



環境 DNA 分析技術を用いた 淡水魚類調査手法の手引き

二次的自然環境において
はじめて環境 DNA 分析を利用するみなさまへ

第 3 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「絶滅の恐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、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、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 4 年 6 月には改訂第 2 版を公開しました。この第 3 版では、その後に本業務で実施した重点調査で得られた新しい知見を追加しています。

本手引きは、上記の調査の結果や最新の研究結果等の知見に基づき、主に二次的自然環境に生息する淡水魚類を対象に、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。

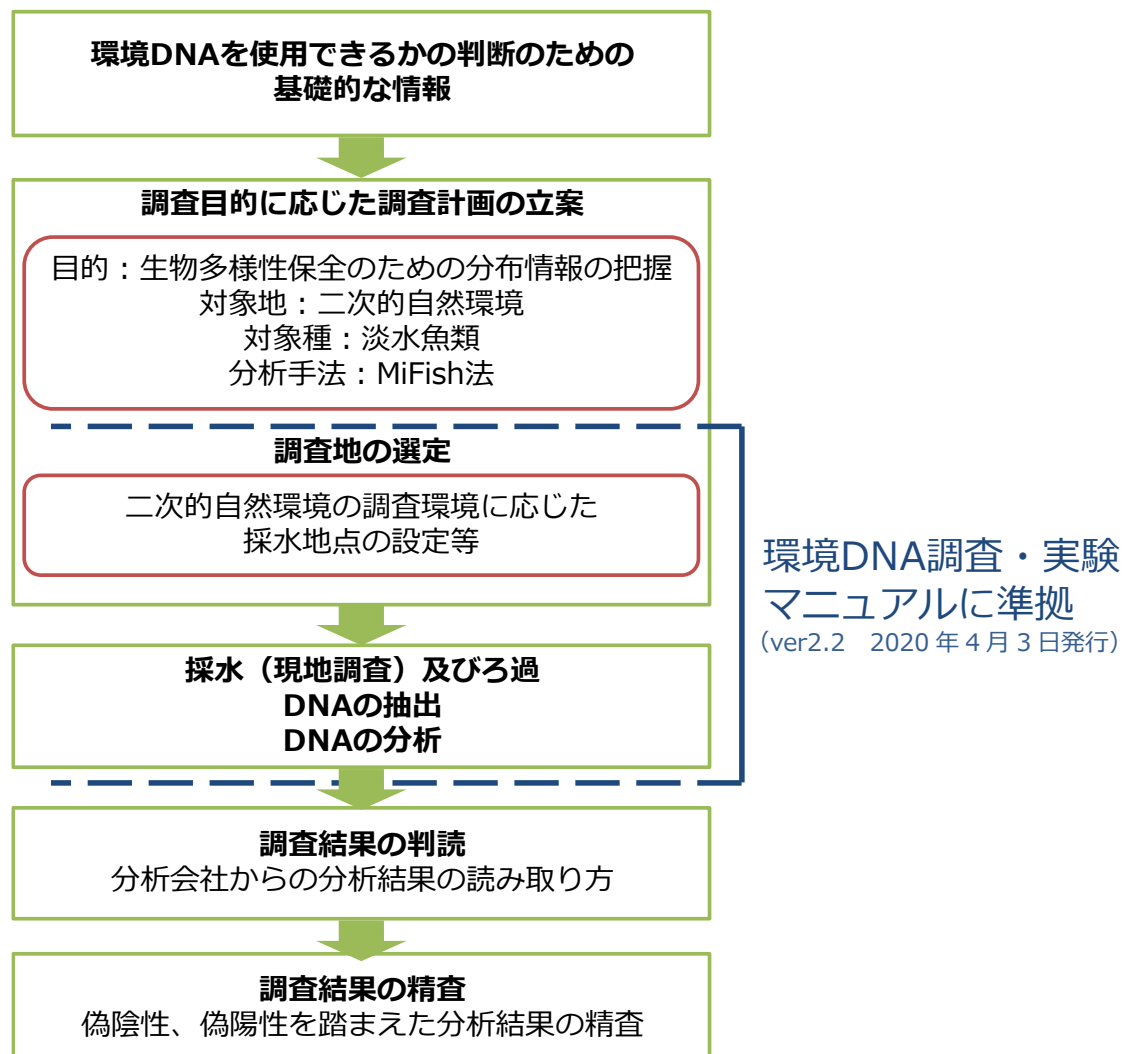
今後、本手引きにより、環境 DNA 分析を、淡水魚類の分布情報の把握、希少種保全の推進や外来種対策の強化などの生物多様性保全施策へ活用していただきたいと思います。

本手引きのご利用にあたって

本手引きは、二次的自然環境[※]に生息する淡水魚類の保全のために必要な魚類の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 学会が技術者・研究者向けに作成した標準版「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 調査・実験マニュアル ver.2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）に準拠しつつ、環境 DNA を利用した二次的自然環境に生息する淡水魚類調査を実施するに当たっての基礎的な情報や二次的自然環境における調査特有の情報、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」（2020 年 4 月 3 日発行）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、ため池や水路など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、本手引きでは大規模河川は対象ではありません。

目 次

はじめに

本手引きのご利用にあたって

1.	環境 DNA 調査を始める前に	1
1-1	環境 DNA 調査とは	1
1-2	環境 DNA 調査の流れ	2
1-2-1	調査計画のポイント	3
1-2-2	現地採水のポイント	4
1-2-3	分析のポイント	4
1-3	環境 DNA 調査の導入にあたって知っておくべきこと	5
1-3-1	環境 DNA 調査の特徴	5
1-3-2	環境 DNA 分析の種類・特徴について	8
1-3-3	環境 DNA 調査の注意点	10
1-3-4	偽陽性及び偽陰性に関する解説	12
2.	環境 DNA 調査の手順	15
3.	調査を実施する前に	16
3-1	環境 DNA 調査の実施の判断	16
3-2	調査計画	16
3-2-1	既存の調査結果や専門家の知見に関する情報の収集	16
3-2-2	調査地点（位置・地点数）・時期・頻度の設定	17
3-2-3	調査計画を検討する上での参考情報	19
3-2-4	採水方法の特徴と各採水方法に適した調査	22
3-2-5	事前の準備（立ち入り等）	23
3-2-6	安全管理	23
3-3	調査機材などの準備	24
4.	現地調査	25
4-1	環境 DNA サンプルの採水手順	25
4-1-1	採水地点での確認事項	25
4-1-2	採水準備	25
4-1-3	採水および塩化ベンザルコニウム液の添加	25
4-1-4	フィールドデータの記録	25
4-1-5	保管・輸送	25
4-2	フィールドデータの記録方法	29
5.	分析	30
6.	分析結果の判読	32
7.	分析結果の精査	33

おわりに

<巻末資料>

○用語集 35

<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 37
○参考資料 2 分析会社へお願いする分析工程記録表（例） 51
○参考資料 3 環境 DNA 調査結果のデータ入力項目の事例 53
○参考資料 4 調査計画を検討する上での参考情報 55
○参考資料 5 環境 DNA 分析に関する参考情報 79
○参考資料 6 環境 DNA 調査の事例紹介 89
○参考資料 7 データ公表に対する考え方 95
○参考資料 8 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..... 97

1. 環境 DNA 調査を始める前に

1-1 環境 DNA 調査とは

水中、土壌中、空気中など、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¹⁾。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。こうした技術は、専門的な用語では環境 DNA メタバーコーディングと言いますが、一般的には「網羅的解析法」などと呼ばれることがあります。本手引きの対象の魚類についても調査・研究が進められており、魚類の網羅的解析法（いわゆる MiFish 法）が開発されています^{2,18)}。MiFish 法は、水に含まれる多種の魚類を網羅的に検出できる分析方法で、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³⁾。この新しい技術は野外の河川や湖沼、沿岸域などの魚類調査に利用されています。例えば、日本全国の海岸線沿いの魚類群集調査では、多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⁴⁾。

この環境 DNA 分析を利用した調査は、従来の魚類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の比較的簡易です。このため、上述した魚類群集調査は、全国 528 地点をたった 3 ヶ月間という短い期間で行われました⁴⁾。このように環境 DNA 分析によって、多地点・多種のデータを短期間で効率的に取得できるようになっています。しかし、現地水を汲んでから、最終的な結果（魚種リスト）を得るまでには、いくつかの手順があります（図 1-1）。

本手引きは、環境 DNA 分析を利用した魚類調査のうち、主に多種の魚類を網羅的に調べることが可能な網羅的解析法（MiFish 法）を用いて、二次的自然環境に生息する淡水魚類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、分析作業）での考え方や注意事項などについて記述しています。

まず、本章では、これから環境 DNA 調査を導入するか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。

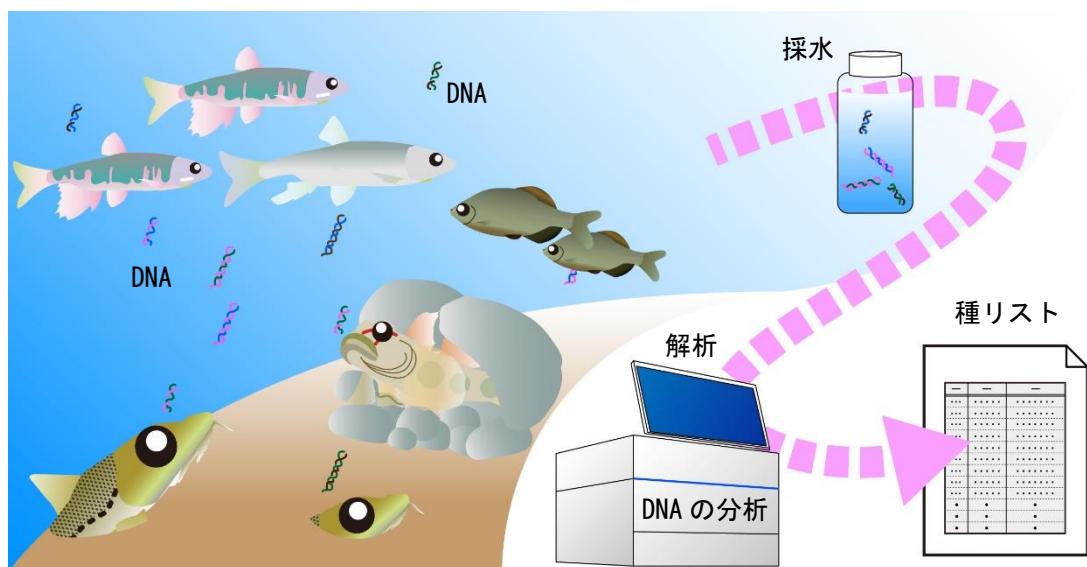


図 1-1 環境 DNA 調査のイメージ図

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」・「現地採水」・「分析」の3つの段階があります（図 1-2）。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。

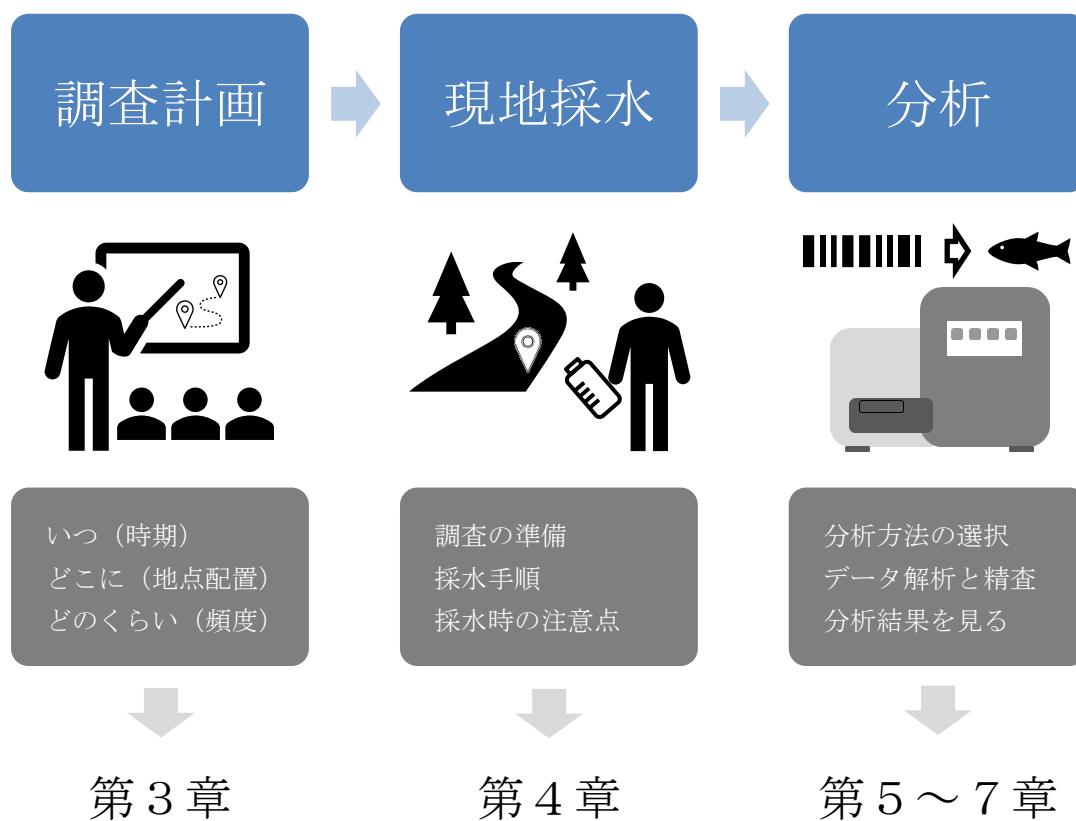


図 1-2 環境 DNA 調査の流れ



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。

- 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。
- 採水地点を決めるときの考え方は、基本的には捕獲調査で地点を選ぶ時と同じで、魚類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数を設定します。
- 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。
- 環境 DNA 調査では、1 地点あ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ます。



環境 DNA 調査を行った二次的自然環境の一例

1-2-2 現地採水のポイント

現地採水を行う際のポイントを、以下にまとめます。現地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、新品を使用するか、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、确实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などを入れて冷やして保管しましょう。



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。
- どんな種類の魚がいるかを調べたいときは「網羅的解析法」が、調べたい魚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 調査の導入に当たっては、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 調査の特徴

魚類を含め、水中の生物の分布等を調べることは難しく、二次的自然環境での淡水魚類調査においても、これまで定置網や投網など主に捕獲を主体とする調査が行われています。これらの手法は、「専門的な技術、労力、費用が必要なこと⁶⁾」、「確認できる種にバイアスがかかること⁶⁾」、「捕獲した魚種の同定に知識が必要なこと⁶⁾」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 分析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種の DNA 分子の有無を調べるため、従来調査との大きな違いは、「調査対象となる魚類を捕獲しないこと⁶⁾」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）⁷⁾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）⁸⁾」、「現地での調査費用を抑えること⁹⁾」ができ、「広範囲・多地点で調査を実施すること¹⁰⁾」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はなく、生息地への立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 (立入りには注意が必要)	必要に応じて申請等 (立入りには注意が必要)
	調査機材	採水キット (P.21 参照)	漁具等
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 (サンプルの郵送)	定置網・投網・タモ網による捕獲 ^{*2}
	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、体重等)
	サンプル処理等	網羅的解析法 (MiFish 法)	種の同定等
		種特異的検出	
費用 (1 検体当たり)		2~4 万円程度 ^{*3}	3~5 万円程度 ^{*4}

※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)。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ります。

※4 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 1-3 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、さらにそれらを効果的に組み合わせて実施する。

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 1-3 環境 DNA 調査と従来調査の特徴

また、その他の環境 DNA 調査の利点としては、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う点が挙げられます。

一方で、環境 DNA 調査では、例えば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、ニゴロブナなど）は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（背鰭条数や鰓耙数など）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、例えば調査を行った地域で稚魚や幼魚が確認できた場合、そこでの繁殖が推測される情報をなども合わせて取得することができます。

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、魚類の環境 DNA 調査において、種の識別性に注意を要するものについては、参考資料 1 で確認してください。

1-3-2 環境 DNA 分析の種類・特徴について

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 (MiFish 法)」と「種特異的検出法」の2つの手法があります¹¹⁾。

網羅的解析法 (MiFish 法) は「水中に漂う DNA に対して網羅的に種を検出する手法」で、調査範囲内で生息の可能性がある種が分かります。一方、種特異的検出は「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 (図 1-4)。

● 「網羅的解析法 (MiFish 法)」の特徴

- ・水中の DNA を網羅的に検出し、種組成をまとめて明らかにすることができる。¹²⁾
- ・共通の MiFish プライマーを用いる²⁾。
- ・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⁷⁾。

● 「種特異的検出法」の特徴

- ・対象種を限定して、その DNA を精度良く検出できる¹³⁾。
- ・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り⁸⁾、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⁶⁾。

