

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 1 版

環境省自然環境局
生物多様性センター

はじめに

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

本手引きは、上記の試行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。

環境省生物多様性センター

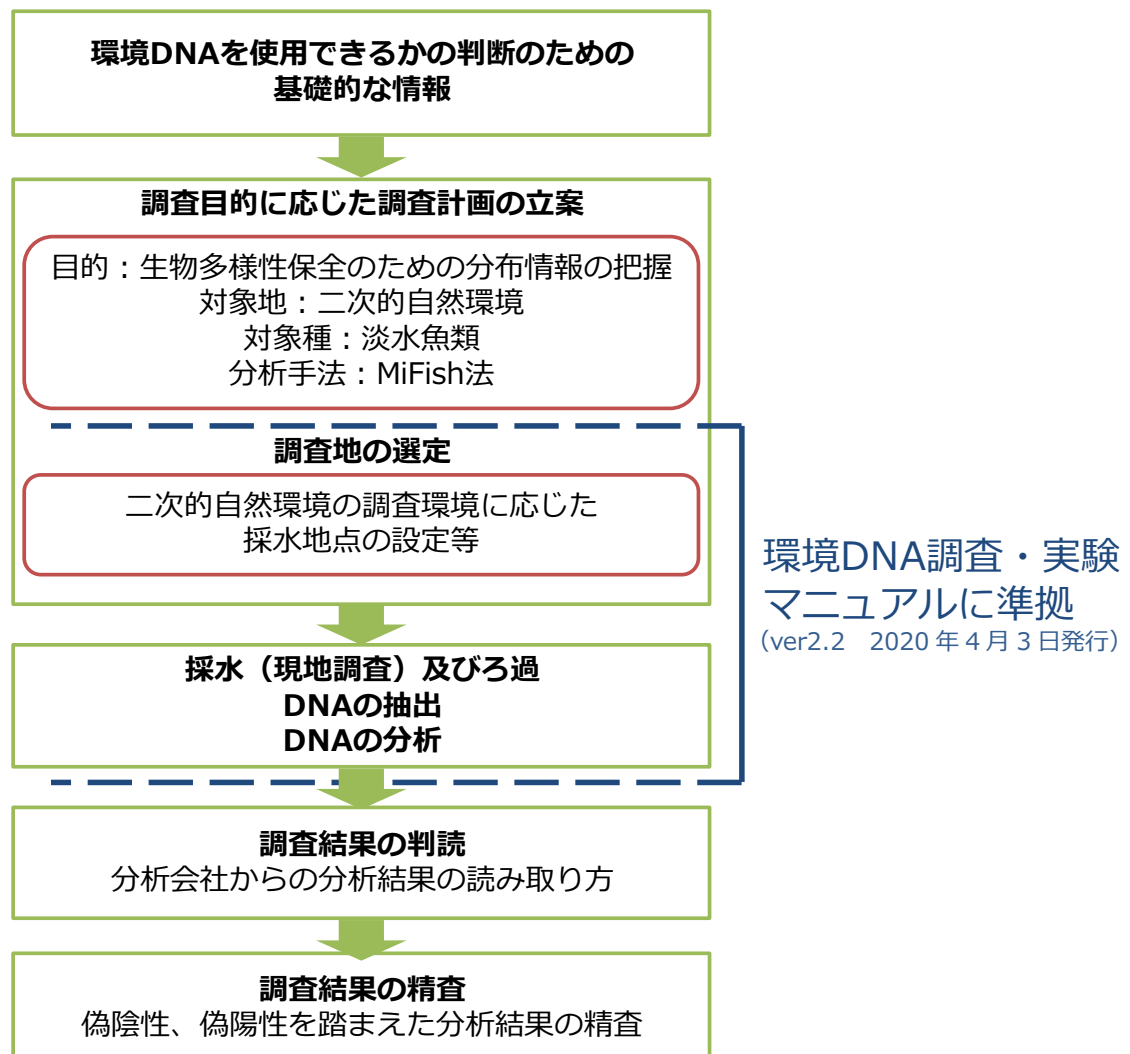
令和 2 年 6 月

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」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あ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 調査の導入にあたって知っておくべきこと	2
1-2-1 環境 DNA 調査の特徴	2
1-2-2 環境 DNA 分析の種類・特徴について	3
1-2-3 環境 DNA 調査の注意点	5
2. 環境 DNA 調査の手順	7
3. 調査を実施する前に	8
3-1 環境 DNA 調査 (MiFish 法) 実施の判断	8
3-2 調査計画	8
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	8
3-2-2 調査地点 (位置・地点数)・時期・頻度の設定	8
3-2-3 採水方法の特徴と各採水方法に適した調査	10
3-2-4 事前の準備 (立ち入り等)	11
3-2-5 安全管理	11
3-3 調査機材などの準備	12
4. 現地調査	13
4-1 環境 DNA サンプルの採水手順	13
4-2 フィールドデータの記録方法	17
5. 分析	18
6. 分析結果の判読	19
7. 分析結果の精査	20
おわりに	21

<巻末資料>

○Q&A

- ・環境 DNA 分析技術に関する Q&A (Q1~2) 22
- ・現地調査に関する Q&A (Q3~6) 22
- ・環境 DNA 分析に関する Q&A (Q7~9) 25

○用語集 26

<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 28
- 参考資料 2 分析会社へお願いする分析工程記録表 (例) 39
- 参考資料 3 環境 DNA 調査結果のデータ入力項目の事例 40

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ⁱ。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。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、魚類の環境 DNA メタバーコーディング法（主に MiFish 法）が開発されていますⁱⁱ。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魚類の 9 割を超す 168 種の検出に成功していますⁱⁱⁱ。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^{iv}。

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^{iv}。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することができるようになってきました。しかし、現地で水を汲んでから、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）。

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 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。

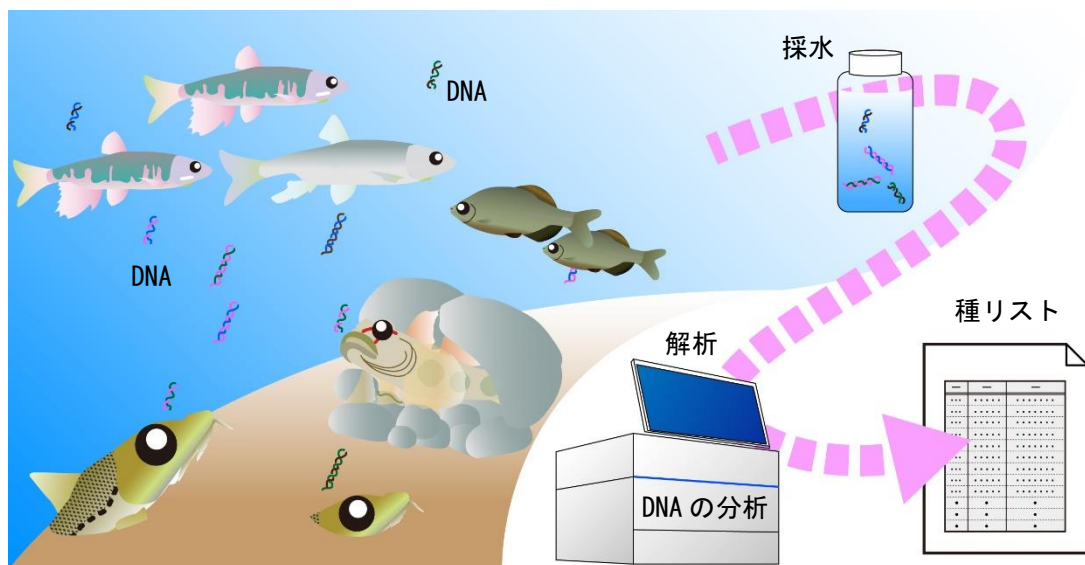


図- 1 環境 DNA 調査のイメージ図

1-2 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いたします。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。

1-2-1 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、「労力・専門的な技術が必要なこと^v」、「確認できる種にバイアスがかかること^v」、「捕獲した魚種の同定に知識が必要なこと^v」から、広域を短期間に調査することは困難です。近年、従来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^{vi}」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）^{vii}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）^{viii}」、「現地での調査費用を抑えること^{ix}」ができ、「広範囲・多地点で調査を実施すること^x」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 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.12 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	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。

1-2-2 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「MiFish 法」と「種特異的検出」の 2 つの手法があります^{xi}。

MiFish 法は「水中に漂う DNA に対して網羅的に種を増幅・検出する手法」で、調査範囲内で生息の可能性がある種がわかります。一方、種特異的検出は「水中に漂う対象種（単一種）の DNA のみを増幅・検出させる手法」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- 2）。

● 「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。^{xii}
- ・ 共通の MiFish プライマーを用いるⁱⁱ。
- ・ 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^{vii}。

● 「種特異的検出」の特徴

- ・ 対象種を限定して、その DNA を精度良く検出できる^{xiii}。
- ・ 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^{xiii}、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^{vi}。

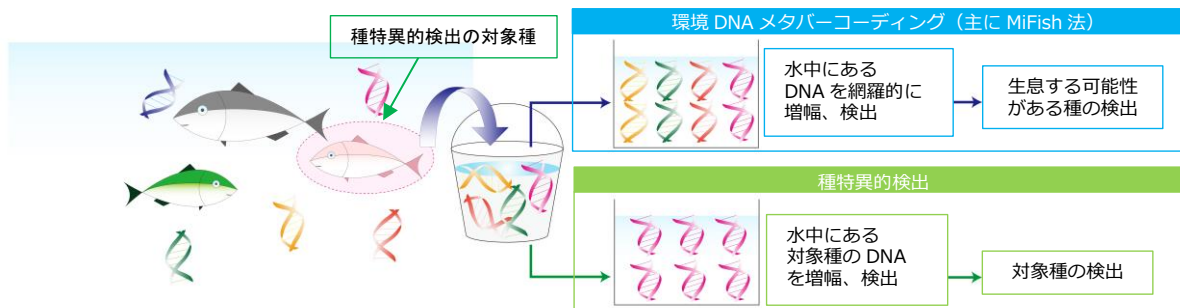


図- 2 MiFish 法と種特異的検出のイメージ

MiFish 法、種特異的検出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は、すでに希少種や外来種の調査に用いられています。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、国土交通省では河川事業への適用性^{xiv}を検討しています。

図- 3 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。

なお、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たり、迅速かつ効果的な対策につなげることができます。

