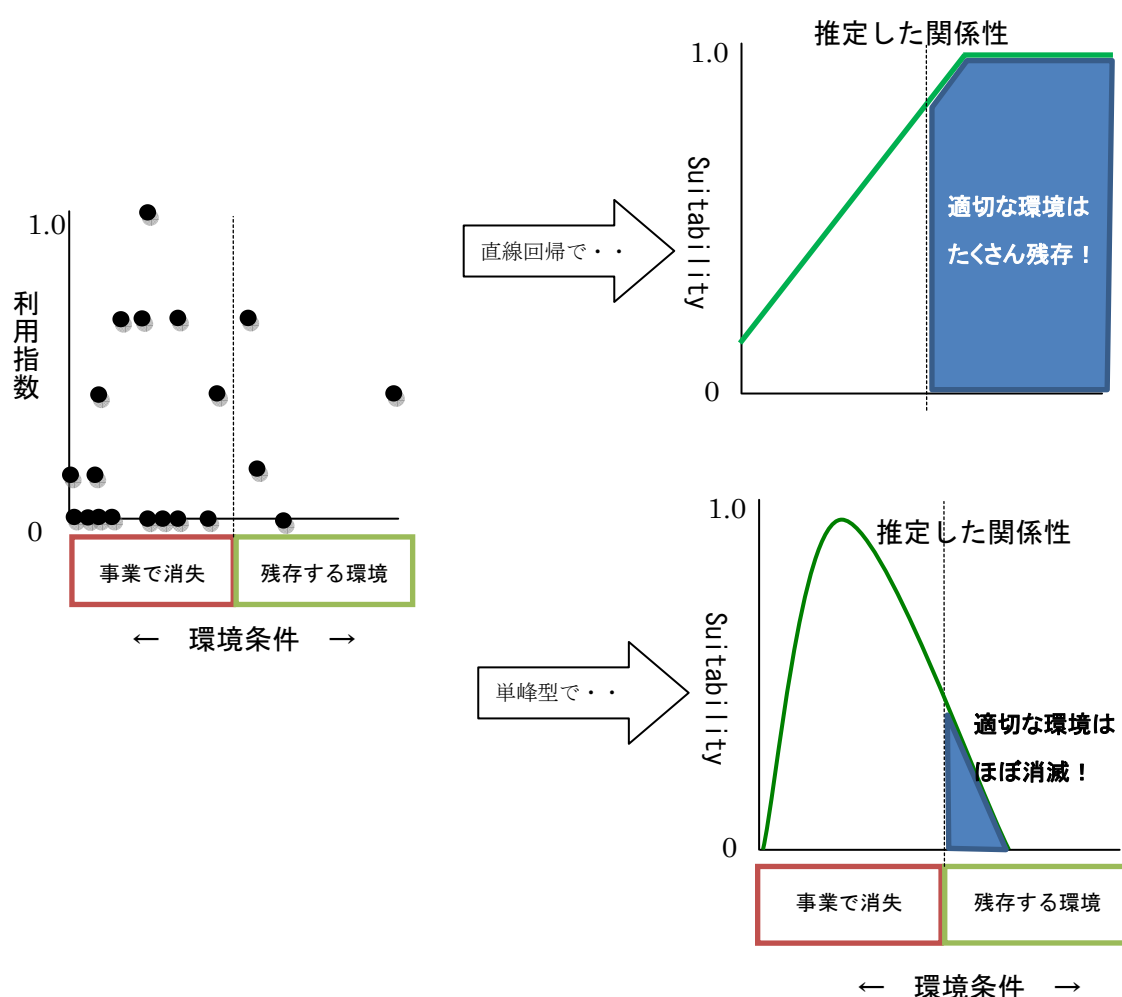


図 3-13 不適切な関係づけの可能性のある例



ボックス 3-6

推定結果の確からしさの評価の重要性(2)

予測の良さとは、「同一のデータ取得方法で別のデータを得たときに、そのモデルがどれくらい正確にいいあてているか」を表している。

例えば図 3-14 の的に対して、真ん中の黒い部分に 1 回的中することは、あるデータでモデルを構築し、そのデータセットによる結果が実際の出現状況とおおよそ一致したことに対応する（「あてはまりの良さ」）。しかし、同じモデルを用いて、別の環境条件のデータセットで再現した場合に実際の出現状況に合わない場合（B～D）、予測（再現性）が良いとは言えない。モデル構築に使っていない新しい複数のデータセットを用いても、A のように何度も実際の出現状況とおおよそ一致する場合に「予測（再現性）が良いモデル」と考えることができる。

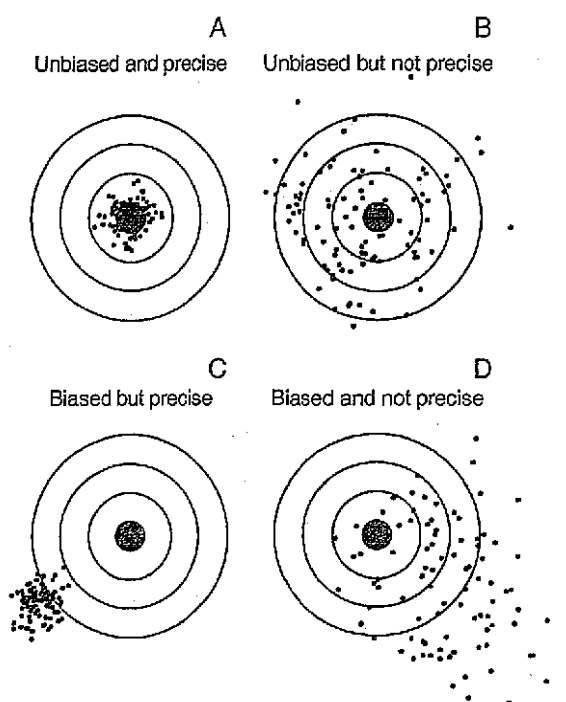


図 3-14 推定精度模式図(White ら 1982)

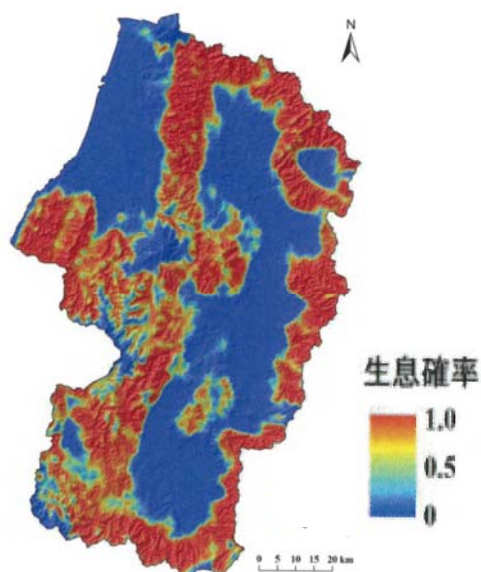
(2) 分布の閾値⁵を決定する

種の出現ポテンシャルや分布確率を推定するような場合、どの確率値を選定するかによって分布範囲が異なってくる（図 3-15 参照）。

閾値選定の手法例を表 3-10 示した。

環境影響評価においては安全側で評価することが求められることから、偽陰性となる率（実際には存在する場所をいないと場所と誤って推定する率）を小さくするように評価すべきである（図 3-12 を参照）。

種の分布を推定した結果、これまでに記録が無いにも関わらず分布している可能性が高いと推定され、その範囲に事業計画が重なるようであれば、その後のリスク回避をするためにも現地踏査等により実際に存在するかどうかを確認することが望ましい。



杉山ら(2009)より

図 3-15 生息確率のポテンシャルマップの例

山形県内のクマタカの生息適地をロジスティック回帰分析を用いて推定した例。赤い範囲は正則確立が高く、青い範囲は確立が低い。生息確率の値は 0～1.0 の値を持っているが、適地か不適地かを二分する閾値については分かっていない。従って、閾値をどの値に設定するか（0.1、0.5、0.9 など）によって、生息適地の分布形状は変化する。

表 3-10 閾値選定手法例

手法名など	閾値とするところ	引用文献
最大感度特異度合計 MaxSSS	特異度と感度の合計が最大となるところを閾値とする	Manelら 2001
最大 κ	κ 指数が最大となるところを閾値とする	Moisenら2006 他
Maximum Percent Correct Classification:PCC	PCCが最大となるところを閾値とする	—
ROC曲線と左上コーナーの距離が最小となるところ	$(1 - \text{感度})^2 + (\text{特異度} - 1)^2$ の最小化	Cantorら 1999
その他	False positiveとFalse negativeが同率となるところ	Fielding and Bell 1997

Franklin(2009)を改変

閾値を選定するために図 3-12 の濃い青い線のどこを選ぶか（感度と特異度の異なる値の組み合わせをどこで選ぶか）を示した手法例である。

⁵ ここでいう閾値とは、対象種の分布範囲の境界値となる確率値を指す。例えば図 3-10 において対象種の分布範囲を「出現ポテンシャル」が 0.9～1.0 の橙色が最も濃い範囲に限った場合と、0.4～0.5 の濃い緑色の範囲までを分布域とした場合には、まったく異なってしまう。このように閾値の設定によって予測結果が大きく異なることもあり得るため、表 3-10 のような客観的な手法で決定することが望ましい。

2.5 予測と評価

2. 4 までの手順により、分布状況が不明で重要な影響が想定される重要種について、対象地域において分布範囲を推定したのちに影響予測を実施することができる。

事業による重大な影響の有無は、地域特性（重要な対象の重要性の程度や地域における分布状況等）と事業計画の特性（影響要因の内容や強度、例えば、対象の分布状況と事業の実施が想定される範囲との重なり程度の程度や不可逆的な変化を引き起こすかどうか等）の関係から予測することになる。

特に重なり程度の程度は2. 4 までの推定範囲と事業の実施が想定される範囲の確実性に依存することから、範囲の重なり程度で影響の重大性を評価するだけでなく、両者の不確実性を明示しておくことが重要である（第4章ティアリング参照）。

これまでに示したような手法を活用することで、表 3-11 に示すような予測結果が得られる。

表 3-11 予測結果のアウトプット・イメージ

区 分		予測評価項目	複数案			備考(用いた手法)
			A	B	C	
動物、植物	動物	クマタカの狩場の改変面積(ha)	0	0	3	ロジスティック回帰分析
		オオムラサキの潜在的生息地の改変面積(ha)	0	1.2	0	最大エントロピー法
		ブチサンショウウオの生息地と計画の重なりの有無	なし	なし	あり	物理データ等に基づく分布の推定
		ヤイロチョウ分布域との重なりの有無	0	1	2	既往メッシュ図と計画が重なるメッシュの数
	植物	カタクリの生育地改変箇所数	2	9	4	〇〇市DBIによる情報との重ね合わせ
		ヒカゲノカズラ生育地改変面積(ha)	3	4	5	一般化加法モデルによる推定
		：				
		：				

3節 地域の重要な場を推定する

3.1 推定の対象

ここでは生態系の重要な対象への影響を予測するために必要となる重要な場を推定する手法について解説する。

なお、表 3-12 の①、③の対象については、表 2-6 に示す生物多様性地域戦略等から地域により注目されている具体的な対象を確認するとともに、対象地域の専門家や地域住民等にヒアリングを実施し、把握することが望ましい。

表 3-12 生態系の重要な対象の区分

特性 環境要素	事業計画の 特性	地域特性		
		①環境影響を受けやすい地域	②環境保全の観点から法令等により指定された地域	③法令等の指定はないが地域により重要な場として選定すべき地域
生態系	・重要な生息・生育環境の改変 ・長大構造物による生息場所や生態系ネットワークの分断、断片化 ・生物が特別に利用をする地域での障害（渡りルート等） ・河川、海域の流砂系の改変 等	・自然林、湿原、藻場、干潟、サンゴ群集、自然海岸等の人為的な改変をほとんど受けていない自然環境又は野生生物の重要な生息・生育の場 ・運河、内湾等の閉鎖性水域 等	・文化財保護法に基づき指定された天然保護区域、地方自治体の文化財保護条例に基づき指定された天然保護区域 ・自然公園（国立公園、国定公園及び都道府県立自然公園）の区域 ・原生自然環境保全地域、自然環境保全地域 ・緑地保全地区（都市緑地保全法） ・鳥獣保護区、ラムサール条約に基づく登録簿に掲載された湿地 ・保安林等の地域において重要な機能を有する自然環境 等	・里地里山（二次林、人工林、農地、ため池、草原等）並びに河川沿いの氾濫原の湿地帯及び河畔林等のうち、減少又は劣化しつつある自然環境 ・都市に残存する樹林地及び緑地（斜面林、社寺林、屋敷林等）並びに水辺地等のうち、地域を特徴づける重要な自然環境 ・地域で重視すべき場 ・地域で認められている魚類の産卵場等である藻場やマングローブ林等の浅海域等

＜生態系で考慮すべき地域特性（重要な自然環境のまとまりの場）について＞

表 3-12 の①～③の捉え方を図 3-16 に模式的に示した。対象地域において「②環境保全の観点から法令等により指定された場」は明確に位置づけられ、重要な自然環境のまとまりの場と判断する根拠の不確実性は低い。

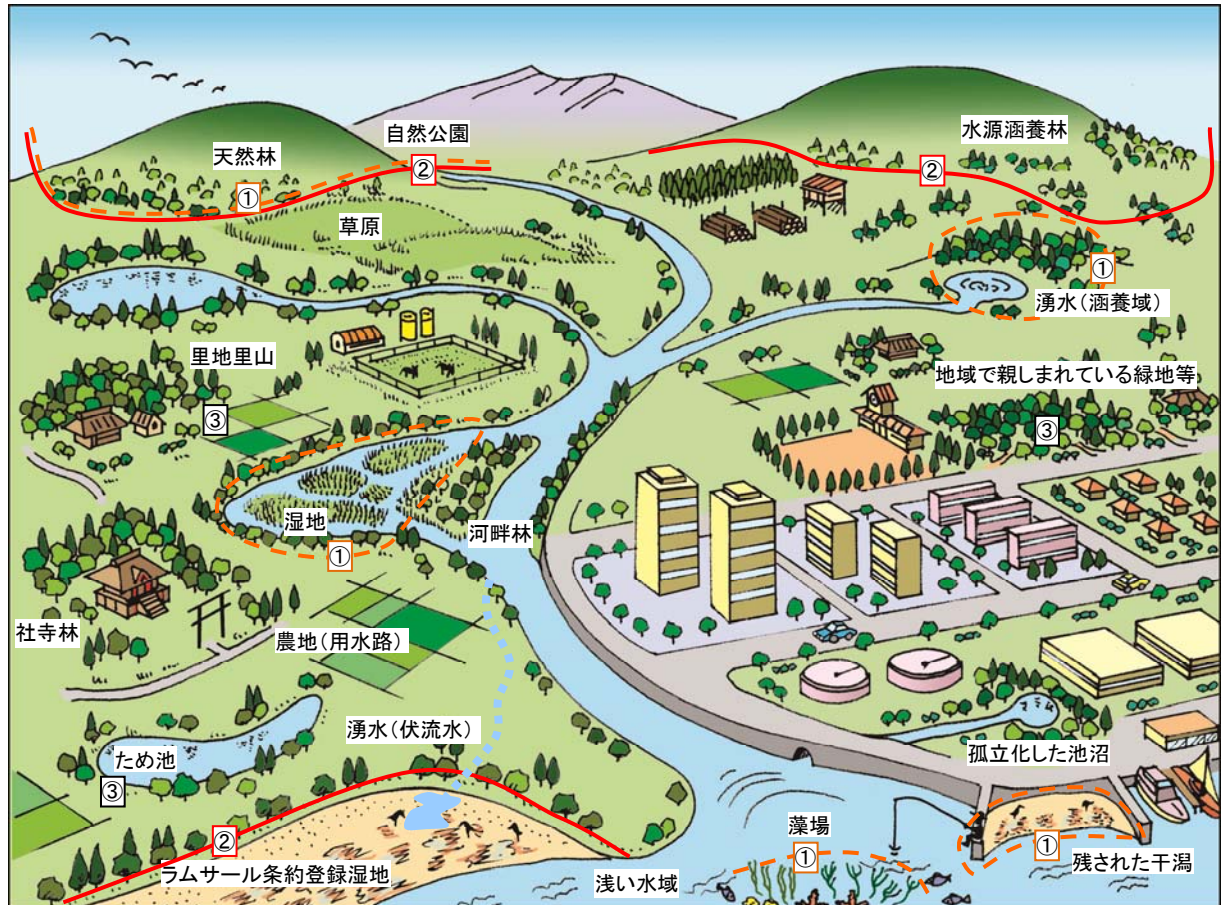
「①環境影響を受けやすい場」の範囲は、②に比べ曖昧となるが、主要なものは法令等により既に指定されている場合が多く、指定されていない場合でも②で指定された環境に類する人為的な改変をほとんど受けていない自然環境や脆弱な自然環境を考えることで、比較的抽出しやすいと考えられる。

「③法令等により指定されていないが地域により注目されている場」については、生物多様性地域戦略や地域計画等で明示されている里地里山、湿地帯等は抽出しやすいものの、その地域のみで親し

まれている林、小さな水辺等の地域を特徴づける重要な自然環境についても見落としのないよう留意する必要がある。

特に都市部や都市近郊の田園地帯においては、残された良好な自然環境が孤立的に存在することもあり、これらは周辺環境との相対的な関係により重要な自然環境のまとまりの場として把握できる。

周辺環境と相対的な関係の把握の際には、対象の歴史性、地域に親しまれた環境、種の多様性、生態系の機能など、複数の視点から確認する。



①環境影響を受けやすい場、②環境保全の観点から法令等により指定された場、③法令等により指定されていないが地域により注目されている場

図 3-16 生態系で考慮すべき地域特性の模式図

3.2 推定の流れ

生態系の重要な自然環境のままとりの場の推定の流れを以下に示した（図 3-17）

(1) 情報の収集整理、データの信頼性の確認

調査対象範囲を設定し、範囲内の自然環境保全の観点から法令等により指定された地域を既往 GIS データ等から地図化するとともに、生物多様性地域戦略や環境基本計画等に掲載された生物多様性地図等から、当該対象地域において分布している重要な場を整理し、地図化する（第Ⅲ章の2参照）。

得られた情報に関してはその信頼性について確認しておく（第1章 1節 参照）。

なお、地域によっては重要な場が示されていない場合も想定されるが、「重要な場がない」と判断するのではなく、以下に示す手法等を用いて検討することが必要である。

(2) 地域の重要な場の推定

既往の情報を整理するとともに、地域によって認識されていない重要な場が存在することも想定されるため、対象地域の地域特性を考慮して重要な場の抽出の視点を定め、抽出に必要な情報の入手程度に応じて、適切な推定手法を選定する。