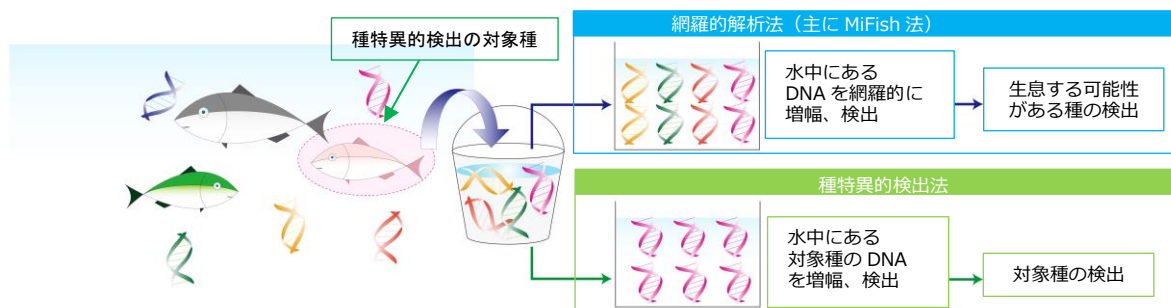


図 1-4 網羅的解析法 (MiFish 法) と種特異的検出法のイメージ

網羅的解析法 (MiFish 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 (MiFish 法) についても魚類相や分布の把握に活用されつつあり、環境省では二次的自然環境における淡水魚類調査への有効性を、国土交通省では河川事業への適用性¹⁴⁾を検討しています。

図 1-5 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良いでしょう。

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たり、迅速かつ効果的な対策につなげることが期待できます。

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

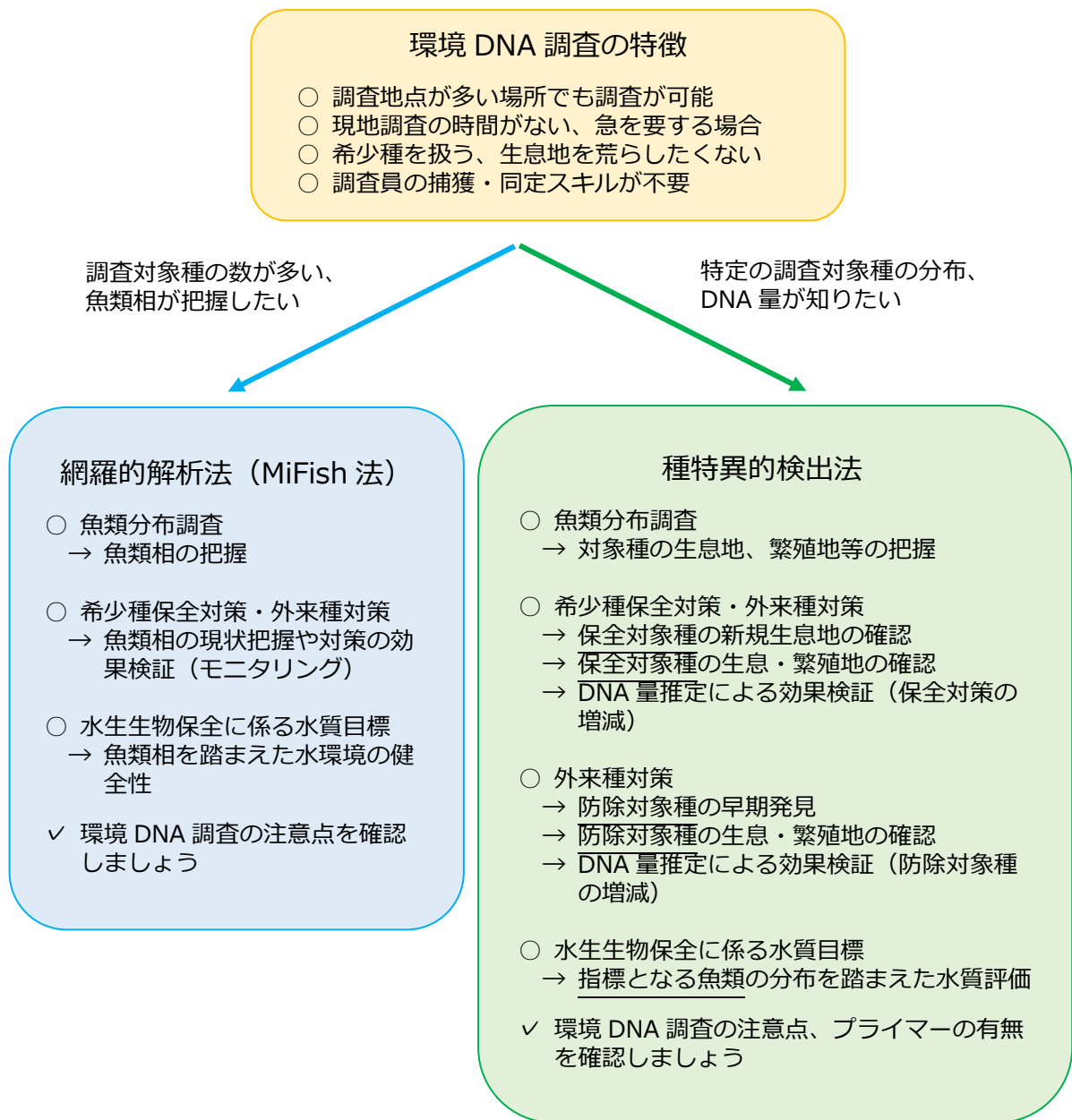


図 1-5 環境 DNA 調査の特徴と各検出方法で活用可能な保全施策の例

1-3-3 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があります。それは以下の3つになります。

- ① 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⁵⁾(例、DNA が検出された魚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かわからない、環境 DNA は分解、劣化する。環境 DNA の反映距離は数百mと見積もられている¹³⁾)。
- ② 環境 DNA からは生物の状態がわからない⁵⁾(例、稚魚、成魚などの成育段階、生きているのかどうかかわからず、死体由来の DNA も検出⁷⁾)。
- ③ 調査対象魚種の DNA データがなければ分析ができない⁷⁾(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、繰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)⁷⁾」、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)⁷⁾」といった問題など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うる注意点及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 の構造(塩基配列(MiFish 配列)) が登録されていないと識別できない ⁷⁾ 。【▲】	事前に調査地に生息すると想定される種の塩基配列(MiFish 配列)が登録されているか、確認しましょう。	参考資料 1
	網羅的解析法(MiFish 法)で種を特定するために参照している DNA 内の領域(MiFish 領域)の塩基配列が、近縁種と差がない種は識別できない ⁷⁾ 。 ex.チチブとヌマチチブなど【▲】	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「二次的自然環境に生息する淡水魚類のリスト」の「MiFish 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
	環境 DNA の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 ⁷⁾ 。【▲・△】	「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。	P.15-17
	生活排水や養殖場の排水などの影響を受ける ¹³⁾ 。ex.海産魚、一部のサケ科魚類など【△】		
	特定の種の DNA が優占していると、少数の種が検出されにくい ¹³⁾ 。ex.優占種の繁殖期や集団で遡上・流下する時期など【▲】		
冬場は環境 DNA の検出率が下がる ¹³⁾ 。【▲】			

【▲】…偽陰性の要因となるもの、【△】…偽陽性の要因となるもの

表 1-2 環境 DNA 調査の注意点とその対応策（続き）

環境 DNA 調査の注意点		対応策	紹介 ページ
現地調査	環境 DNA は分解、劣化していく ¹⁵⁾ 。【▲】	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、ろ紙の保存に安定剤（RNAlater）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）。	P.22-25
	死体由来の DNA も検出する。【△】	「4-1 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。	
	水質により分析が阻害されて生息している種が確認されない ¹³⁾ 。ex.水の濁り、アオコ【▲】		
分析	網羅的解析法（MiFish 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。	P.27 参考資料 5
	採水時や分析時に人為的コンタミネーションが生じる ¹³⁾ 。【△】	「4-1 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。	P.22 P.27
	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、MiFish 法に係る誤同定チェックシートを活用しましょう。	参考資料 5 参考資料 8
	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【▲・△】	同様の事例や文献を調べたり、専門家へヒアリングをしましょう。	参考資料 5

【▲】…偽陰性の要因となるもの、【△】…偽陽性の要因となるもの

1-3-4 偽陽性及び偽陰性に関する解説

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。

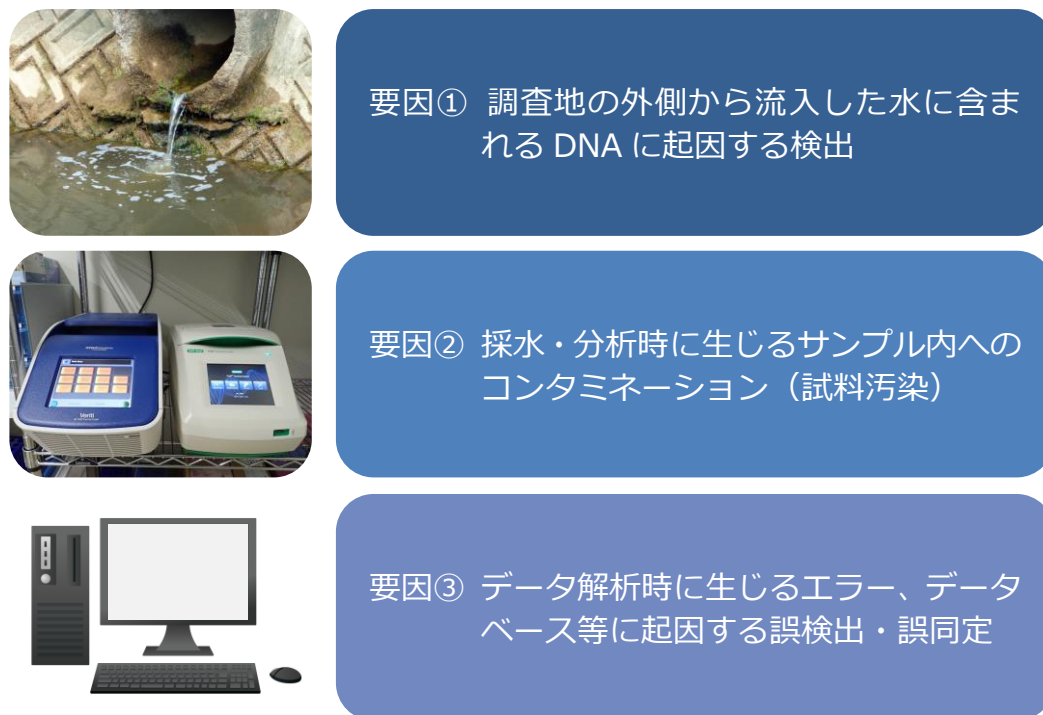


図 1-6 環境 DNA 調査で偽陽性が生じる要因

要因①の例としては、養魚場や釣り堀などから流れ出た飼育水や家庭や食品加工場など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、小河川や水路などの流水域では、調査地外からの流入 DNA の影響レベルは、流速や流入量など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、まだ詳細にわかっていません。

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 後の調整など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。

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 の検出などによる偽陽性があります。

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。



要因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



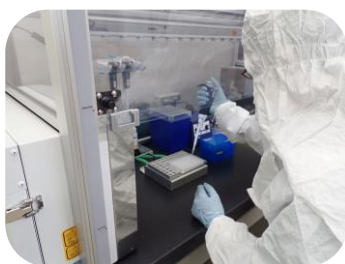
同じ調査地であっても、採水する位置や時間（時期）、種の生息密度などの影響によって、種が採水地点に生息する確率はばらつきます。



要因② 採水時に種の DNA がサンプルに含まれる確率の揺らぎ



種が採水地点に生息していた場合でも、種の生息密度や環境条件などの影響によって、種の DNA が採水したサンプルに含まれる確率はばらつきます。



要因③ 分析時に種の DNA が検出される確率の揺らぎ



採水したサンプルに種の DNA が含まれていた場合でも、分析時の分注操作などの影響によって、種の DNA が検出される確率はばらつきます。

図 1-7 環境 DNA 調査で偽陰性が生じる要因

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、餌環境など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、調査地点の水深など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 自体が水の流れなど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と考えられることから、採水地点における環境 DNA の存在状態は、時間とともに変化します。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 3-2-3 章に、詳細な検討結果が参考資料 4 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 溶液などは、分析時に全量を使用せず、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 (MiFish 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などが影響し、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。

2. 環境 DNA 調査の手順

ここからは、網羅的解析法（MiFish 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、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、参照ページを確認して下さい。

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、事前に相談しておくといでしょう。

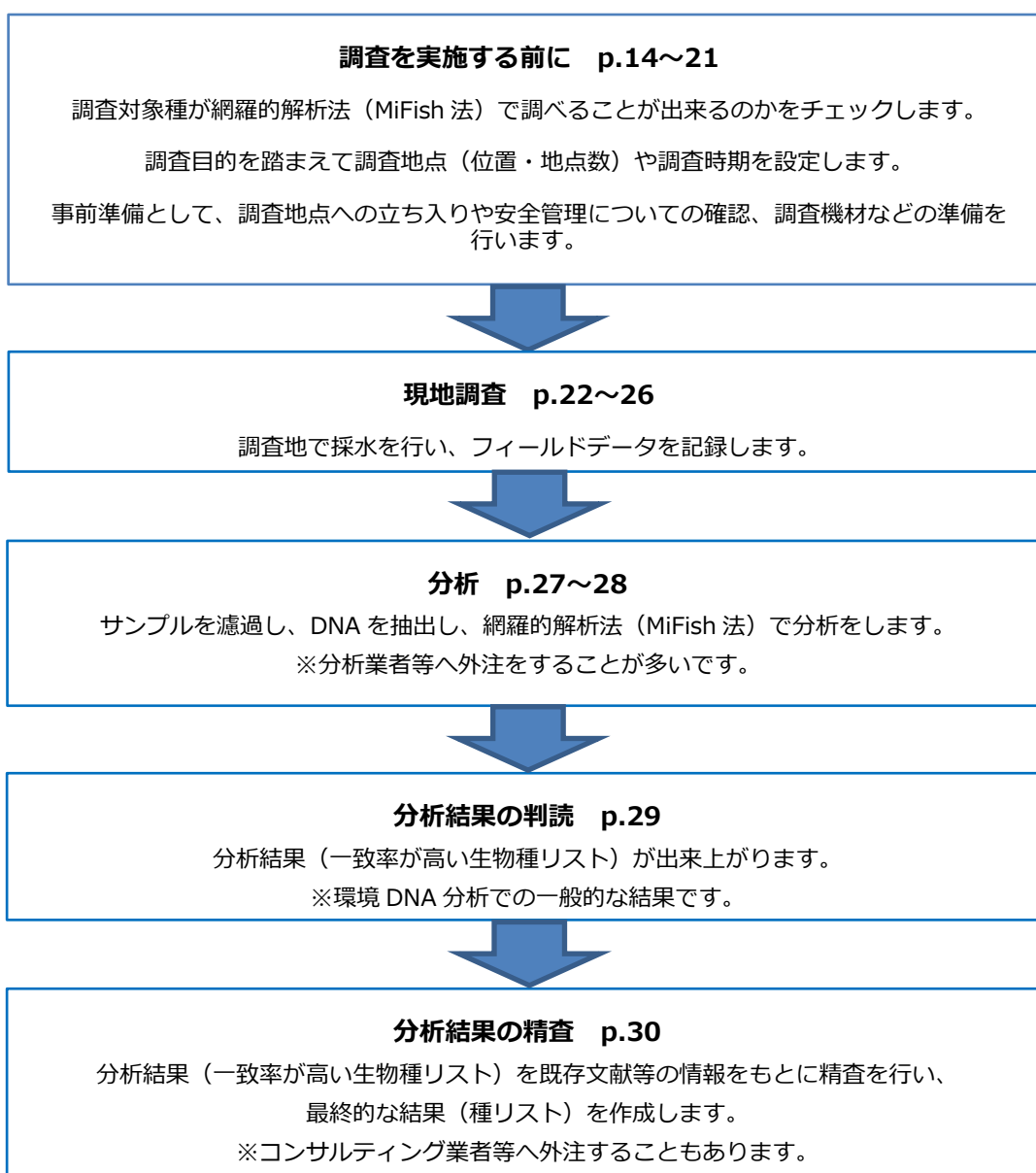


図 2-1 網羅的解析法（MiFish 法）を用いた環境 DNA 調査の手順

3. 調査を実施する前に

3-1 環境 DNA 調査の実施の判断

網羅的解析法 (MiFish 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」、「MiFish 領域の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ことが重要です。そこで、参考資料 1 を参考に、調査対象種が検出できるのか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。