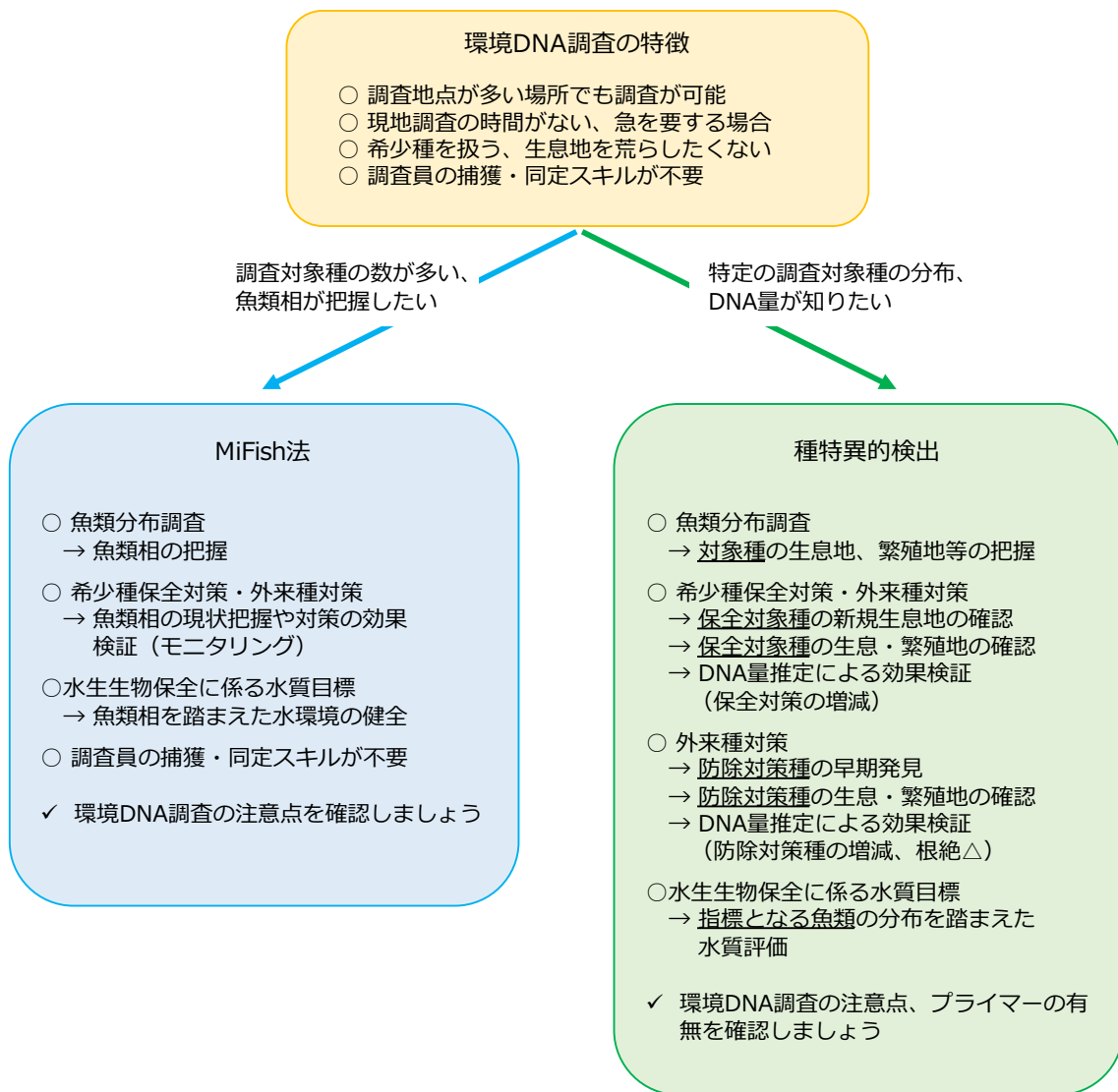


図- 3 環境 DNA 調査の特徴と各検出方法で活用可能な保全施策の例

1-2-3 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^v (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^{xiii})。
- ② 環境 DNA からは生物の状態がわからない^v (例、稚魚、成魚などの成育段階、生きていますのかわからず、死体由来の DNA も検出^{vii})。
- ③ 調査対象魚種の DNA データがなければ分析ができない^{vii} (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)^{vii}」、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)^{vii}」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- 2、表- 3)。

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- 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 ^{vii} 。【▲】	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。	P.28
	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 ^{vii} 。ex.チチブとヌマチチブなど【▲】	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。	P.28
	環境 DNA の拡散は、水の流れに影響を受ける。ex.上流から下流に流れる。検出率は必ずしも 100%ではない ^{vii} 。【▲・△】	「調査地点・時期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」に留意しましょう。	P.8 P.9
	生活排水や養殖場の排水などの影響を受ける ^{xiii} 。ex.海産魚、サケなど【△】		
	特定の種の DNA が多く含まれていると、少数の種が検出されにくい ^{xiii} 。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 ^{xiii} 。【▲】			

【▲】…偽陰性の要因となるもの、【△】…偽陽性の要因となるもの

表- 3 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 ^{xv} 。【▲】	塩化ベンザルコニウム液（劣化防止剤）を添加しましょう。 なお、現地濾過を行う場合には、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 35 日発行）参照）。	P.13
	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 ^{xiii} 。ex.水の濁り、アオコ【▲】		
分析	プライマーが不適合の種は検出できない。 ex.スナヤツメ、アユ、ワカサギ【▲】	プライマーを新たに設計すれば、検出できます。	P.18
	採水時や分析時に人為的コンタミネーションが生じる ^{xiii} 。【△】	「4-1 環境 DNA サンプルの採水手順」や環境 DNA 学会のマニュアル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.13 P.18
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。	P.20
	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。	P.20

【▲】…偽陰性の要因となるもの、【△】…偽陽性の要因となるもの

事例



MiFish 法では検出されなかったヤツメウナギ類

生息しているはずの魚類が MiFish 法では確認できないことがあります。その事例を 1 つ紹介します。

環境省では、二次的自然環境における環境 DNA 調査の活用を図るために、平成 30 年から 36 箇所で環境 DNA を用いた試行調査を実施しています。この調査では、生息しているはずのヤツメウナギ類が確認されないという問題が生じました。確認されなかった理由を検討したところ、試行調査で用いたプライマーではヤツメウナギ類の DNA の増幅が進まないことが原因であることがわかりました。そこで、ヤツメウナギ類の DNA 専用に新たに設計したプライマーを用いたところ、見事、スナヤツメが確認されました。

ヤツメウナギ類が生息する地域では、業者に分析を依頼する際に、淡水魚用の MiFish-U-F/R プライマーのほかに、以下のヤツメウナギ類用の MiFish-L-F/R プライマーの追加を依頼するとヤツメウナギ類をより確実に検出することができます。（そのほか、分析にあたっての注意点は、P.18 にも記載しています。）

ヤツメウナギ類用プライマー配列

MiFish-L-F	アダプター配列+NNNNNNGCTGGTAAACCTCGTGCCAGC
MiFish-L-R	アダプター配列+NNNNNNCATAGCGGGGTATCTAATCCCGGTTTG

2. 環境 DNA 調査の手順

ここからは、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 (MiFish 法) 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。

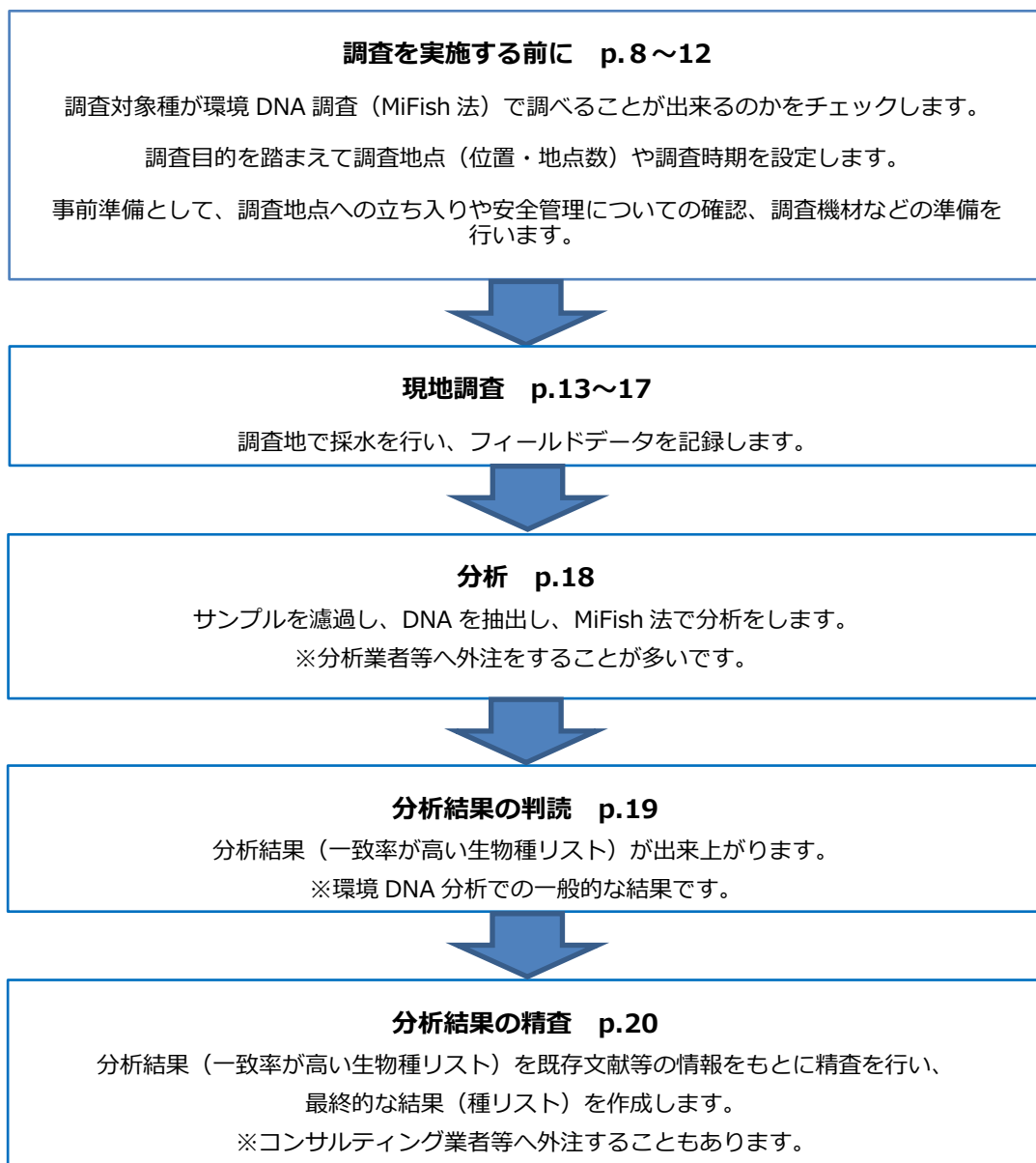


図- 4 環境 DNA 調査 (MiFish 法) の手順

3. 調査を実施する前に

3-1 環境 DNA 調査 (MiFish 法) 実施の判断

環境 DNA 調査 (MiFish 法) 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を見極めることが重要です。そこで、巻末にある「二次的自然環境に生息する淡水魚類のリスト MiFish 法で種まで特定が可能な種」を参考に、調査対象種が検出できるのチェックした上で、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。