推定の手法としては、物理データ等に基づく推定が主となるが、解析に必要なデータが存在する場合には、解析的な手法を用いることも検討する。

(3) 推定結果の検証

地域によって認識されていない重要な場を推定し、既往の情報に無い場合には、地域の環境に詳しい有識者にヒアリングを実施し、推定の妥当性について確認することが望ましい。重要な影響が想定されるような場合等、必要に応じて現地踏査を実施し、確認することも考えられる。

(4) 予測・評価の実施

重要な自然環境のままとりの場の重要性の程度、地域における分布状況と事業の実施が想定される範囲との重なり の程度、不可逆的な変化が生じるかどうか等から、事業による重大な影響の有無を予測評価する。

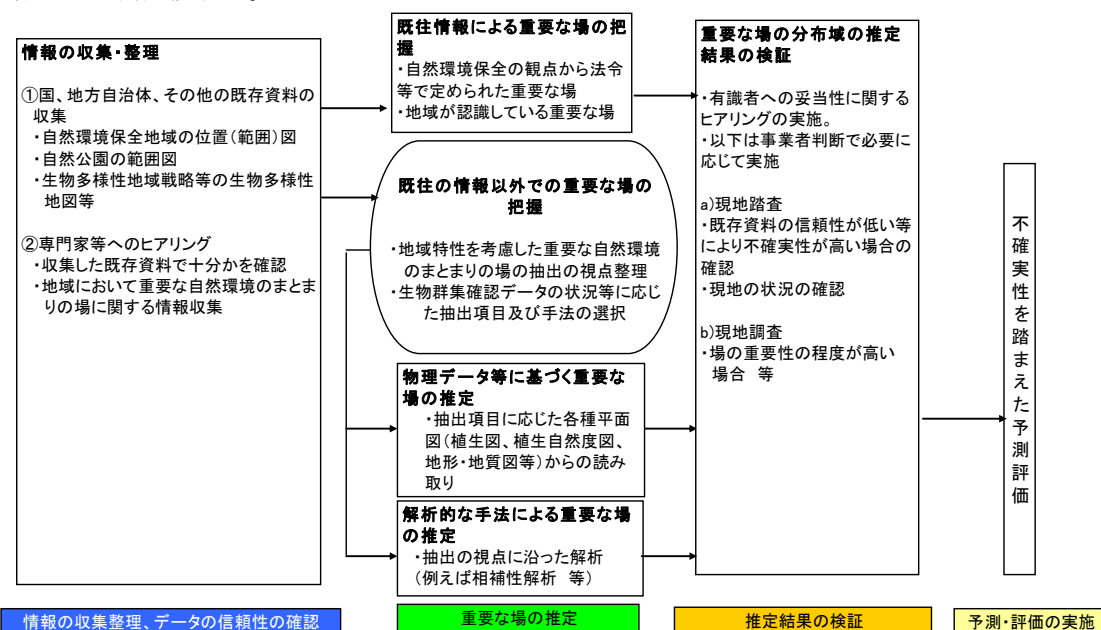


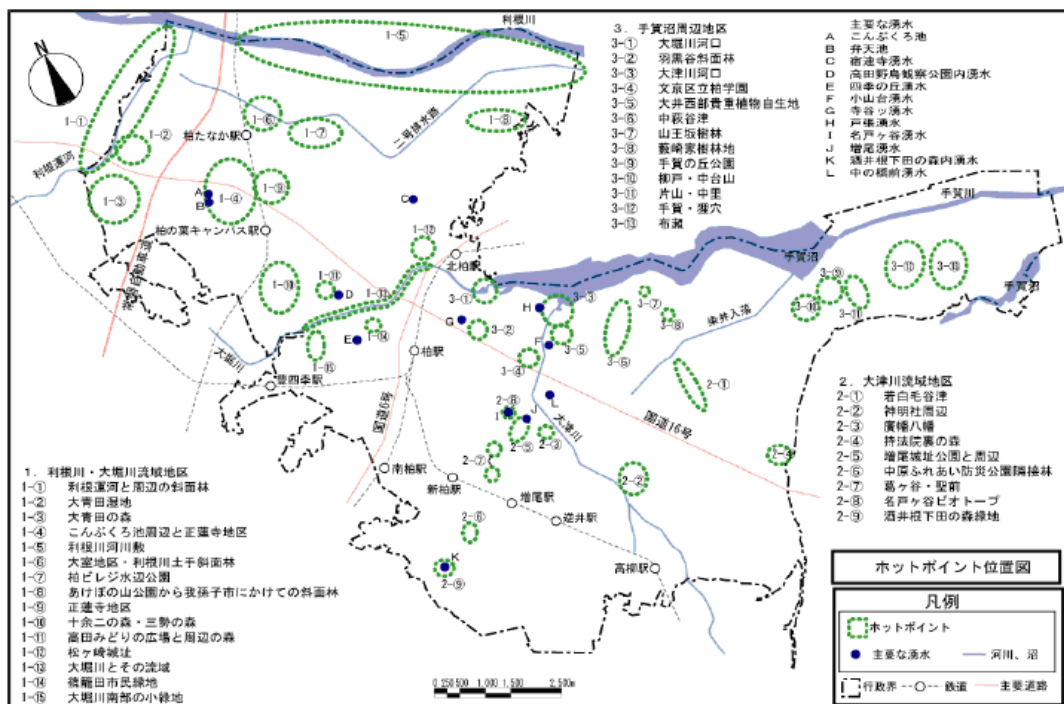
図 3-17 重要な場の推定の流れ(例)

3.3 推定の手法

3.3.1 既往の分布情報の活用

地方自治体では生物多様性地域戦略などで、その地域で重要と考えられ場について分布図を作成している場合がある(図 3-3)。地域の生物多様性地図にはいろいろなスケールの地図があることから、空間スケール別に整理し、各スケールで事業計画区域との重なるかどうかを確認する。

分布域が事業計画区域と重なる可能性があるなど、より詳細に推定する必要がある場合には、入手出来た物理データ等に基づく方法で検討する。



(柏市生きもの多様性プランより)

図 3-18 生物多様性地域戦略による重要な場掲載例

3.3.2 物理データ等に基づく分布の推定

既往の分布図等があったとしても、これら以外に地域でも認識していないが、地域の重要な自然環境のまよりの場が存在することも考えられる。重要な場が示されていない場合、「重要な場がない」と判断してしまうのではなく、地域で検討中あるいは認識されていない可能性もある。

このため、既往の分布図等だけで予測評価を実施するのではなく、地域の特性に応じて重要な場を抽出する視点を適切に設け、その視点に応じて具体的な抽出項目を設定する（重要な自然環境のまよりの場の抽出の視点例はボックス 3-5 参照）。

生物データが無いあるいは少ない場合、「第3章 2節 動物・植物の生息場所の推定」で示したように、対象地域内の植生、地形、地質等から地域に残された重要な場を推定する。

例えば、一般に気候的極相林が卓越する斜面においても、下部谷壁斜面には他の群落が成立する(菊池 2001)。(仙台市モミ林が成立する下部谷壁斜面域の植生はイイギリが優占し、モミが優占する上部谷壁斜面域の植生と明らかに異なっている)。

斜面域で急な平場が出現する場合には山裾に湿地が形成されている可能性があるなどといった推察も必要となる。

洞窟、湧水のような特殊な環境に生息する種の生息場所を推定する場合、これらの場所に関する既往の分布図の有無を確認する。あるいは地形図、地質図等から推定することが考えられる。

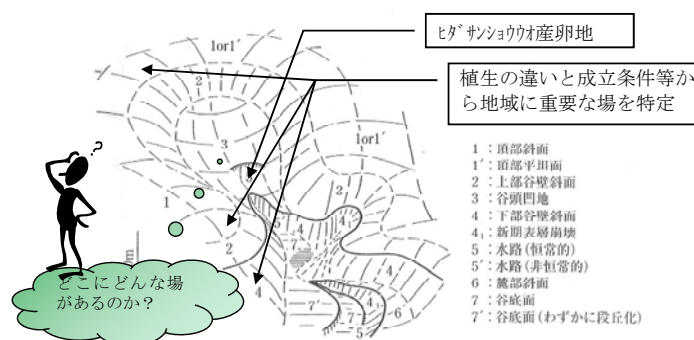


図 3-19 既往知見と物理データ等による推定イメージ

地域の過去の出現情報からヒダサンショウウオが分布している可能性があり、生態情報や経験から生息している可能性の高い溪流を推定したり、特異的な植生が成立する地形条件等から生態系の重要な場の存在を推定したりする。

海域であれば、漁業データから生息している群集を推定し、どのような場なのかを推測することも考えられる。海域では、藻場、干潟、浅場、ヨシ帯、サンゴ礁といった沿岸域の環境生態系の適切な保全管理の進め方、配慮すべき事項等の情報等を記載した「環境・生態系保全活動の手引き」（平成 21 年 3 月水産庁）等が重要な場を抽出する際の参考となる。

また、地域の地形や植生の変遷（直線河道整備による旧河道の池沼化、植林等による植生の変遷、地域本来の樹木の残存）の情報は、地域に残された重要な場の推定に役立つ場合がある。

なお、自然環境を見かけだけから判断することは重大なミスとなる可能性がある。

例えば、日本各地で山地斜面がスギ植林で一様になっている場合でも、標高の違いを反映した鳥類群集が成立するといったことがあり得る。このため、情報量が少ないからといって、単純な見方で済ませるのではなく、生態学等の専門的な知識を有する者によって妥当な検討を行うことが重要である。

このようにして推定した場については、地元の有識者へのヒアリングや現地踏査を実施し、推定結果を確かめることが望ましい。

参考に、重要な場としての里地・里山の抽出の考え方をボックス 3-8 に示す。



ボックス 3-7

EBSA の視点をベースにした重要海域抽出例

生物の多様性に関する条約（CBD）の EBSA（The Ecologically or Biologically Significant Areas）の抽出の視点に対して、環境省の「重要海域抽出検討会」では[典型性/代表性]が加えられた。

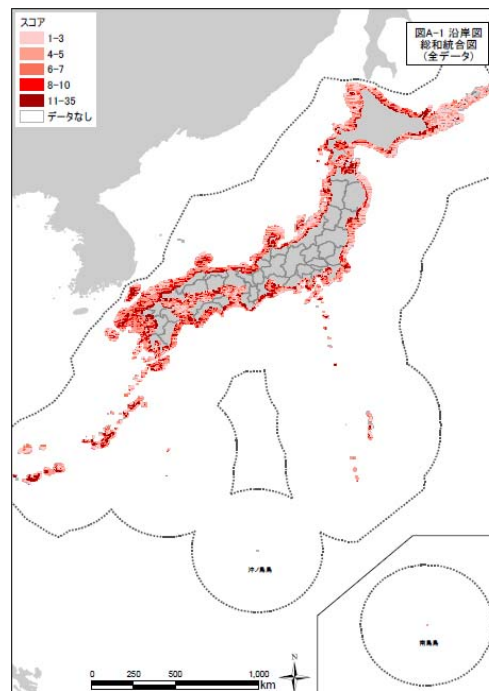
このような検討において地域の重要な場を抽出するためには、絶対的な評価だけではなく、周辺域との相対的な位置関係から重要な場を抽出するという視点が必要である。

例えば、国レベル、県レベル、市町村レベルで重要性、希少性といった視点から抽出される「環境保全の観点から法令等により指定された地域」は、空間スケールに応じた指定（例えば国レベルでは〇〇国立公園、市レベルでは△町のアヤメ生育地等）がなされる。一方、「環境保全の観点から法令等により指定されていないが」脆弱な場所は存在するし、多様性、自然性やその他の視点でも空間スケールから相対的にみて重要性が増し、(地域によって気がついていない場合でも)保全すべき場が存在する。

<EBSA をベースにした環境省の重要海域抽出の視点>

多様性、自然性、希少性/唯一性、絶滅危惧種又は減少しつつある生息地、典型性/代表性、生態的な脆弱性/感受性/低回復性、相補性/非代替性、種の生活史における重要性、生物学的生産性

検討会の報告書では、これらの指標のそれぞれについて作図が行われている。これらの異なる指標を単純にスコア合計して統合することは推奨されていないが、ここでは最も簡便な例として示した。



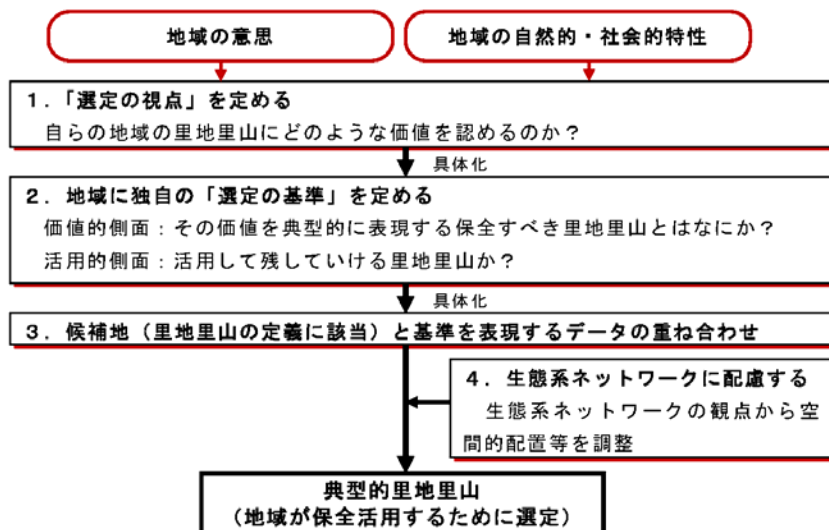
環境省資料

図 3-20 沿岸域の総和統合図(すべての基準のスコア合計)



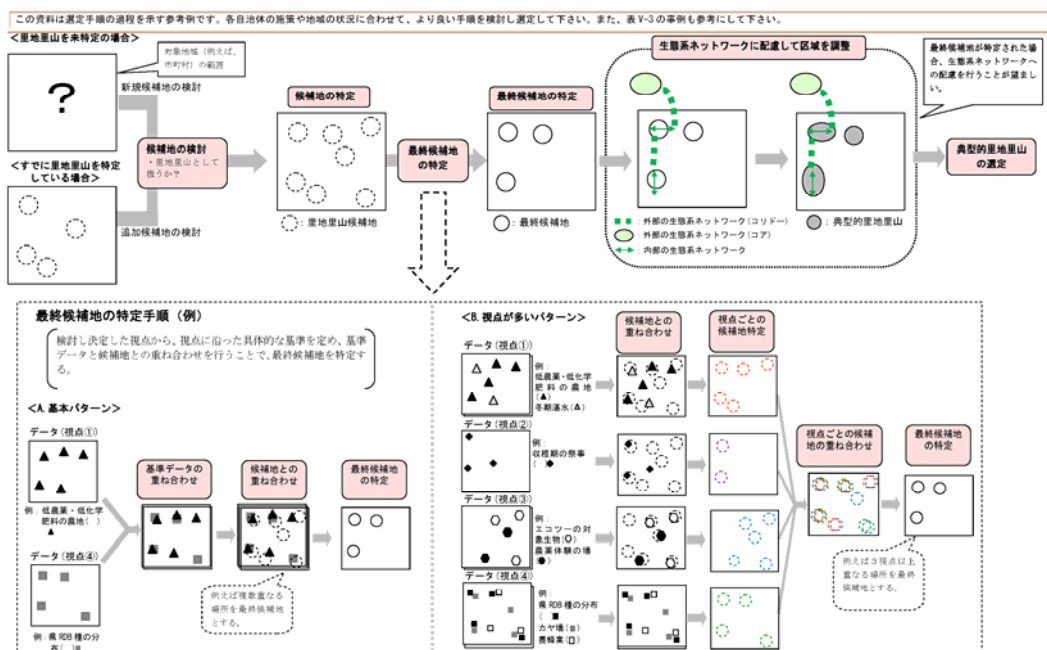
ボックス 3-8

生態系の重要な場として里地・里山の考え方(環境省)



図V-2 典型的な里地里山の選定手順

注：地域が独自に検討して定めた手順により選定を進めることを期待するところであり、必ずしもこの手順に沿う必要はない。



図V-4 典型的な里地里山の選定手順の例(イメージ図)

3.3.3 解析的な手法に基づく重要な場の推定

「第2章 1節 生物多様性分野に関するデータベースの整備状況」に示したような対象地域の博物館等により生物多様性分野のデータベースが整備されている場合には、これらのデータを用いて解析的に重要な場を推定する手法を用いることも考えられる。

ここで示す手法は、対象地域内でどのようなデータが、どのような解像度で存在し、面的に網羅されているかにまず左右される。

例えば、表 2-3 に示す地方自治体による動物等の 1km メッシュデータが利用可能な場合と確認地点のデータが利用できる場合では、後者の方が様々な手法を用いることが可能となる。

(1) 指標を用いた手法

絶対的な、あるいは相対的な重要性を一つの指標値として表す手法である。

絶対的な重要性の指標には総種数や重要種数などが挙げられる。

重要種数などは、「第3章 2節 動物・植物の生息場所の推定」で推定した重要種の分布域を重ね合わせてホットスポットを抽出するようなことも考えられる（この場合、不確実性の異なる様々な結果が重なることに留意する必要がある）。

各種の個体数など、種のアバンダンスデータが存在する場合に利用されることの多い代表的な指標に多様度指数が挙げられる。しかし、最近では単純に数値を比較できるものではないことがわかってきており、取扱いに注意が必要である（Lande 1996、Jost 2007 参照）。

その他には、里山インデックス⁶のように特定の環境を表すような指標もある。

生物多様性の状態を示す様々な指標が考案されており、世界的には OECD の環境指標、RUBICODE による検討などがある。わが国でも生物多様性総合評価における「状態の評価」の 16 指標が挙げられているが、これらに掲げられた指標がすべて地域の重要な場に沿うものではなく、扱っている空間スケールも異なっているため、先に示した重要性の視点に沿った指標を選定すべきである。

なお、重要な場を抽出する視点が多数存在し、対象範囲内で様々な重複することで、どこを優先的に重要な場と抽出すれば良いかわからなくなることが想定される。このような状況に対して、解析者自らが設定した条件に基づき、優先すべき場所を客観的に抽出する手法が次に示す相補性解析である。

(2) 相補性解析

先に示した個々の重要性の指標を用いて、重要な場を抽出することには問題点もある。例えば、「種数の多いところ」を選択する指標では重要な種が多数出現する環境が選択される一方で、洞窟や熱水噴出孔に代表される特殊な環境を利用する、少数ではあるが重要な種の生息の場は選択されない可能性が高い(Ferrier and Wintle 2009)。また、複数の重要性を踏まえて重要な場を抽出しようとする、用いる指標が多くなり、視覚的に客観性をもって選択することが困難になりやすい。