3-2 調査計画

本手引きの対象である二次的自然環境には、湖沼、湧水地、水田・水路、ため池と様々な環境があります。このため、調査を行う環境や調査時期によって調査結果が異なるため、調査目的にあわせて、それらを設定する必要があります。また、採水方法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、調査地点の環境や調査目的を踏まえて、どのように調査地点や時期を設定したら良いのか、また、各採水方法の特徴とそれらに適した調査について紹介します。さらに、調査の事前準備、現地調査でのフィールドデータの記録例についても紹介します。

3-2-1 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、調査地点周辺に関する既存の調査結果や、地域の専門家の知見など、事前に情報を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の精査を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、農業活動など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ますので、環境 DNA 調査を計画する際は、表 3-1 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、水利施設など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た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)	<p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 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など）
文献調査	<p>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。</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 生物図鑑、学術文献、郷土史資料など ● 行政機関等による調査データ <ul style="list-style-type: none"> 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 <p>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。</p>
専門家ヒアリング	<p>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。</p>

3-2-2 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）¹³⁾

<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良く把握しておくことが重要（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 4
- ・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）がわかっている場合、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 4
- ・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、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 4

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¹³⁾

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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 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） <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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（偽陰性の防止）
	外来種対策の効果検証	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 上記と同様 <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 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） <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 上記と同様 <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 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） <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 代掻き時期など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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 上記と同様 <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 上記と同様 <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 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）

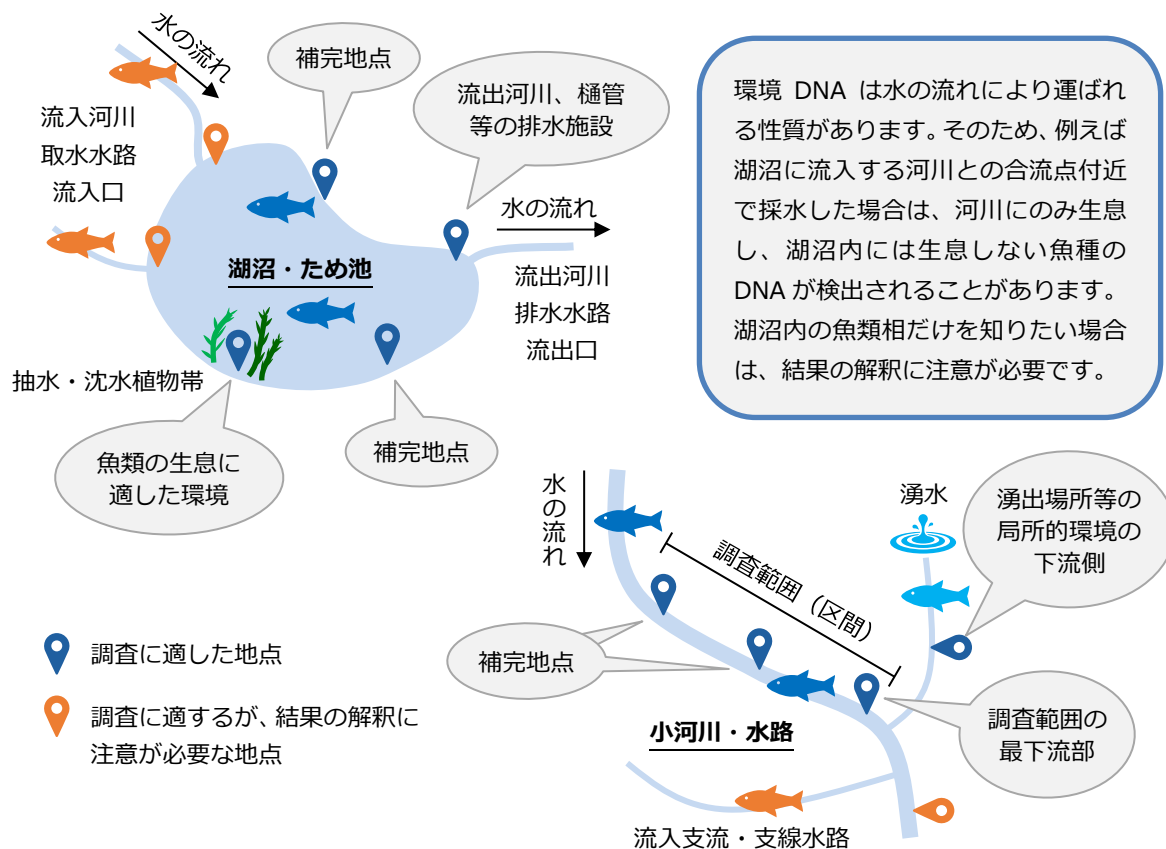


図 3-1 調査地点の配置例

3-2-3 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、本章に関しての詳細な内容については、参考資料4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

段階	項目	ポイント
調査計画	反復採水	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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)	<ul style="list-style-type: none"> 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)	<ul style="list-style-type: none"> 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。
	降雨の影響	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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。

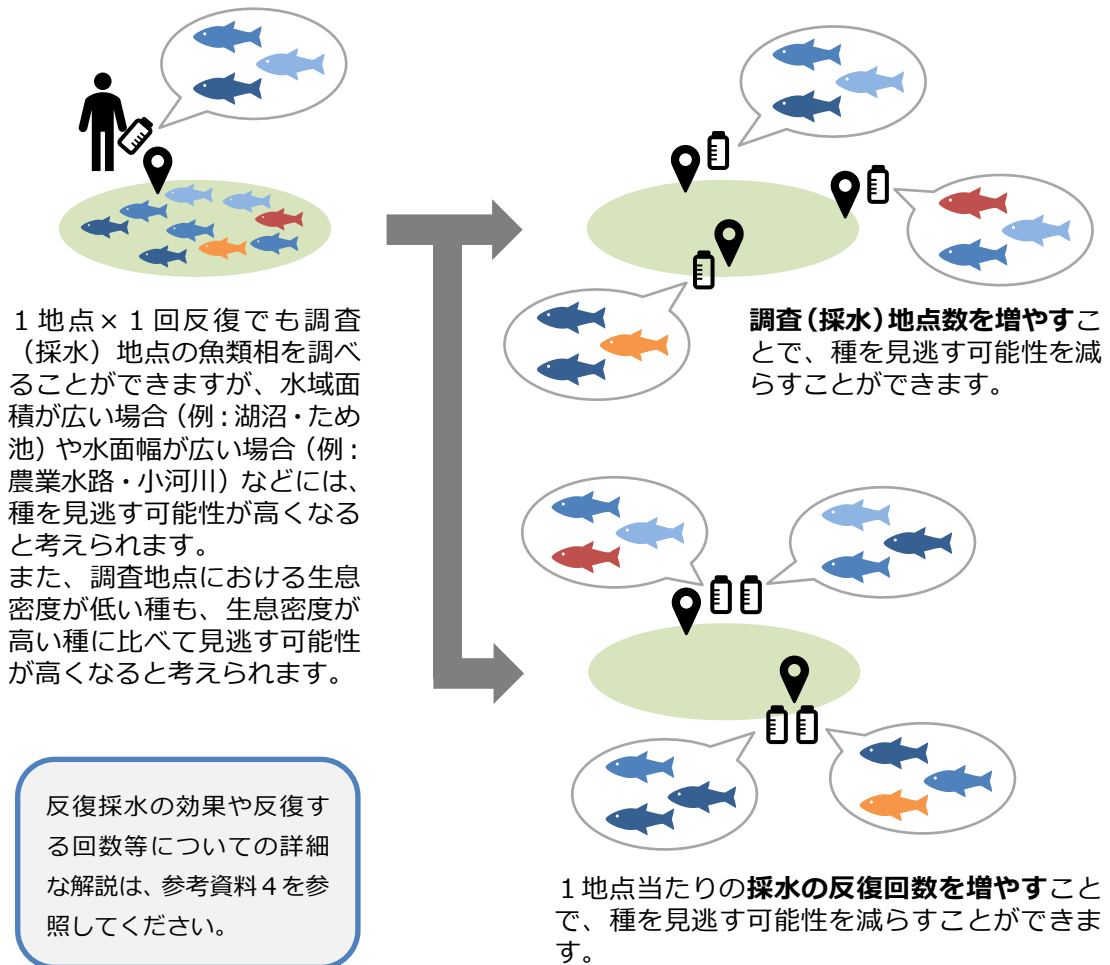


図 3-2 環境 DNA 調査における偽陰性を減らすための工夫（概要）

3-2-4 採水方法の特徴と各採水方法に適した調査

本手引きでは、「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」の3つの採水方法について紹介しています (P.23~25)。ここでは、各採水方法の特徴について紹介します。調査計画の立案の際には、調査に適した採水方法を選ぶとよいでしょう。

表 3-4 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 ¹³⁾ →手順は P.23 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1、2のような地点
2	バケツを用いた採水 ¹³⁾ →手順は P.24 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.25 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



直接採水の様子(写真1、2)



写真3 バケツ採水

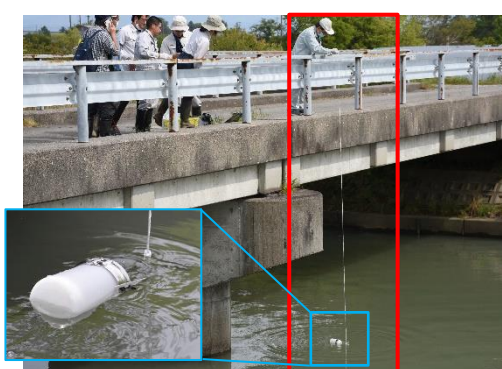


写真4 採水器採水

3-2-5 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、漁業協同組合など）がいる場合は連絡を入れ、調査同意を得ましょう。

※捕獲調査も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、漁業調整規則など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。

3-2-6 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、降雨による調査対象地の増水や夏季の熱中症など、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/>



気象庁 高解像度降水ナウキャスト

<https://www.jma.go.jp/jp/highresorad/>



国土交通省 川の防災情報

<http://www.river.go.jp/portal/>



環境省 熱中症予防情報サイト

<http://www.wbgt.env.go.jp/>



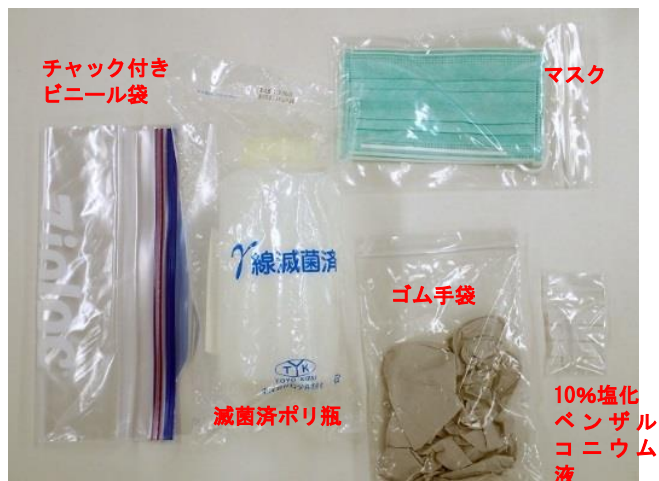
3-3 調査機材などの準備

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、事前に相談すると良いでしょう。

<1 地点あたりの採水キット> ^{xiii}

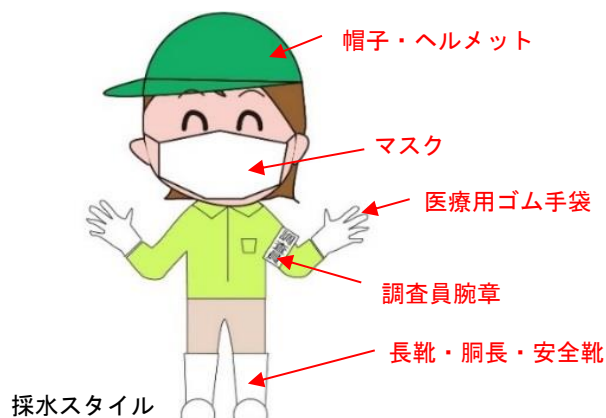
- ・滅菌済ポリ瓶（1L）
- ・10%塩化ベンザルコニウム液（1.2mLに小分け）
- ・医療用ゴム手袋（2組）
- ・マスク（2組）
- ・チャック付きビニール袋（大）

※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>

- ・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（右図参照）

- ・ライフジャケット

※直接水際にアクセスする場合は必須



4. 現地調査

4-1 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。

4-1-1 採水地点での確認事項

- 1) 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）、特定の魚類が集団で産卵している、魚類の死がいがある等など、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。
- 2) 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。

4-1-2 採水準備

- 1) 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。
- 2) 作業時には使い捨てゴム手袋をはめる。

4-1-3 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（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ますので、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など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 3-4 に記載しています。

4-1-4 フィールドデータの記録

- 1) 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。
- 2) 水深、水温などを観測し、表 4-1 に示すフィールドデータを記録する。

4-1-5 保管・輸送

- 1) 採水したポリ瓶はクーラーボックスに入れ、保冷剤などで保冷して実験室へ輸送する。
- 2) 宅配便を使用する場合はクール便（4℃）とする。
- 3) 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、水面の浮遊物などを避けるよう、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、底泥の巻き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、地点などを記入する。



- 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など、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など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、地点などを記入する。



- 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。水面の浮遊物などを避けるよう、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あらかじめ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、地点などを記入する。



- 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 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 4-1 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 4-1 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などで調べてもよい	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	必須
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	濁りの程度を濁、微濁、透などの段階で記録 コンクリート護岸、水生植物など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、間接的に影響を与える要因など、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、郵送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（MiFish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）での該当箇所及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、プライマー情報など）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 2 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 4 年 3 月現在は ver. 2.2）。

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>

①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などが示されています。

②網羅的解析法（MiFish 法）では、プライマーの不適合の種は検出できない（偽陰性）

ヤツメウナギ類、アユ、ワカサギなど、網羅的解析法（MiFish 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。

魚類の環境 DNA 分析の手法には、主に「網羅的解析法 (MiFish 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 分析の手法及びデータ解析についてのさらに詳しい解説は、参考資料 5 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 (MiFish 法) と種特異的検出法

項目	網羅的解析法 (MiFish 法)	種特異的検出法
得られる結果	<ul style="list-style-type: none"> ● 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 (MiFish 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)。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 特定の種の環境 DNA の有無及び濃度 (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、生物量と関連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	<ul style="list-style-type: none"> ● 国際塩基配列データベースに、網羅的解析法 (MiFish 法) で使用する配列 (ミトコンドリア DNA の 12S リボゾーム 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、日本産の淡水魚類のほとんどの種において、網羅的解析法 (MiFish 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 で確認してください。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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 で確認してください。 ● PCR プライマーが設計されている種も、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	<ul style="list-style-type: none"> ● 1 度の分析で、複数の種の生息情報がわかる 	<ul style="list-style-type: none"> ● 網羅的解析法 (MiFish 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	<ul style="list-style-type: none"> ● 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 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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	<ul style="list-style-type: none"> ● 淡水魚類相のモニタリング ● 希少種等の調査対象種の探索 ● 外来種の駆除効果の確認 	<ul style="list-style-type: none"> ● 特定の魚種のモニタリング ● 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）に生息する魚類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魚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>

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/キンブナ	CACCGCGGTTAGA
Zotu4	9599	LC458044.1	100	Phoxinus steindachneri	アブラハヤ	CACCGCGGTTAAA
Zotu5	18244	LC385178.1	100	Rhinogobius fluviatilis / ssp.	旧トヨシノボリ種群	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魚類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5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に詳しい専門家に相談する必要もあります。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でしょう。また、参考資料8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、最終的な魚種リストを確定させています。