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) ^{xiii}

<調査地点>

- ・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>

- ・降雨時やその直後は、水中の環境 DNA が流出しやすい状況にあるため、避けて設定する。特に、梅雨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)。

<調査頻度[※]>

- ・周年で生息する種は 1 回の調査で概ね存在を判断できるが、一時的にしか生息しない種の存在が想定される場合は、その種の生息時期に応じて複数回調査が必要 (偽陰性の防止)。

※ 環境省が実施した試行調査では、全国 9 か所の調査地 (各調査地で 4~8 か所で採水) で環境 DNA 分析結果と既存調査で得られた結果とを比較しました。この結果、1 回の環境 DNA 調査で、既存資料の確認種数の約 70~100% が検出されることがわかりました。一方で、希少種などの生息数や生息地が限られた種は複数の採水地点や複数回の調査を実施しないと検出されにくいことが示されました。

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-4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-4 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^{xiii}

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） 規模の大きな湖沼の場合は、代表的なハビタット（魚類の生息環境）を含むように調査地点を複数設定（魚類相の網羅的な把握） 湖沼への流入河川周辺は避ける（偽陽性の防止） 産卵などで優占種のみが集中している地点は避ける（偽陰性の防止） <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 周年、湖沼で生息する種を調査対象とする場合は、春から秋に調査時期を設定する（偽陰性の防止） 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
	希少種保全対策の効果検証	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 調査対象種の産卵時期、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（効率的な DNA の採取） 採水しやすい岸際（安全性の確保）
	外来種対策の効果検証	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 調査対象種の産卵時期、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"> 調査対象種の産卵時期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）
水田・水路	水路の魚類相の把握	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> 対象水路の魚類相を調査する場合は、対象水路以外の水路との合流部よりも上流側。また、水田からの流入部よりも上流側（偽陽性の防止） 水路距離が長い場合は、代表的なハビタット（魚類の生息環境）を含むように調査地点の複数設定（魚類相の網羅的な把握） 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"> 周年、水路で生息する種を調査対象とする場合は、春から秋に調査時期を設定（偽陰性の防止） 代掻き時期など水質が濁りやすい時期は 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
	希少種保全対策の効果検証	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 調査対象種の産卵時期、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"> 余水履き等の流出口周辺（効率的な DNA の採取） 採水しやすい岸際（安全性の確保） 規模の大きなため池の場合は代表的なハビタット（魚類の生息環境）を含むように調査地点の複数設定（魚類相の網羅的な把握） ため池への流入河川周辺を避ける（偽陽性の防止） <p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 周年、ため池で生息する種を調査対象とする場合は、春から秋に調査時期を設定する（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
	希少種保全対策の効果検証	<p><調査時期></p> <ul style="list-style-type: none"> 調査対象種の産卵時期、または活動が活発化する時期（効率的な DNA の採取）

3-2-3 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.14～16）。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- 5 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 ^{xiii} →手順は P.14 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 ^{xiii} →手順は P.15 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.16 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

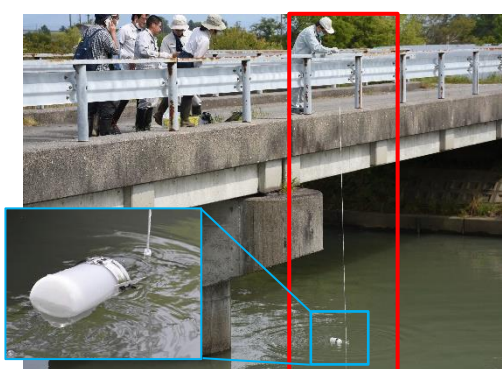


写真4 採水器採水

3-2-4 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。

3-2-5 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/>



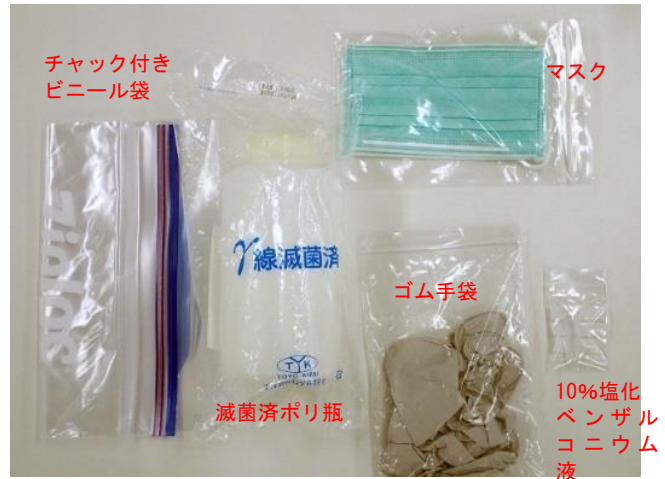
3-3 調査機材などの準備

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}

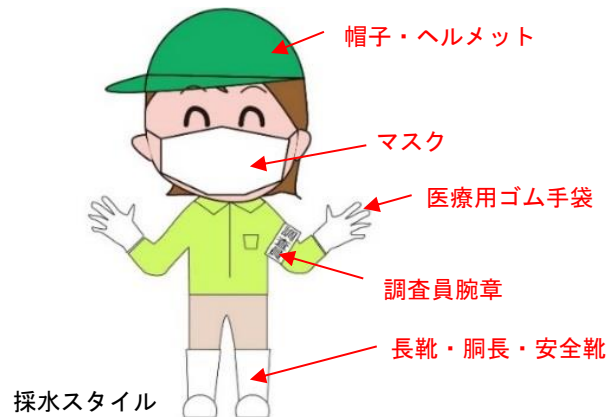
- ・滅菌済ポリ瓶（1L）
- ・10%塩化ベンザルコニウム液（1.2mLに小分け）
- ・医療用ゴム手袋（2組）
- ・マスク（2組）
- ・チャック付きビニール袋（大）

※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。

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。

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。

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。

※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 P. 14～16、各採水方法の特徴と適した調査は P. 10 の表- 5 に記載しています。

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、P. 17 に示すフィールドデータを記録する。

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。



- 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- 6 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- 6 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量を記録	必須
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うる要因など、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採水した水の濾過」→「②DNAの抽出」→「③DNAの分析（MiFishメタバーコーディング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-7に「環境DNA調査・実験マニュアル ver. 2.2」（2020年4月35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P.38の参考資料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2年6月現在は ver. 2.2）。

表-7 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	採水した水の濾過	「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、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、プライマーを追加することで検出できるようになります。

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- 8 に示します。

このうち「一致率が高い生物種リスト」の結果を用いて、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- 8 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- 8 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	代表配列 (OTU と呼ばれる)	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/ギンブナ	CACCGCGGTTAGA
Zotu4	9599	LC458044.1	100	Phoxinus steindachneri	アブラハヤ	CACCGCGGTTAAA
Zotu5	18244	LC385178.1	100	Rhinogobius fluviatilis / s	旧トウヨシノボリ種群	CACCGCGGTTATA
Zotu6	34625	LC020972.1	100	Zacco platypus	オイカワ	CACCGCGGTTAAA
Zotu7	13019	LC492321.1	98.864	Tribolodon hakonensis	ウグイ	CACCGCGGTTAAA
Zotu8	5497	LC474233.1	100	Gymnogobius urotaenia	ウキゴリ	CACCGCGGTTATA
Zotu9	1926	LC468891.1	100	Misgurnus anguillicaudatus	ドジョウ(在来型)	CACCGCGGTTATA

代表配列と同じ配列を持つ塩基配列が検出された数。

アクセッション番号
(DNA データベースの登録番号)

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

DNA データベースに登録されている学名と和名

代表配列

7. 分析結果の精査

「一致率が高い生物種リスト」を精査するには、調査対象地域における既往知見や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。現時点で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、分析をコンサルティング業者等に依頼する際には確認しておくといでしょう。

以下の事例は、環境省の試行調査で実施した分析結果の精査方法になります。この方法が常に正しいわけではありませんが、一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。

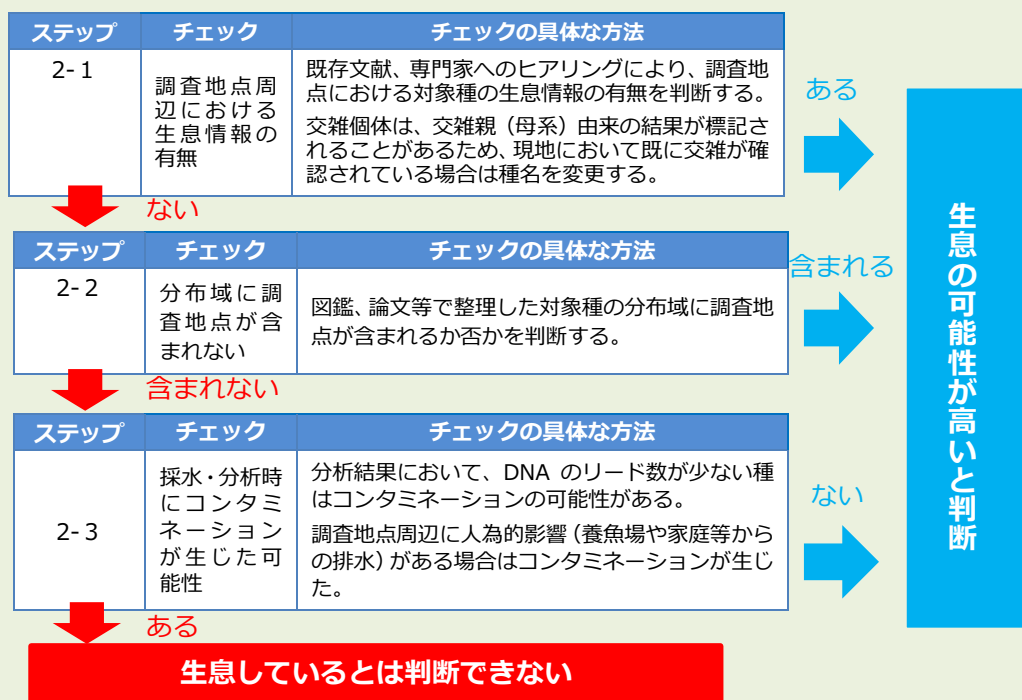
ステップ1 分析結果に誤った種名が記載されていないか？

まず、ステップ1として、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。	誤っていると判断された場合は、「MiFish 法」による種の識別に注意を要する淡水魚類リスト」をもとに種名・学名を変更する。

ステップ2 生息していない種が含まれている可能性はないか？

次に、下記のチェックフローに従って、分析結果に生息していない種が含まれていないかを確認します。生息していない可能性が高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とでしょう。

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、令和元年（2019 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、状況に応じて改訂していくこととしています。引き続き環境 DNA 学会や他省庁とも連携し、本手引きがより良いものとなるよう努めていきます。