⁶里山インデックス：日本全国を 6km メッシュに区切り、都市域以外のメッシュの中で 36 のグリッドで一つでも農地のグリッドが存在するメッシュに対して、土地利用の多様性をシンプソンの多様度指数によって示した指数。

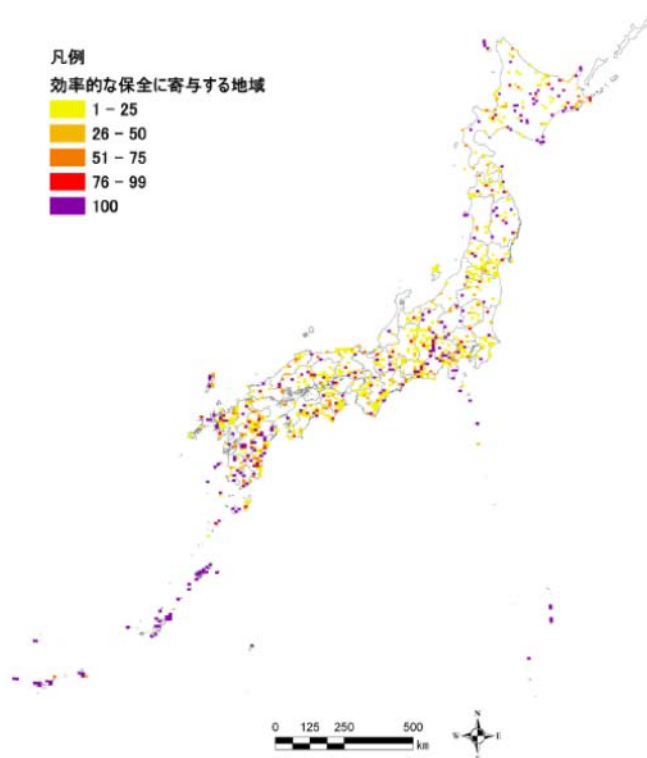
そこで対象地域の中で様々な重要性に関わる項目を満足させることのできる最小限の範囲を抽出する解析的な手法が考案されてきている。

これらの手法は、新たに保護区域を設ける場合に、設定のために必要と考える条件を設定し、条件に即した場を抽出する手法である。わが国では相補性解析（ボックス 3-9 参照）と総称され、Marxan、ZONATION といったプログラムを用いて重要な場の抽出に利用され始めている。

環境省では、相補性解析を用い重要な場の抽出（図 3-2 1）や Marxan を用いて重要海域の抽出を試みている。相補性解析には面的に把握できている様々なデータが必要となる場合が多いこと、その適切な使い方にはある程度の経験が必要であることから、活用可能な条件が揃っている場合には検討してみるのも良い。

実際に相補性解析を実施する場合、例えば対象の種が出てくる植生や環境に代表させて重要性を扱うことで、偶然に左右されやすい種の確認位置等による影響を受けにくい解析を行うような工夫が必要である。

また、得られた結果に対しては、どのような仮定や目標に基づいて得られたものかを、図中に表記し、その後にだれが見てもその考え方を再現できるようにしておく。結果の透明性を確保するため、設定条件を全て明示することが必要である。



（我が国の絶滅のおそれのある野生生物の保全に関する点検会議 2012）

図 3-21 相補性ベース・アプローチによる重要な場の抽出例

ここではレッドリスト掲載の 1219 種の維管束植物を優先的に保護すべき場所(2 次メッシュ)を、相補性解析を 100 回繰り返し、選定された回数で示した。



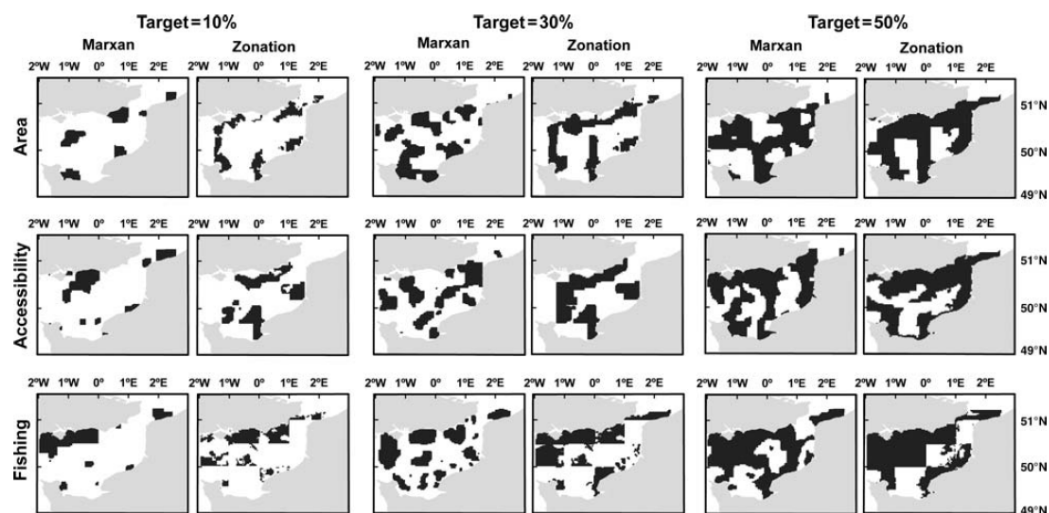
ボックス 3-9

相補性解析(Complementary Analysis)について

相補性解析は、対象となる全種の分布データを使用し、種の組成が重ならない（相補性の高い）区画のセットを選ぶことで「全種を1箇所以上で保全する」といった保全目標を、できるだけ少ないコストで達成するための方法である。例えば、以下の出現に対して「全種を最低1箇所で保全する」という目標の場合、区画 A がすでに保全地域として選択されている場合、種数のみに注目すれば区画 C よりも種数が多い区画 B が選択されるが、相補性解析においては、区画 A との種の重なりが少ない（相補性の高い）区画 C が選択される。その結果、保全対象区画としては区画 A と区画 C が選択される。このような手順で、対象種ごとに最低保全すべき任意の区画数の目標を立て、その目標からできるだけ少ない総区画数で実現できる区画セットを特定するのが相補性解析である（環境省 2012）。

区画 A	種 1	種 2	種 3	種 4		
区画 B	種 1	種 2		種 4		
区画 C					種 5	種 6

Marxan, Zonation, C-Plan 等、様々なプログラムがあり、それぞれの特徴があり、手法によっても、目標によっても選定される範囲が異なることから、重要な場の選定の考え方に応じて、適切な選定を行う必要がある。



Delavenne ら(2012)より

図 3-22 Marxan と Zonation の比較 例

Zonation は、分析対象地域全体から、例えば種の保全等に最も貢献度の低いセルから順に除去することにより、地域内における保全優先地域をランキングする手法である。除去の順序によって種の保全上の各セルの重要性が特定され、最後まで残ったエリアが最も重要な保全対象地となる。設定した条件が同じであれば、同じ場所が選定される。これに対し、Marxan は条件に合う場をランダムに抽出し、選定箇所を抽出確率で表現する。このように異なる考え方で優先箇所の選定を行うため、選ばれる範囲が二つの手法により異なる場合がある。



ボックス 3-9 (続き)

本手法では、「設定する範囲によって、得られる抽出結果が大きく異なる」ことに留意する必要がある。例えば、都市から山岳地域にかけた広範な生態系を含む範囲で、保全すべき場を抽出することを目標に解析すると、結果として抽出される場の多くは元来生物多様性に富む山岳地域に集中する可能性が高い。その結果、都市部に残された鎮守の森のような「都心部では特に重視すべき場」や山岳地域以外に棲む種の生息の場は抽出できないかもしれない。このように「地域で重視すべき場」を抽出するには、それぞれにふさわしい範囲を適切に設定することが重要である。

また、相補性解析に関する多くのツールでは社会経済的な場の評価を含む場合がほとんどであり、社会経済評価を含まない我が国の環境影響評価で適用する場合には、社会経済的な要素を加えずに解析を実施し、生態学的な側面から評価していることに留意する必要がある。

3.4 推定した結果を確かめる

地域の重要な場のリストや平面図が全国的に網羅されてはいないため、配慮書手続の段階で、事業者自らが地域の重要な場を推定することが多くなるものと考えられる。

このように推定した結果を机上で検証することはできないため、基本的には地元の有識者や現地踏査によって推定結果を確認するしかない。

また、解析的手法により選ばれた場所は、データが網羅できていれば、設定した重視すべき条件に依存するため、解析前にも設定した条件の妥当性について有識者に相談しておくことが望ましい。

3.5 予測と評価

3.4までで地域の重要な場が推定されれば、「第2節動物、植物の生息場所の推定 2.5 予測・評価」で示したように、事業による重大な影響の有無及び地域特性と事業特性との関係から予測することになる。不確実性の把握、明示することも同様に重要である。

なお、法令等の指定はないが地域により重要な場として選定された地域が大きく改変されると予測された場合、「法令等の指定はないから重大な影響ではない」と考えるのではなく、3.3.2で示したように「地域の特性に応じて重要な場を抽出する視点」を適切に設定したうえで抽出された場であれば、「重要な影響」と考えることは言うまでもない。

これまでに示したような手法を活用することで、表 3-13 に示すような予測結果が得られる。

表 3-13 予測結果のアウトプット・イメージ

区 分		予測評価項目	複 数 案			備考(用いた手法)
			A	B	C	
生態系	環境保全の観点から法令等によって指定された地域	〇〇県立自然公園(普通地域)改変面積(ha)	0	4	10	〇〇県の自然(CDR版)
		鳥獣保護区(特別地域)の改変面積	0	2	6	〇〇県の自然(CDR版)
	環境影響を受けやすい地域	〇△ノ湿地の改変面積(m2)	0	0	400	■町誌による記載
		◇付近の湧水群の改変率	0	100	0	市役所HP
	法令等の指定はないが地域により重要な場として選定すべき地域	生物多様性地図掲載地の改変面積(ha)	10	17	25	〇〇市のかげがえのない環境
		物理環境から推定した地域に残された重要なまとまりの場の改変面積(ha)	4	2	0	植生図(〇〇)、〇〇1/25000地形図
		相補性解析により抽出された地域の重要な自然環境のまとまりの場メッシュと計画との重	17	25	36	ZONATIONによる抽出

4節 ハビタットや生態系の連続性等を推定する

ここでは対象とした種のハビタットあるいは対象とした生態系が連続、連結している状態を総称して生態系ネットワークと称することとし、これらのネットワークを推定する手法について示す(ボックス 3-8)。

(なお、対象としたハビタットや生態系が物理的につながっている状態を「連続性(continuity)」と称し、対象としたハビタットあるいは生態系以外の空間を一時的に利用することで、同一のハビタットあるいは生態系間を対象とする生物等が移動可能である状態を「連結性(connectivity)」と称することとする)。

4.1 推定の対象

環境影響評価、特に配慮書手続の中で、すべての生態系ネットワークに対する影響予測を実施することは困難である。このため、事業計画の実施に伴い生態系ネットワークの連続性等の分断によって重大な影響が生じることが想定される対象を選定することが望ましい。例えば、重要種に関しては、種が存続していくために、例えば繁殖地と通常的生活圏が異なる環境を利用することが必要な種などを対象とすることも考えられる(ボックス 3-8 参照)。また、生態系ネットワークの連結性の低下は、理論的、経験的な研究によりある閾値を下回ると急激に進行することが示されてきた(Turner *et al.* 2001)。この閾値を様々なケースに対して一般化して示すことはできないが、地域を構成する主要な生態系に対して、複数案各案による連続性の低下の程度とともに、連結性の変化を予測し、複数案の中で連結性が急激に変化する案による影響について特に注意すべきである。



ボックス 3-10

生態系ネットワークへの影響を予測することの重要性

生物多様性国家戦略 2012-2020 の中では、野生生物をその生息場所の中で保全していくことを基本としつつ、各種法令等に基づく保全地域の指定や生息場所適切な管理、さらに野生生物の生息場所を連続して確保するなど生態系のネットワークにも考慮して生物多様性の保全ができるよう努めるとしている。また、同国家戦略中の国土空間的施策の冒頭には、生態系ネットワークが掲げられており、すでに存在している生態系ネットワークの保全を十分に実施していくことは当然のこととして、事業による重大な影響が生じないかという観点から環境影響評価を行うことは重要である(ボックス 1-1 も参照)。

このように生物多様性の保全の面から生態系ネットワークが重視されるのは、生活史を全うするために異なる複数の生態系が必要な種が存在することが一つの理由である。例えばアユは、河川域で産卵し、孵化した稚仔魚は河川を下り海域で越冬する。こうした種では、堰等により河川域と海域との連続性等が分断されることで個体群の存続に関わる重大な影響となる可能性がある。

また、このような景観補完だけでなく、種の分散(dispersal)の源となるソース(source)個体群から個体の掃き溜めとなるシンク(sink)個体群への分散、あるいは病気の蔓延によるソース個体群の消滅をシンク個体群からの分散により復活させるといった種の分布域の維持拡大の面からも重要である。

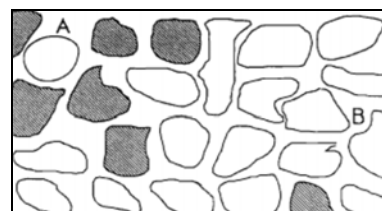
生態系については、例えば道路建設などによりニホンザルやニホンジカの遊動域である森林域が二つに分割され

れば、遊動域が一方に集中し、食物量の低下に伴う植物の過食と植生の劣化といった影響を生じるかもしれない。また、物質、エネルギーのやり取りという面からも連続性等の維持は重要である。

ところで、これまでの事業アセスでは、生態系への影響を、上位性、典型性、特殊性のほか、「移動性」のような観点を加えて予測評価を実施している場合があるものの、検討範囲は対象事業実施区域周辺に限られており、より広域の生態系ネットワークに対する影響予測を実施した例はほとんど無かった。

一方で、改正された環境影響評価法の下で実施される配慮書手続では、方法書以降の手続よりも広い範囲を対象としていることから、これまでに扱うことのできなかつた広域の生態系ネットワークに対する影響予測を実施することが可能となった。

現行の環境影響評価法において生態系ネットワークは具体的に明示された項目にはなっていないが、方法書以降で取り扱うことが難しくなることを考えれば、配慮書手続の段階で生態系ネットワークへの影響を予測しておくことは重要である。



景観補完の概念図

2つのハビタット(斜線部と白抜き)に、ある種にとっては相互に補完できない資源(例えば餌や営巣の場)が存在するため、これらのハビタットの両方を生存のために必要とすることを景観補完という。上図のA付近では互いに近隣に両ハビタットが存在するため、B付近よりも多くの個体が生息することが想定される。(Dunning *et al.* 1992)

4.2 推定の流れ

生態系ネットワークの推定の流れを以下に示した（図 3-23）

（1）情報の収集整理、データの信頼性の確認

推定し地図化した重要な動物、植物のハビタット、重要な自然環境のまよりの場のほかに、範囲内の自然環境の情報（植生、地形、地質等）を整理するとともに、生物多様性地域戦略や環境基本計画等に掲載された生態系ネットワーク図を整理し、地図化する（第2章2節参照）。

得られた情報に関してはその信頼性について確認しておく（第3章5節参照）。

（2）地域の生態系ネットワークの推定

既往の情報を整理したのち、地域によって示された生態系ネットワーク図などを活用するとともに、これに類する図等の存在の有無に関わらず、地域で認識されていない重要な生態系ネットワークが存在することも想定されることから、以下に示す手法等を用いて検討することが必要である。

対象地域の地域特性を考慮して、対象とすべき生態系ネットワークの抽出の視点を定め、推定する。推定の手法としては、物理データ等に基づく経験的な推定が主となるが、解析的な手法を用いることも検討する。

（3）推定結果の検証

推定した生態系ネットワークについては、地域の自然環境に詳しい有識者にヒアリングを実施し、推定の妥当性について確認することが望ましい。重要な影響が想定されるような場合等には、必要に応じて現地踏査を実施し、確認することも考えられる。

（4）予測・評価の実施

生態系ネットワークにおける場の重要性の程度、地域における分布状況と事業の実施が想定される範囲との重なる位置、程度等から、事業による重大な影響の有無を予測評価する。