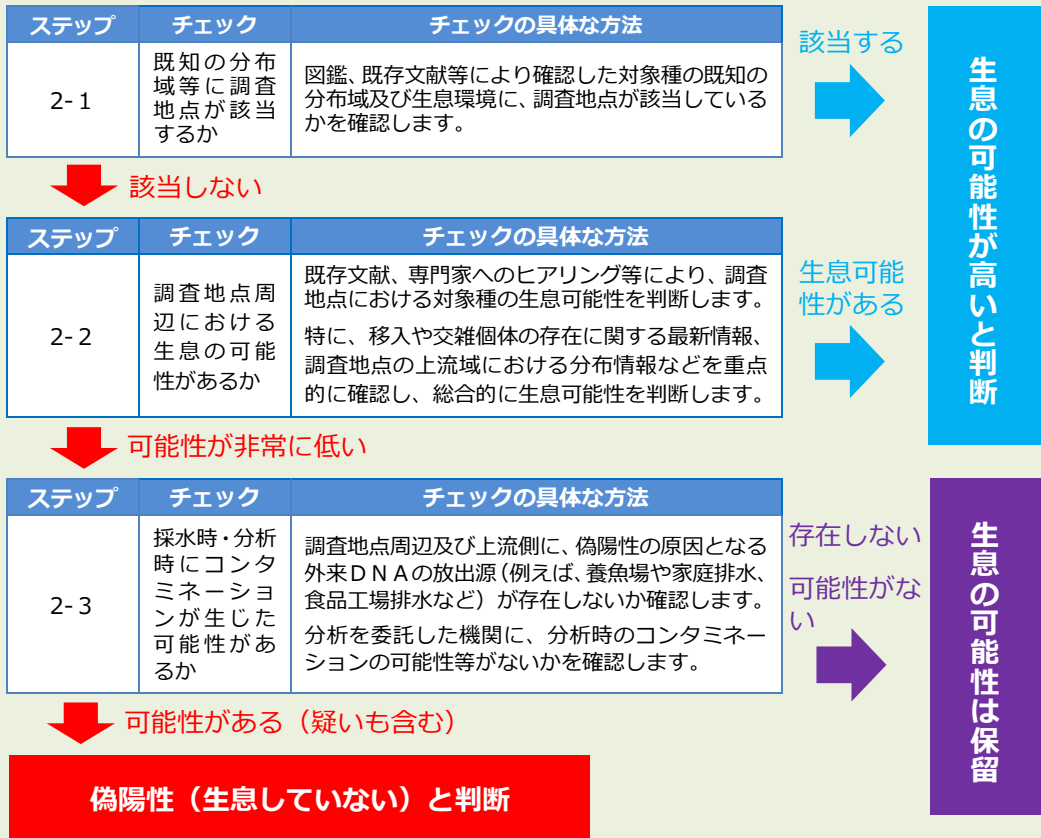
ステップ1 分析結果に誤った種名が記載されていないか？

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
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。



おわりに

二次的自然環境における淡水魚類の調査はこれまで捕獲や目視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られ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ることから、本手引きがこれから環境 DNA 調査を始める方々の役に立つことができれば幸いです。

本手引きは、令和 4 年（2022 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」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。

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

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及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）

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

➤ 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。

➤ 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もっている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。

➤ 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。

➤ 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で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。

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 I A 類、EN：絶滅危惧 I B 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 プライマー 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 プライマー 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 プライ 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	ウケクチウグイ	<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 用プライ 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 用プ 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-四国型)	<i>Lefua torrentis</i>	○					
200	ナガレホトケドジョウ(山陽-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 ryukyensis</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 sp.</i>	○	◎		NT		
244	タウナギ(本土産)	<i>Monopterus albus</i>	○	◎				
245	タウナギ(沖縄産)	<i>Monopterus sp.</i>	○	◎		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 sp. 1</i>	○		△	LP		
258	トミヨ属汽水型	<i>Pungitius sp. 2</i>	○		△	NT		
259	トミヨ属雄物型	<i>Pungitius sp. 3</i>	○		△	CR		
260	ムサシトミヨ	<i>Pungitius sp. 4</i>	○	◎		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	ネッタイイソイワシ	<i>Atherinomorus duodecimalis</i>	○	◎		DD		
275	ミナギンイソイワシ	<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	クルマサヨリ	<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 プライ 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>Varica hyalosoma</i>	○	◎		CR		
299	ワケイシモチ	<i>Fibramia lateralis</i>	×			DD		
300	ヒルギヌメリテンジクダイ	<i>Pseudamia amblyuroptera</i>	○	◎		DD		
301	ウラウチフエダイ	<i>Lutjanus goldiei</i>	×			CR		
302	ダイダイコシヨウダイ	<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>Pseudocalliurichthys 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 用プ 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 ryukyensis</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 niraikanaiensis</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	ギンポハゼ	<i>Parkraemia 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	イリオモテバイヌキバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius aonumai aonumai</i>	×					
436	イシガキバ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>Kraemia 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 オシヨロコマ 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> . <i>Biodiversity Data Journal</i> 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. <i>Limnology and Oceanography: Methods</i> 18: 437-445.
シシャモ	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>). <i>Environmental DNA</i> , 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. <i>Zoological Studied</i> , 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. <i>Ichthyological Research</i> , 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. <i>河川技術論文集</i> , 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> . <i>Limnology</i> , 23: 49-56.
イタセンバラ	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. <i>Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems</i> , 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. <i>Ichthy, Natural History of Fishes of Japan</i> , 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. <i>Ichthyological Research</i> , 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> . <i>Landscape and Ecological Engineering</i> , 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. <i>Landscape and Ecological Engineering</i> , 19: 79-86.

(余 白)

参考資料 2 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	濾過者	◎		
2	関連情報	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	分析日時	◎	
8	関係情報	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 (μL)	◎
22			1stPCR フォワードプライマー	濃度/液量 (μL)	○
23			1stPCR リバースプライマー	濃度/液量 (μL)	○
24			2ndPCR DNA ポリメラーゼ (酵素)	濃度/液量 (μL)	△
25			2ndPCR フォワードプライマー	濃度/液量 (μL)	△
26			2ndPCR リバースプライマー	濃度/液量 (μL)	△
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 3 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。参考にとると良いでしょう。

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）

※1 入力的重要性：●は必須項目、○は推奨項目

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	◎

※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 ATATTACAACGGCGTAAAGGG.....	organismNuclotideSeq uence	◎
	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 4 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 1-3-4 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 4- 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 4- 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	<p>(大規模水域、小規模水域[小河川]の事例)</p> <ul style="list-style-type: none"> 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。 <p>(小規模水域[ため池]の事例)</p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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	<p>(大規模水域の事例)</p> <ul style="list-style-type: none"> 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によって、さらに検出種数を増やす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時は、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。 <p>(小規模水域の事例)</p> <ul style="list-style-type: none"> 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によって、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 4- 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)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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	<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。

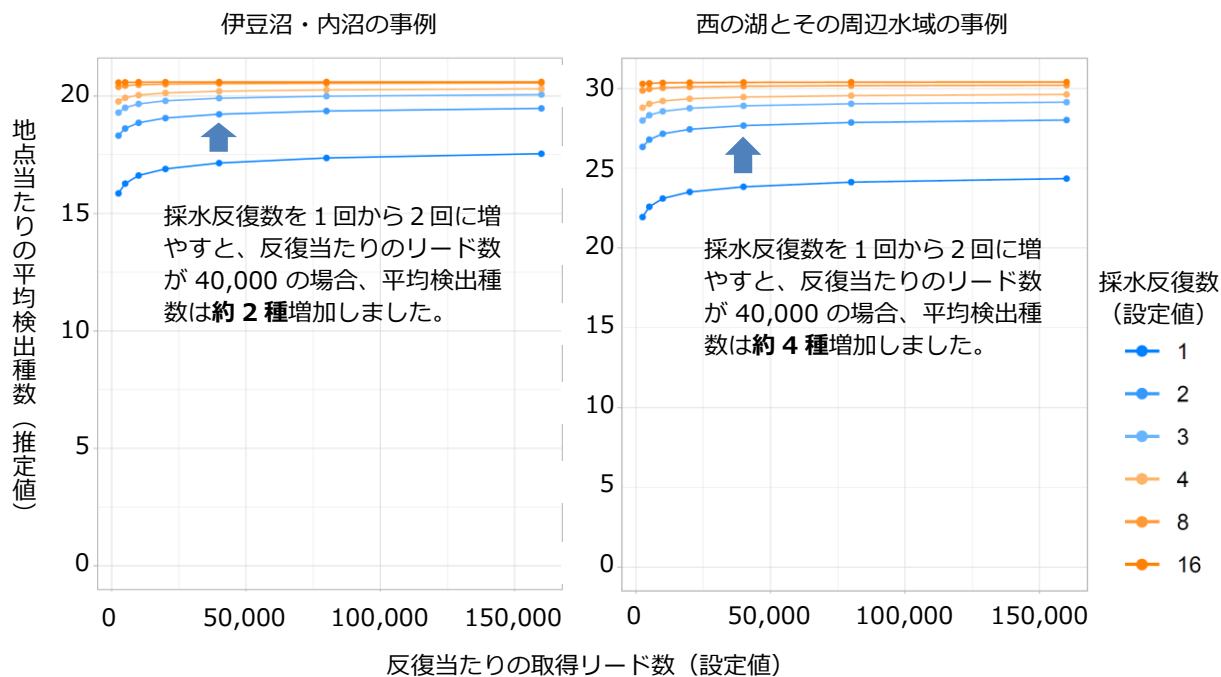
そこで、環境省では、個別の調査地における検討事例を積み重ねることで、調査計画時に指針や目安となりうる具体的な参考情報を集めることを目指し、令和 2 年度には伊豆沼・内沼、令和 3 年度には琵琶湖の内湖である西の湖とその周辺水域において、多地点・高頻度の環境 DNA 調査（以降、重点調査とします）を実施しました。

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 4- 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 4- 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 4- 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)

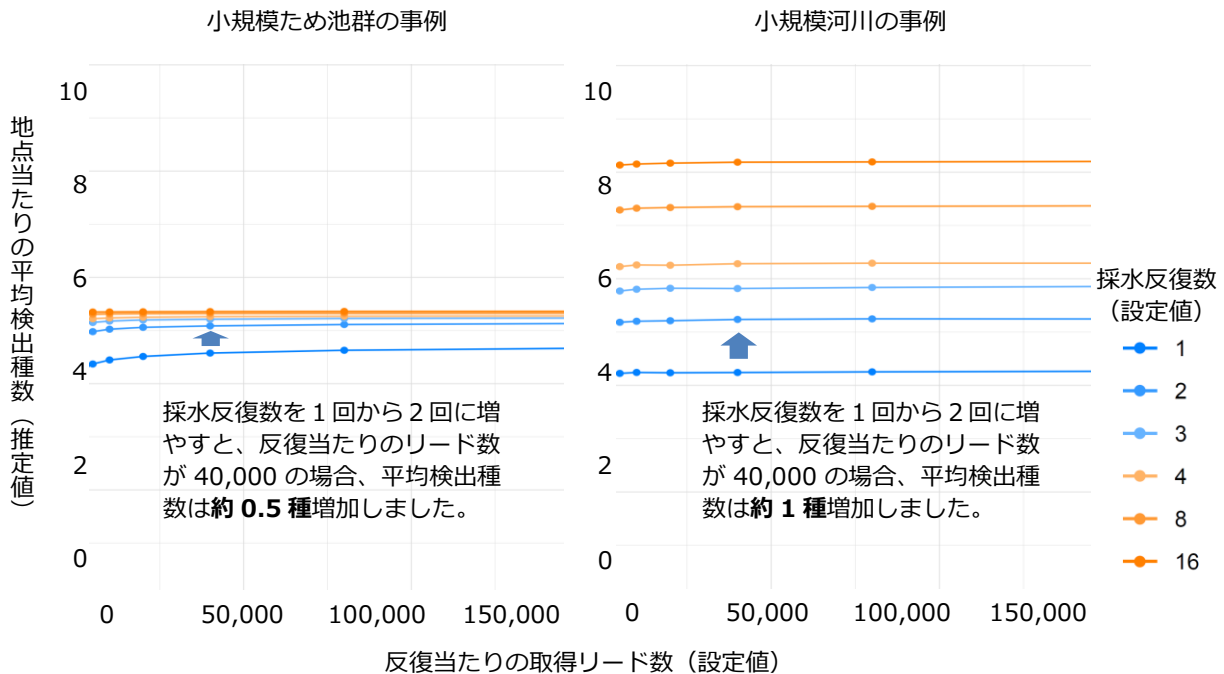
(2) 反復採水の効果：小規模水域の事例

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-参4-2）。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-参4-2 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）

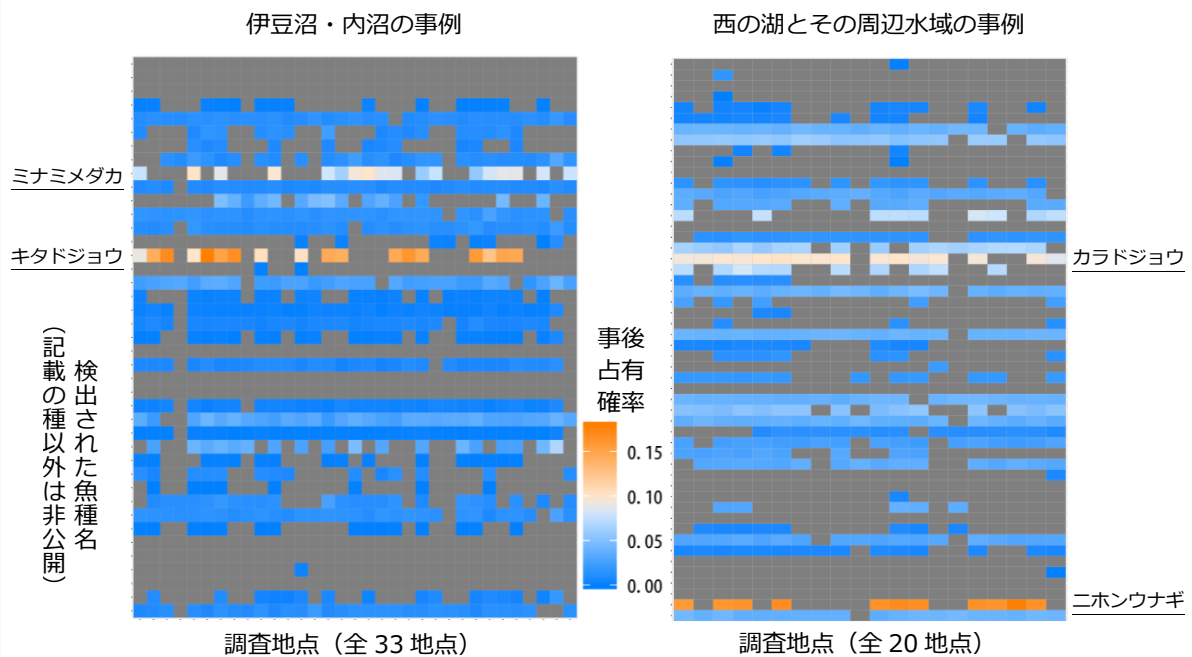


コラム 調査地が変わると、偽陰性が起きやすい種も変わる

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、1-3-4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、おおよ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-参4-3、図-参4-4)。

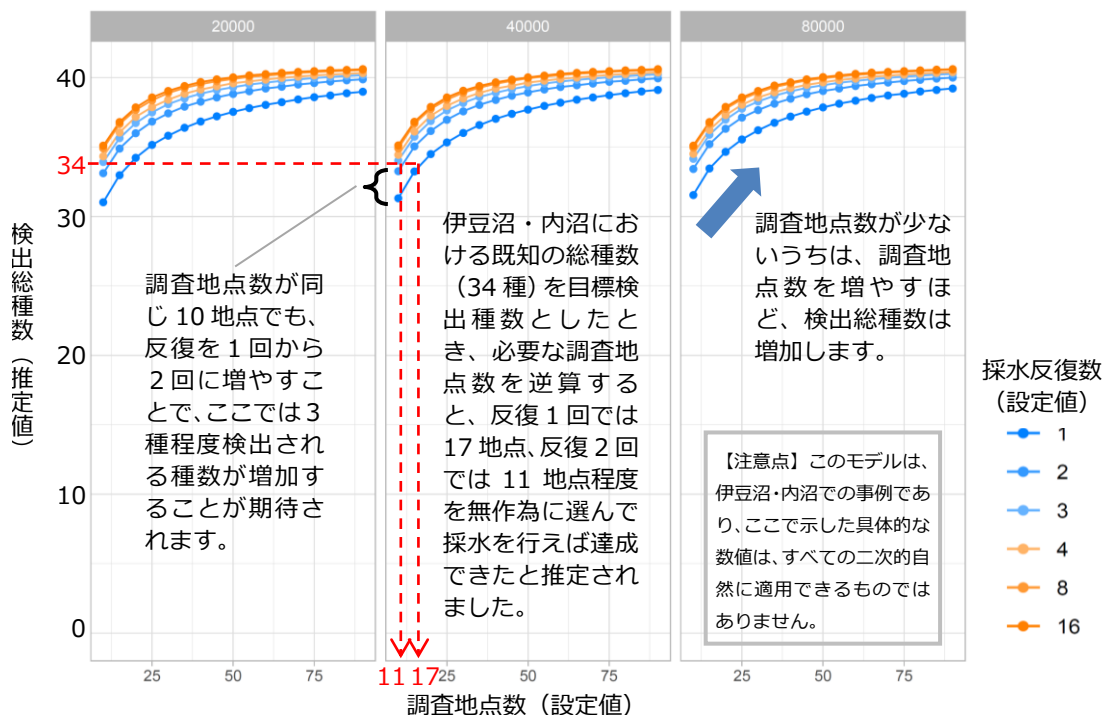
その結果、伊豆沼及び西の湖の両調査地において、調査地点数が少ないうちは、地点数を増やすほど検出される総種数は増加しましたが、その効果は30地点を超えるあたりから小さくなりました。また、1地点当たりの採水反復数は、1回(すなわち反復を取らない)のときよりも、反復を2回以上取ることで、より少ない地点数で検出総種数を増やす効果が得られることが分かりました。