環境 DNA 分析技術に関する Q&A

Q 1 採水だけで調査範囲の魚類が全てわかるのですか？

<回答>

本手引きで紹介している MiFish 法では、本来生息しているにも関わらず、DNA が検出されないこと（偽陰性）があり、全ての魚類がわからないことがあります。一方で、本来生息していない種（偽陽性）が確認されることもあります。環境省の試行調査でも環境 DNA 調査と既存資料調査の結果を比較してみると、本来生息しているはずの種が確認されなかったり、生息しないはずの種が確認されたりしています。以下に事例を紹介しますので、参考にしてください。

Topic



伊豆沼・内沼周辺における環境 DNA 調査

宮城県伊豆沼・内沼周辺では、既存資料調査で 33 種の魚類が確認されていました。今回、環境省が実施した環境 DNA 調査では、57 種の魚類が確認され、このうち 30 種が既存資料調査と共通していました。

既存資料調査のみで確認された 3 種について精査したところ、『ヤツメウナギ類は DNA を増幅するプライマーのミスマッチにより検出がされなかったこと』、『ホトケドジョウとサケは MiFish 法では識別が難しく検出できなかったこと』がわかりました。また、環境 DNA 調査のみで確認された 25 種には、コンタミネーション等の分析上の問題等により偽陽性となった 15 種が含まれていることがわかりました。このように、現在の MiFish 法では分析技術上の課題により偽陰性や偽陽性が生じることがあります。一方で、キタドジョウ、ニッコウイワナ等の従来調査では確認されてなかった種が環境 DNA 分析で新たに検出されました。

このように環境 DNA 調査の分析結果については、偽陽性や偽陰性が生じる可能性があるため、精査することが大切です。本手引き P.20 を参考に精査すると良いでしょう。

Q 2 官公庁での MiFish 法の事例はありますか？

<回答>

環境省では平成 30 年から MiFish 法の試行調査を実施し始めています。種特異的検出としては、中国四国地方環境事務所において、アユモドキの在不在調査を実施した事例があります。今後、各官公庁で使用されるようになり、事例も増えるでしょう。

現地調査に関する Q&A

Q 3 複数地点で採水したサンプルを混合しても良いですか？

<回答>

混合するべきか否かは、調査目的によって判断する必要があります。例えば、採水した地点の魚類相を知りたい場合は、混合せずに採水した地点のみのサンプルで環境 DNA 分析を行います。一方で、調査範囲内のおおまかな魚類相を知りたい場合は、調査範囲内の複数地点を混合したサンプルで効率的に環境 DNA 分析を行うことができます。

Q 4 採水地点は何地点ぐらい設定すれば良いでしょうか？

<回答>

水中の DNA 断片は水の動きに影響を受けるとされています。環境 DNA が生物分布を反映する距離は数百m程度とされる^{xiii}ため、1箇所の採水で数百mの範囲に分布する魚類の種類がわかると推察されます。このため、調査範囲が小規模なため池では1箇所でも良いと考えられますが、規模の大きな湖沼や距離の長い水路では複数地点設定することが大切です。環境省の試行調査でも、大きな湖沼と小さな池で調査結果を比べてみると、違いがあることがわかりました。以下に事例を紹介しますので、参考にしてください。

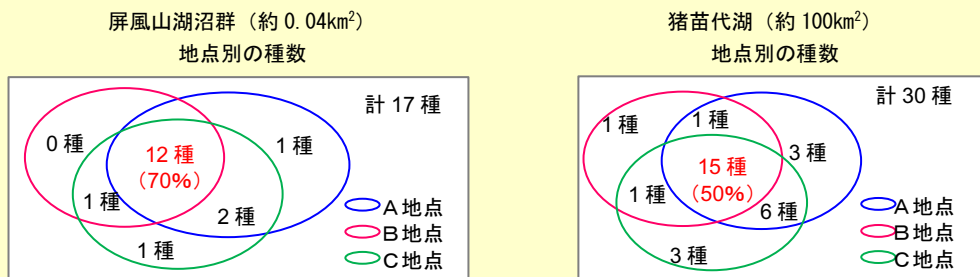
Topic



規模の大きな湖沼と小さな池の調査地点数と種数の違い

規模を比較した場所は、青森県の屏風山湖沼群（約 0.04km²）と福島県の猪苗代湖（約 100km²）です。両方ともそれぞれ3地点から水を採取し、環境 DNA 分析を行いました。それぞれ調査地点は、屏風山湖沼群では約 500mの区間に3地点、猪苗代湖では約 9km 区間に3地点を設定しました。それぞれの地点で確認された魚類の種類がどのぐらい共通するのか比べてみました。

その結果、屏風山湖沼群では、3地点で確認された種の合計 17 種のうち、各地点で共通したのは 12 種、約 7 割と多くの種が共通することがわかりました。一方、猪苗代湖では、3地点で確認された種の合計 30 種のうち、各地点で共通したのは 15 種（約 5 割）と確認種の半数が地点間で異なることがわかりました。一方で、今回の試行調査では、調査地点における水の動向による結果の違いについては、十分に検討できていない状況にあります。環境省では、今後も調査地点の具体的な設定に活用できる情報を収集していきます。



Q 5 濾過が 1L できない場合の対処の仕方は？

<回答>

採取した水の濁度が高い場合は、濾過フィルターが目詰まりして、1L まで濾過できないことがあります。このような場合は可能な範囲で濾過を行い、濾過水量を記録しましょう。

なお、環境省の試行調査でも、ひどい濁りにより通常の約 5 分の 1 の 182ml しか濾過できないことがありました。分析の結果、10 種の魚類が確認されました。わずかな濾過水量でもサンプルの状態が良ければ、環境 DNA が検出できるようです。

Q6 最も良い調査時期はいつですか？

<回答>

採水の時期については、魚類の活性が低い冬場に環境 DNA の検出率が下がる¹ことが報告されていますので、春から秋に行うと検出率が向上する可能性があります。一方、産卵期は水中に特定の種の DNA 断片が増えることで、他の種の環境 DNA の検出が下がることもあるようです。また、代掻きなどにより濁りが多く発生する時期には、検出率が下がる可能性があります。このように、調査時期を設定する際は、対象地に生息する魚類の生活史や水利用の時期などを考慮することが重要となります。環境省の試行調査でも、水利用の時期によって結果に違いがあることがわかりました。以下に事例を紹介しますので、参考にしてください。

Topic



水路で調査する場合、
濁りが少なく、水量の多い場所や時期を選ぶとよいでしょう

水田や畑からの排水が混じる場所、赤潮やアオコの発生箇所では PCR 阻害要因が含まれるため留意するようになっています¹。環境省が実施した環境 DNA 試行調査でも、多くの水路で代掻き時期やプランクトンの発生量が増える時期に確認種数が少ない状況がみられました。その事例を以下に紹介します。

環境省の試行調査では、12 箇所の水路で 5 月、7 月、9 月、11 月の計 4 回調査を実施しました。各水路の調査時期別の種数を比べると、12 箇所のうち 9 箇所で、最も種数が多いのが 9 月、最も種数が少ないのが 5 月であることがわかりました。種数が少なかった 5 月の水路利用を調べると、代掻きが行われていたり、非灌漑期であるため水量が少ない状況でした。このように、濁りが多い時期や、水量が少ない時期に調査すると結果の精度が下がります。このため、水路で調査を実施する際には、その地域の水利用を事前に把握し、濁りが少なく、水量が多いと想定される時期を設定しましょう。

なお、プランクトン発生量と確認種数との関係については、わかりませんでした。今後の試行調査の課題となりそうです。



佐賀県の水路 非灌漑期（5月）
確認された種数は 18 種
一番水位が低く、濁りが強かった



佐賀県の水路 非灌漑期（9月）
確認された種数は 30 種
最も水位が高く、水質が良かった

環境 DNA 分析に関する Q&A

Q 7 環境 DNA 分析の認定機関はありますか？

<回答>

環境 DNA 分析については、現段階で資格や法令などに定められた規則がないため、環境 DNA 分析の認証や指定を受けた会社などはありません。なお、環境 DNA 分析を依頼する際は、「環境 DNA 調査・実験マニュアル」（一般社団法人環境 DNA 学会）に示された分析方法に準拠しているかを確認した上で行うことが大切です。

Q 8 分析会社から生物リスト以外に提出してもらうデータはありますか？

<回答>

表- 8 (P.19) に掲載した情報は全て提供してもらうようにしてください。このほか、P.38 に示す「分析工程記録表」についても情報を提供して頂くことをお勧めします。

Q 9 二次的自然環境で使用する MiFish プライマーは何が良いですか？

<回答>

「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.2」の P.61～62 では、3 種類のプライマーセットが紹介されています。このうち、二次的自然環境に適したプライマーは MiFish-U（硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー）です。このほかには、サメ・エイ類に最適化した MiFish-E、温帯の沿岸域で一般的にアナハゼ類に最適化した MiFish-U2 があります。

なお、ヤツメウナギ類、キュウリウオ科、アユ科等は、上記のプライマーでは検出できないことがあります。ヤツメウナギ類については、P.6 に示すプライマー（MiFish-L-F/R）を用いると検出できるようになります。

➤ **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。

➤ **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。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。

➤ **代表配列 (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。MiFish 法のプライマーは、板鰓類用（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、リファレンスの整備状況、種特異的分析法に用いるプライマーの整備状況、MiFish 法において識別に注意を要する種^{*}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。

※ MiFish 領域において、塩基配列が複数の種と一致する場合や、種内の塩基配列の変異によって一致しない場合などに別の種に判定される種のこと。なお、本種は現時点の分析技術や知見に基づき整理しており、今後技術の進展により変更が生じる可能性もある。

<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) 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魚類リスト掲載種の一部。ただし、汽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。

・採用した和名の出典

環境省レッドリスト 2020 年版、その他の情報源（中坊 2013「魚類検索」、2018「日本魚類館」、中島 2017「日本のドジョウ」）

・学名の採用の優先順位

1) 環境省レッドリスト 2020、2) Watanabe et al. (2017)、3) 河川水辺の国勢調査リスト・生態系被害防止外来種リスト・その他の情報源、DNA データバンクに使用される NCBI の生物名リストも参照する。

・使用する配列

2019 年 6 月時点で NCBI の GenBank に登録されている MiFish 領域の配列全て。BLAST 検索により得られる配列を全て用いた上で、樹形図で判断。

<表中の凡例>

 MiFish 法で種まで特定が可能な種

【MiFish 法で識別可能な種】○：MiFish 法で種まで特定が可能な種

【MiFish 法で識別に注意を要する種】○：MiFish 法で種まで特定が難しい種

【MiFish 領域の有無】○：登録配列あり、×：登録配列なし、

【種特異的プライマー】○：種特異的分析法に用いるプライマーが整備されている

【環境省 RL2020】環境省レッドリスト 2020 の公表について（環境省、2020 年）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。