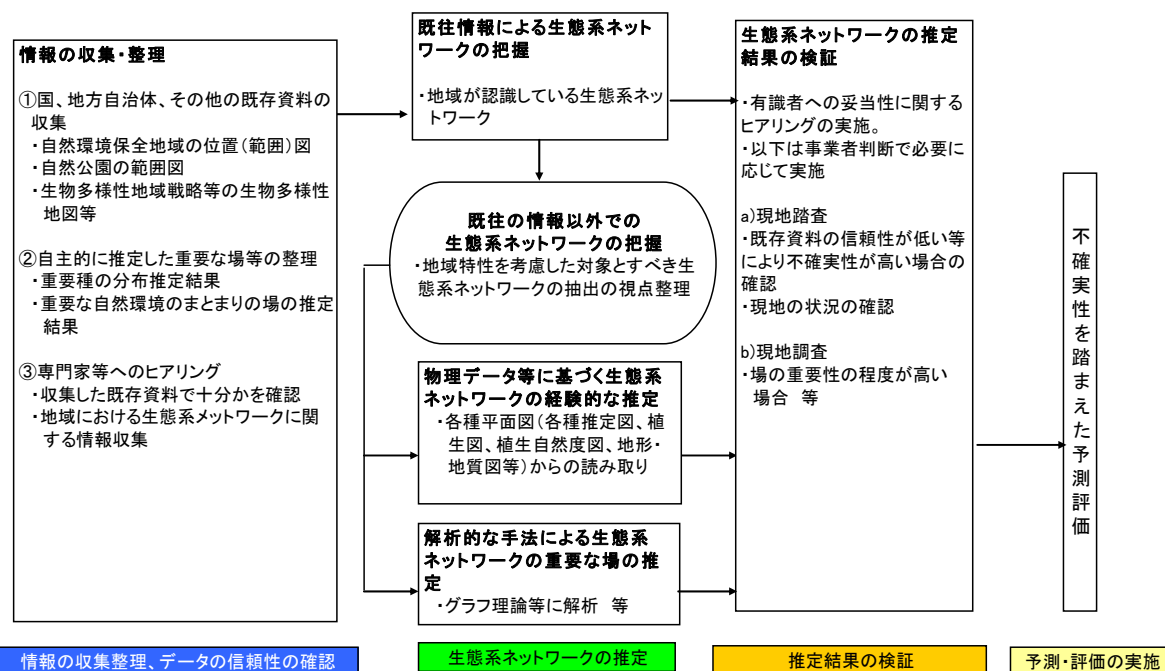
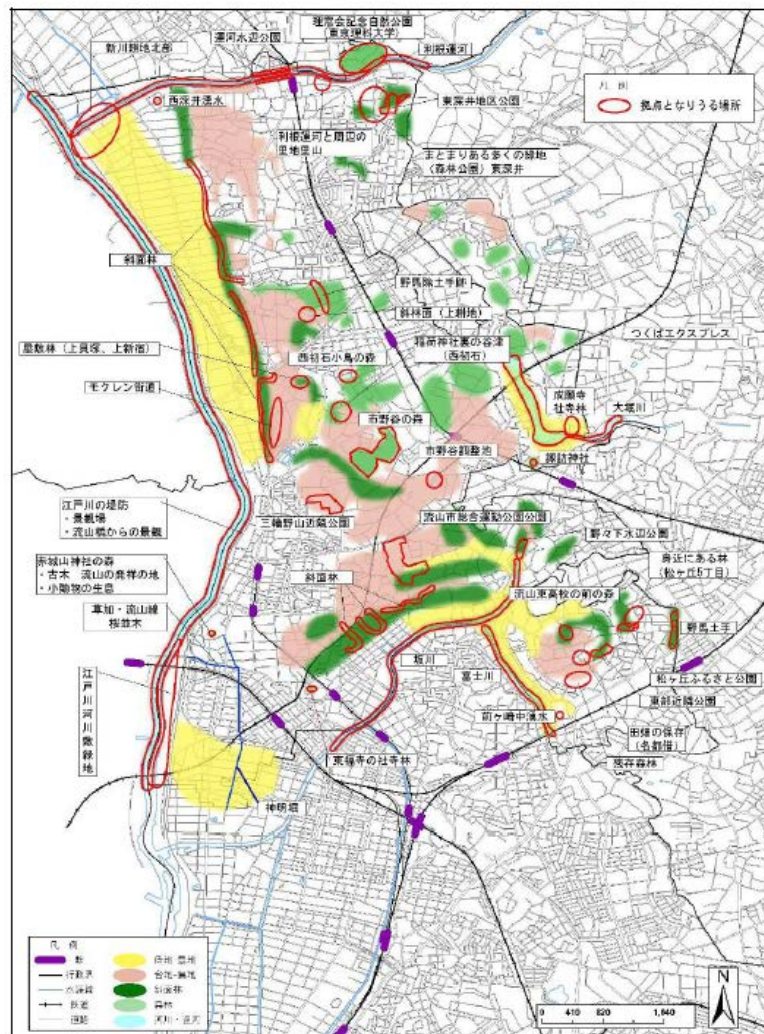


図 3-23 重要な場の推定の流れ(例)

4.3 推定の手法

4.3.1 既往の生態系ネットワーク図の活用

「第Ⅲ章 2. 既往の生物多様性関連の地図を活用する」で整理したように、地域の環境計画関連の資料において生態系ネットワークを示している場合もある。同時に専門家への聞き取りを行うなど、これら地域の認識を把握したうえで、更なる解析を進めることが望ましい。



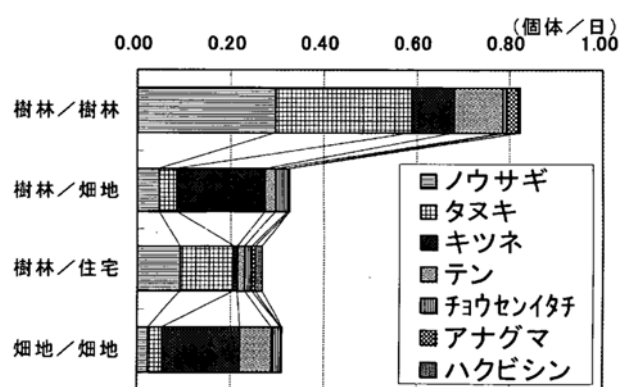
備考) 上図は既存資料等を参考に、現時点で抽出される場所です。本戦略の進行政管理において定期的な見直しを行います。

図 3-24 既往のネットワーク図の例(流山市)

4.3.2 物理データ等に基づく生態系ネットワークの経験的な推定

生態系ネットワークが示されていない場合でも、生態系ネットワークがないのではなく、地域で検討中あるいは認識されていない可能性がある。また、既往のネットワーク図等があったとしても、これら以外に地域でも認識していないが、地域の重要な生態系ネットワークの場が存在することも考えられることから、重要種や地域の重要な自然環境のまよりの場の分布状況等から、対象とすべき生態系ネットワークを抽出し、検討することが望ましい。

注目すべき対象のネットワークが明確になれば、対象地域や近傍地域での研究実施状況など、例えば対象とする種のロードキルが発生しやすい地形条件に関する研究事例(図 3-25)などに留意し、活用可能な情報に基づいて推定することが考えられる。

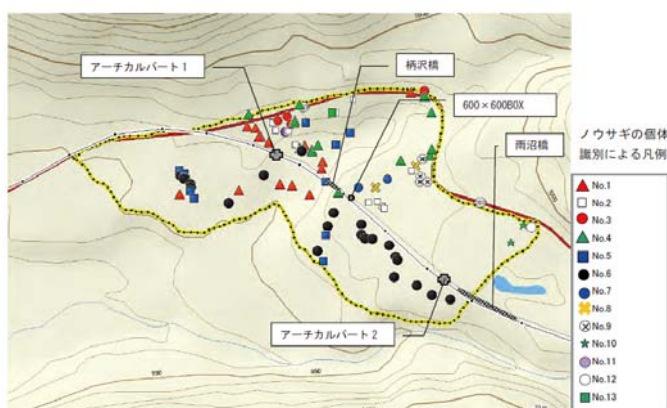


国総研資料 No.152(2004)

図 3-25 既往の研究事例から重大なネットワーク分断箇所の推定

縦軸は道路を挟む両側の環境の組み合わせを示している。例えば、ノウサギでは両側が樹林地である箇所でロードキルが多く、キツネは樹林地と畑の箇所で多くなっている。どこで道路事業による影響の大小と種特性を推察することができる。(図題→ロードキル発生頻度の例)

当該地域においてテレメトリー調査や遺伝的交流の状況が調べられている場合には(例として、図 3-26 の様に)、対象地域でどのような連続性が存在しているのかを、対象地域の地形、植生図等の平面情報とともに考慮することは可能である。



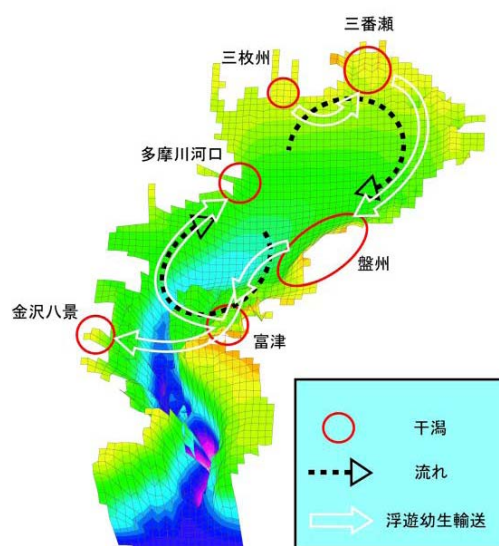
(松江、園田 2010)

図 3-26 DNA 分析によるノウサギ個体の道路両側の移動状況

ノウサギの個体ごとの分布域を糞の DNA 分析によって明らかにした事例。個体 No.1 や No.5 が道路を挟み両側を利用していることが分かる。本事例ではアーチカルバートの設置により、連続性が確保されたことを示す根拠となっている。対象事業による分断の影響程度を評価する際に有効な手法となりえる。

沿岸域の生態系には、ヨシ原－干潟－藻場－浅場の岸沖方向の連続性と、空間的に離れた干潟相互の湾スケールの連続性が判明している場合もある（図 3-27）。こうしたネットワークから、それぞれの集団間の結びつきや移動・回遊等の動態を念頭において、藻場・干潟、魚礁等の複合的な生息環境の評価を行うことも可能である。

なお、国土交通省港湾局・環境省自然環境局は共同で、「干潟ネットワークの再生に向けて－東京湾の干潟等の生態系再生研究会報告書，国立印刷局(2004)」を作成し、東京湾におけるネットワークを解説している。また、古川（2010）は内湾域の生態系再生・管理に関するデータ活用を論じていることから参照されたい。



（田中 2003）

図 3-27 干潟ネットワークの概念図(東京湾)

沿岸域の水生生物の多くは浮遊幼生期を有しており、産卵場所と着底場所が必ずしも一致していないため、生態系の維持において干潟ネットワークは重要な役割を果たしていると考えられる。

4.3.3 解析的な手法に基づく生態系ネットワークの推定

連続性等を対象地域の植生や地形といった構造的な面から把握する手法であり、近年のGISの普及、国土数値情報などのデータ整備に伴い、生物データが無くとも解析可能である。生物の移動能力も考慮する機能的連続性等については、対象種の移動能力が知られており、分断によって重大な影響が生じる可能性がある場合などに実施する。

ハビタットや生態系の連続性等に対する情報は、一般的に構造的、機能的、実測による連続性等の把握の順に、より多くの知見が得られるものの、これらを把握するために必要となるデータ量も増大する (Calabrese & Fagan, 2004)。一方で、我が国では生物各種の移動能力に関する研究はあまり進んでいないことから、機能的連続性等まで検討することは、配慮書手続の段階では困難な場合も多いものと考えられる。しかしながら、機能的な連続性等を把握する手法を用いて構造的な連続性等を検討することも、配慮書手続の段階では、重大な影響を把握する手法として有用と考えられる (バッファの距離を順次変更することで、非常に重要な場 (ノード) があきらかとなる)。

従って、以降では機能的な連続性等を把握する手法も含めて整理した。

なお、実測による連続性等の把握手法に関しては、方法書以降の手続でも実施されることが稀であることから、ここでは取り扱わない。

表 3-14 ネットワーク解析手法の例

手法	連続性の解析タイプ	手法の特徴	地理的データ	種データ	長所	短所
最近隣法	構造 (a) 分散能力は考慮せずに、配置、距離等の条件から連結性を評価	・対象としているパッチに最も近いパッチのみを扱っており、その他の連続性のあるパッチは無視している。 ・多くの限界があるにも関わらず最も使用されている。	・最近隣のパッチ間の距離	パッチでの出現の有無	計算が単純である。	他の複雑な指標よりサンプル数の違いに敏感であり、連続性の指標としても劣る。
グラフ理論による手法	ポテンシャル (b)	対象生物の分散能力を勘案して、すべてのパッチ間の潜在的な連結性を設定する。	パッチの位置	分散能力	・景観レベルの連結性に対して最も貢献しているパッチは何か等を抽出することができる。	・生物の分散能力は不明であることが多い。
Buffer radius	対象生物の移動能力を考慮して潜在的な連結性を評価	あるパッチから一定の距離のバッファを発生させ、その中に含まれるすべてのパッチでの同種の出現状況から連結性を評価する。	パッチの位置、面積	分散能力、パッチでの出現の有無	・計算が単純である。 (移動能力が分からない場合には、バッファとする距離を変化させ、算出することも可能)	・生物の分散能力は不明であることが多い。
移出入率、分散率	実測 (c) 実際の移動の有無から評価	マーキングした個体の再捕獲、テレメトリー等により、実際の移動を記録する。	適宜	移動経路、移動時の位置、移動能力	・移動に関する記録が確かである。	・実際の移動の把握は、時間、費用がかかる。 ・一般論で示すには多数のデータが必要 ・各個体の移動の意味するところの把握が困難

(Calabrese & Fagan 2004 を基に作成)

4.3.4 構造的な連結性に関わる手法

構造的な連結性に関わる手法は、景観上のパッチのサイズ、形、配置等の物理的な特徴をもとにした構造的指標で判断する手法である。

本手法は生物の分散に関するデータを含めず、景観の物理条件から求めることから、GIS により容易に算定することが可能である。

<構造的な連結性の把握の例>

最近隣法（図 3-28）

各パッチから最も近いパッチまでの距離を算出し、平均値を算出し、連続性の指標とする。パッチの形状やパッチの数によって影響を受けやすい。

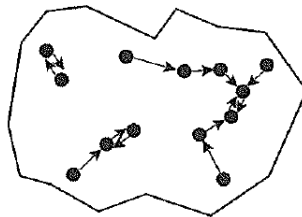


図 3-28 最も近いパッチまでの距離

4.3.5 機能的な連結性に関わる手法

機能的な連結性に関わる手法は、対象種の移動能力や生活史との関係等を考慮する手法であるが、移動距離や生活史自体が分かっていない種も多い。このため、配慮書手続において機能的な連結性に関わる手法を、種の移動能力を考慮して用いる場合は少ないものと考えられるが、対象種の重要性が非常に高い場合などでは、対象種の移動能力を表 3-15 のような事例を参照しながら安全サイドで設定し、構造的な連結性の面からでも重大な影響の有無を予測するといった活用は考えられる。

表 3-15 様々な分類群の移動能力の整理事例

分類群	サイズ	移動	該当種	地区レベル (1/2,500~1/5,000)	都市域レベル (1/10,000~1/25,000)	広域レベル (1/50,000~)
				100m	1km	10km
哺乳類	中型	陸上(歩行)	タヌキ、イタチなど	----->	----->	----->
	小型	陸上(歩行)	ネズミ類(アカネズミなど)	----->	----->	----->
	小型	飛翔	コウモリ類(アブラコウモリ、ユビナガコウモリなど)	----->	----->	----->
鳥類	小型	地中	モグラ類(アズマモグラなど)	----->	----->	----->
	大~中型	飛翔	オオタカ、カワウなど	----->	----->	----->
	小型	飛翔	シジュウカラなど	----->	----->	----->
爬虫類	-	陸上(地道)	トカゲ類(トカゲ、カナヘビなど)	----->	----->	----->
	-	陸上(地道)	ヘビ類(シマヘビ、アオダイショウなど)	不明	不明	不明
	-	陸上(地道)・水中	カメ類(ニホンシガメなど)	----->	----->	----->
両生類	大型	陸上(地道)	カエル類(アズマヒキガエルなど)	----->	----->	----->
	中~小型	陸上(地道)	カエル類(ニホンアカガエル、シュレーゲルアオガエルなど)	----->	----->	----->
	小型	陸上(地道)	サンショウウオ類(トウキョウサンショウウオなど)	----->	----->	----->
昆虫類	-	飛翔(強)	バッタ類(カワラバッタ、トノサマバッタなど)	----->	----->	----->
	-	飛翔(弱)	バッタ類(クツワムシ、ヒガシキリギリスなど)	----->	----->	----->
	-	飛翔	セミ類(クマゼミ、ミンミンゼミなど)	----->	----->	----->
	-	飛翔	トンボ類(シオカラトンボ、アジイトトンボなど)	----->	----->	----->
	-	飛翔(強)	トンボ類(オニヤンマなど)	----->	----->	----->
	-	飛翔	チョウ類(アゲハチョウなど)	----->	----->	----->
クモ類	-	飛翔	アシナガクモなど	----->	----->	----->
	-	陸上	ジグモなど	不明	不明	不明
陸生貝類	-	陸上	有肺類(ミズジマイマイ、ウスカワマイマイなど)	----->	----->	----->

-----> 移動分散の直線距離の最大値

● 移動分散の直線距離の平均値(最も大きな数値を得た事例を明示。)

徳江ら(2011)

＜機能的連結性の手法の例＞

i. ネットワークを使った指標

当該指標の例としては最短経路長（任意の2つのパッチの最も短い距離の平均値）が挙げられる。

例えば、図 3-29 では、1 から 6 まで行く経路は、1→3→6、1→3→5→6、1→3→5→2→4→6 があり、最も短い 1→3→6 の距離を測る。同様な作業を 1 以外のパッチにも行い、各パッチから任意の別のパッチへ行き際の最短距離の平均値を算出して、指数とするものである。事業実施前後の値の変化を複数案で比較することで、相対的な連続性の変化の大きさが判断できる。下図のように単純な場合には、手計算も可能であるが、図 3-32 のような場合、コンピューターに頼るしかない。

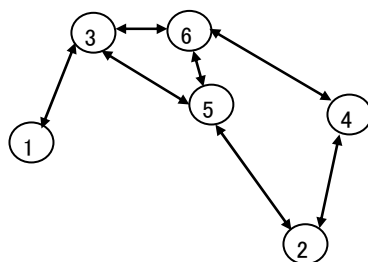


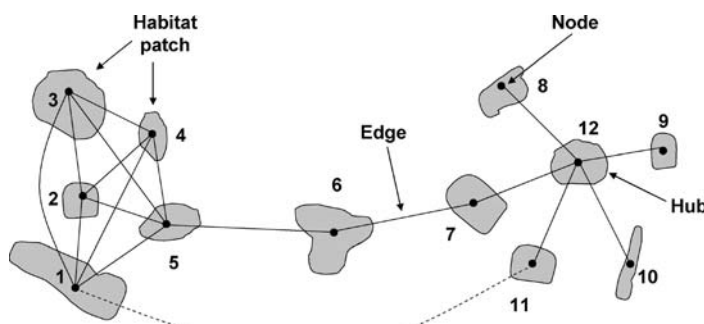
図 3-29 最短経路長による解析事例

ii. グラフ理論を用いた手法

パッチ間のすべての組み合わせについて、対象とする種の分散能力を考慮し、パッチ間の接続可能性を設定する生息パッチの消失や分散のためのコリドーをシミュレートするグラフ操作によって、ランドスケープレベルでのパッチの連続性に貢献している度合いから各パッチをランク付けすることができる (Keitt *et al.* 1997)。

このようにグラフ理論からのアプローチは、事業者がランドスケープの接続性に重要なパッチはどのパッチなのかを判断可能にする (図 3-31 グラフ理論による重要パッチの抽出では矢印のパッチが全体の連続性にとって重要であることが示されている)。

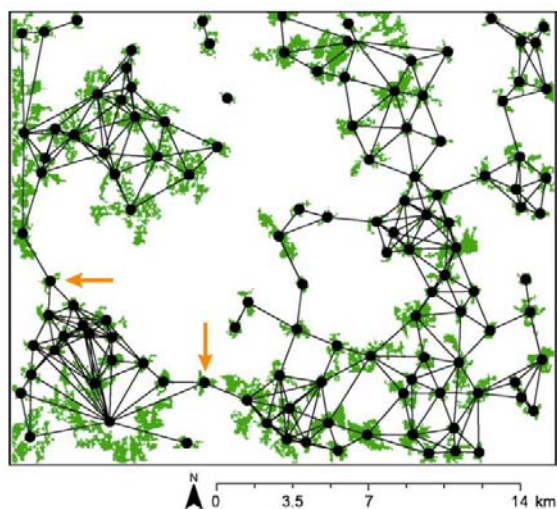
グラフ理論は空間スケールに関わりなく、対象に応じて計算可能であり (図 3-32)、フリーのソフトウェアもある。