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-参4-3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-参4-4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。

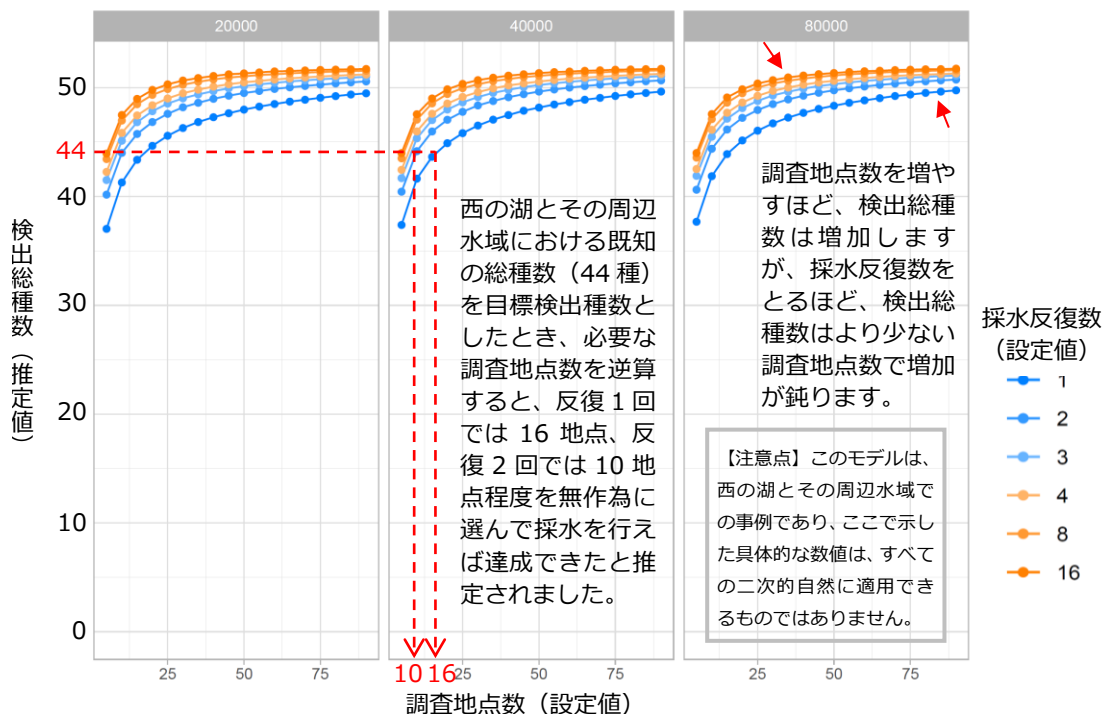
これらの結果から、伊豆沼(面積3.32km²)・内沼(面積1.05km²)や西の湖(面積2.85km²)と同等規模の止水域を対象に環境DNA調査を行う場合には、一つの目安として、反復1回(すなわち反復を取らないとき)では16~17地点、反復2回では10~11地点程度を調査地点数として設定すると、捕獲調査を行ったときと同等レベルの種数が検出できると期待されます。なお、この結果は、伊豆沼・内沼及び西の湖における推定値であり、異なる調査地においては、その地域の魚類相や調査範囲の広さ、湖沼や水路など環境の違い等によって必要な調査地点数は変化するものと考えられます。

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、次善の策として、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 4- 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 4- 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

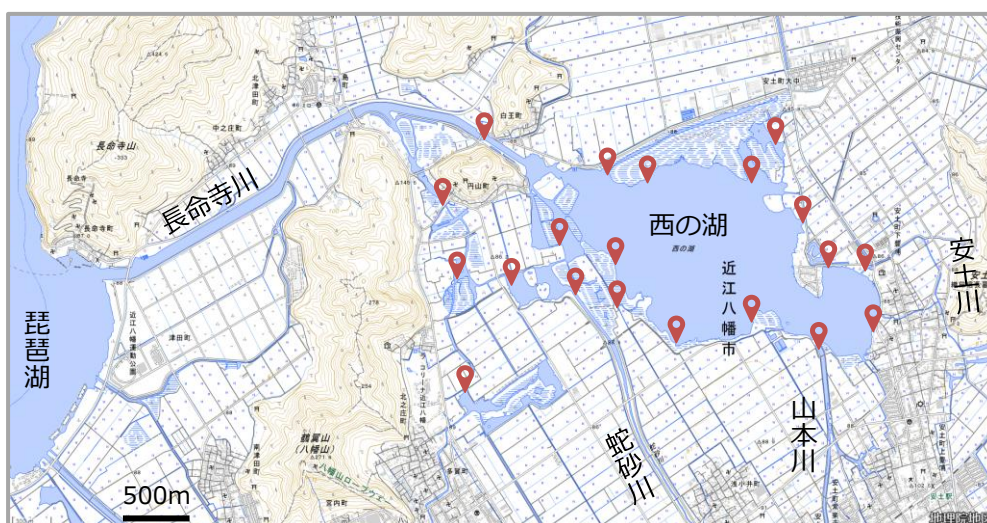
< 重点調査の内容に関する補足説明 >

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び出して計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）

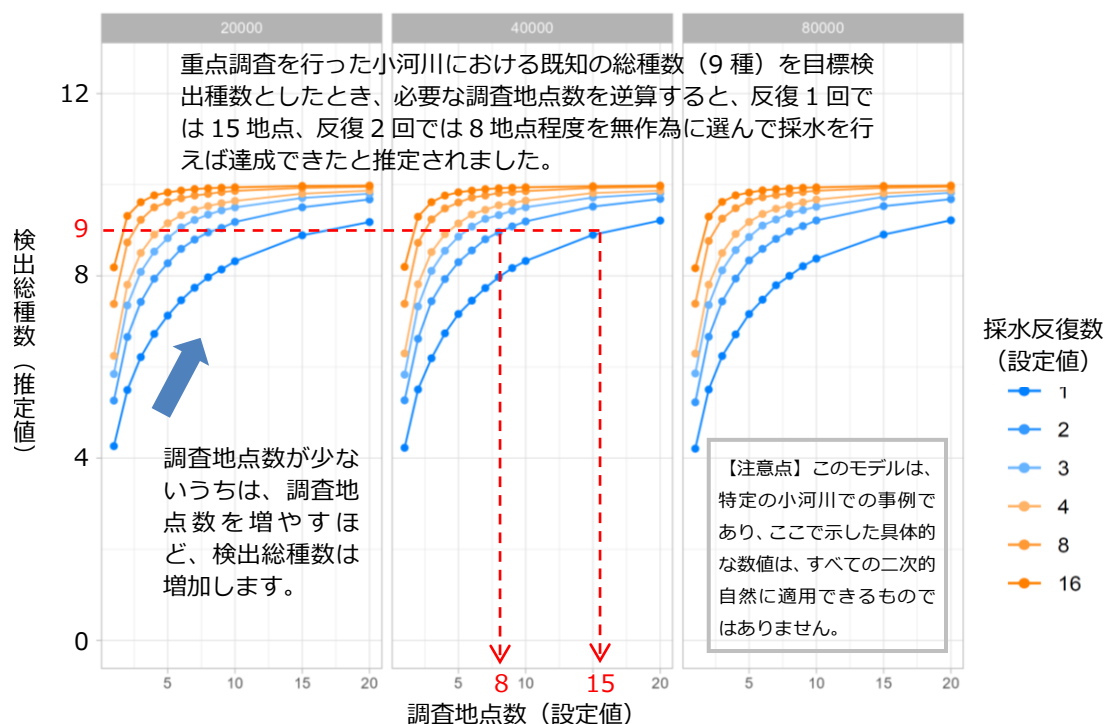
(4) 調査地点数の目安：小規模水域の事例

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-参4-5)。

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-参4-5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回ではその約半分当たる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-参4-5 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-参4-6)。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。

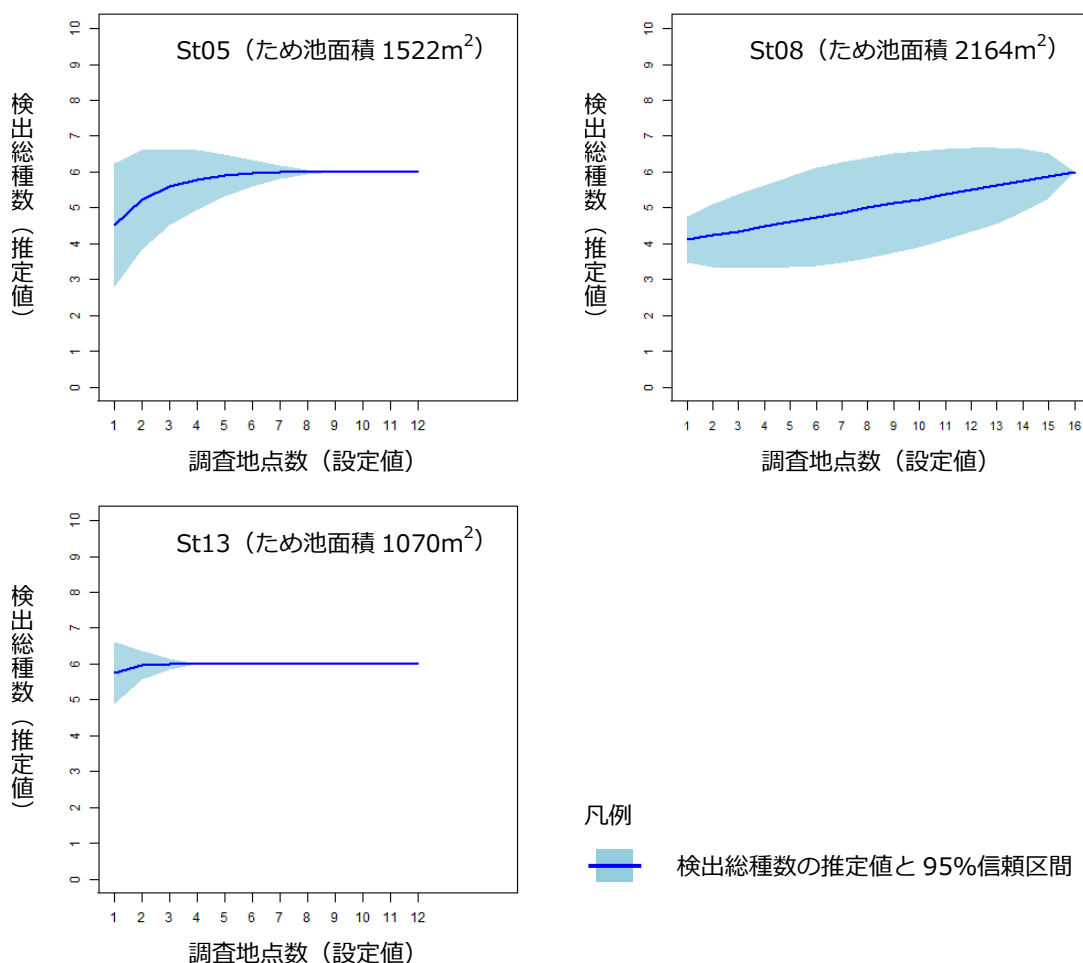


図-参4-6 1池当たりの調査地点数に対する検出総種数(推定値)の変化:小規模ため池の事例

(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-参4-7）。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。

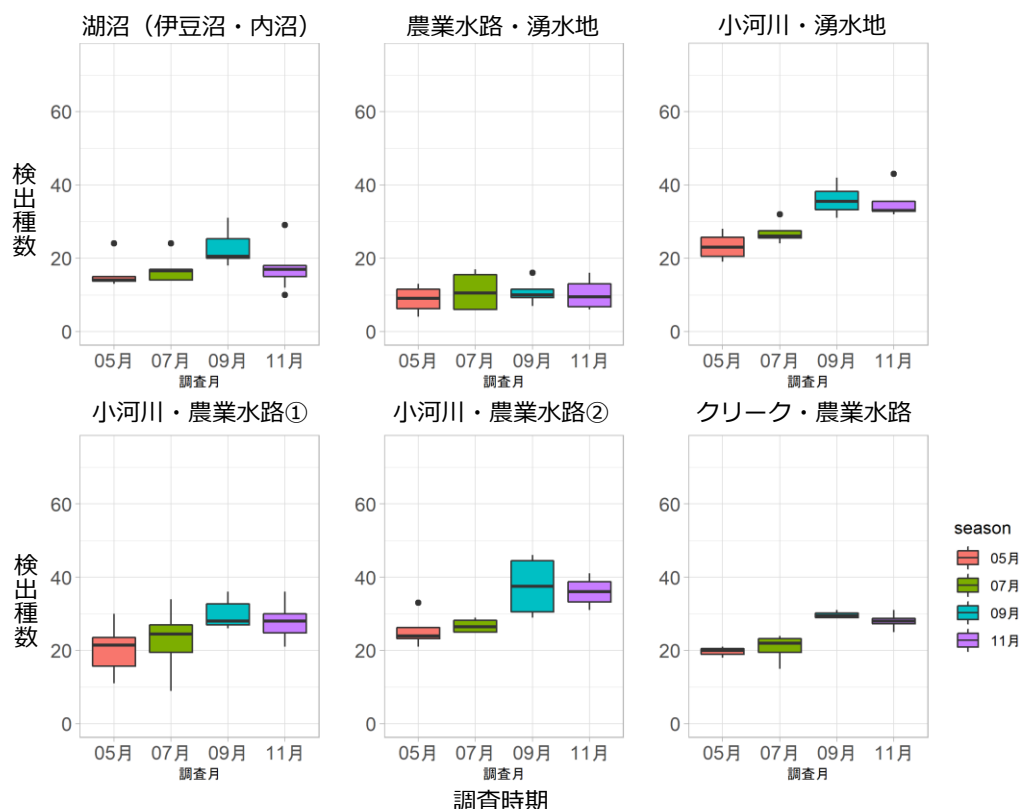


図-参4-7 調査時期による検出種数の比較

(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、DO、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 4- 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 4- 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」は雑種個体が持つ 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。

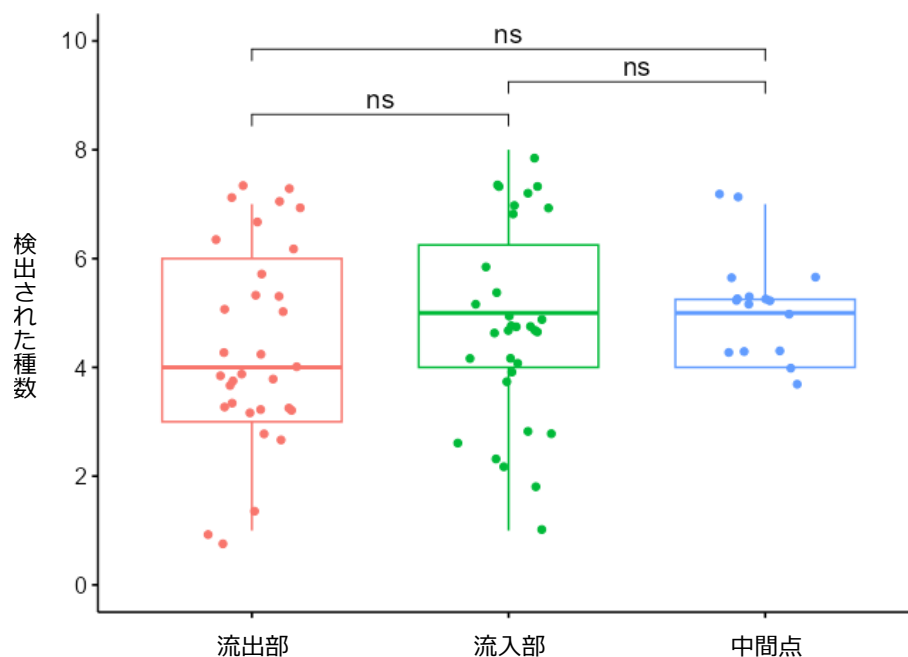
(7) 調査地点の環境条件の影響：小規模水域の事例

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いう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 4- 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 4- 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 4- 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。