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

SK：産業管理外来種

【地域個体群】○：地域個体群として掲載されている種

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
1	ミツバヤツメ	<i>Entosphenus tridentatus</i>		○	○		LP		
2	スナヤツメ北方種	<i>Lethenteron</i> sp. N.		○	○		VU		
3	スナヤツメ南方種	<i>Lethenteron</i> sp. S.	○		○	○	VU		
4	シベリアヤツメ	<i>Lethenteron kessleri</i>		○	○		NT		
5	カラヤツメ	<i>Lethenteron japonicum</i>		○	○		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>	○		○			TY	
8	ロンクノーズガー	<i>Lepisosteus osseus</i>		○	○			TY	
9	スポットガー	<i>Lepisosteus oculatus</i>		○	○			TY	
10	ニューギニアウナギ	<i>Anguilla bicolor pacifica</i>	○		○		DD		
11	ニホンウナギ	<i>Anguilla japonica</i>	○		○	○	EN		
12	オオウナギ	<i>Anguilla marmorata</i>		○	○				
13	コゲウツボ	<i>Uropterygius concolor</i>	○		○		CR		
14	ナミタカリウツボ	<i>Echidna rhodochilus</i>	○		○		CR		
15	ニシン	<i>Clupea pallasii</i>	○		○		LP		
16	トウロイ	<i>Nematalosa japonica</i>	○		○		EN		
17	エツ	<i>Coilia nasus</i>		○	○		EN		
18	コイ(飼育品種)	<i>Cyprinus carpio</i>		○	○	○			
19	コイ(ノコイ)	<i>Cyprinus carpio</i>		○	○	○	LP		
20	ゲンコウロブナ	<i>Carassius cuvieri</i>		○	○		EN		
21	キンギョ	<i>Carassius auratus</i>		○	○	○			
22	ニコロブナ	<i>Carassius buergeri grandoculis</i>		○	○		EN		
23	ナガブナ	<i>Carassius buergeri</i> subsp. 1			×		DD		
24	キンブナ	<i>Carassius buergeri</i> subsp. 2		○	○		VU		
25	オオキンブナ	<i>Carassius buergeri buergeri</i>		○	○				
26	キンブナ	<i>Carassius</i> sp.		○	○				
27	フナ属の一種(琉球列島)	<i>Carassius</i> sp.			×		CR		
28	ミヤコタナゴ	<i>Tanakia tanago</i>	○		○		CR		
29	ヤリタナゴ	<i>Tanakia lanceolata</i>					NT		
30	ヤリタナゴ LA1	<i>Tanakia lanceolata</i>							
31	ヤリタナゴ LA2	<i>Tanakia lanceolata</i>		○	○				○
32	ヤリタナゴ LA3	<i>Tanakia lanceolata</i>							
33	ヤリタナゴ LA4	<i>Tanakia lanceolata</i>							
34	アブラホテ	<i>Tanakia limbata</i>					NT		
35	アブラホテ LI1	<i>Tanakia limbata</i>							
36	アブラホテ LI2	<i>Tanakia limbata</i>		○	○				○
37	アブラホテ LI3	<i>Tanakia limbata</i>							
38	カネヒラ	<i>Acheilognathus rhombeus</i>		○	○				
39	オオタナゴ	<i>Acheilognathus macropterus</i>		○	○			ST	
40	イチモンジタナゴ	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>					CR		
41	イチモンジタナゴ clade1	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>							
42	イチモンジタナゴ clade2	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>		○	○				○
43	イチモンジタナゴ clade3	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>							
44	タナゴ	<i>Acheilognathus melanogaster</i>	○		○		EN		
45	イタセンバラ	<i>Acheilognathus longipinnis</i>	○				CR		
46	イタセンバラ(琵琶湖-淀川型)	<i>Acheilognathus longipinnis</i>			○				○
47	イタセンバラ(濃尾型)	<i>Acheilognathus longipinnis</i>							
48	イタセンバラ(富山型)	<i>Acheilognathus longipinnis</i>							
49	ミナアカヒレヒラ	<i>Acheilognathus tabira jordani</i>		○	○		CR		
50	セボシタヒラ	<i>Acheilognathus tabira nakamurae</i>		○	○		CR		
51	シロヒレヒラ	<i>Acheilognathus tabira tabira</i>		○	○		EN		
52	アカヒレヒラ	<i>Acheilognathus tabira erythropterus</i>		○	○		EN		
53	キタアカヒレヒラ	<i>Acheilognathus tabira tohokuensis</i>		○	○		EN		
54	ゼニタナゴ	<i>Acheilognathus typus</i>	○		○	○	CR		
55	タイリクバラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	○		○			JT	

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
56	ニッポ ^ン ハ ^ラ タナコ ^〇	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	○				CR		
57	ニッポ ^ン ハ ^ラ タナコ ^〇 (大阪型)	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>			○				○
58	ニッポ ^ン ハ ^ラ タナコ ^〇 (山陽型)	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>							
59	ニッポ ^ン ハ ^ラ タナコ ^〇 (九州型)	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>							
60	スイゲ ^ン ゼ ^ニ タナコ ^〇	<i>Rhodeus atremius suigensis</i>		○	○		CR		
61	カゼ ^ト ゲ ^タ ナコ ^〇	<i>Rhodeus atremius atremius</i>	○		○		EN		
62	ハクレン	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>		○	○	○		ST	
63	コクレン	<i>Aristichthys nobilis</i>		○	○	○		ST	
64	ワタカ	<i>Ischikauia steenackeri</i>	○		○		CR		
65	ハ ^ニ ール ^タ ニオ	<i>Danio albolineatus</i>	○		○			ST	
66	セ ^ツ フ ^ラ ダ ^ニ オ	<i>Danio rerio</i>	○		○			ST	
67	カ ^ワ ハ ^タ モロコ	<i>Hemigrammocypripis neglectus</i>	○			○	EN		
68	カ ^ワ ハ ^タ モロコ (本州-四国 型)	<i>Hemigrammocypripis neglectus</i>			○				○
69	カ ^ワ ハ ^タ モロコ (九州型)	<i>Hemigrammocypripis neglectus</i>							
70	ハス	<i>Opsariichthys uncirostris uncirostris</i>	○		○	○	VU		
71	オイカリ	<i>Zacco platypus</i>	○						
72	オイカリ group1	<i>Zacco platypus</i>			○				○
73	オイカリ group2	<i>Zacco platypus</i>							
74	オイカリ group3	<i>Zacco platypus</i>							
75	カ ^ワ ムツ	<i>Nipponocypris temminckii</i>	○						
76	カ ^ワ ムツ group1	<i>Nipponocypris temminckii</i>			○				○
77	カ ^ワ ムツ group2	<i>Nipponocypris temminckii</i>							
78	カ ^ワ ムツ group3	<i>Nipponocypris temminckii</i>							
79	ヌ ^メ ムツ	<i>Nipponocypris sieboldii</i>	○						
80	ヌ ^メ ムツ group1	<i>Nipponocypris sieboldii</i>			○				○
81	ヌ ^メ ムツ group2	<i>Nipponocypris sieboldii</i>							
82	ヌ ^メ ムツ group3	<i>Nipponocypris sieboldii</i>							
83	ヒ ^ナ モロコ	<i>Aphyocypris chinensis</i>		○	○		CR		
84	ソウキ ^ョ	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	○		○			ST	
85	ア ^ウ オ	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	○		○			ST	
86	ヤチウ ^ケ イ	<i>Phoxinus perenurus sachalinensis</i>	○		○		NT		
87	ア ^ラ ハヤ	<i>Rhynchocypris lagowskii steindachneri</i>		○	○				
88	ヤマナカ ^{ハヤ}	<i>Phoxinus lagowskii yamamotisi</i>			×		DD		
89	タカ ^{ハヤ}	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>							
90	タカ ^{ハヤ} group1	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>		○	○				○
91	タカ ^{ハヤ} group2	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>							
92	シ ^ユ ウ ^サ ン ^ウ ケ ^イ	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>		○	○		LP		
93	マル ^タ	<i>Tribolodon brandtii maruta</i>		○	○				
94	ウ ^ケ チ ^ウ ケ ^イ	<i>Tribolodon nakamurai</i>	○		○		EN		
95	エ ^ツ ウ ^ケ イ	<i>Tribolodon sachalinensis</i>	○		○		LP		
96	ウ ^ケ イ	<i>Tribolodon hakonensis</i>	○						
97	ウ ^ケ イ group1	<i>Tribolodon hakonensis</i>			○				○
98	ウ ^ケ イ group2	<i>Tribolodon hakonensis</i>							
99	ウ ^ケ イ group3	<i>Tribolodon hakonensis</i>							
100	モ ^ツ コ ^〇	<i>Pseudorasbora parva</i>	○			○			
101	モ ^ツ コ ^〇 group1	<i>Pseudorasbora parva</i>							
102	モ ^ツ コ ^〇 group2	<i>Pseudorasbora parva</i>			○				○
103	モ ^ツ コ ^〇 group3	<i>Pseudorasbora parva</i>							
104	モ ^ツ コ ^〇 group4	<i>Pseudorasbora parva</i>							
105	シ ^{ナイ} モ ^ツ コ ^〇	<i>Pseudorasbora pumila</i>	○		○		CR		
106	ウ ^シ モ ^ツ コ ^〇	<i>Pseudorasbora pugnax</i>	○		○		CR		
107	ア ^ラ ヒ ^カ イ	<i>Sarcocheilichthys biwaensis</i>		○	○		CR		
108	カ ^ワ ヒ ^カ イ	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>					NT		
109	カ ^ワ ヒ ^カ イ (東海型)	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>		○	○				○
110	カ ^ワ ヒ ^カ イ (西日本型)	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>							