Minor & Urban (2008)

図 3-30 距離 L でパッチの中央が結ばれるネットワーク

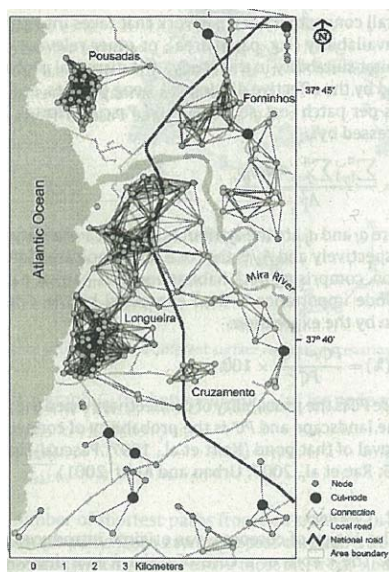
1～12 のパッチのうち、No.6 が非常に重要であることを示している。



(Chetkiewicz ら2006)

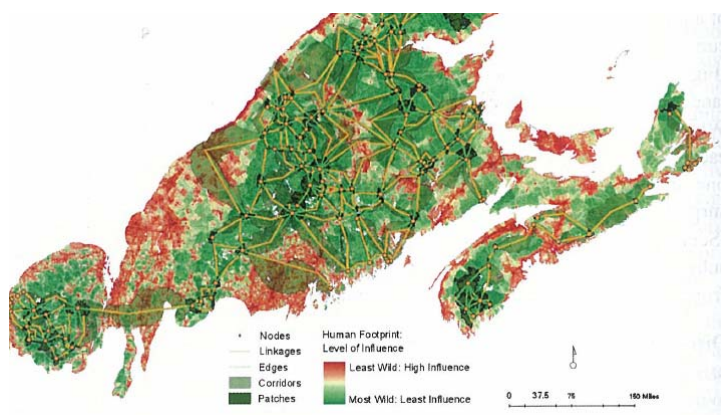
図 3-31 グラフ理論による重要パッチの抽出

モリツグミ Wood thrush の分散距離の閾値を 2.5km と設定した場合のノース・キャロライナ州の森林ネットワークを示している。矢印は、一つのパッチが消滅することで一つのネットワークが複数のネットワークになってしまうパッチの位置を示している。



Pereira ら(2011)

カメに対する池沼間のネットワーク



Baldwin ら(2010)

北アパラチアでの景観ネットワーク

図 3-32 異なる対象スケールでのグラフ理論による解析事例

左図は約 6×12km の範囲、右図は 850km×450km の範囲におけるネットワークをグラフ理論で示しており、様々なスケールに対して解析が可能である。

4.3.6 手法に関わる留意事項

パッチの形状、大きさ

構造的指標のひとつである最近接パッチ間距離はパッチ形状や大きさのばらつきがある場合には連続性の評価能力が低下するといわれている。

サンプル数

構造的指標である最近接パッチ間距離はサンプル数に影響を受けやすいが、機能的指標のひとつであるグラフ理論による手法は、パッチが推定できていればサンプル数に関係なく解析可能である。

タクサの違いによる対象範囲の違い

重要性の高い種のハビタットの連続性に関しては、対象種の移動能力、ハビタットの連続性を考慮し種毎に考えることが望ましい。

指標の性質

用いる指標によっては図 3-33 のように、同じ値でも実際の状況は大きく異なることがあることから、指標の持つ性質について、使用前に十分に把握しておく必要がある。

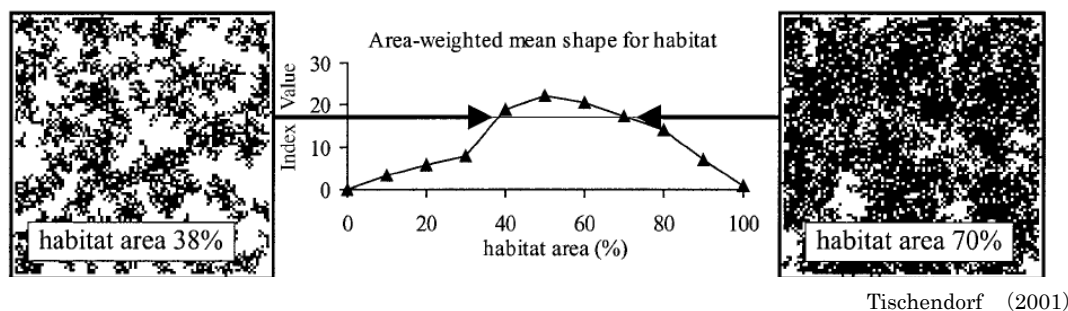


図 3-33 景観指標の1種(面積加重平均)による指標性の留意点

明らかに右図のほうが連続性は高いと判断できるが、指数では同じ値になっており、連続性の指標にはそぐわない。

4.4 推定した結果を確かめる

地域の重要なネットワークは対象とする空間スケールの問題から、地元でも認識されていることは少ないと考えられる。また、推定したネットワークの適性度合いを検証することは、配慮書手続段階では困難である。

このため、得られた結果に関しては地域の自然に詳しい有識者に聞き取りを行い、得られた結果の妥当性についてヒアリングを行うことが望ましい。

4.5 予測と評価

先に示したネットワークの現状の推定方法から、予測結果はネットワークのつながりが線などで示される連続性がどこで、何箇所が影響を受けるかという結果で示される場合と、景観的に全体の連結性が現状と比べどのくらい低下するのかという結果で示される場合に分けられる。

これまでに示したような手法を活用することで、表 3-16 に示すような予測結果が得られる。

表 3-16 予測結果のアウトプット・イメージ

区 分			予測評価項目	複数案			備考(用いた手法)
				A	B	C	
生態系ネットワーク	連続性	オオムラサキ	生息パッチの分断箇所数	1	3	5	上記推定範囲と事業計画の重ね合わせ
			生息パッチの林内部面積の減少面積(ha)	0.5	2	10	GISによる計算
		カトリヤンマ	ネットワークの観点から重要なハビタットの消滅箇所数	2	0	1	グラフ理論による
	連結性	落葉広葉樹林	森林パッチ数	40	53	64	GISによる計算
			森林パッチ間距離合計(m)	2070	2415	3382	
			森林パッチ平均距離(m)	52	46	53	
			最近隣まで50m以上のパッチ	14	17	24	
			100m以上	3	2	6	
			300m以上	0	0	0	
		:	:				

5節 データの信頼性と取扱い

先に示したデータベースや生物多様性地図は、事業者自らが目的に応じて収集した情報ではないことから、データを取り扱う前に、その精度確認や精度確保が重要である。

なお、事業者が過去に環境影響評価関連調査を実施し、未公表調査結果を利用する場合においても安易に使用するのではなく、その有効性・客観性を専門家に改めて確認したうえで使用すべきである。

5.1 データの信頼性

5.1.1 確認対象の信頼性

対象地域の中にどのようなデータが存在するかによって、重要な場を抽出する手法や得られる結果の不確実性の度合いが異なってくる。

まずは入手したデータがどのようにして記録されたものなのかを把握し、データの信頼性を確認することが重要である（図 3-34）。

たとえば、生死に関わらず標本が残されていれば、その存在は確実である。一方で、痕跡記録は、痕跡だけによる種の判別が難しい場合もあり、種の確認の信頼性が低い場合も多くなると考えられる。痕跡記録は後の再確認が不可能であることからその信頼性は低いものとなる。

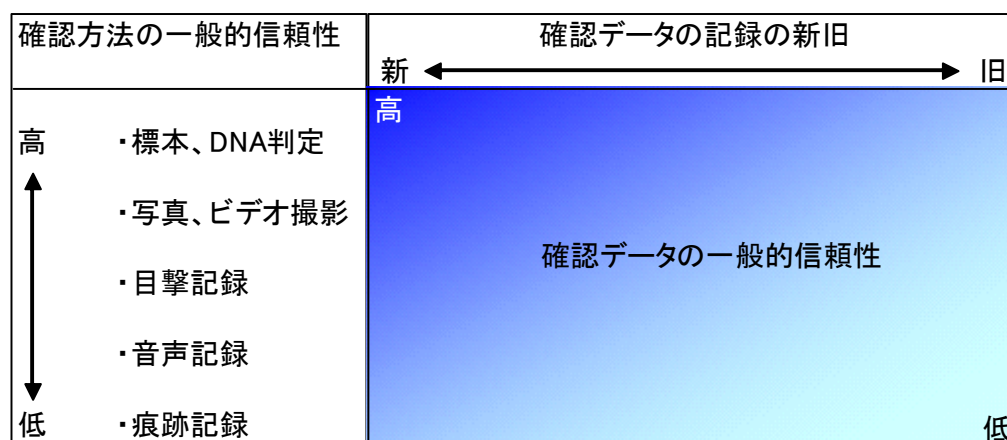


図 3-34 データの信頼性

注：人による同定能力の差異に起因する確認結果の信頼性の低下までは含めていない。

（McKelvey ら 2008 を参考に作成）

また、年月が経過することで、過去に確認した地域からはすでに絶滅し、分布範囲が変化している可能性がある。分類体系が変化し再同定を行う際に、標本であれば再確認可能であるが、標本以外には識別形質が不明であるため、確認状況の信頼性は時間とともに低下するものと考えられる。更に過去のデータを統合する際に、紙媒体では書き写しのミス、電子データではデータの統合ミス等による信頼性の低下も考えられる。

データの信頼性に加え、どんな時期に取得したデータなのかを把握することも重要である。例えば、ある種の確認がその種の繁殖期以外に限られているのであれば、分布域としての可能性は考えられるが、実際の繁殖地と判断することはより困難である。海域では大きな季節消長を伴う生物現象も多く、

データを取った時間や海域、水深等の把握が重要となる。調査手法等が同一で新旧の比較が可能な場合には確認頻度の変動の把握に用いることも可能である。

5.1.2 確認位置の信頼性

既存のデータの確認対象の信頼性ととも、その確認位置の信頼性の程度についても十分に留意すべきである。

例えば、緯度経度による位置情報について、緯度・経度が整数レベルか、あるいは小数点以下何桁まで把握されているのかによって、位置の精度が大きく異なる。また、地名による記録でも市町村レベルなのか、番地レベルなのかによっても位置精度が異なってくる。このように、データの活用者は位置情報の信頼性のために、位置精度がどうであったのかという情報を明示しておく必要がある。

対象範囲における確認位置を網羅するために必要なデータソースが複数に渡り、それらの位置精度が異なっている場合も想定される。このような場合でも、精度を粗いものに合わせ、対象範囲全域での位置情報を整理することで、地域における重要な自然環境のまとまりの場等が影響評価を行うために十分なスケールで相対的に特定できるかもしれない。

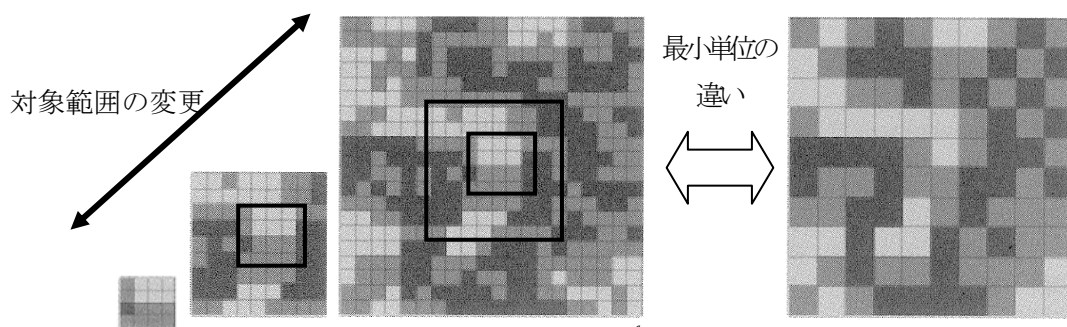
5.2 データの活用にあたっての留意点

以上のように、データの信頼性はその時の状況に応じて様々であり、その信頼性に応じて収集したデータを適切に活用することが重要である。

例えば、データの取得年が古くとも、データの信頼性が高ければ、かつてはそこにいた、そして現在も存在する可能性があるという情報として、分布状況を考えるうえで重要な情報である。また、経年的な変動状況を知るうえでも重要である。

その種の存在が確実である標本データであっても、確認数が少なければ、その種の分布状況を把握することはできない。この場合、種の分布をモデル化して推定する手法を用いることが可能なデータ数があれば、モデルによってその分布を推定することが可能となることも考えられる。データ数が少ない場合には、対象種の生息場所となりえる植生、地形、地質等の分布状況から生息場所を推定することが考えられる。

また、データの活用にあたり、配慮書手続において対象とする空間スケールに留意する必要がある（ボックス3-1も参照）。図3-35に示すように、空間上のパターンやプロセスはスケールに依存し、測定の最少単位や範囲に応じて変化する。例えば、図の左端の範囲では色の最も濃い環境が連続しているようには捉えられないが、右に移るにつれ、その連続性が明らかとなる。一方で事業計画の大きさと比較して最小単位となるメッシュサイズが細かすぎる場合、影響を評価するには複雑となり過ぎる、あるいは事業計画の大きさと比較して粗すぎる場合には影響の有無が判断できなくなるなど、影響を検討するために最適な解像度となるように得られたデータの最小単位を調整する必要がある。また、地域の重要な自然環境のまとまりの場を相対的に抽出したり、生態系ネットワークのパターンを把握したりするために、事業計画特性と地域特性に応じて適切な空間範囲を設定する必要がある。



(Turnerら 2001 をもとに改変)

図 3-35 調査対象とする範囲、最小単位の模式図

左の大きさの異なる3つの図では、対象範囲が変わることで空間パターンの捉え方が異なってくる。また、右図と同一範囲の左の図を比較すると左図の小さいメッシュ4つを統合して右図で表していることから、事業計画地と重ね合わせたときに影響程度が異なって表現される。



ボックス 3-9

データの解像度と予測結果

タンポポの確認位置を 1km メッシュで表現してしまえば、それよりも細かい位置は不明になってしまう。これを 1m のメッシュで表現すれば、誰でもそのタンポポを発見できるだろう（前者は解像度が粗く、後者は細かい）。

データを入手するデータベースの解像度によって、推定可能な状態も変わってしまう。

図では細かい解像度では同じメッシュ数で分布していたが、粗いメッシュでは分布範囲が全く異なってしまうだけでなく、影響予測を実施すると、左の場合では細メッシュ：1/9 箇所影響、粗メッシュ：3/7 箇所影響、右の場合、細メッシュ：2/9 箇所影響、粗メッシュ：2/3 箇所影響と予測されるようなことが生じるため、使うデータの解像度に十分注意する必要がある。

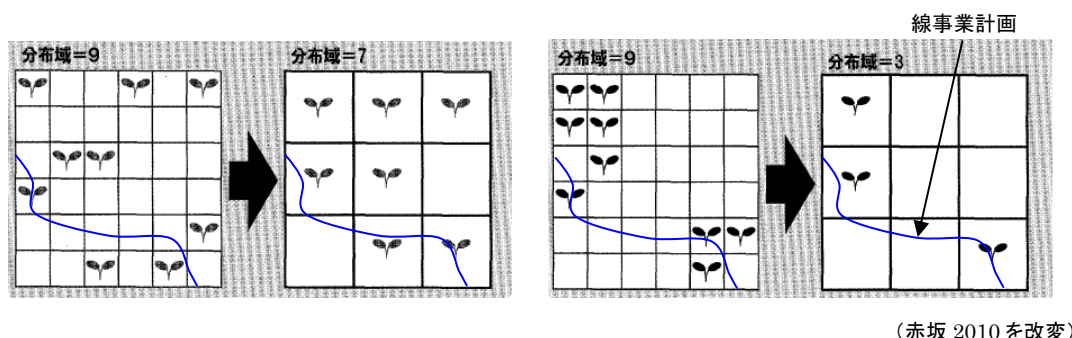


図 3-36 解像度の違いによる分布範囲の表現の違い

<空間情報に関わる範囲と粗さ>

範囲（extent） 考慮している対象地のサイズや継続時間。

粗さ（grain） あるデータセットにおいて考え得る最も詳細な空間解像度のレベル。

範囲は最小単位とは無関係に変更可能である。パターンやプロセスがスケールに依存するというのは、それらが測定の最少単位や範囲に応じて変化することを意味している。

（Turner ら 2001、Wiens1989）

総説**Marxan による効率的な保全計画：その原理と適用事例**松葉 史紗子^{1,*}・赤坂 宗光²・宮下 直¹¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科・² 東京農工大学大学院農学研究院自然環境保全学部門

Marxan for systematic conservation planning: principles and applications

Misako Matsuba^{1,*}, Munemitsu Akasaka² and Tadashi Miyashita¹¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,²Department of Environment Conservation, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

要旨：愛知目標の採択を受けて、科学的根拠に基づいた戦略的な保護地域選定の必要性が高まっている。Marxan は、生物多様性を保全する上で優先度が高い場所を効率的に選定する手法として開発されたコンピュータプログラムである。ここでは、その基本的な仕組みを解説するとともに、適用事例を紹介し、その有効性や使用上の留意点について概説した。Marxan では、利用者が設定した総コストが最小となる計画ユニットの組み合わせを相補的に選び出す。保全対象となる対象分類群は多岐に及ぶが、遺伝的多様性の保全や、土地利用を代替指標とした研究も行われている。具体的な事例としては、気候変動や土地利用の改変による影響を考慮した将来予測を保護区の選定に反映させたものや、生態系サービスとのトレードオフを評価したものを紹介した。また、保護区選定以外の事例として、再導入地や再生地、外来種駆除の優先地の選定を目的とした研究も取り上げた。保全目標や各種パラメータの設定には、生態学的な知見やデータが不可欠であるため、Marxan の有効な利用は、利用者側の見識に大きく依存している。しかし、保全目標やコストに基づいた優先保全地域の組み合わせを空間明示的に提示できるため、予算や人的資源の効率的な投資を可能にし、社会的な合意形成をより円滑に進めることにつながるツールとして、その活用がますます期待される。

キーワード：愛知目標、生物多様性保全、相補性解析、保護区、優先地選定

Abstract: Marxan is reserve selection software that was developed to identify efficient, near-optimal spatial solutions to conservation planning. Here we describe its basic mechanisms and introduce previous studies to outline the program's use and potential applications. Marxan seeks sets of planning units to achieve a given conservation goal at minimum cost based on the principle of complementarity. It uses a wide array of conservation targets, including genetic diversity and habitat types as surrogates, in addition to species. We introduce previous studies focused on reserve selection under future climate or land-use change and on evaluating priority areas by considering trade-offs between biodiversity conservation and ecosystem services. We also review research on priority areas for the reintroduction, restoration, and management of invasive species. Marxan depends on user-specified ecological and socioeconomic parameters and, therefore, may be subject to bias. Nevertheless, Marxan can suggest spatially explicit solutions based on conservation targets and given costs, facilitating the effective investment of monetary or human resources and aiding consensus among stakeholders and decision makers.