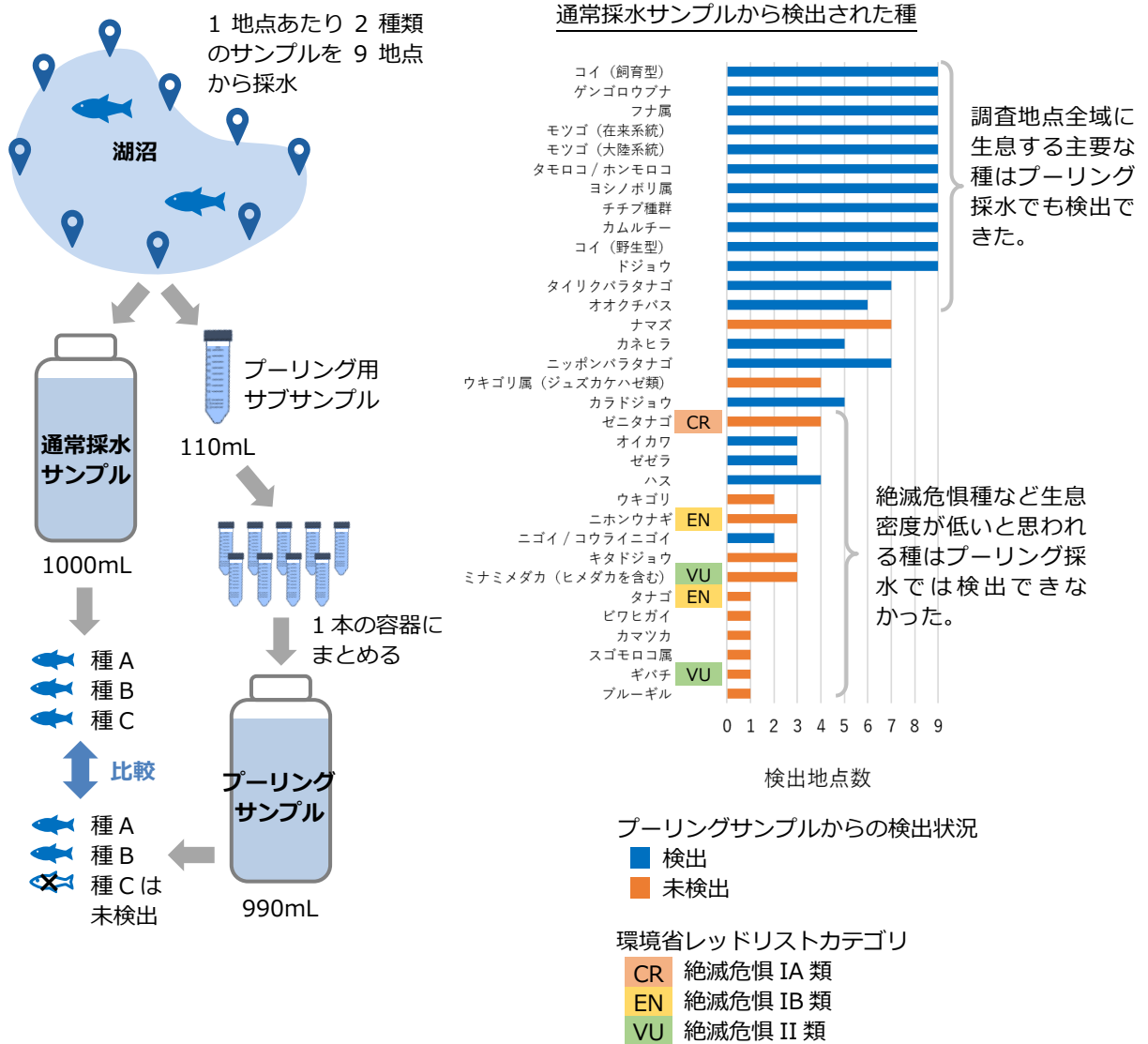
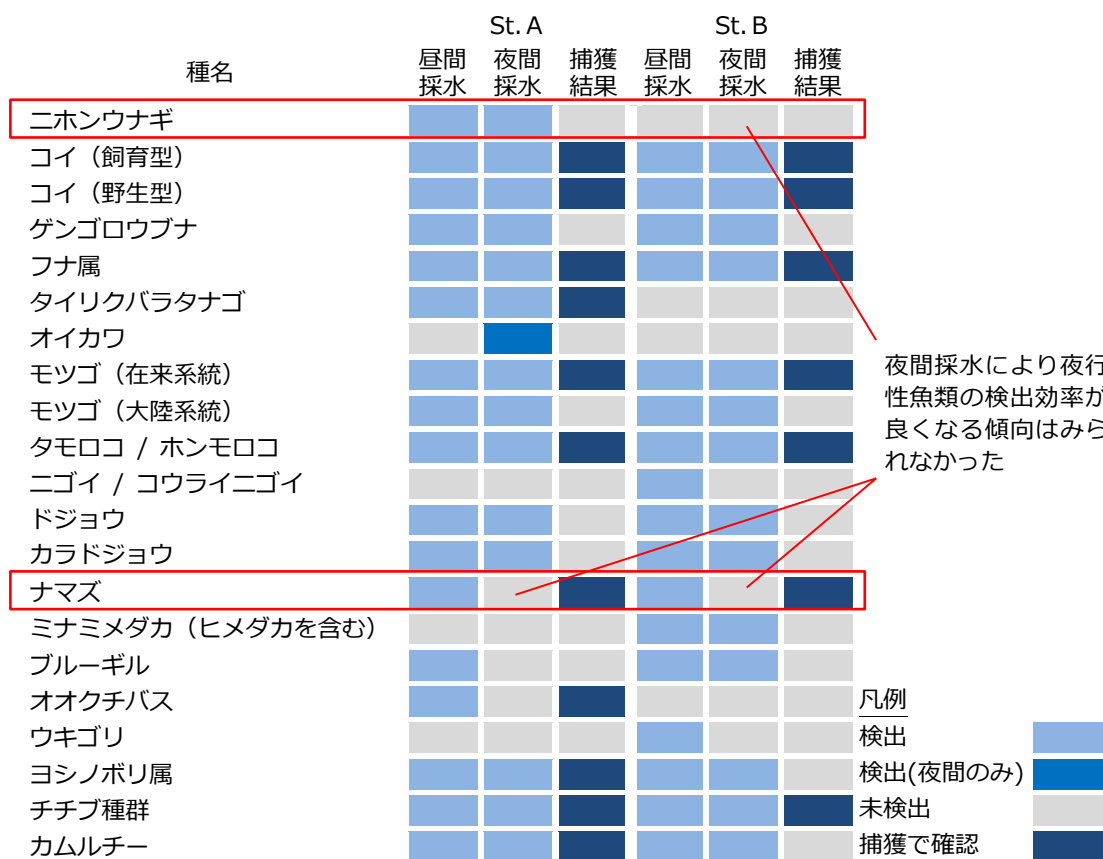


図-参 4- 9 通常採水とプーリング採水の比較

(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-参4-10）。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。



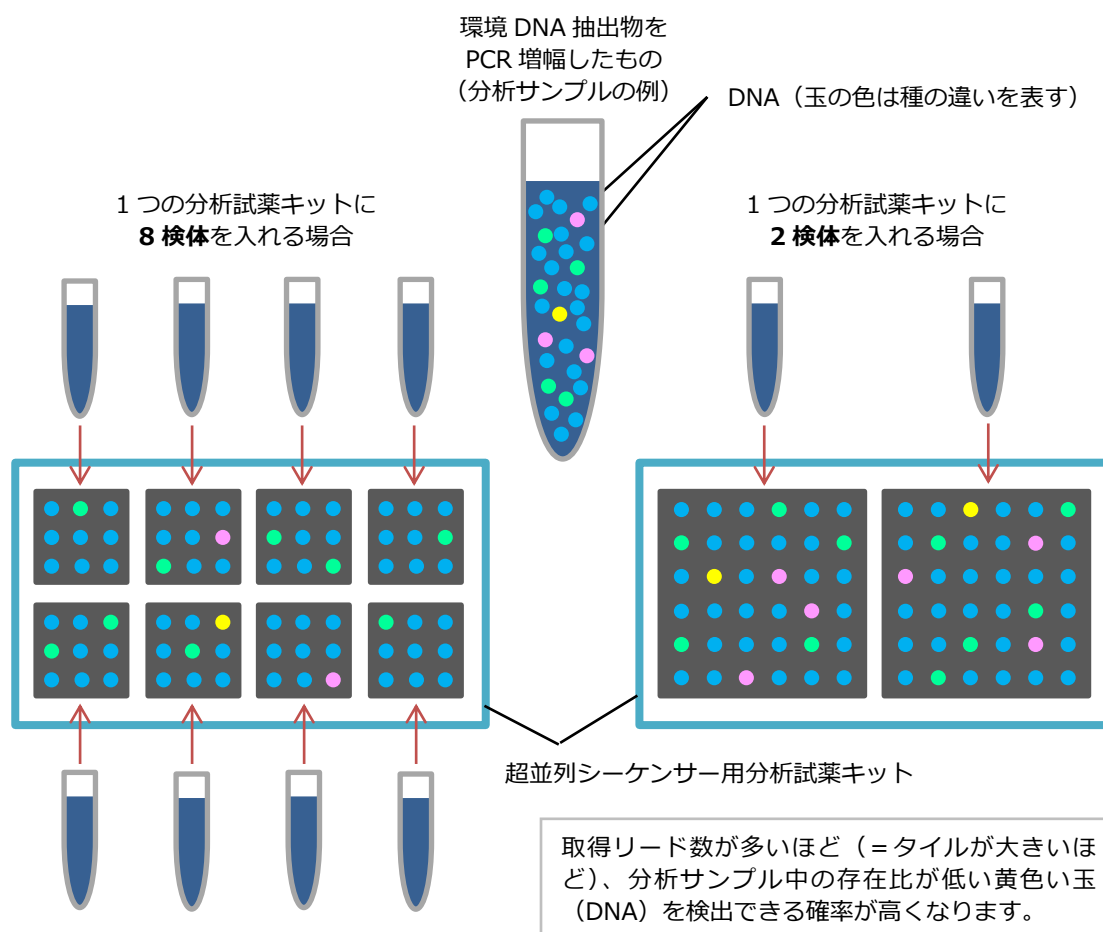
※夜間採水は、夏季の日没から2時間後（21時頃）に行いました。

図-参4-10 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 4-4 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となります。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。



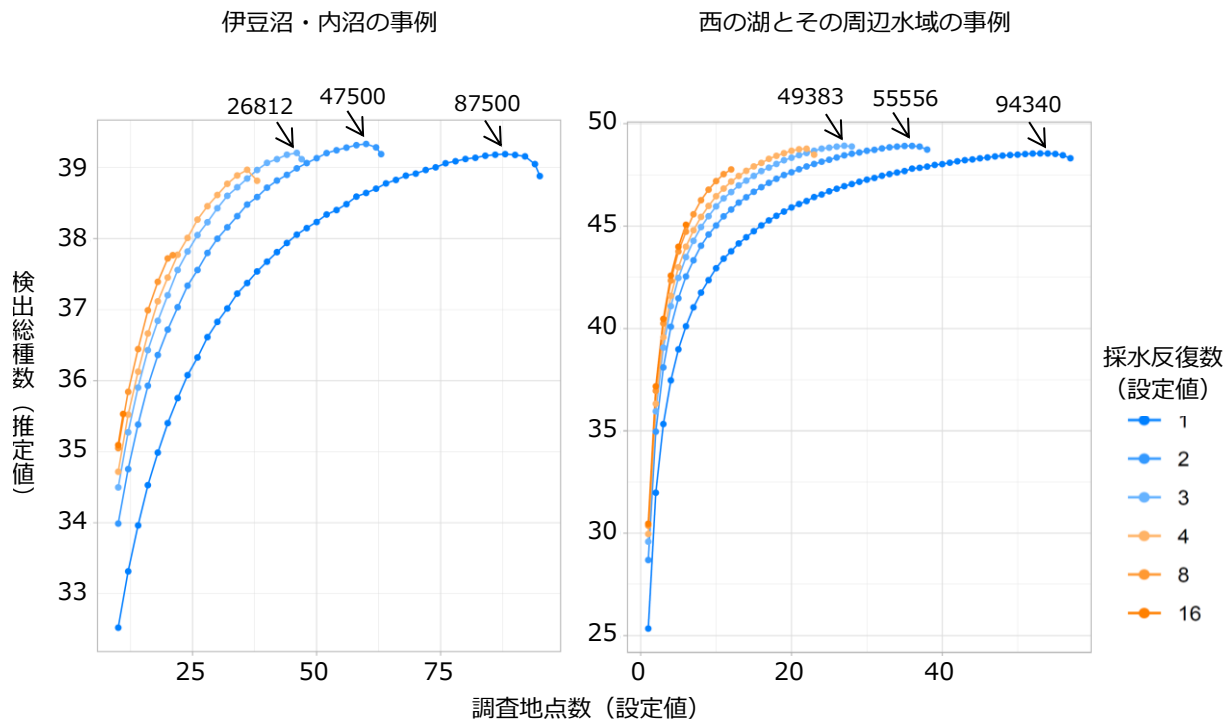
※分析試薬キットに並べられる灰色のタイルの総面積と 1 つのタイルに並べられる玉 (DNA) の個数がほぼ固定されているとき、タイルの数が同時に分析できるサンプルの検体数、タイルの大きさが 1 検体当たりの取得リード数を表しています。

図-参 4- 11 検体当たりの取得リード数の違いが種の検出感度に与える影響 (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 4-5）。

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 4- 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 100mL の採水サン

ブ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 4- 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。

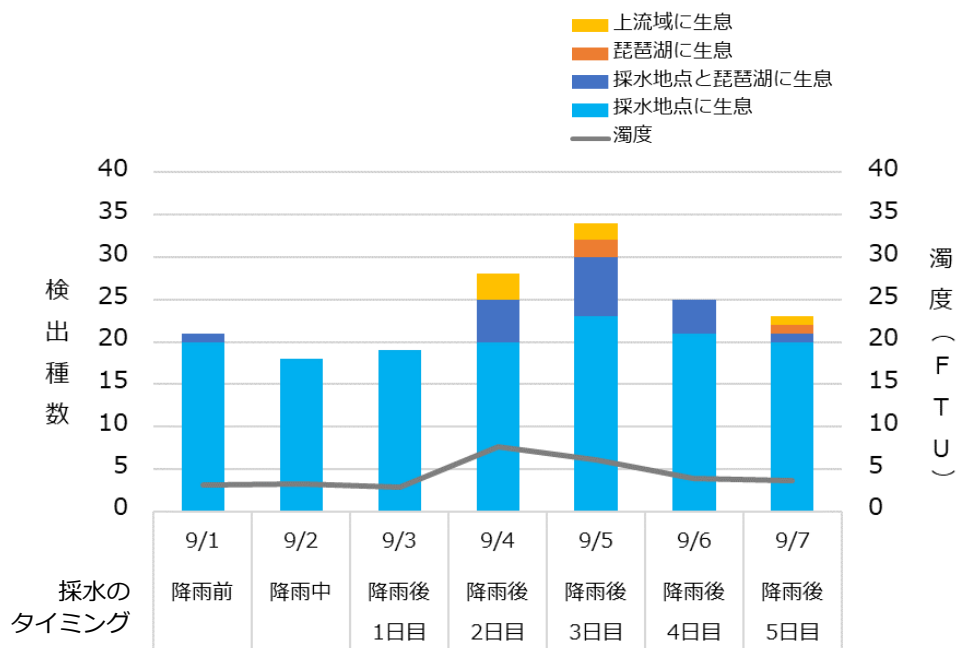


図-参 4- 13 降雨による濁りの発生状況とカテゴリ別の検出種数

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。

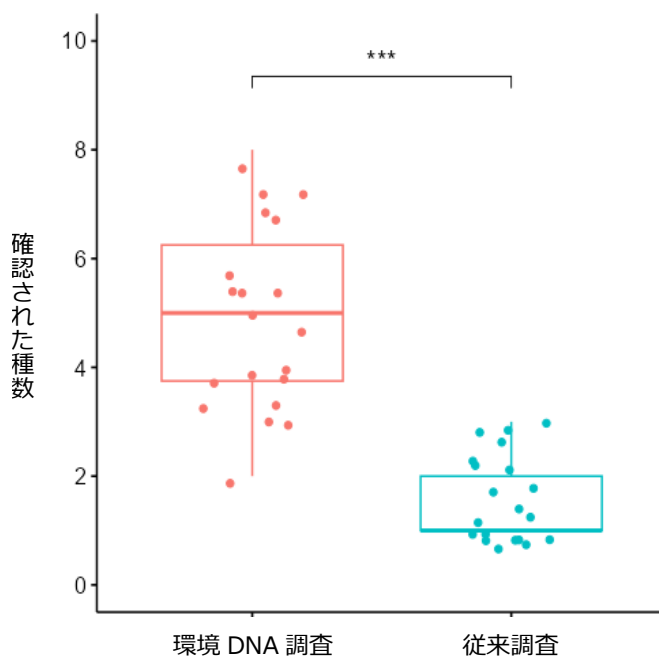
なお、ここで言う「濁り」とは、平常時と比べて明らかに濁りの度合いが増している場合を指しており、一部の沼やため池などのように、平常時においても環境水が濁っている場合は、平常時と判断される状態であれば、採水を行うことに問題はありません。

