



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2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「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」が改正され、二次的自然に分布する種を対象とした「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。こうした中で、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 版を公開しました。この第 2 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、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。

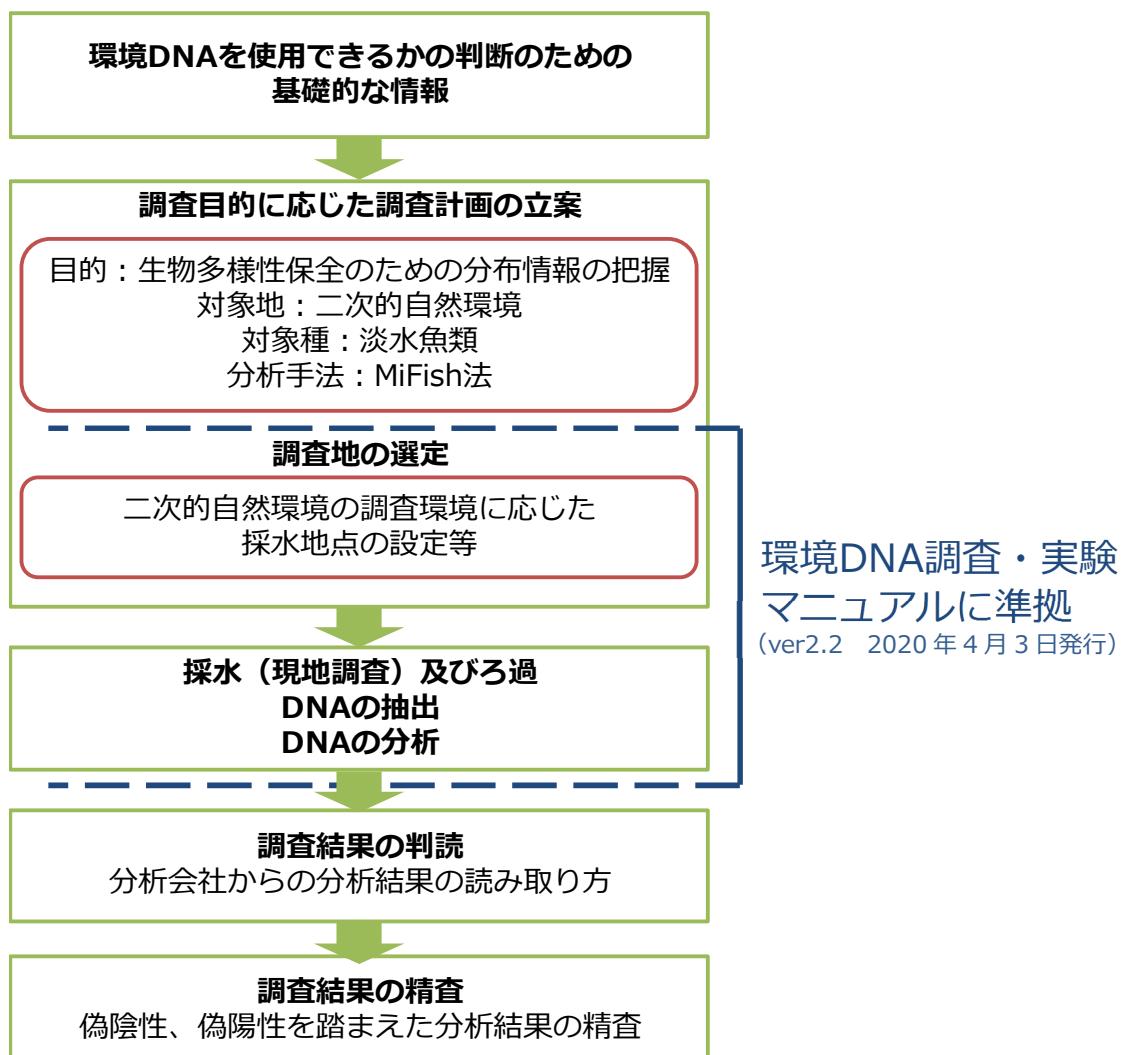
本手引きを活用していただき、環境 DNA 分析技術を、淡水魚類の分布情報の把握、希少種保全の推進や外来種対策の強化などの今後の生物多様性保全施策へつなげていただければ幸いです。

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て作成されたものです。環境DNA分析技術を用いた調査・実験に関する情報としては、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、特に環境DNAを利用した二次的自然環境に生息する淡水魚類調査の実施にあたり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。以下を踏まえて参考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、本手引きでは調査地として大規模河川を想定したものではありません。