Keywords: Aichi target, biodiversity conservation, complementary analysis, protected area, reserve selection

* 〒 113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科生圏システム学専攻生物多様性科学研究室
Laboratory of Biodiversity Science, Department of Ecosystem studies, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of
Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
e-mail:matsubamisaco@es.a.u-tokyo.ac.jp 2014 年 2 月 10 日受付、2014 年 10 月 21 日受理

はじめに

急速な生物多様性の損失が懸念されているなか、2010年に開催された第10回締約国会議（COP10）では、2020年までのミッションとして、生物多様性の保護地域に関して具体的な数値目標（陸域の17%、海域の10%）を盛り込んだ愛知目標が採択された（「Convention on Biological Diversity」<https://www.cbd.int/sp/targets/default.shtml>、2015年4月20日確認）。締約国にとっては、数値目標を達成するために、緊急かつ実効力のある保全への取組み要請が高まったと言える。とりわけ、保護地域は生物多様性保全には必要不可欠な柱として、各国の国家戦略の主軸を成しており、科学的根拠に基づいた戦略的な保護地域選定の必要性が高まっている。

戦略的な保護地域の選定には、効率的な生物多様性の保全計画（Systematic conservation planning）が重要とされる（Margules and Pressey 2000）。生息地管理には、しばしば生態学的な視点はもとより、社会学的・経済学的な視点を考慮することが求められるが、これらの利害はときに相反する（Dobson et al. 1997）。また、限られた資源のもとでは、候補地のすべてを保全することは難しく、保全・管理する地域を節約的に選択する必要に迫られる（赤坂・森 2012）。

Marxan とその原理

Marxan は最小セット問題（minimum set problem）（Kirkpatrick 1983；Pressey et al. 1997）を解決し、生物多様性を保全するうえで優先度が高い場所（以下、優先保全地域と呼ぶ）を効率的に選定する手法として開発されたコンピュータプログラムである（Ardron et al. 2010）。利用者が設定した生物や生息地の特徴といった保全対象（以下、保全対象と呼ぶ）と保全目標、さらに保全する上で生じるコストに関する情報（詳細は「基本的な原理」で説明する）をもとに、最小限のコストで保全目標を達成する優先保全地域の組み合わせを相補的に選び出すことができる（Ball and Possingham 2000；Possingham et al. 2000）。優先保全地域の選定における相補性とは、他の地域で保全されていない対象生物や生息地タイプが含まれる地域を、優先的に候補地に選定していくことで、より少ないコストで保全目標を達成するという考えである（Margules and Pressey 2000）。

Marxan は、以下の式（1）で求められる総コストが最小となるような計画ユニットの組み合わせを選び出す。

ただし、Marxan では、総コストを最小化する唯一の最適な組み合わせを選択するわけではなく、最適に近い組み合わせを選び出しているという点に注意が必要である。これは、最終的に選ばれる計画ユニットの組み合わせの候補は、2のユニット数乗となるため、計画ユニット数が多くなると最適な組み合わせを1つに特定することは困難になるからである。そして保全計画を実施する際に、利害関係者の合意形成を行う上では、一意の組み合わせを提示するよりも複数の最適に近い組み合わせを提示するほうが有効であるという考え（Pressey et al. 1996）に基づいている。計画ユニットとは、保全対象地域を任意に分割して作られ、例としては集水域や土地の所有権界が挙げられる。保全対象地域は、国や地域、あるいは集水域といった比較的広いスケールを対象とすることが多く（Wilson et al. 2010）、計画ユニットの単位は、100平方メートル（Zielinski et al. 2006）から10平方キロメートル（Carvalho et al. 2010）と様々である。保全対象に関する情報は、この計画ユニット単位で用意する必要がある。

$$\text{総コスト} = \sum_{PUs} \text{Cost} + \text{BLM} \sum_{PUs} \text{Boundary} + \sum_{\text{Con Value}} \text{SPF} \times \text{Penalty} + \text{Cost Threshold Penalty}(t) \quad (1)$$

第1項は、候補地となったすべての計画ユニットを保全する際に生じるコストを示す。PUs は Planning Units の省略形で、候補地となった計画ユニットを指す。利用者はあらかじめ1つの計画ユニットあたりのコスト（Cost）を定めておく。面積や用地の取得・管理費用などがあてはまる。

第2項では、選択した計画ユニットの総周縁長（Boundary）を示し、Boundary Length Modifier（BLM）値によりその重みが調整されている。この項により、選択する計画ユニット間の分断化の程度を指定できる。BLM 値を大きくするほど、分断化へのコストが高くなり、空間的にまとまった計画ユニットが選択されるようになる。

第3項では、各保全対象の保全優先度合を指定する。Con Value は Conservation Value の省略形で、生物種や生息地タイプといった個々の保全対象を指す。利用者は、対象ごとに保全したい面積や個体数などの保全目標を設定する。選択した計画ユニットの組み合わせが、保全目標を満たす場合には、その保全対象に対するペナルティは0をとるが、満たさない場合には、1のペナルティが科される。ペナルティの大きさは保全対象ごとに Species Penalty Factor（SPF）として指定する。対象ごと

Marxan による効率的な保全計画

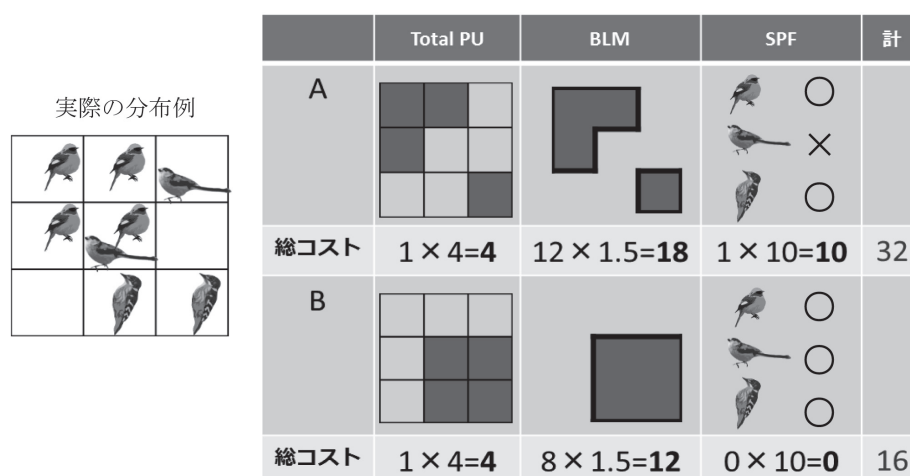


図 1. Marxan の仕組みを具体的なケースを想定して説明した図。Total PU は 1、BLM は 1.5、SPF はいずれの種も 10 とした。実際の分布例に基づき、A と B の 2 つのケースで候補地を選んだ際に生じるコストを比較した。A と B では同じ数の計画ユニットが選ばれているが、ユニットの分断化の程度やユニット内に含まれる種が異なることから、B の計画ユニットのセットのほうが総コストが低い（上図は「Marxan, Informing Conservation Decisions Globally (The University of Queensland)」の Teaching & Learning で紹介されている Online Tutorial を参考に作成した」<http://www.uq.edu.au/marxan/index.html>、2014 年 9 月 18 日確認）。

に SPF 値を変えることで、対象間の保全優先度を、選択過程に反映させることができる（図 1）。また、目標が達成されない保全対象が複数いる場合には、SPF で重み付けされた各対象のペナルティの総和が総コストに加えられる。

保全目標の設定は、Marxan による解析結果が実際の保全現場で有用なものとなりえるかを決める重要なプロセスである（Margulis and Pressey 2000；Ardrón et al. 2010）。したがって、ある種を保全対象とした場合には、健全な個体群サイズの維持に必要な保全面積等を最少存続可能個体数（Shaffer 1981）など科学的知見にもとづいて与えることが理想とされる（Ardrón et al. 2010）。そして、こうした科学的知見とともに、政策決定者や地域住民といった利害関係者による合意形成も、異なる要望や意見の衝突を避け、より実現可能性の高い政策決定をもたらす上で、重要な意味をもつ（Morin 2001；Knight et al. 2006；Reed 2008；Ardrón et al. 2010）。

第 4 項は、設定したコストの上限を超えた場合に課せられるペナルティである。BLM を除いたコストについて、利用者が上限を設けることができる。保全目標の達成のために、あまりにも高いコストが払われていないかを監視する役割を担う。コストに上限を設けたとしても Marxan は目標を達成する最小コストの組み合わせを探索するため、与えられたコストで可能な限り目標を達成

する最適化された組み合わせが得られるとは限らない点には注意が必要である。

なお、第 2 項と第 4 項は省略できる。

また、式 (1) で求められる総コストの計算は反復して実行する。これは先述の通り、Marxan は最適に近い計画ユニットの組み合わせを抽出するものであり、そのような組み合わせは必ずしも 1 組に限定されないためである。反復回数は利用者が設定できる。反復された実行のうち、計画ユニットが候補地に選ばれた回数が、選択頻度（selection frequency）として求められる。その計画ユニットが、保全目標を達成する上で、どのくらい重要なかを示す非代替性（irreplaceability）の指標としてしばしば用いられ、Marxan irreplaceability と呼ばれることもある。Ferrier et al. (2000) が提唱した元来の非代替性は、個々の計画ユニットが目標達成において、他の計画ユニットで代替できない割合とし、値は 0 から 1 をとり、非代替性が高いほど 1 に近くなる。つまり、目標を達成する計画ユニットのすべての組み合わせのうち、その計画ユニットが含まれないと、目標を達成できない組み合わせがどのくらいあるかによって求められる。したがって、原理的には Marxan で計算される選択頻度は、一般的な非代替性とは異なる指標である（Ardrón et al. 2010）。例えば、選択頻度が高くなるユニットは、1) 非常に希少な種がいるユニット、2) 中程度に希少な種が

複数いるユニット、の2つが挙げられる。1は非代替性が高いのは当然だが、2はそのユニットを仮に除いて解析した場合、総コストは上がるものの、順位が低かった他のユニットが繰り上がるだけなので、一般的な非代替性は高くないことになる。また、選択頻度が低い場所であっても、保全目標の達成に不要とは限らない点にも留意が必要だろう。上述のような留意点はあるものの、選択頻度を非代替性の指標として利用する価値は依然として否定されるものではなく、使用するデータの特性を熟知して、活用することが望まれる (Carwardine et al. 2007)。

保全対象に関する情報

保全対象の種類

絶滅危惧種といった特定の種に焦点をあてた研究 (Rayfield et al. 2008 ; Hazlitt et al. 2010) もあるが、多数の種を対象に、その分布の組み合わせをもとにホットスポットを選定した研究が多い (Rondinini et al. 2005 ; Zhang et al. 2012)。

保全を目的として Marxan を利用した研究は、Thomson Reuter 社が提供する学術文献データベース Web of Science での検索によると、114 件が該当した (検索キーワード: Marxan + conservation)。対象分類群の内訳は魚類 35 件、哺乳類 22 件、鳥類 14 件、植物 9 件、両生類 6 件、爬虫類 4 件、昆虫 1 件が報告されている (検索キーワード: Marxan + conservation + fish/ mammal/ bird/ plant/ amphibian/ reptile/ insect)。そのうち、約 20% の研究では、保全対象が複数の分類群にわたっていた。上述での Web of Science を用いた検索は、2000 年から 2013 年に査読付き雑誌に掲載された論文を対象としている (2013 年 12 月 24 日確認)。

また、生物相以外を保全対象に設定している研究もある。これは、Marxan を利用した解析では比較的広い地理的範囲が対象となりうるため、対象地域全体をカバーする生物相のデータが揃わないことが一因となっているだろう。そのような場合には、地質、地形、土壌の特徴を代替指標として用いた解析 (Carwardine et al. 2007) や、土地利用といった景観構造を指標にした解析 (Klein et al. 2008b ; Smith et al. 2008) が行われている。また、生物生息地としての機能だけでなく、炭素固定や水供給など生態系サービスを考慮した研究もある (Chan et al. 2006 ; Egoh et al. 2007 ; Egoh et al. 2010 ; Izquierdo and Clark 2012)。一方、送粉サービスといった調整サービス

の観点を保護区の選定に反映した研究はまだない。

種の多様性だけでなく、遺伝的多様性の保全も重要であるが、それを保全目標にして解析した研究はいまだ少ない (但し、Carvalho et al. 2011b ; Yokogawa et al. 2013 を参照)。Carvalho et al. (2011b) は、両生爬虫類を対象に、局所的な環境の違いが適応的な遺伝的分化をもたらしていると仮定し、環境勾配を指標とした保全優先地の選定を行った。その結果、種の分布をもとにした場合と遺伝的分化を考慮した場合とで、各グリッドの候補地に選択された回数のピアソン相関係数は 0.51 と低く、優先的に保全する候補地がかなり異なることを明らかにしている。

保全対象に関するデータ

Marxan による相補性解析で得られる計画ユニットの最適に近い組み合わせは、保全の対象となる生物や生息地の空間分布が完全に既知であるという前提に基づいている。そのため、保全対象の選定に加えて、使用される生物データのタイプも、選ばれる候補地に影響する。使用される生物データは、主に 4 タイプに分けられる。1) 生物の分布範囲 (Extent of occurrence) やある範囲における生息地の特性を記述したレンジマップ (Shriner et al. 2006 ; Pearce et al. 2008 ; Becker et al. 2010 ; Drummond et al. 2010 ; Hazlitt et al. 2010)、2) 観察や標本など実際にいた記録から得られた分布データ (Area of occupancy) (Nhancale and Smith 2011 ; Gordon et al. 2013)、3) 分布データを用いて構築した分布予測モデルから得られた分布あるいは存在確率をもとにした場合 (Carvalho et al. 2010 ; Carvalho et al. 2011a ; Esselman and Allan 2011 ; Zhang et al. 2012 ; Loyola et al. 2013)、4) 保全対象ごとに利用できるデータのタイプが異なる場合 (Kiesecker et al. 2009 ; Carvalho et al. 2010) がある。

データのもつ不確実性は選択される候補地の信ぴょう性やその効率性に大きく影響するため、留意が必要である (Carvalho et al. 2010)。既往のレンジマップを用いた場合、実際の分布域よりも広く評価していることが多い。つまり、節約的に保護区を設定するプログラムのもとでは、実際には保全対象が不在である地点が候補地に含まれやすくなる (Rondinini et al. 2005, 2006)。一方、観察で得られたデータでは、観察努力量の不足や個体の発見率が低いと、実際にいる場所を見落とす可能性がある (de Solla et al. 2005 ; Rondinini et al. 2006)。また、そうしたデータをもとにした分布予測や分布確率を用いる場合、観察努力量の偏りや予測に用いる環境変数の測定誤差によって、過大推定や過小推定となる危険性を伴う

(Segurado and Araújo 2004; Rondinini et al. 2006)。予測で生じる誤差は、分布予測モデルの種類によっても異なり、使用するデータの特性に合った手法を選ぶ必要がある (Segurado and Araújo 2004)。例えば、最大エントロピー法を用いた MaxEnt (Phillips et al. 2006) は、在のみデータによる分布推定の精度が比較的高いとされている (Elith et al. 2006)。Marxan で扱うような広域スケールを対象とした場合では、しばしば標本や市民モニタリングといった在のみ記録からなるデータが使用され、分布推定モデルとして MaxEnt が利用されている (Fuller et al. 2008; Carvalho et al. 2010, 2011a, b; Zhang et al. 2012)。MaxEnt は、解析で出力された存在確率を存在不在に変換する際に必要となる閾値の設定 (Liu et al. 2005) や、分布予測の不確実性に関する課題 (Phillips et al. 2009) が残されているものの、有効に活用されていくことが期待される。

既存の保護区の扱い

生息地の管理には、新たな保護区の整備だけでなく、既存の保護区の管理も想定する必要がある。既存の保護区で生物や生息地の保全を十分に達成できていることが理想だが、実際には Marxan で選定された候補地と既存の保護区との間にはギャップがあることが報告されている (Stewart et al. 2003; Pearce et al. 2008; Esselman and Allan 2011; Malcolm et al. 2012)。Malcolm et al. (2012) は、オーストラリア東南部沿岸域におけるサンクチュアリ (漁獲禁止区域) の整備にあたり、3つのシナリオ下での候補地の選ばれ方と保全目標の達成度を比較した。3つのシナリオは、既存のサンクチュアリを維持する (シナリオ 1)、既存のサンクチュアリを拡張する (シナリオ 2)、既存のサンクチュアリを無視して、新たに候補地を探索する (シナリオ 3) とした。Marxan の結果から、シナリオ 3 が最も効率的に候補地を選定でき、シナリオ 2 では、既存のサンクチュアリの周辺が優先的に選ばれるようになる一方で、効率性は低下し、飛び地が発生したり、より多くの面積を必要とするようになった。そして、既存のサンクチュアリが最も非効率であるという結果が示された。しかし、地域制自然公園制度を採用する日本のように、自然公園の設置に国や地方公共団体が用地取得を伴わない場合や、既存の保護区が生物学的な価値だけではなく、社会において文化的、歴史的な価値もすでに備えている場合には、保護区を見直すという判断は容易ではない。Marxan の強みである相補性の概念に立ち返れば、既存の保護区を補完し、保全目標を達成

できるような候補地を選定していくことが現実的だろう。

保全目標の設定

Marxan の解析結果が、実際の保全の現場で活かされるものになるかどうかは、目標設定が科学的根拠に基づき、利害関係者で合意形成がなされていることが重要である (Smith et al. 2009; Ardrone et al. 2010)。しかしながら、例えば対象種ごとに最少存続可能個体数 (Shaffer 1981) を求めることは、絶滅リスクといった情報が限られている状況では容易ではない (Ardrone et al. 2010)。実際には、IUCN の保護面積目標ガイドライン (IUCN 2003) や対象地域で定められた個別のガイドラインに沿って、種ごとに保全に必要な面積を定め、保全目標としている研究 (Carwardine et al. 2007; Klein et al. 2008a, b; Carissa et al. 2009) や、保全したい個体数から面積を推定している研究がある (Drummond et al. 2010; Stralberg et al. 2011; Cook and Auster 2013)。また、保全面積の目標を複数設定するといった、複数のシナリオに応じて異なる目標を設定する事例もある (Stewart et al. 2003; Rondinini et al. 2005; Zielinski et al. 2006; Hazlitt et al. 2010; Izquierdo and Clark 2012)。複数のシナリオを想定することは、利用できる情報やデータが限られている状況に対応する 1 つの手立てと考えられる (Peterson et al. 2003)。また、後述の利害関係者や意思決定者間の合意形成をより円滑に進めることにもつながるだろう (Pressey et al. 1996; Tompkins et al. 2008; Chirozva et al. 2013)。