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
111	ヒノヒガイ	<i>Sarcocheilichthys variegatus microoculus</i>		○	○				
112	ムギツク	<i>Pungtungia herzi</i>	○		○				
113	タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>							
114	タモロコ E1(西日本型)	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>		○	○				○
115	タモロコ E2(東海型)	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>							
116	タモロコ E3(伊那型)	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>							
117	スワモロコ	<i>Gnathopogon elongatus suwae</i>			×		EX		
118	ホンモロコ	<i>Gnathopogon caeruleus</i>		○	○		CR		
119	ゼゼラ	<i>Biwia zezera</i>	○				VU		
120	ゼゼラ(岐阜型)	<i>Biwia zezera</i>							
121	ゼゼラ(琵琶湖型)	<i>Biwia zezera</i>			○				○
122	ゼゼラ(山陽型)	<i>Biwia zezera</i>							
123	ゼゼラ(九州型)	<i>Biwia zezera</i>							
124	ヨトゼゼラ	<i>Biwia yodoensis</i>	○		○		EN		
125	カマツカ	<i>Pseudogobio esocinus</i>		○	○				
126	ナガレカマツカ	<i>Pseudogobio agathonectris</i>		○	○				○
127	スナゴカマツカ	<i>Pseudogobio polysticta</i>		○	○				
128	ツチフキ	<i>Abbottina rivularis</i>					EN		
129	ツチフキ(大陸型)	<i>Abbottina rivularis</i>		○	○				○
130	ツチフキ(日本在来型)	<i>Abbottina rivularis</i>							
131	スナゴイ	<i>Hemibarbus longirostris</i>		○	○				
132	コウライゴイ	<i>Hemibarbus labeo</i>		○	○				
133	ゴイ	<i>Hemibarbus barbuis</i>		○	○				
134	イトモロコ	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>	○						
135	イトモロコ group1	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>				○			○
136	イトモロコ group2	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>							
137	イトモロコ group3	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>							
138	デメモロコ	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>					VU		
139	デメモロコ(琵琶湖型)	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>		○	○				○
140	デメモロコ(濃尾型)	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>							
141	スコモロコ	<i>Squalidus chankaensis biwae</i>		○	○		VU		
142	コウライモロコ	<i>Squalidus biwae tsuchigae</i>		○	○				
143	アカヒレ	<i>Tanichthys albonubes</i>	○		○			ST	
144	トシヨウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>		○	○		NT		
145	キタトシヨウ	<i>Misgurnus sp. (Clade A)</i>		○	○		DD		
146	ヒヨウモントシヨウ	<i>Misgurnus sp. OK</i>			×		DD		○
147	シノヒトシヨウ	<i>Misgurnus sp. IR</i>	○		○		DD		
148	トシヨウ(大陸産)	<i>Misgurnus anguillicaudatus Clade B-1</i>		○	○				
149	カラトシヨウ	<i>Misgurnus dabryanus</i>		○	○			ST	
150	オオシマトシヨウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type A</i>	○		○				
151	ニシマトシヨウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type B</i>		○	○				
152	ヒカシマトシヨウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type C</i>	○		○				
153	トサシマトシヨウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type D</i>			×		VU		
154	サンヨウコカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis minamorii minamorii</i>		○	○		CR		
155	トウカイコカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis minamorii tokaiensis</i>		○	○		EN		
156	ヒノコカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis minamorii oumiensis</i>		○	○		EN		
157	ヨトコカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis minamorii yodoensis</i>			×		CR		
158	サンインコカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis minamorii saninensis</i>		○	○		EN		
159	チュウカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis striata striata</i>		○	○		VU		
160	ワカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis striata fuchigamii</i>			×		EN		
161	ハカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis striata hakataensis</i>			×		CR		
162	アリアケダシシマトシヨウ	<i>Cobitis kaibarai</i>	○		○		EN		
163	オオカダシシマトシヨウ	<i>Cobitis magnostriata</i>		○	○		EN		
164	タンコダシシマトシヨウ	<i>Cobitis takenoi</i>		○	○		CR		
165	ヤマトシマトシヨウ	<i>Cobitis matsubarae</i>		○	○		VU		

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
166	ヤマトシマトシヨウA型	<i>Cobitis</i> sp. 'yamato' complex Type A			×				
167	オオトシマトシヨウ	<i>Cobitis sakahoko</i>		○	○		EN		
168	イシトシヨウ	<i>Cobitis takatsuensis</i>	○		○		EN		
169	ヒナイトシヨウ	<i>Cobitis shikokuensis</i>	○		○		EN		
170	アシメトシヨウ	<i>Niwaella delicata</i>	○				VU		
171	アシメトシヨウG(太平洋側型)	<i>Niwaella delicata</i>			○				○
172	アシメトシヨウS(日本海側型)	<i>Niwaella delicata</i>							
173	フクトシヨウ	<i>Barbatula oreas</i>	○		○				
174	エゾホトケトシヨウ	<i>Lefua costata nikkonis</i>	○		○		EN		
175	ヒメトシヨウ	<i>Lefua costata</i>	○		○				
176	ホトケトシヨウ	<i>Lefua echigonia</i>					EN		
177	ホトケトシヨウ(北陸型)	<i>Lefua echigonia</i>							
178	ホトケトシヨウ(近畿型)	<i>Lefua echigonia</i>							
179	ホトケトシヨウ(東海型)	<i>Lefua echigonia</i>							
180	ホトケトシヨウ(山形型)	<i>Lefua echigonia</i>		○	○				○
181	ホトケトシヨウ(東北型)	<i>Lefua echigonia</i>							
182	ホトケトシヨウ(北関東型)	<i>Lefua echigonia</i>							
183	ホトケトシヨウ(南関東型)	<i>Lefua echigonia</i>							
184	ホトケトシヨウ(岩手型)	<i>Lefua echigonia</i>							
185	ナカレホトケトシヨウ	<i>Lefua torrentis</i>	○				EN		
186	ナカレホトケトシヨウ(紀伊-四国型)	<i>Lefua torrentis</i>			○				○
187	ナカレホトケトシヨウ(山陽-山陰型)	<i>Lefua torrentis</i>							
188	トウカイナカレホトケトシヨウ	<i>Lefua tokaiensis</i>	○		○		EN		
189	アユモトキ	<i>Parabotia curtus</i>	○		○		CR		
190	キギキ	<i>Tachysurus nudiceps</i>		○	○				
191	ネコキギ	<i>Tachysurus ichikawai</i>	○		○		EN		
192	キバチ	<i>Tachysurus tokiensis</i>	○		○		VU		
193	アリアケキバチ	<i>Tachysurus aurantiacus</i>			×		VU		
194	コウライキギ	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	○		○			ST	
195	イトコナマス	<i>Silurus lithophilus</i>		○	○		NT		
196	タニカワナマス	<i>Silurus tomodai</i>		○	○				
197	ヒメワコオナマス	<i>Silurus biwaensis</i>		○	○				
198	ナマス	<i>Silurus asotus</i>		○	○				
199	アカサ	<i>Liobagrus reinii</i>	○			○	VU		
200	アカサ Group1	<i>Liobagrus reinii</i>			○				○
201	アカサ Group2	<i>Liobagrus reinii</i>							
202	チャンネルキャットフィッシュ	<i>Ictalurus punctatus</i>		○	○			KT	
203	ヒレナマス	<i>Clarias fuscus</i>	○		○			ST	
204	マダラロリカリ	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>		○	○			ST	
205	シシモ	<i>Spirinchus lanceolatus</i>		○	○		LP		
206	キュウリウオ	<i>Osmerus dentex</i>		○	○				
207	ワカサギ	<i>Hypomesus nipponensis</i>		○	○				
208	イシカリワカサギ	<i>Hypomesus olidus</i>		○	○		NT		
209	アユ	<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	○		○	○			
210	リュウキュウアユ	<i>Plecoglossus altivelis ryukyuensis</i>			×	○	CR		
211	アリアケシラウオ	<i>Salanx ariakensis</i>		○	○		CR		
212	アリアケヒメシラウオ	<i>Neosalanx reganiana</i>			×		CR		
213	イトウ	<i>Hucho perryi</i>	○		○	○	EN		
214	フナウツトラウト	<i>Salmo trutta</i>		○	○			SK	
215	カワマス	<i>Salvelinus fontinalis</i>		○	○			ST	
216	レイクトラウト	<i>Salvelinus namaycush</i>	○		○			SK	
217	アメマス	<i>Salvelinus leucomaenis leucomaenis</i>		○	○	○			

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
218	ヤマトイワナ	<i>Salvelinus leucomaenis japonicus</i>		○	○		LP		
219	ニッコウイワナ	<i>Salvelinus leucomaenis pluvius</i>		○	○		DD		
220	ゴキ	<i>Salvelinus leucomaenis imbricus</i>		○	○		VU		
221	オシロコマ	<i>Salvelinus malma krascheninnikovi</i>		○	○	○	VU		
222	ミヤベイワナ	<i>Salvelinus malma miyabei</i>			×		VU		
223	ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	○		○	○		SK	
224	サケ	<i>Oncorhynchus keta</i>		○	○				
225	ヘニサケ(ヒマス)	<i>Oncorhynchus nerka</i>		○	○		CR		
226	クニマス	<i>Oncorhynchus kawamurae</i>			×		EW		
227	カラフトマス	<i>Oncorhynchus gorbusha</i>	○		○				
228	サケマス(ヤマメ)	<i>Oncorhynchus masou masou</i>		○	○		NT		
229	サツキマス(アマゴ)	<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>		○	○		NT		
230	ヒワマス	<i>Oncorhynchus sp.</i>		○	○		NT		
231	タウナギ	<i>Monopterus albus</i>	○		○				
232	タウナギ属の1種(琉球列島)	<i>Monopterus sp.</i>			×		CR		
233	イトヨ	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>				○			
234	イトヨ降海型	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>							
235	イトヨ福井型	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>		○	○				○
236	太平洋系陸封型イトヨ	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 1</i>					LP		
237	イトヨ湖沼型(福島県)	<i>Gasterosteus aculeatus subsp.3</i>							
238	ハリヨ	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 2</i>					CR		
239	ハリヨ(濃尾型)	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 2</i>		○	○				○
240	ハリヨ(近江型)	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 2</i>							
241	ニホニトヨ	<i>Gasterosteus nipponicus</i>		○	○		LP		
242	エゾトヨ	<i>Pungitius tymensis</i>		○	○		VU		
243	ミナトヨ	<i>Pungitius kaibarae</i>		○	○		EX		
244	トヨ属雄物型	<i>Pungitius sp. 3</i>		○	○		CR		
245	トヨ属淡水型	<i>Pungitius sp. 1</i>		○	○		LP		
246	トヨ属汽水型	<i>Pungitius sp. 2</i>		○	○		NT		
247	ムサトヨ	<i>Pungitius sp. 4</i>		○	○		CR		
248	アミカリヨウジ	<i>Hippichthys heptagonus</i>	○		○		EN		
249	ホシイセヨウジ	<i>Microphis argulus</i>			×		CR		
250	ヒメテングヨウジ	<i>Microphis jagorii</i>	○		○		CR		
251	タニヨウジ	<i>Microphis retzii</i>			×		CR		
252	カワボラ	<i>Cestraeus plicatilis</i>		○	○		CR		
253	ナカレフウライボラ	<i>Crenimugil heterocheilos</i>			×		EN		
254	オニボラ	<i>Ellochelon vaigiensis</i>	○		○		DD		
255	アンビニボラ	<i>Chelon subviridis</i>	○		○		DD		
256	カマヒレボラ	<i>Moolgarda pedaraki</i>		○	○		DD		
257	モンナシボラ	<i>Moolgarda engeli</i>		○	○		DD		
258	ベヘレイ	<i>Odontesthes bonariensis</i>	○		○			ST	
259	ネッタインソウワシ	<i>Atherinomorus duodecimalis</i>		○	○		DD		
260	ミナミキンソウワシ	<i>Hypoatherina temminckii</i>		○	○		DD		
261	グリーンソートテール	<i>Xiphophorus hellerii</i>	○		○			ST	
262	カタギシ	<i>Gambusia affinis</i>		○	○			JT	
263	グッピー	<i>Poecilia reticulata</i>	○		○			ST	
264	ミナミダカ	<i>Oryzias latipes</i>		○	○	○	VU		○
265	キタメダカ	<i>Oryzias sakaizumii</i>		○	○	○	VU		○
266	ヒメダカ	<i>Oryzias latipes</i>		○	○				○
267	コモチサヨリ	<i>Zenarchopterus dunckeri</i>	○		○		NT		
268	クルマサヨリ	<i>Hyporhamphus intermedius</i>	○		○		NT		
269	アコヒゲオコゼ	<i>Tetraroge barbata</i>	○		○		CR		
270	ヒゲソリオコゼ	<i>Tetraroge nigra</i>			×		CR		
271	アカメ	<i>Lates japonicus</i>	○		○		EN		
272	インドタカサコイシモチ	<i>Pseudambassis ranga</i>	○		○			ST	