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	6
1-3-3	環境 DNA 調査の注意点	8
1-3-4	偽陽性及び偽陰性に関する解説	10
2.	環境 DNA 調査の手順	13
3.	調査を実施する前に	14
3-1	環境 DNA 調査の実施の判断	14
3-2	調査計画	14
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	14
3-2-2	調査地点（位置・地点数）・時期・頻度の設定	15
3-2-3	調査計画を検討するまでの参考情報	17
3-2-4	採水方法の特徴と各採水方法に適した調査	19
3-2-5	事前の準備（立ち入り等）	20
3-2-6	安全管理	20
3-3	調査機材などの準備	21
4.	現地調査	22
4-1	環境 DNA サンプルの採水手順	22
4-1-1	採水地点での確認事項	22
4-1-2	採水準備	22
4-1-3	採水および塩化ベンザルコニウム液の添加	22
4-1-4	フィールドデータの記録	22
4-1-5	保管・輸送	22
4-2	フィールドデータの記録方法	26
5.	分析	27
6.	分析結果の判読	29
7.	分析結果の精査	30

おわりに

<巻末資料>

○用語集	33
------------	----

<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	35
○参考資料 2 分析会社へお願ひする分析工程記録表（例）	49
○参考資料 3 環境 DNA 調査結果のデータ入力項目の事例	51
○参考資料 4 調査計画を検討する上での参考情報	53
○参考資料 5 環境 DNA 分析に関する参考情報	59
○参考資料 6 環境 DNA 調査の事例紹介	69
○参考資料 7 データ公表に対する考え方	75
○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.....	77

1. 環境 DNA 調査を始める前に

1-1 環境 DNA 調査とは

水中、土壤中、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。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と比較的簡易です。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 分析によつて、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可能となっています。しかし、現地で水を汲んでから、最終的な結果（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、1 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。

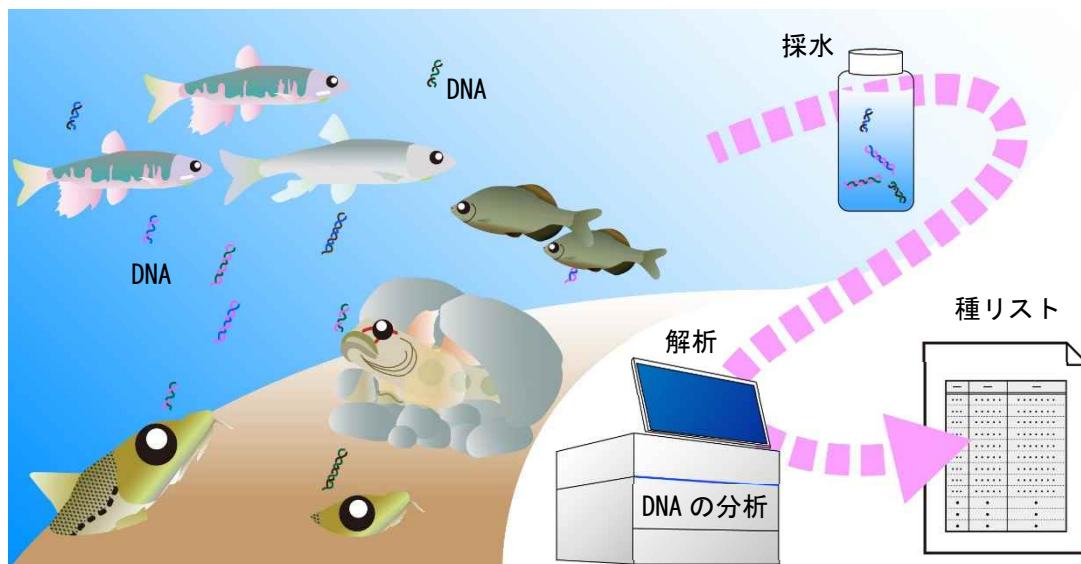


図 1-1 環境 DNA 調査のイメージ図

※本文中の i、ii、iii 等は、p32 掲載の引用文献を示しています。

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 3 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。