科学的知見に加え、目標設定における合意形成プロセスは、保全計画を現場で有用なものとする上で重要な意味を持つ (Pressey et al. 1997; Soutullo et al. 2008; Ardrone et al. 2010)。例えば、政策決定者や地域住民が科学者とともに、保全対象や目標の選定に携わったり (Kiesecker et al. 2009; Esselman and Allan 2011)、対象域での生業者が経済学的コストの査定に関与すること (Klein et al. 2008a, b) が挙げられる。Klein et al. (2008b) は、カリフォルニア州沿岸域における、漁業への負荷を抑えた保全区域の選定に際し、漁業関係者や釣り人からなるグループ (A)、保全への関心が高い人からなるグループ (B)、両者が含まれるグループ (C) のそれぞれが作成した保全計画の効率性を比較した。その結果、A の計画が最も効率的に漁業への負荷を抑えつつ、生物多様性の保全目標が達成されていた。これは、漁業関係者が漁獲量の多い地域などに関する知見を有しており、保全計画に反映できたことが功を奏していたことによる。この研究は、漁業への負荷の大きさから計画の効率性を

評価したため、漁業関係者の計画が効率的であると評価されやすかったが、一部の関係者しか持ち得ない情報の共有が、効率的な保全計画につながることを示唆している。この研究で得られた保全計画は、実際にカリフォルニア州漁業狩猟委員会によって採用されている。計画の一部は、Marxan で 1 度も選ばれなかった地域が含まれているものの、Marxan の解析が実際の保全現場に活かされた好例である。複数の利害関係者が協働することで、異なる要望や意見の調整が可能になるだけでなく、一部の関係者しか持ち得ない情報の共有が進み、より効率的な保全計画の提案が期待できる (Ban et al. 2009 ; Gordon et al. 2013)。

コスト

Marxan では保護区を整備した際に発生する費用や損失をコストとして考慮することができる。これまで優先保全地域の選定では、生物学的な価値に重きが置かれ、社会経済学的なコストは考慮されない傾向にあった (Possingham and Wilson 2005)。しかし、限られた予算や人的資源のもとで効率的に保全計画を実施するうえでも社会経済学的コストを考慮することは、不可欠である (Naidoo et al. 2006 ; Knight et al. 2006 ; Carwardine et al. 2008)。具体的には、保護する用地の購入や管理に要する費用 (Wilson et al. 2010 ; Januchowski-Hartley et al. 2011 ; Levin et al. 2013) や、保護される以前にその場所で営まれていた漁業や農業、林業といった経済活動が停止することで被る損失 (Klein et al. 2008a ; Smith et al. 2008 ; Gordon et al. 2013) が挙げられる。そのほか、用地の取得に要する時間や人件費などの費用もこれに該当する (Naidoo et al. 2006)。

また、対象となる土地に内在するリスクや脅威をコストに反映させる場合もある。Drummond et al. (2010) は、人間のアクセスのしやすさを指標として、アクセスが困難な環境ほど、人間による攪乱頻度が低く、管理費用がかからないとした。同様に、人口密度 (Rondinini et al. 2005) や道路密度 (Huber et al. 2010)、都市域密度 (Huber et al. 2010)、都市域密度と農業従事者の積 (Yoshioka et al. 2014) をコストとして用いている研究もある。

事例紹介

Marxan を用いた研究事例として、生物の分布に関する将来予測を保護区の選定に反映させた研究と、生態系サービスとのトレードオフを評価した研究を紹介する。将来予測には、気候変動と土地利用の変化による影響を

取り上げる。

また、Marxan は保護区の選定を目的に開発されたソフトウェアであるが、保護区の選定以外にも活用されている研究もある。事例として、再導入地選定と外来種駆除の優先地選定を目的とした研究を取り上げ、最後に Marxan の新たな利用価値を紹介する。

将来予測

1) 気候変動

気候変動は、生息地の消失や拡大といった生物の分布域の変化や、フェノロジーの変化をもたらすことで、生物多様性に影響を及ぼすと懸念されている (Araújo et al. 2004 ; Araújo and Rahbek 2006)。将来的な気候変動の影響を踏まえると、現在の分布をもとにした優先保全地域の選定と保全活動では、長期的な種の保全を達成することが困難な可能性が指摘されている (Araújo et al. 2004)。

Marxan を用いた優先保全地域の選定においても、将来的な気候変動を考慮した場合と、現在の分布をもとにした場合とでは、選定される候補地が異なることが報告されている (Rayfield et al. 2008 ; Carvalho et al. 2011a ; Loyola et al. 2013)。Rayfield et al. (2008) は、カナダ・ケベック州にあるおよそ 430,000 ha の北方混交林を対象に、アメリカテン *Martes americana* の保護区選定を目的とした保護候補地のシミュレーションを行った。気候や土地利用の変化を 50 年ごとに考慮して、そのたびに候補地を選びなおす方法 (動的な保護区選定シナリオ)、シミュレーション期間 (200 年間) を通じて候補地を固定した方法 (静的なシナリオ)、さらに動的保護区に一部の静的な保護区を合わせた方法 (混合シナリオ) の 3 種類のシナリオを想定した。その結果、選ばれる候補地は、動的シナリオでより質の高いアメリカテンのホームレンジをカバーできることを示した。動的シナリオ下では経年変化とともに現在の候補地とは異なる候補地が選ばれるため、現在の保護区だけでなく、将来的に保護区となる場所の環境が、シミュレーションで想定した以上の土地改変を受けないように配慮する必要性に言及している。しかし、動的シナリオや混合シナリオでは、既存の保護区はすべて、あるいは一部を除き、維持しないものとして最適な候補地を選びなおしている。実際には、50 年ごとに既存の保護区の廃止や新たに保護区を設定にはコストが伴うはずで、そうしたコストを踏まえた上で、どのように候補地を選定するかを検討することが、より現実的である。

それに対して、Loyola et al. (2013) は、南米に位置する大西洋岸森林を対象に、現在の気候と 2050 年における気候のそれぞれの条件下で、両生類 222 種の地理的分布を予測し、地点ごとの種数を求めた。将来にわたって、種数が多く、種の入れ替わりが少ない場所を効率的な保護区とみなし、候補地として選択される頻度をもとに保護区を特定した。また、種数が減少してしまう地点は、保全のために投資するリスクが高く、逆に増加する地点は、将来の候補地となる可能性が高い。新たに保護区として整備する際のコストは考慮されていないものの、気候変動の影響を現在の候補地の選定にリンクさせて議論することは、有効な手段と言えるだろう。

気候変動の影響が顕著にでやすい地域や広い空間スケールを対象とした場合、気候変動の影響を Marxan の候補地選定プロセスに組み込むことで、より長期的に種の保全を可能とする保護区の選定が可能になる。また、将来の保護区となりうる場所での開発等のインパクトを、予め回避する働きかけができるかもしれない。

2) 土地利用の変化

気候変動と同様に、保全する対象地の土地利用も不変ではなく、将来的に変化し、生物の分布に影響する可能性が高い。

Marxan では、保護の対象となる場所の土地利用の将来的な変化をコストとして考慮した研究がある (Smith et al. 2008 ; Drummond et al. 2010 ; Nhamale and Smith 2011)。生物に負の影響を及ぼす場合の土地利用の変化は、保護の観点からは 2 つの解釈ができる。1 つは、将来的な土地利用の変化を保護の緊急性が高いと捉え、積極的に保護し、土地改変を未然に防ぐことで、絶滅リスクを低減しようとするものである。もう 1 つは、土地利用の変化が保護の効率性や確実性を低下させると捉えることである。保護区に関するコストには、初期の土地購入費用だけでなく、例えば、外来種の駆除や山火事の制御、定期的な火入れ、生態学的なモニタリングなどの長期的な維持管理が必要であり、人件費を含む管理費用がコストとして発生し続ける (Frazee et al. 2003)。保護区に指定された場所が必ずしも、恒常的な管理が行き届かないために環境が悪化し、保護が十分に達成されないことがある (Mascia and Pailler 2010)。Drummond et al. (2010) は、インドネシアの東カリマンタン州全域を対象に、土地利用圧と人口密度を指標とし、森林が伐採されるリスクを評価し、森林伐採の可能性が高く、候補地に選択される頻度が高い場所を早急な保全アクションを要する候

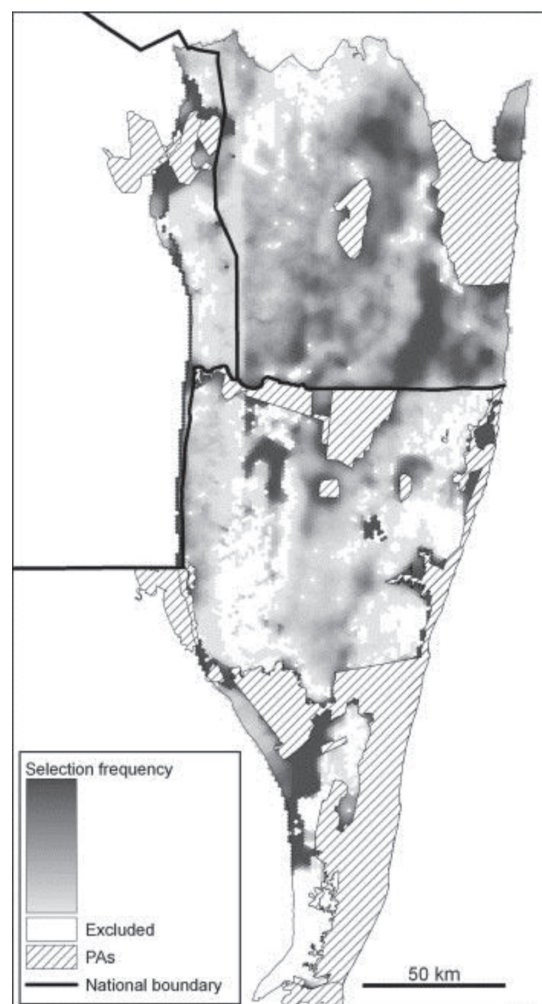


図 2. 南アフリカのマピュタランド地域での候補地選定の結果。Selection frequency は選択頻度を指し、濃い色ほど選択頻度が高いことを表している。また、PAs (Protected Areas) は既存の保護区を指す (Smith et al. 2008)。

補地としている。一方、Smith et al. (2008) は、南アフリカのマピュタランド地域で、脊椎動物や無脊椎動物、植物、生息地タイプなどを保全の対象として、候補地の選定を行った。その際、農地への転換リスクを既存の農地までの距離、農地としての土地ポテンシャル、標高と傾斜を説明変数としたモデルから予測し、コストとして採用した。農地への転換リスクが高い場所は保全優先度が低くなるようにしている (図 2)。

生態系サービス

人間は、生態系から食糧などの直接的な利益や気候調整といった間接的な利益といった生態系サービスを享受

している。愛知目標においても、生態系サービスの強化が掲げられ、生物多様性保全との両立が目指している（「Convention on Biological Diversity」<https://www.cbd.int/sp/targets/default.shtml>、2015年4月20日確認）。一方で、生物多様性の保全と生態系サービスの提供には、しばしばトレードオフが生じる（Turner et al. 2007）。どのような生態系サービスが生物多様性とどの程度トレードオフ関係にあるのかを空間明示的に把握することは、管理のあり方を具体的に考える手立てになるだろう。

例えばEgoh et al. (2010) は、南アフリカの半乾燥地域（19,730 平方キロメートル）において、植生タイプの生物多様性保全と生態系サービス（炭素固定、水供給、飼料供給）の保全を目的に、複数のシナリオを用いて保全目標の達成度合いや、生物多様性と生態系サービス間のトレードオフを検証した。生物多様性のみを保全の目標とした場合（シナリオ 1）に選ばれた候補地では、炭素固定の 37%、水供給の 57%、飼料供給の 45% の保全を同時に達成することができた。また、生物多様性の保全の達成度を 8% 減じると、各生態系サービスの保全達成度は最低 80% に改善された。ただし、トレードオフにより失われる植生の多くは回復が困難になった。Chan et al. (2006) は、生態系サービスを保全の対象に含めると、生物多様性を単独で保全の対象にした場合と比べて、生物多様性の損失は 44% 大きくなるとしており、生態系サービスが生物多様性の代替指標にはならないとしている。

生態系サービスの評価方法は、発展途上にある（Egoh et al. 2007）。例えば、食糧生産といった土地利用の転換を要する生態系サービスでは、その管理のあり方によっても、生物多様性への影響は異なるだろう。また、生物多様性の文化的側面、すなわち種の多様性自体がもたらす住環境の快適性向上（Tyrväinen et al. 2003；Hedblom et al. 2014）や巨木といったシンボルが地域住民の保全への関心を高めるといった作用（Blicharska and Mikusiński in press）を生態系サービスに位置づける研究も増えてきている（Egoh et al. 2007；Mace et al. 2012）。今後、Marxan の解析においても、生物多様性自体を生態系サービスと位置づけた場合に、生物多様性の保全とのトレードオフの程度はどのように変化し、候補地の選ばれ方がどのように変わるのかは興味深い内容である。

再導入・再生

絶滅の危機にある種は、しばしば自生地における保全だけでなく、自生地外での保全によって絶滅リスクを

低減する必要が生じる。

Yokogawa et al. (2013) は、阿蘇地域における絶滅危惧種のハナシノブ *Polemonium kiushianum* Kitam. を対象に、自生地個体群と生息地外個体群とで遺伝的多様度を比較し、生息地外個体群でより多様度が低いことを明らかにした。これは生息地外個体群でのボトルネックによる影響と、自生地個体群における遺伝的浮動による集団間の遺伝的分化に起因しているらしい。Marxan による解析では生息地外個体群の遺伝的多様度を高めるのに必要な自生地個体群の種子供給源を特定した。その際、候補地として選択される頻度を指標として、頻度が高い地域を供給源とみなしている。

また、Yoshioka et al. (2014) は、相補性解析により優先的に自然再生を行う地域の選定方法を提案している。この研究では、日本国内全域における鳥類の過去と現在の分布情報から、鳥類各種の「いなくなった地点」の情報を抽出し、これを用いて相補性解析を行い、候補地として選択される頻度の高い地域を優先的に再生することが望ましい地域としている。

侵入種の駆除

侵入種の蔓延は生物多様性に壊滅的なダメージを与えることがある（Lövei 1997）。侵入種の根絶や再侵入を防ぐことが急務であるが、その管理や対策には経済的なコストが伴う。経済的なコストには、人件費や燃料費などが含まれ、対象種や侵入先の環境、必要となる管理手法によって異なる。こうしたコストに充てられる予算は限られている場合が多く、効率的に駆除を進めるには、経済的なコストを踏まえた駆除の優先地域を選定する必要がある（Simberloff 2009）。Januchowski-Hartley et al. (2011) は、オーストラリア・クイーンズランド北部のおよそ 1500 平方キロメートルにわたる集水域にある湿地 1353 箇所で、侵略的水生植物であるヒメナクン属種の 1 種 *Hymenachne amplexicaulis* を対象に、管理にかかるコストを考慮した駆除を優先する湿地の特定を行った。管理にかかるコストは、人件費、燃料費、1 計画ユニット当たりの管理にかかる時間を用いている。また、区画同士の近接性が高いと、再侵入の可能性が高まるとして、近接性を低く保つように候補地は選ばれた。再侵入の可能性は、さらなる駆除や管理費用の発生に関わるため、侵入種の効率的な管理には必要不可欠である。Marxan は管理コストや再侵入の可能性を統合的に扱うことができる点で、効率的な侵入種駆除を可能にする有効なツールとして期待される。

今後の課題

技術的な課題

既に述べたとおり、目標とする保全対象が新たな保護区の設定により実際に有効に保全されるかどうかは、利用者が使用データの特性や対象種に関する生態学的な知見を熟知しているかどうかにかかっている (Noss 2003 ; Smith et al. 2009 ; Ardron et al. 2010)。そうでないと、予測結果が役に立たないばかりか、保全地域の優先順位を見誤ることで、保全が手遅れになったり、保全に必要な面積が不十分なことで、結果的に対象生物を保全できないなどの取り返しのつかない失敗をもたらす恐れさえある (Noss 2003)。その意味で、個体群を維持するのに必要な生息地の最小面積や生息地間の連結性の程度などの科学的知見は重要である (Ardron et al. 2010)。

ただしこの際、対象種間でその程度が異なることは珍しくないだろう。対象種間の保全上の重み付けは *Conservation Value* の項で設定できるが、候補地間の凝集度に影響する *BLM* は保全対象ごとに異なる値を指定することはできない¹。こうした違いをどのように候補地の選定に反映させるかは、Marxan の今後の技術的な課題と言える。

保全現場への活用に向けて

コストをはじめ、Marxan で指定する各項の値は、利用者が適宜判断して与えることになる。値の根拠となる生態学的な知見やデータを利用者があらかじめ把握しておく必要があるが、その場合でも利用者の恣意的な判断を完全に排除することはできない。その意味で、Marxan の保全管理への利用価値は、利用者側の見識に大きく依存していると言える。

また、複数の利害関係者による合意形成は、その必要性が認識されつつも、必ずしも実行されていない (Knight et al. 2008 ; Gordon et al. 2013)。例えば、複数の主体の関与が認められない場合 (Rayfield et al. 2008 ; Huber et al. 2010 ; Hermoso et al. 2011 ; Stralberg et al. 2011) や、合意形成の必要性を今後の課題として言及するにとどまっているものも多い (Pearce et al. 2008 ; Smith et al. 2008 ; Becker et al. 2010 ; Linke et al. 2012)。Marxan での解析結果を、真に現場で有用なものとするには、政策決

定者や土地保有者、生業者などが、計画の初期段階から、解析を行う科学者と連携し、現場での課題を汲み入れた保全目標を設定することが重要である (Knight et al. 2008)。また、こうした複数の利害関係者の参画は、ときとして対立を引き起こしやすくし、合意形成が困難となったり、関係者間の力関係が合意形成の結果に反映されかねない (Reed 2008)。中立的な立場のファシリテータやコミュニケーションの専門家に関わることも、合意形成の実現には有効だろう (Game and Grantham 2008 ; Reed 2008)。今後、科学的知見に基づき、さまざまな利害関係者の議論によって設定された保全対象や目標に対して Marxan を実行し、保全の現場に適用した事例が増えることが期待される (Knight et al. 2008 ; Gordon et al. 2013)。