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
273	ナンヨウカサゴ イシモチ	<i>Ambassis interrupta</i>			×		DD		
274	ハナダカサゴ イシモチ	<i>Ambassis macracanthus</i>			×		DD		
275	オヤニラミ	<i>Coreoperca kawamebari</i>	○			○	EN		
276	オヤニラミ group1	<i>Coreoperca kawamebari</i>			○				○
277	オヤニラミ group2	<i>Coreoperca kawamebari</i>							
278	スズキ	<i>Lateolabrax japonicus</i>	○		○		LP		
279	シラスイハタ	<i>Epinephelus bontoides</i>	○		○		DD		
280	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>	○		○	○		KT	
281	オクチハス	<i>Micropterus salmoides</i>		○	○	○		KT	
282	コクチハス	<i>Micropterus dolomieu</i>	○		○			KT	
283	カガミテンジクタイ	<i>Yarica hyalosoma</i>	○		○		CR		
284	ワキイシモチ	<i>Fibramia lateralis</i>	○		○		DD		
285	ヒルギスメリテンジクタイ	<i>Pseudamia amblyuroptera</i>	○		○		DD		
286	ウラウチフエダイ	<i>Lutjanus goldiei</i>			×		CR		
287	タビタビイコシヨウダイ	<i>Plectorhynchus albovittatus</i>			×		DD		
288	ナンヨウチヌ	<i>Acanthopagrus pacificus</i>	○		○		VU		
289	アオキス	<i>Sillago parvisquamis</i>	○		○		CR		
290	アトクキス	<i>Sillaginops macrolepis</i>			×		EN		
291	テッポウウオ	<i>Toxotes jaculatrix</i>			×		CR		
292	カラスメ	<i>Oreochromis mossambicus</i>		○	○			ST	
293	ナイルティラピア	<i>Oreochromis niloticus</i>		○	○			ST	
294	シールティラピア	<i>Tilapia zillii</i>		○	○			ST	
295	ヨコシマイサキ	<i>Mesopristes cancellatus</i>	○		○		CR		
296	ニセシマイサキ	<i>Mesopristes argenteus</i>			×		CR		
297	シミスシマイサキ	<i>Mesopristes iravi</i>			×		CR		
298	トゲナガエコイ	<i>Kuhlia munda</i>			×		EN		
299	ヤマノカミ	<i>Trachidermus fasciatus</i>	○		○		EN		
300	カマキリ(アユカケ)	<i>Cottus kazika</i>	○		○		VU		
301	カジカ大卵型	<i>Cottus pollux</i>		○	○		NT		○
302	カジカ中卵型	<i>Cottus sp.</i>		○	○		EN		○
303	カジカ小卵型	<i>Cottus reinii</i>					EN		
304	ウツセミカジカ(琵琶湖型)	<i>Cottus reinii</i>		○	○				○
305	ウツセミカジカ(回遊型)	<i>Cottus reinii</i>							
306	カンキョウカジカ	<i>Cottus hangiongensis</i>	○		○		LP		
307	ハナカジカ	<i>Cottus nozawae</i>					LP		
308	ハナカジカ(北海道型)	<i>Cottus nozawae</i>		○	○				○
309	ハナカジカ(北東北型)	<i>Cottus nozawae</i>							
310	ハナカジカ(山形型)	<i>Cottus nozawae</i>							
311	エゾハナカジカ	<i>Cottus amblystomopsis</i>	○		○				
312	ウラウチヘビギンボ	<i>Enneapterygius cheni</i>			×		CR		
313	ヒルギギンボ	<i>Omox biporos</i>			×		CR		
314	コマクモギンボ	<i>Omobranchus elongatus</i>		○	○		DD		
315	カワギンボ	<i>Omobranchus ferox</i>			×		CR		
316	ナリタイトヒキヌメリ	<i>Pseudocalliurichthys ikedai</i>			×		DD		
317	ツバサハゼ	<i>Rhyacichthys aspro</i>	○		○		CR		
318	トシコ	<i>Odontobutis obscura</i>	○						
319	トシコ(西九州型)	<i>Odontobutis obscura</i>							
320	トシコ(西瀬戸内海型)	<i>Odontobutis obscura</i>			○				○
321	トシコ(東瀬戸内海型)	<i>Odontobutis obscura</i>							
322	トシコ(山陰-琵琶湖-伊勢型)	<i>Odontobutis obscura</i>							
323	イシトシコ	<i>Odontobutis hikimius</i>	○		○		VU		
324	タナコモトキ	<i>Hypseleotris cyprinoides</i>	○		○		EN		
325	オウギハゼ	<i>Bunaka gyrimoides</i>			×		NT		
326	カリアナコ	<i>Eleotris oxycephala</i>	○		○				
327	テンジクカリアナコ	<i>Eleotris fusca</i>		○	○				

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
328	エリトケハゼ	<i>Belobranchus belobranchus</i>			×		DD		
329	ヤエヤマノコキリハゼ	<i>Butis amboinensis</i>	○		○		CR		
330	ジノメハゼ	<i>Bostyrchus sinensis</i>	○		○		EN		
331	ホシマダラハゼ	<i>Ophiocara porocephala</i>	○		○		VU		
332	タメトモハゼ	<i>Giuris</i> sp. 1	○		○		EN		
333	コシキタメトモハゼ	<i>Giuris</i> sp. 2			×		EN		
334	トウクツミズハゼ	<i>Luciogobius albus</i>			×		CR		
335	ネムリミズハゼ	<i>Luciogobius dormitoris</i>			×		DD		
336	イトミミズハゼ	<i>Luciogobius pallidus</i>	○		○		NT		
337	ナカレミズハゼ	<i>Luciogobius fluviialis</i>			×		NT		
338	ユウスイミズハゼ	<i>Luciogobius fonticola</i>			×		NT		
339	ミナミメミズハゼ	<i>Luciogobius ryukyuensis</i>		○	○		VU		
340	ヒモハゼ	<i>Eutaeniichthys gilli</i>	○		○		NT		
341	シロウオ	<i>Leucopsarion petersii</i>	○		○		VU		
342	ワラスホ	<i>Odontamblyopus lacepedii</i>		○	○		VU		
343	アサガラハゼ	<i>Caragobius urolepis</i>	○		○		VU		
344	チワラスホ	<i>Taenioides cirratus</i>		○	○		EN		
345	ヒゲワラスホ	<i>Trypauchenopsis intermedia</i>		○	○		VU		
346	トカゲハゼ	<i>Scartelaos histophorus</i>	○		○		CR		
347	ムツコロウ	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	○		○		EN		
348	タビラクチ	<i>Apocryptodon punctatus</i>	○		○		VU		
349	トビハゼ	<i>Periophthalmus modestus</i>		○	○		NT		
350	トサカハゼ	<i>Cristatogobius lophius</i>	○		○		EN		
351	ヒメトサカハゼ	<i>Cristatogobius aurimaculatus</i>			×		CR		
352	クロトサカハゼ	<i>Cristatogobius nonatoae</i>	○		○		CR		
353	シマサルハゼ	<i>Oxyurichthys takagi</i>			×		CR		
354	ミスジハゼ	<i>Callogobius</i> sp.			×		CR		
355	ハゼクチ	<i>Acanthogobius hasta</i>	○		○		VU		
356	ミナミアシロハゼ	<i>Acanthogobius insularis</i>			×		VU		
357	ヨロイホウスハゼ	<i>Lentipes armatus</i>	○		○		CR		
358	カエルハゼ	<i>Smilosicyopus leprurus</i>			×		CR		
359	アカホウスハゼ	<i>Sicyopus zosterophorus</i>			×		CR		
360	ヒノコモホウスハゼ	<i>Sicyopus auxilimentus</i>			×		DD		
361	ルリホウスハゼ	<i>Sicyopterus lagocephalus</i>		○	○		VU		
362	ホウスハゼ	<i>Sicyopterus japonicus</i>		○	○				
363	カキイロヒメホウスハゼ	<i>Stiphodon surrufus</i>			×		DD		
364	ナンヨウホウスハゼ	<i>Stiphodon percnopterygius</i>	○		○				
365	ハヤセホウスハゼ	<i>Stiphodon imperiorientis</i>			×		CR		
366	コンテリホウスハゼ	<i>Stiphodon atropurpureus</i>			×		CR		
367	ヒスイホウスハゼ	<i>Stiphodon alcedo</i>	○		○		CR		
368	ニライカナイホウスハゼ	<i>Stiphodon niraikanaensis</i>			×		DD		
369	トラフホウスハゼ	<i>Stiphodon multisquamus</i>			×		DD		
370	ワカケササハゼ	<i>Amblygobius linki</i>			×		NT		
371	シラスナイハゼ	<i>Silhouettea dotui</i>			×		NT		
372	ニセシラスナイハゼ	<i>Silhouettea</i> sp.			×		NT		
373	キンホハゼ	<i>Parkraemeria saltator</i>	○		○		VU		
374	マンダローフコマハゼ	<i>Pandaka lidwilli</i>	○		○		VU		
375	コマハゼ	<i>Pandaka</i> sp.			×		VU		
376	カブキハゼ	<i>Eugnathogobius mindora</i>			×		NT		
377	フタホシハゼ	<i>Mugilogobius fuscus</i>			×		DD		
378	ホホクシロハゼ	<i>Mugilogobius cavifrons</i>	○		○		EN		
379	ムジナハゼ	<i>Mugilogobius mertoni</i>			×		VU		
380	マサコハゼ	<i>Pseudogobius masago</i>	○		○		VU		
381	コクチスナコハゼ	<i>Pseudogobius gastrospilus</i>			×		DD		
382	エリハゼ	<i>Schismatogobius roxasi</i>	○		○		EN		
383	シマエソハゼ	<i>Schismatogobius ampluvinculus</i>			×		EN		