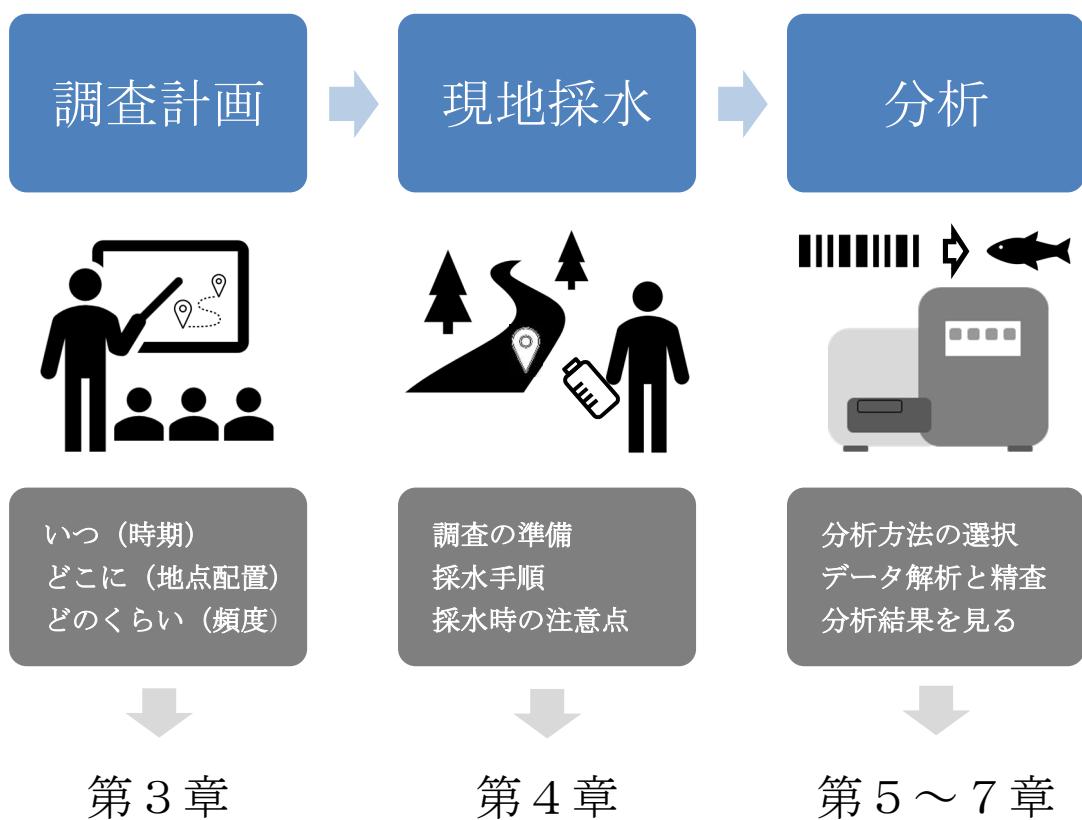


図 1-2 環境 DNA 調査の流れ



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、以下に記します。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。
- 採水地点を決める際の考え方は、基本的には捕獲調査で地点を選ぶ際と同様で、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します。
- 現地での採水は、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※が少ないと、例えば生息密度の低い希少種等が検出されない可能性があるため注意が必要です。

※反復回数とは、1地点あたりの採水瓶の本数（1本=1反復、3本=3反復）を示す。ただし、バケツ等で採水した水を分水した場合は反復と見なさない。



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、以下に記します。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、塩素系漂白剤等で付着したDNAを事前にしっかりと除去しておく必要があります。
- 採水の際は、安全管理に十分に配慮した上で、定められた手順に従って、確実かつ丁寧に進めましょう。
- 暑い時期には、採水したサンプルが高温にならないように、クーラーボックスに保冷剤や氷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、以下に記します。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、基本的には分析機関等に委託する必要があります。
- その地点に生息する魚類を把握したい時には「網羅的解析法（MiFish法）」が、特定の種の生息状況を把握したい時には「種特異的検出法」が推奨されます。
- 環境DNA調査では、その種が実際には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、分析結果を判読する必要があります。
- 環境DNA調査の分析結果を判読する際は、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もとに、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 調査の特徴や、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、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^{vii}」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）^{viii}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ではなく、生息地への立入りも少なくてすむことから、「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・タモ網等による捕獲 ^{*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 (漁具による損傷、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)	メタバーコンディング分析等
		種特異的検出	リアルタイム PCR 分析等
	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。

1-3-2 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^{xii}。

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 1-3）。

● 「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ます。^{xiii}
- ・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^{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 の濃度を推定できる^{vi}。