(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の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)}。

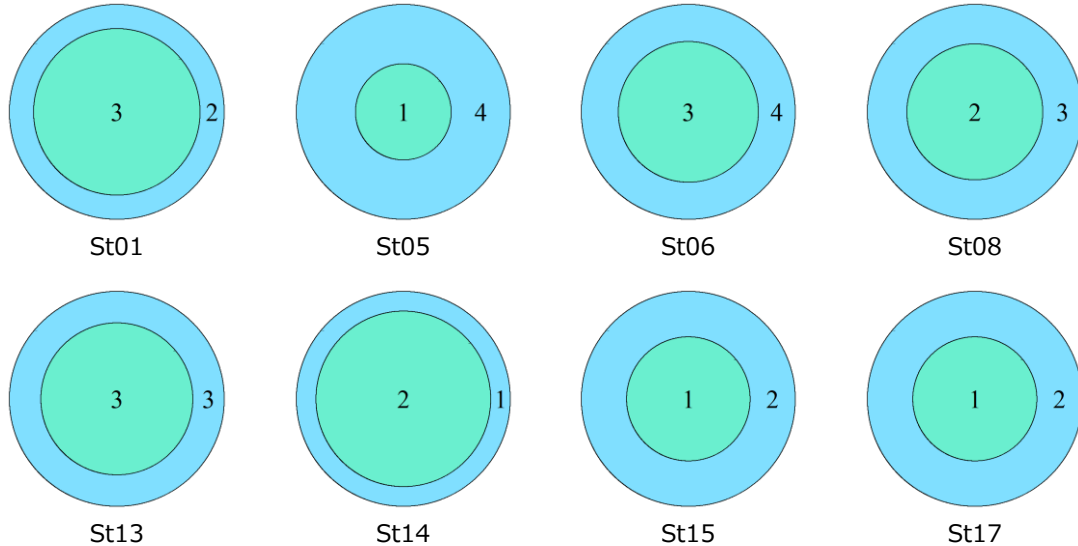
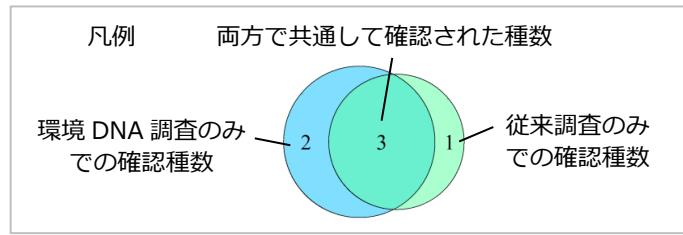


注1) 図中の「***」印はp値が0.001未満で有意差があることを示します。

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-参4-14 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-参4-15）。



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 4- 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 4- 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。

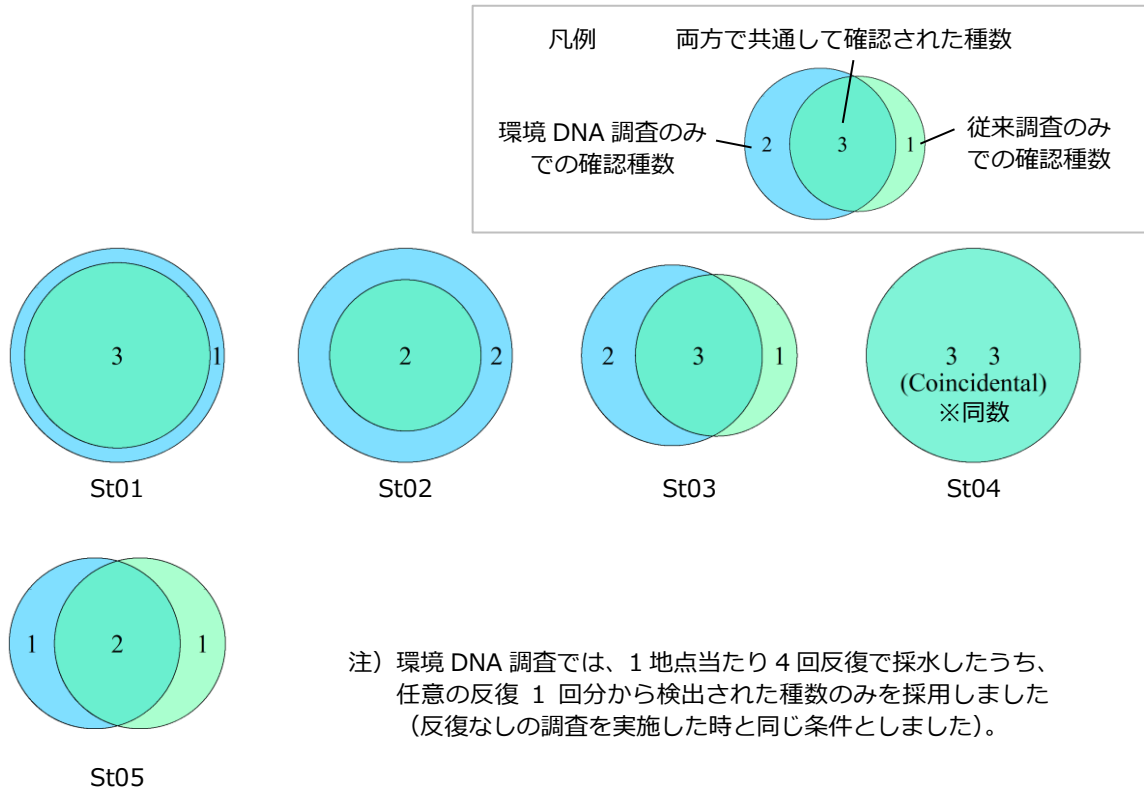


図-参 4- 16 環境 DNA 調査と従来調査による確認された種数の比較 (小河川)

(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 5- 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。

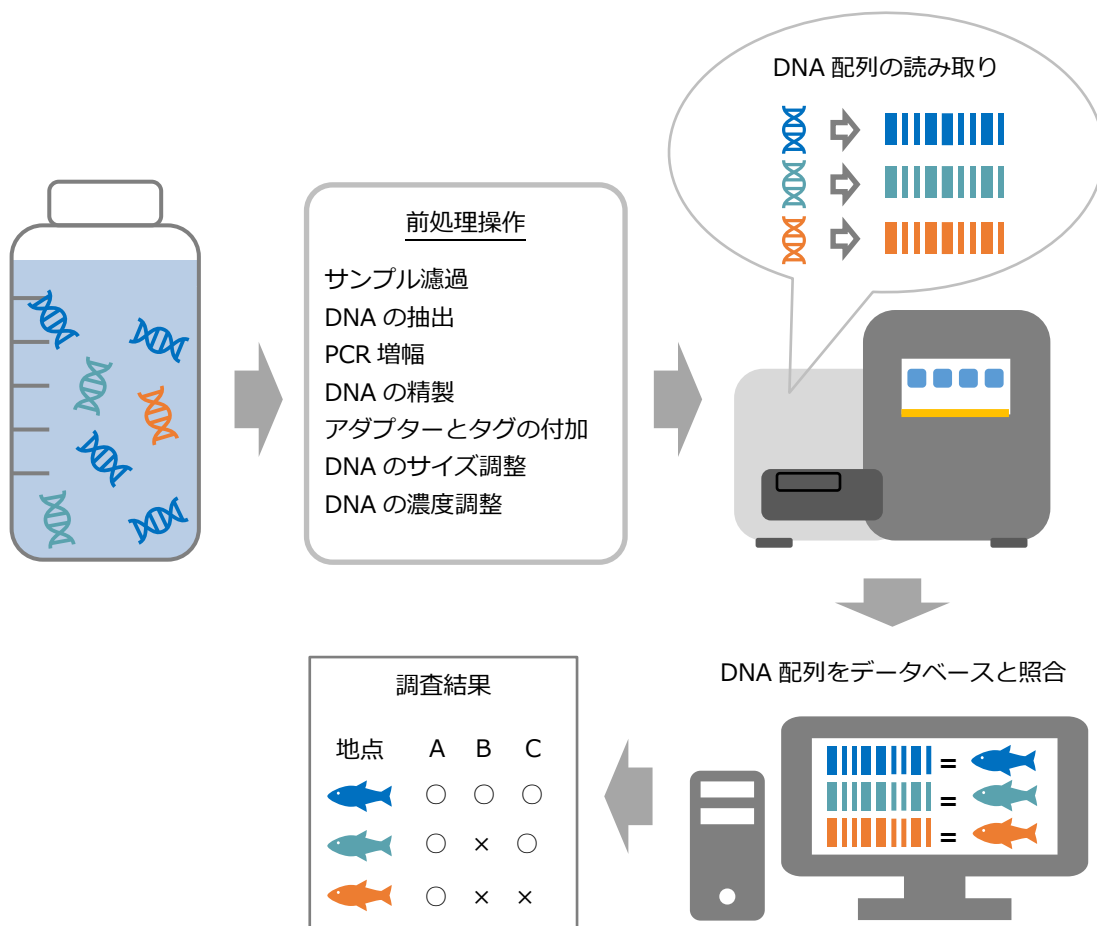


図-参 5- 1 網羅的解析法の概要

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 5- 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 5- 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	<p>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)</p> <p>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)</p>
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、スイ属) 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 5- 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	タウンナギ,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,沖縄産タウンナギほか	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	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C	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	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	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	A	A	C	C	C	A	G	T	T	T	G	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	G
4	タウンナギ,沖縄産タウンナギ	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	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	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	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	G
8	カワスズメ科,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	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-参5-2 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 5- 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 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。

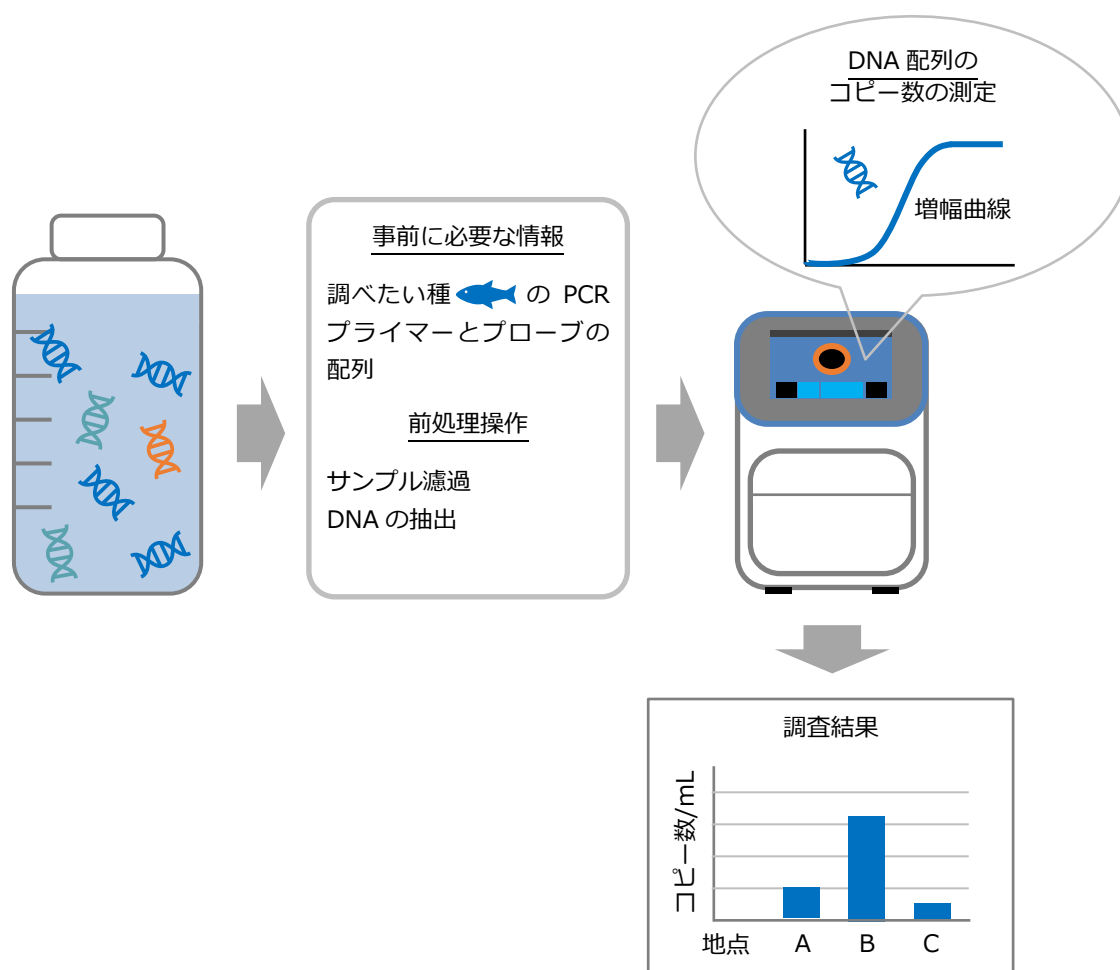


図-参 5- 3 種特異的検出法の概要

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

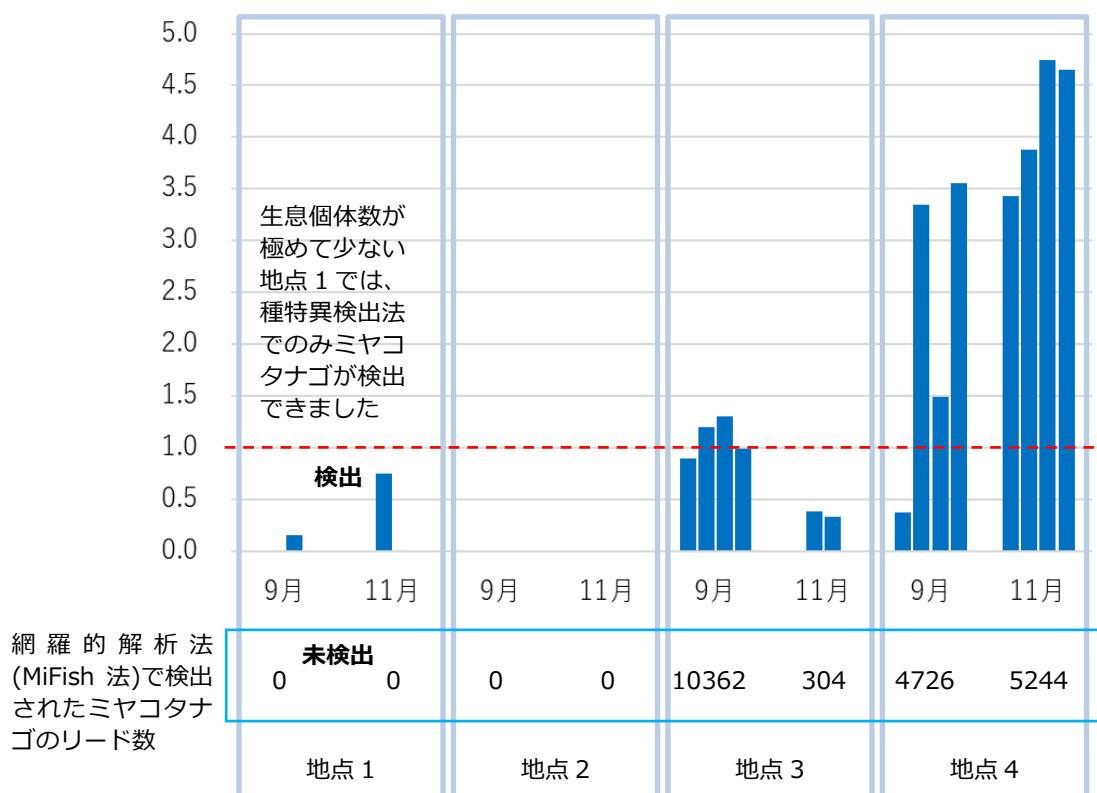
とで、検出する種を任意に変えることができます。種特異的検出法のための PCR プライマーがすでに設計されている種の一覧は、参考資料 1 で確認してください。

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るものの、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 5- 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/2 μ l)