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的のプラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
384	タネカワハゼ	<i>Stenogobius</i> sp.	○		○				
385	トウケハゼ	<i>Stenogobius ophthalmoporus</i>			×		DD		
386	クロミナシハゼ	<i>Awaous melanocephalus</i>	○		○				
387	シロチチフ	<i>Tridentiger nudicervicus</i>			×		NT		
388	ショウキハゼ	<i>Tridentiger barbatus</i>		○	○		NT		
389	アカオビシマハゼ	<i>Tridentiger trigonocephalus</i>		○	○				
390	シモフリシマハゼ	<i>Tridentiger bifasciatus</i>		○	○				
391	ヌマチチフ	<i>Tridentiger brevispinis</i>		○	○				
392	チチフ	<i>Tridentiger obscurus</i>		○	○				
393	ナカノコリ	<i>Tridentiger kuroiwae</i>		○	○				
394	タスキヒナハゼ	<i>Redigobius balteatus</i>	○		○		DD		
395	カラクモハゼ	<i>Bathygobius</i> sp.			×		CR		
396	ヒラヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp.DL			×				
397	カワヨシノボリ	<i>Rhinogobius flumineus</i>							
398	カワヨシノボリ group1	<i>Rhinogobius flumineus</i>		○	○				○
399	カワヨシノボリ group2	<i>Rhinogobius flumineus</i>							
400	カワヨシノボリ group3	<i>Rhinogobius flumineus</i>							
401	シマヨシノボリ	<i>Rhinogobius nagoyae</i>		○	○				
402	ルリヨシノボリ	<i>Rhinogobius mizunoi</i>		○	○				
403	アヤヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp.MO		○	○				
404	オオヨシノボリ	<i>Rhinogobius fluviatilis</i>		○	○				
405	クロヨシノボリ	<i>Rhinogobius brunneus</i>		○	○				
406	オカサワヨシノボリ	<i>Rhinogobius ogasawaraensis</i>		○	○		EN		
407	コクラクハゼ	<i>Rhinogobius similis</i>	○		○				
408	アオハラヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. BB			×		CR		
409	トウカイヨシノボリ	<i>Rhinogobius telma</i>		○	○		NT		
410	クロタハゼ	<i>Rhinogobius kurodai</i>			×				
411	シマヒレヨシノボリ	<i>Rhinogobius tyoni</i>		○	○		NT		
412	キハラヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. YB		○	○		EN		
413	ヒラヨシノボリ	<i>Rhinogobius biwaensis</i>		○	○		DD		
414	カズサヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. KZ		○	○				
415	オウミヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. OM		○	○				
416	旧トウヨシノボリ類	<i>Rhinogobius</i> sp. OR		○	○				
417	アコヒケハゼ	<i>Glossogobius bicirrhosus</i>			×		CR		
418	スタレウロハゼ	<i>Glossogobius circumspectus</i>			×		NT		
419	コンシキハゼ	<i>Glossogobius aureus</i>	○		○		CR		
420	フタコハゼ	<i>Glossogobius</i> sp.			×		DD		
421	ホクロハゼ	<i>Acentrogobius caninus</i>	○		○		NT		
422	キララハゼ	<i>Acentrogobius viridipunctatus</i>			×		VU		
423	ニセツムキハゼ	<i>Acentrogobius audax</i>			×		NT		
424	ホホグロスシハゼ	<i>Acentrogobius suluensis</i>			×		NT		
425	イサザ	<i>Gymnogobius isaza</i>		○	○		CR		
426	スミウキコリ	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>		○	○		LP		
427	ウキコリ	<i>Gymnogobius urotaenia</i>		○	○				
428	シマウキコリ	<i>Gymnogobius opperiens</i>		○	○				
429	ヘビハゼ	<i>Gymnogobius mororanus</i>	○		○		DD		
430	シンジコハゼ	<i>Gymnogobius taranetzi</i>		○	○		VU		
431	シユスカケハゼ	<i>Gymnogobius castaneus</i>		○	○		NT		
432	コシノハゼ	<i>Gymnogobius nakamurae</i>			×		CR		
433	ムサシノシユスカケハゼ	<i>Gymnogobius</i> sp. 1	○		○		EN		
434	ホクリクシユスカケハゼ	<i>Gymnogobius</i> sp. 2		○	○		CR		
435	チクゼンハゼ	<i>Gymnogobius uchidai</i>	○		○		VU		
436	クホハゼ	<i>Gymnogobius scrobiculatus</i>	○		○		EN		
437	キセルハゼ	<i>Gymnogobius cylindricus</i>			×		EN		
438	エトハゼ	<i>Gymnogobius macrognathos</i>	○		○		VU		
439	ウラウチイハゼ	<i>Eviota ocellifer</i>			×		CR		

二次的自然環境に生息する淡水魚類

No.	種和名	学名	MiFish 法で識 別可能 な種	MiFish 法で識 別に注 意を要 する種	MiFish 領域の 有無	種特異 的プラ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
440	ナミノコハゼ	<i>Gobitrichinotus radiocularis</i>			×		NT		
441	トンカスナハゼ	<i>Kraemeria tongaensis</i>			×		DD		
442	マイコハゼ	<i>Parioglossus lineatus</i>			×		DD		
443	コマチハゼ	<i>Parioglossus taeniatus</i>			×		CR		
444	ホルネオハゼ	<i>Parioglossus palustris</i>			×		VU		
445	コヒトハゼ	<i>Parioglossus rainfordi</i>			×		EN		
446	ヒメサツキハゼ	<i>Parioglossus interruptus</i>			×		CR		
447	クジヤクハゼ	<i>Parioglossus caeruleolineatus</i>			×		DD		
448	タイワンキンギョ	<i>Macropodus opercularis</i>		○	○		CR		
449	チョウセンブナ	<i>Macropodus ocellatus</i>		○	○				
450	コウタイ	<i>Channa asiatica</i>	○		○				
451	タイワントシヨウ	<i>Channa maculata</i>		○	○				
452	カムルチー	<i>Channa argus</i>		○	○	○			
453	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) 河川における流量 500m 間隔での環境 DNA 分析と現地採集調査による魚類検出結果の比較. 保全生態学研究, 23(2): 257-264.
ニホンウナギ	TaqMan	Minegishi Y, Yoshinaga T, Aoyama J, Tsukamoto K (2009) Species identification of <i>Anguilla japonica</i> by real-time PCR based on a sequence detection system: a practical application to eggs and larvae. ICES Journal of Marine Science, 66(9): 1915-1918.
		Itakura H, Wakiya R, Yamamoto S, Kaifu K, Sato T, Minamoto T (2019) Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance and biomass of Japanese eels at the river basin scale. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 29: 361-373.
コイ	TaqMan	Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. PLoS ONE, 7(4): e35868.
キンギョ	SYBR	Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM (2014) Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. Environmental Science & Technology, 48(3): 1819-1827.
ゼニタナゴ	TaqMan	Sakata MK, Maki N, Sugiyama H, Minamoto T (2017) Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, <i>Acheilognathus typus</i> , in a natural river in Japan. The Science of Nature, 104: 100-108.
ハクレン	TaqMan	Merkes CM, McCalla SG, Jensen NR, Gaikowski MP, Amberg JJ (2014) Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data. PLoS ONE, 9: e113346.
コクレン	TaqMan	Wilson C, Wright E, Bronnenhuber J, MacDonald F, Belore M, Locke B (2014) Tracking ghosts: combined electrofishing and environmental DNA surveillance efforts for Asian carps in Ontario waters of Lake Erie. Management of Biological Invasions, 5: 225-223.
カワバタモロコ	TaqMan	福岡 有紗, 高原 輝彦, 松本 宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸 敦史, 源 利文 (2016) 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立. 日本生態学会誌, 66: 613-620.
ハス	TaqMan	Yamanaka H, Takao D, Maruyama A, Imamura A (2018) Species-specific detection of the endangered piscivorous cyprinid fish <i>Opsariichthys uncirostris uncirostris</i> , three-lips, using environmental DNA analysis. Ecological Research, 33(5): 1075-1078.
モツゴ	SYBR	Robinson C, de Leaniz CG, Rolla M, Consuegra S (2018) Monitoring the eradication of the highly invasive topmouth gudgeon (<i>Pseudorasbora parva</i>) using a novel eDNA assay. bioRxiv, 409821.
アユ リュウキュウアユ	TaqMan	Yamanaka H, Minamoto T (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. Ecological Indicators, 62: 147-153.
イトウ	TaqMan	Mizumoto H, Urabe H, Kanbe T, Fukushima M, Araki H (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. Limnology, 19(2): 219-227.
アメマス オシロコマ ニジマス	TaqMan	Minamoto T, Hayami K, Sakata MK, Imamura A (2019) Real-time polymerase chain reaction assays for environmental DNA detection of three salmonid fish in Hokkaido, Japan: Application to winter surveys. Ecological Research, 34(1): 237-242.
イトヨ	TaqMan	Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE, 7(8): e41732.
キタノメダカ ミナメダカ	TaqMan	Tsuji 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, Tsuji 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.

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)		◎	

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	◎
分析情報	8	採水者	○	地域環境計画 後藤	sampledBy	◎
	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. xxxxxxx	treatedFieldNotes	◎	
解析情報	16	解析方法	●	2019 年度環境省環境 DNA 標準化業務試行調査手順（解析パイプライン）	analyzingProtocol	◎
	17	解析日	●	2019/9/13	analyzingDate	◎
	18	解析パイプライン	●	KEEA Pipeline for MiFish ver0.1 (UNOISE3)	analyzingMethod	◎
	19	参照データベース	●	GenBank BLAST (2019/9/13)	analyzingReference	◎
	20	解析結果の要約	○	Number of OTUs: 16, Total size: 135537	analysisSummary	◎
	21	解析者	○	●●株式会社 山田	analyzedBy	◎
	22	解析データへのリンク	○	OTU-table: 5St1-1	analyzedFieldNotes	◎

調査情報（コアファイル）の入力項目（案）

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

※1 入力的重要度：●は必須項目、○は推奨項目

※2 公開可否：◎は公開情報、×は非公開情報

コアファイルに付随する生物情報の入力項目（案）

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

※1 入力的重要度：●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

引用文献

- i (一社) 環境 DNA 学会ホームページ (<http://ednasociety.org/edna>) より
- ii 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.
- iii 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
- iv 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
- v 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
- vi 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.
- vii 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
- viii Christopher L. Jerde et al. (2011) : “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. Conservation Letters, vol. 4, 150-157
- ix 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
- x 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.
- xi 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.
- xii 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
- xiii 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)
- xiv 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
- xv 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.

- * 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」での検討を経て、令和 2 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 1 版

発行日 令和 2 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 Fax : 0555-72-6035
URL: <http://www.biodic.go.jp/>

制作
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>