Marxan は、保全対象とその保全目標を適切に設定することさえできれば、どこを優先的に保全すべきかを明確にできる効果的なツールである (Ardron et al. 2010 ; 角谷ほか 印刷中)。定量的な保全目標やコストを設定することで、優先保全地域を空間明示的に特定することができ、保全管理の予算や人的資源を効率的に投資することが可能になるからである (Ball and Possingham 2000 ; Possingham et al. 2000)。先述したとおり、Marxan で指定する各項の値は恣意性を完全に排除することは難しいが、1つの結論ではなく、いくつかの値の組み合わせに基づいた優先保全地域の組み合わせを複数示すことは、利害関係者や意思決定者の間の合意形成をより円滑に進めることにつながる (Pressey et al. 1996 ; Tompkins et al. 2008 ; Chirozva et al. 2013)。今後、Marxan の改良とその有効な活用がますます期待される。

参考サイト

Marxan は The University of Queensland が運営している以下のサイトで配布されている。ソフトウェアのダウンロードに合わせて、ソフトウェアの操作手順を仕様画面とともに丁寧に解説した資料や、マニュアル、過去のワークショップで使用された教材も公開されている。Marxan, Informing Conservation Decisions Globally (The University of Queensland) <http://www.uq.edu.au/marxan/index.html>

謝 辞

本総説は環境省環境研究総合推進費 (S-9) アジア規模での生物多様性観測・評価・予測に関する総合的研究

¹ Conservation Feature File で設定する Minimum Separation Distance は、保全対象ごとに異なる値を与えることができる。このパラメータでは、選択されるユニット間の最小の距離を指定できる。省略可能。

の支援を受けて実施した。ここに記して感謝申し上げます。

引用文献

- 赤坂宗光・森 章 (2012) 自然保全区のマネジメント—設置の計画から管理のあり方まで. (森 章編) エコシステムマネジメント —包括的な生態系の保全と管理へ—. pp 73-95. 共立出版, 東京.
- Araújo MB, Cabeza M, Thuiller W, Hannah L, Williams PH (2004) Would climate change drive species out of reserves? An assessment of existing reserve-selection methods. *Global Change Biology* 10:1618-1626.
- Araújo MB, Rahbek C (2006) How does climate change affect biodiversity? *Science* 313:1396-1397.
- Ardron JA, Possingham HP, Klein CJ (eds) (2010) *Marxan Good Practices Handbook*, version 2. Pacific Marine Analysis and Research Association, Victoria.
- Ball IR, Possingham HP (2000) MARXAN (V1.8.2): Marine Reserve Design Using Spatially Explicit Annealing: A Manual. University of Queensland, Brisbane.
- Ban NC, Picard CR, Vincent ACJ (2009) Comparing and integrating community-based and science-based approaches to prioritizing marine areas for protection. *Conservation Biology* 23:899-910.
- Becker CG, Loyola RD, Haddad CFB, Zamudio KR (2010) Integrating species life-history traits and patterns of deforestation in amphibian conservation planning. *Diversity and Distributions* 16:10-19.
- Blicharska M, Mikusiński G (in press) Incorporating social and cultural significance of large old trees in conservation policy. *Conservation Biology*.
- Carissa K, Wilson K, Watts M, Stein J, Berry S, Carwardine J, Smith MS, Mackey B, Possingham H (2009) Incorporating ecological and evolutionary processes into continental-scale conservation planning. *Ecological Applications* 19:206-217.
- Carvalho SB, Brito JC, Pressey RL, Crespo E, Possingham HP (2010) Simulating the effects of using different types of species distribution data in reserve selection. *Biological Conservation* 143:426-438.
- Carvalho SB, Brito JC, Crespo EG, Watts ME, Possingham HP (2011a) Conservation planning under climate change: Toward accounting for uncertainty in predicted species distributions to increase confidence in conservation investments in space and time. *Biological Conservation* 144:2020-2030.
- Carvalho SB, Brito JC, Crespo EJ, Possingham HP (2011b) Incorporating evolutionary processes into conservation planning using species distribution data: A case study with the western Mediterranean herpetofauna. *Diversity and Distributions* 17:408-421.
- Carwardine J, Rochester WA, Richardson KS, Williams KJ, Pressey RL, Possingham HP (2007) Conservation planning with irreplaceability: Does the method matter? *Biodiversity and Conservation* 16:245-258.
- Carwardine J, Wilson KA, Watts M, Etter A, Klein CJ, Possingham HP (2008) Avoiding costly conservation mistakes: The importance of defining actions and costs in spatial priority setting. *PLoS ONE* 3:e2586.
- Chan KM, Shaw MR, Cameron DR, Underwood EC, Daily GC (2006) Conservation planning for ecosystem services. *PLoS Biology* 4:e379.
- Chirozva C, Mukamuri BB, Manjengwa J (2013) Using scenario planning for stakeholder engagement in livelihood futures in the Great Limpopo Transfrontier Conservation Area. *Development Southern Africa* 30:771-788.
- Cook RR, Auster PJ (2013) The biodiversity value of marine protected areas for multi-species fishery management in the Gulf of Maine. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* 23:429-440.
- de Solla SR, Shirose LJ, Fernie KJ, Barrett GC, Brousseau CS, Bishop CA (2005) Effect of sampling effort and species detectability on volunteer based anuran monitoring programs. *Biological Conservation* 121:585-594.
- Dobson AP, Rodriguez JP, Roberts WM, Wilcove DS (1997) Geographic distribution of endangered species in the United States. *Science* 275:550-553.
- Drummond SP, Wilson KA, Meijaard E, Watts M, Dennis R, Christy L, Possingham HP (2010) Influence of a threatened-species focus on conservation planning. *Conservation Biology* 24:441-449.
- Egoh B, Rouget M, Reyers B, Knight AT, Cowling RM, van Jaarsveld AS, Welz A (2007) Integrating ecosystem services into conservation assessments: A review. *Ecological Economics* 63:714-721.
- Egoh BN, Reyers B, Carwardine J, Bode M, O'Farrell PJ, Wilson KA, Possingham HP, Rouget M, DeLange W, Richardson DM, Cowling RM (2010) Safeguarding biodiversity and ecosystem services in the Little Karoo, South Africa. *Conservation Biology* 24:1021-1030.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudik M, Ferrier S, Guisan A, Hijmans RJ, Huettmann F, Leathwick JR, Lehmann A, Li J, Lohmann LG, Loiselle B, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, Overton JM, Peterson AT, Phillips SJ, Richardoson K, Scachetti-Pereir R, Schapire RE, Soberón J, Williams S, Wisz MS, Zimmermann NE (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29:129-151.
- Esselman PC, Allan JD (2011) Application of species distribution models and conservation planning software to the design of a reserve network for the riverine fishes of northeastern Mesoamerica. *Freshwater Biology* 56:71-88.
- Ferrier S, Pressey RL, Barrett TW (2000) A new predictor of the irreplaceability of areas for achieving a conservation

- goal, its application to real-world planning, and a research agenda for further refinement. *Biological Conservation* 93:303-325.
- Frazee SR, Cowling RM, Pressey RL, Turpie JK, Lindenberg N (2003) Estimating the costs of conserving a biodiversity hotspot: A case-study of the Cape Floristic Region, South Africa. *Biological Conservation* 112:275-290.
- Fuller T, Morton DP, Sarkar S (2008) Incorporating uncertainty about species' potential distributions under climate change into the selection of conservation areas with a case study from the Arctic Coastal Plain of Alaska. *Biological Conservation* 141:1547-1559.
- Game ET, Grantham HS (2008) Marxan User Manual: For Marxan version 1.8.10. University of Queensland, Brisbane and Pacific Marine Analysis and Research Association, Vancouver.
- Gordon A, Bastin L, Langford WT, Lechner AM, Bekessy SA (2013) Simulating the value of collaboration in multi-actor conservation planning. *Ecological Modelling* 249:19-25.
- Hazlitt SL, Martin TG, Sampson L, Arcese P (2010) The effects of including marine ecological values in terrestrial reserve planning for a forest-nesting seabird. *Biological Conservation* 143:1299-1303.
- Hedblom M, Heyman E, Antonsson H, Gunnarsson B (2014) Bird song diversity influences young people's appreciation of urban landscapes. *Urban Forestry & Urban Greening* 13:469-474.
- Hermoso V, Linke S, Prenda J, Possingham HP (2011) Addressing longitudinal connectivity in the systematic conservation planning of fresh waters. *Freshwater Biology* 56:57-70.
- Huber PR, Greco SE, Thorne JH (2010) Spatial scale effects on conservation network design: Trade-offs and omissions in regional versus local scale planning. *Landscape Ecology* 25:683-695.
- IUCN (The World Conservation Union) (2003) Recommendations of the Fifth IUCN World Parks Congress. IUCN, Gland.
- Izquierdo AE, Clark ML (2012) Spatial analysis of conservation priorities based on ecosystem services in the Atlantic forest region of Misiones, Argentina. *Forests* 3:764-786.
- Januchowski-Hartley SR, Visconti P, Pressey RL (2011) A systematic approach for prioritizing multiple management actions for invasive species. *Biological Invasions* 13:1241-1253.
- 角谷 拓・赤坂宗光・竹中明夫 (2014) 相補性解析による効率的な保全に寄与する地域の地図化. 景観生態学 (印刷中).
- Kiesecker JM, Copeland H, Pocerwicz A, Nibbelink N, McKenney B, Dahlke J, Holloran M, Stroud D (2009) A framework for implementing biodiversity offsets: Selecting sites and determining scale. *BioScience* 59:77-84.
- Kirkpatrick JB (1983) An iterative method for establishing priorities for selection of nature reserves: An example from Tasmania. *Biological Conservation* 25:127-134.
- Klein CJ, Chan A, Kircher L, Cundiff AJ, Gardner N, Hrovat Y, Scholz A, Kendall BE, Airame S (2008a) Striking a balance between biodiversity conservation and socioeconomic viability in the design of marine protected areas. *Conservation Biology* 22:691-700.
- Klein CJ, Steinback C, Scholz AJ, Possingham HP (2008b) Effectiveness of marine reserve networks in representing biodiversity and minimizing impact to fishermen: A comparison of two approaches used in California. *Conservation Letters* 1:44-51.
- Knight AT, Cowling RM, Campbell BM (2006) An operational model for implementing conservation action. *Conservation Biology* 20:408-419.
- Knight AT, Cowling RM, Rouget M, Balmford A, Lombard AT, Campbell BM (2008) Knowing but not doing: Selecting priority conservation areas and the research-implementation gap. *Conservation Biology* 22:610-617.
- Levin N, Watson JE, Joseph LN, Grantham HS, Hadar L, Apel N, Perevolotsky A, DeMalach N, Possingham HP, Kark S (2013) A framework for systematic conservation planning and management of Mediterranean landscapes. *Biological Conservation* 158:371-383.
- Linke S, Kennard MJ, Hermoso V, Olden JD, Stein J, Pusey BJ (2012) Merging connectivity rules and large-scale condition assessment improves conservation adequacy in river systems. *Journal of Applied Ecology* 49:1036-1045.
- Liu C, Berry MP, Dawson PT, Pearson GR (2005) Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography* 28:385-393.
- Loyola RD, Lemes P, Nabout JC, Trindade-Filho J, Sagnori MD, Dobrovolski R, Diniz-Filho JAF (2013) A straightforward conceptual approach for evaluating spatial conservation priorities under climate change. *Biodiversity and Conservation* 22:483-495.
- Lövei GL (1997) Biodiversity: Global change through invasion. *Nature* 388:627-628.
- Mace GM, Norris K, Fitter AH (2012) Biodiversity and ecosystem services: A multilayered relationship. *Trends in Ecology and Evolution* 27:19-26.
- Malcolm HA, Foulsham E, Pressey RL, Jordan A, Davies PL, Ingleton T, Johanstone N, Hessey S, Smith SDA (2012) Selecting zones in a marine park: Early systematic planning improves cost-efficiency; combining habitat and biotic data improves effectiveness. *Ocean and Coastal Management* 59:1-12.
- Margules CR, Pressey RL (2000) Systematic conservation planning. *Nature* 405:243-253.
- Mascia MB, Pailler S (2010) Protected area downgrading, downsizing, and degazettement (PADDD) and its conservation implications. *Conservation Letters* 4:9-20.

- Morin T (2001) Sanctuary advisory councils: Involving the public in the national marine sanctuary program. *Coastal Management* 29:327-339.
- Naidoo R, Balmford A, Ferraro PJ, Polasky S, Ricketts TH, Rouget M (2006) Integrating economic costs into conservation planning. *Trends in Ecology and Evolution* 21:681-687.
- Nhancale BA, Smith RJ (2011) The influence of planning unit characteristics on the efficiency and spatial pattern of systematic conservation planning assessments. *Biodiversity and Conservation* 20:1821-1835.
- Noss RF (2003) A checklist for wildlands network designs. *Conservation Biology* 17:1270-1275.
- Pearce JL, Kirk DA, Lane CP, Mahr MH, Walmsley J, Casey D, Muir JE, Hannon S, Hansen A, Jones K (2008) Prioritizing avian conservation areas for the Yellowstone to Yukon region of North America. *Biological Conservation* 141:908-924.
- Peterson GD, Cumming GS, Carpenter SR (2003) Scenario planning: A tool for conservation in an uncertain world. *Conservation Biology* 17:358-366.
- Phillips SJ, Anderson RO, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231-259.
- Phillips SJ, Dudik M, Elith J, Graham HC, Lehmann A, Leathwick J, Ferrier S (2009) Sample selection bias and presence-only distribution models: Implications for background and pseudo-absence data. *Ecological Applications* 19:181-197.
- Possingham HP, Ball I, Andelman S (2000) Mathematical methods for identifying representative reserve networks. In: Ferson S, Burgman M (eds) *Quantitative Methods for Conservation Biology*. pp 291-306. Springer-Verlag, New York.
- Possingham HP, Wilson KA (2005) Turning up the heat on hotspots. *Nature* 436:919-920.
- Pressey RL, Possingham HP, Margules CR (1996) Optimality in reserve selection algorithms: When does it matter and how much? *Biological Conservation* 76:259-267.
- Pressey RL, Possingham HP, Day JR (1997) Effectiveness of alternative heuristic algorithms for identifying indicative minimum requirements for conservation reserves. *Biological Conservation* 80:207-219.
- Rayfield B, James P, Fall A, Fortin MJ (2008) Comparing static versus dynamic protected areas in the Quebec boreal forest. *Biological Conservation* 141:438-449.
- Reed MS (2008) Stakeholder participation for environmental management: A literature review. *Biological Conservation* 141:2417-2431.
- Rondinini C, Stuart S, Boitani L (2005) Habitat suitability models and the shortfall in conservation planning for African vertebrates. *Conservation Biology* 19:1488-1497.
- Rondinini C, Wilson KA, Boitani L, Grantham H, Possingham HP (2006) Tradeoffs of different types of species occurrence data for use in systematic conservation planning. *Ecology Letters* 9:1136-1145.
- Segurado P, Araújo MB (2004) An evaluation of methods for modelling species distributions. *Journal of Biogeography* 31:1555-1568.
- Shaffer ML (1981) Minimum population sizes for species conservation. *BioScience* 31:131-134.
- Shriner SA, Wilson KR, Flather CH (2006) Reserve networks based on richness hotspots and representation vary with scale. *Ecological Applications* 16:1660-1673.
- Simberloff D (2009) We can eliminate invasions or live with them. Successful management projects. *Biological Invasions* 11:149-157.
- Smith RJ, Easton J, Nhancale BA, Armstrong AJ, Culverwell J, Dlamini S D, Gooddman PS, Loffler L, Matthews WS, Monadjem A, Mulqueeny CM, Ngwenya P, Ntumi CP, Soto B, Leader-Williams N (2008) Designing a transfrontier conservation landscape for the Maputland center of endemism using biodiversity, economic and threat data. *Biological Conservation* 141:2127-2138.
- Smith RJ, Eastwood PD, Ota Y, Rogers SI (2009) Developing best practice for using Marxan to locate marine protected areas in European waters. *ICES Journal of Marine Science* 66:188-194.
- Soutullo A, De Castro M, Urios V (2008) Linking political and scientifically derived targets for global biodiversity conservation: Implications for the expansion of the global network of protected areas. *Diversity and Distributions* 14:604-613.
- Stewart RR, Noyce T, Possingham HP (2003) Opportunity cost of ad hoc marine reserve design decisions: An example from South Australia. *Marine Ecology Progress Series* 253:25-38.
- Stralberg D, Cameron DR, Reynolds MD, Hickey CM, Klausmeyer K, Busby SM, Stenzel LE, Shuford D, Page GW (2011) Identifying habitat conservation priorities and gaps for migratory shorebirds and waterfowl in California. *Biodiversity and Conservation* 20:19-40.
- Tompkins EL, Few R, Brown K (2008) Scenario-based stakeholder engagement: Incorporating stakeholders preferences into coastal planning for climate change. *Journal of Environment Management* 88:1580-1592.
- Turner WR, Brandon K, Brooks TM, Costanza R, Da Fonseca GA, Portela R (2007) Global conservation of biodiversity and ecosystem services. *BioScience* 57:868-873.
- Tyrväinen L, Silvennoinen H, Kolehmainen O (2003) Ecological and aesthetic values in urban forest management. *Urban Forestry & Urban Greening* 1:135-149.
- Wilson KA, Meijaard E, Drummond S, Grantham, HS, Boitani L, Catullo G, Chirstie L, Dennis R, Dutton I, Falcucci A, Maiorano L, Possingham HP, Rondinini C, Turner WR, Venter O, Watts M (2010) Conserving biodiversity in

- production landscapes. *Ecological Applications* 20:1721-1732.
- Yokogawa M, Kaneko S, Takahashi Y, Isagi Y (2013) Genetic consequences of rapid population decline and restoration of the critically endangered herb *Polemonium kiusianum*. *Biological Conservation* 157:401-408.
- Yoshioka A, Akasaka M, Kadoya T (2014) Spatial prioritization for biodiversity restoration: A simple framework referencing past species distributions. *Restoration Ecology* 22:185-195.
- Zhang MG, Zhou ZK, Chen WY, Slik JW, Cannon CH, Raes N (2012) Using species distribution modeling to improve conservation and land use planning of Yunnan, China. *Biological Conservation* 153:257-264.
- Zielinski WJ, Carroll C, Dunk JR (2006) Using landscape suitability models to reconcile conservation planning for two key forest predators. *Biological Conservation* 133:409-430.