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

図-参 5- 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

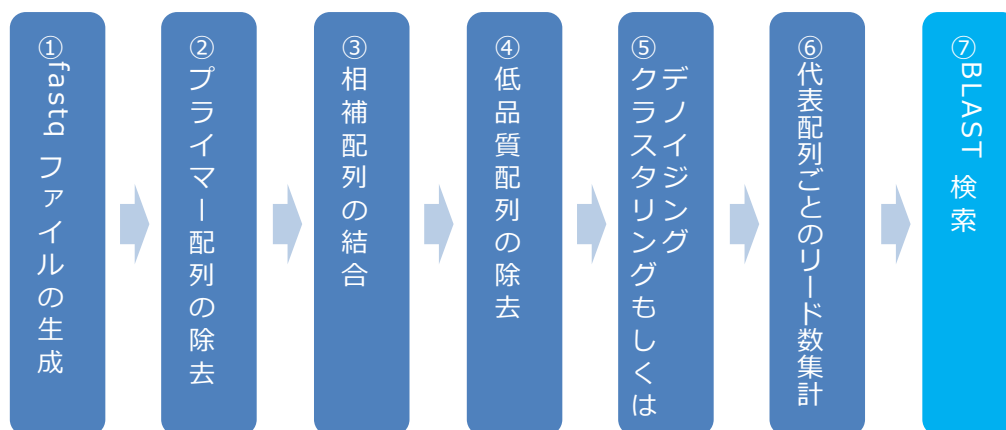
網羅的解析法 (MiFish 法) では、超並列シーケンサーから取得した環境 DNA の配列情報データから分析結果 (一致率が高い生物種リスト) を得るまでの間に、不要な配列を取り除いたり、読み取り時のエラーを補正するなどのデータ処理が必要になります。データ処理の工程は、いくつかのソフトウェアを組み合わせて、流れ作業のように実行されるため、「パイプライン」とも呼ばれます。

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 5- 2 にその代表的なソフトウェアを紹介するとともに、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 5- 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/rogotoh/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ズ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。いずれの場合であっても、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、間違っただけの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れば、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、間違っただけのものとなってしまいます（図-参5-5）。

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見ただけでは判断ができません。

一致率

検索最上位	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudorasbora parva mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	KJ135626.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	KF856965.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio 'wananensis' mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	KF856964.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio color mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JX188253.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio wuyuanensis mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105357.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio wuyuanensis x Carrasius auratus mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105356.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio haematopterus mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105354.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio xingguonensis mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105353.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio carpio mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105352.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio var. baisenensis mitochondrion, complete genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	MT780875.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio complete mitochondrial genome	313	313	100%	2e-81	100.00%	X61010.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Carrasius sp. 'Ginbuna' CBM:ZF:19573 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552369.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Carrasius sp. 'Ginbuna' CBM:ZF:19382 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552368.1

この例の場合、正解は「コイ」であるが、間違っただけで「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となります。

図-参5-5 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 リボゾーム 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 5- 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 8 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。

検索最上位	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Rhinogobius fluviatilis 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 for 12S rRNA	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC385135.1
✓	Rhinogobius sp. KZ mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.17576	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278232.1
✓	Rhinogobius sp. BF mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.17165	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278226.1
✓	Rhinogobius fluviatilis mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.17165	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278211.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16068	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193445.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16881	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193444.1
✓	Rhinogobius sp. CO mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16675	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193346.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16609	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193300.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16493	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193280.1
✓	Rhinogobius sp. OM mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16560	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193279.1
✓	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16527	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193165.1
✓	Rhinogobius sp. CBM.ZF.15797 mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.15797	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, specimen voucher CBM.ZF.16473	306	306	100%	3e-79	100.00%	KM030473.1
✓	Rhinogobius brunneus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence, specimen voucher CBM.ZF.16473	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 CBM.ZF.16473	294	294	100%	1e-77	99.44%	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ず、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 5- 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 だけを持つこととなります。

そのため、図-参 5- 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。

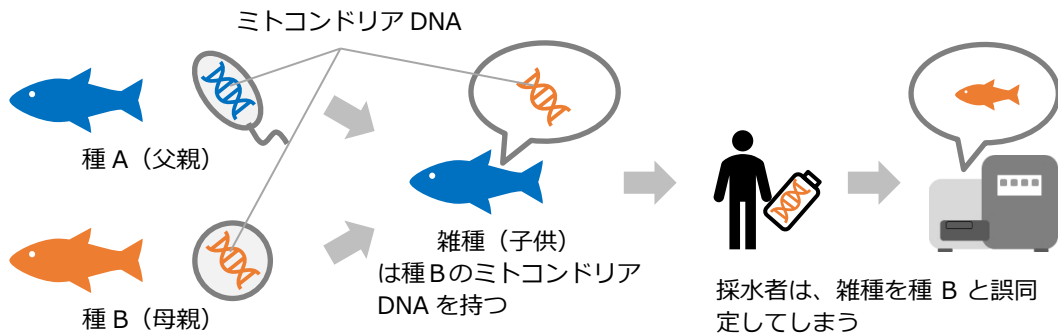


図-参 5- 7 雑種個体が生息している調査地で採水を行ったときに生じる可能性のある誤同定の例

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ができません。

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みトコンドリア 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。

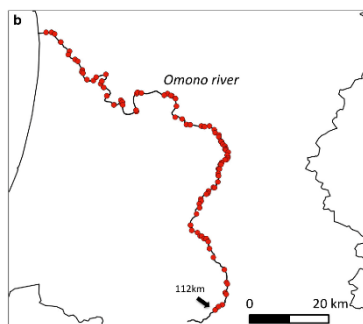


図 環境 DNA 調査が行われた雄物川沿いの 99 地点

※論文 Fig. 1b より転載

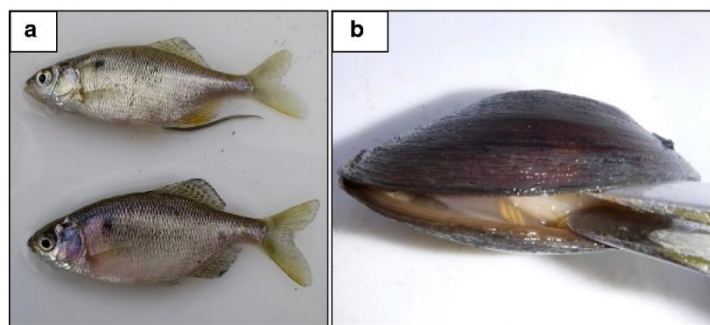


図 環境 DNA が検出された地点で捕獲されたゼニタナゴの成魚と産卵された二枚貝

※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。

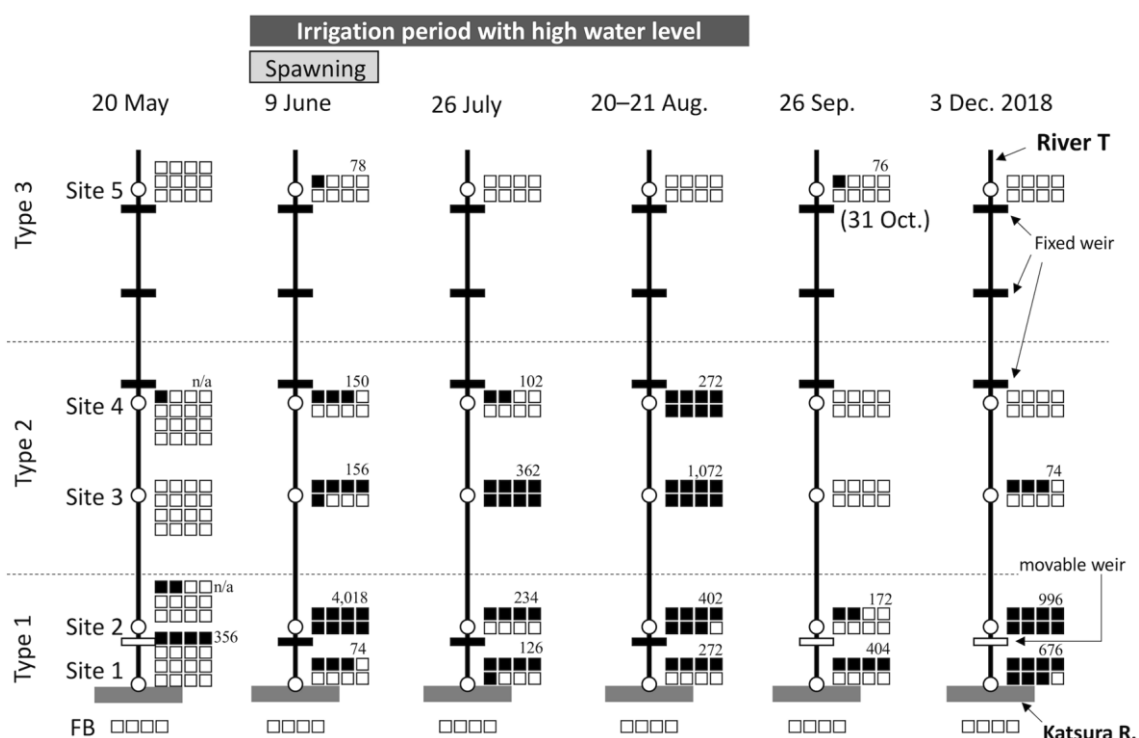


図 京都府亀岡市の生息地で採水したサンプルからのアユモドキの環境DNA検出結果

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。

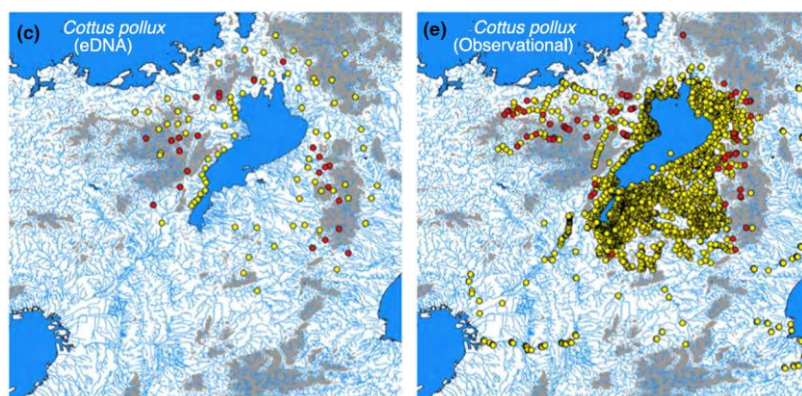


図 カジカの検出結果

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。

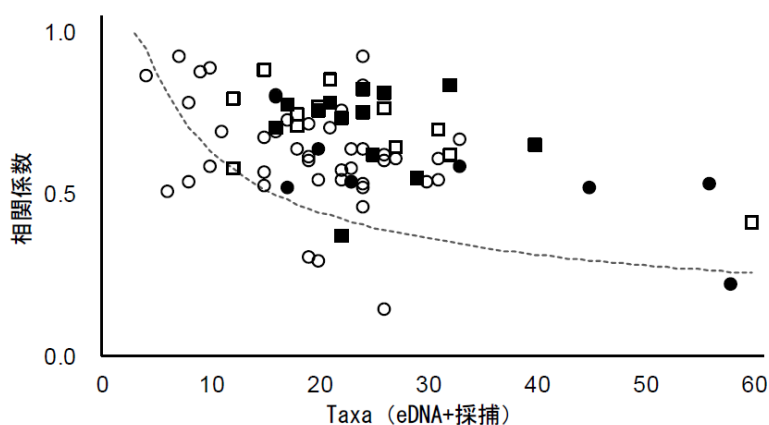


図-1 メタバーコーディング解析と直接採捕の結果に見られた相関. 点線以上には有意な正の相関関係(○:1 検体/1 季, ●:複数検体/1 季, □:1 検体/2 季合算, ■:複数検体/2 季合算. 破線: $p < 0.05$, cor-2 test).

※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。

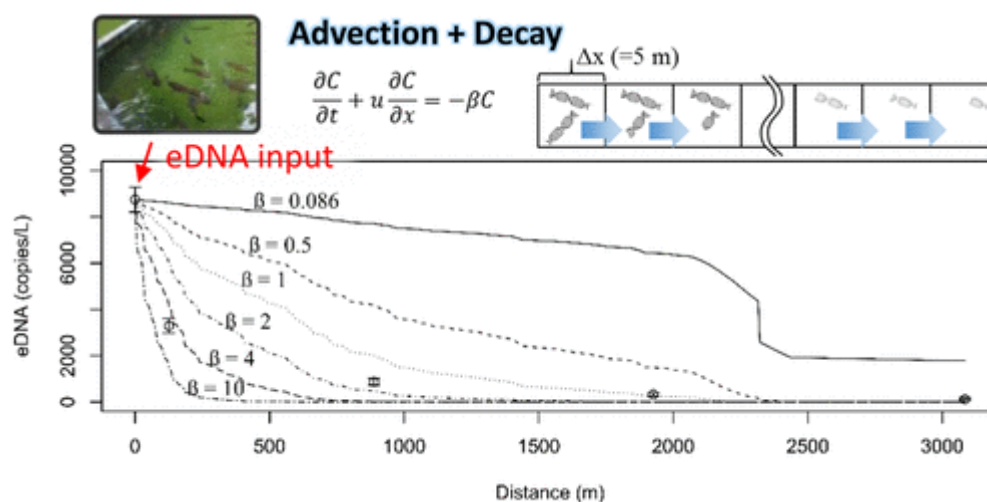


図 様々な減衰パラメータを用いて調査対象河川に沿ってシミュレーションされた環境 DNA ダイナミクス

※論文より転載

(6) 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 つの種間で異なっていました。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。

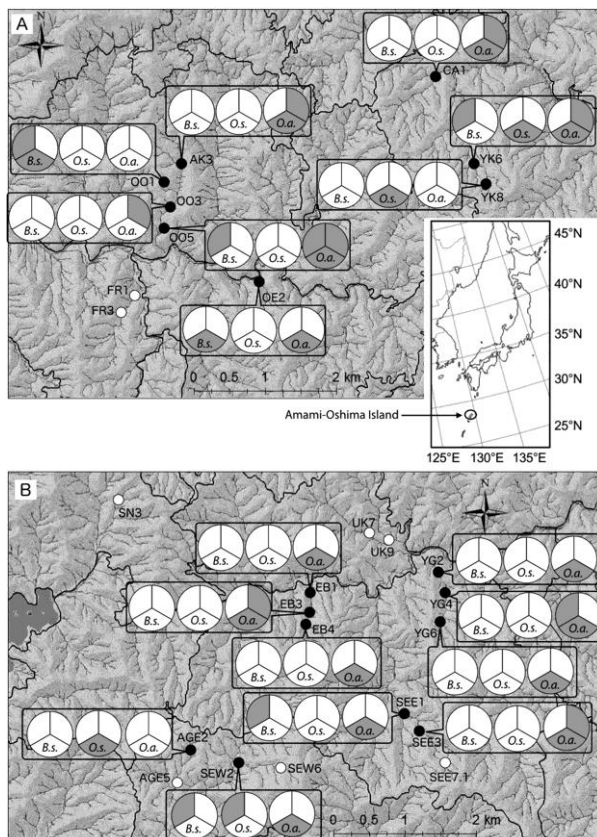


図 調査エリアの地図 (A 北部エリア、B 南部エリア)

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 3 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 3 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。

(余 白)

(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、間違っただけのもの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際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 8- 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 8- 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 8- 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 8-2 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 8- 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 8- 3）。

表-参 8- 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 8- 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 5 の表-参 5- 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 8- 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 調査地	二次的自然			
							2020/4/30	2020/5/30	2020/6/29	
						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 sp.</i>	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	6,880	
11	LC069457.1	100	ドジョウ科	キタドジョウ	<i>Misgurnus sp. (Clade A)</i>	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 sp.</i>	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-参8-1は、チェックシートの実出力結果（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

No.	アクセッション番号	D列の学名に対応する和名	出力名①		出力名②		出力名④		信頼度ランク
			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学名	MiFish解析の結果として採用を推奨する学名		
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 caeruleus	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-参8-1 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

(余 白)

引用文献

- 1) (一社) 環境 DNA 学会ホームページ (<http://ednasociety.org/edna>) より
- 2) 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, Vol. 41 (A), 132-136.
- 3) Masaki Miya 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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, vol. 66, 601-611.
- 7) 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, vol. 66, 583-599.
- 8) Christopher L. Jerde et al. (2011): "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. Conservation Letters, vol. 4, 150-157.
- 9) Eva Egelyng Sigsgaard et al. (2015) : Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. Biological Conservation, vol. 183, 46-52.
- 10) 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, Vol. 41 (A), 137-140.
- 11) 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, Vol. 41 (A), 123-127.
- 12) 辻 冴月ら (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.
- 13) 一般社団法人環境 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)
- 14) 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.
- 15) 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, Vol. 41 (A), 118-122.
- 16) Kazuya Fujii et al. (2019) Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. PLOS One, vol. 14, e0210357.
- 17) Masayuki K. Sakata et al. (2020) Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river. Limnology, vol. 22, 1-15.
- 18) Masaki Miya 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.

- * 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」での検討及び専門家ヒアリングによる助言の反映等を経て、令和 5 年 6 月に発行されました。

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

発行日 令和 5 年 6 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（第 1 版）
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>

制作（第 2 版、改訂第 2 版、第 3 版）
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/>