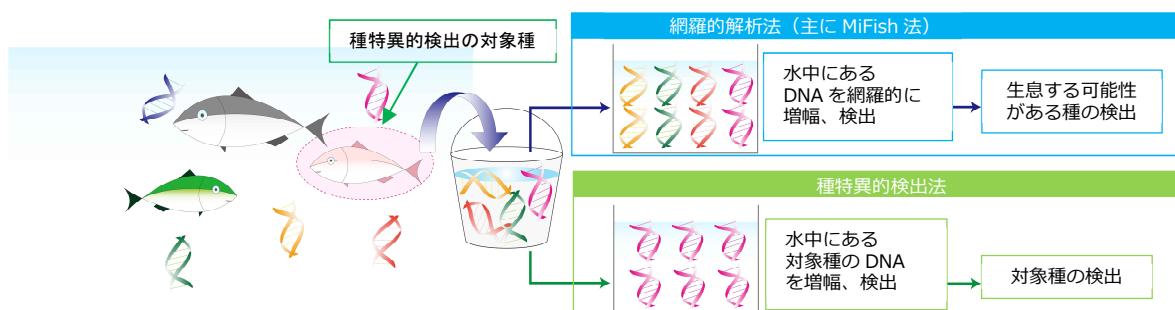


図 1-3 網羅的解析法 (MiFish 法) と種特異的検出法のイメージ

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

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

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

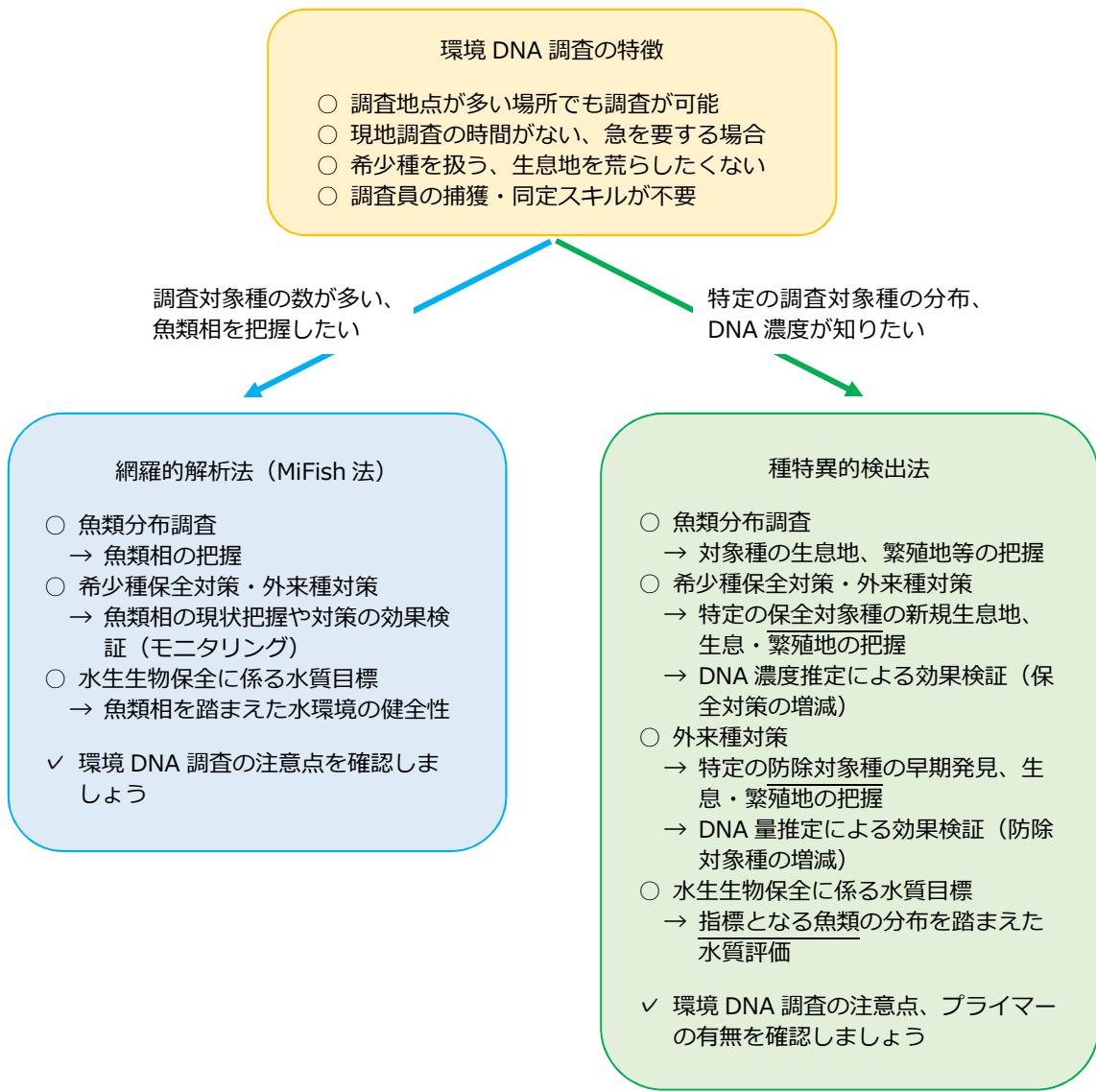


図 1-4 環境 DNA 調査の特徴と各検出方法で活用可能な保全施策の例

1-3-3 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する、知っておくべき重要なポイントを以下に 3 つ挙げます。

- 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がわからない、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、生きているのかどうかわからず、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)^{viii}」、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)^{viii}」といった問題などが生じることがあります。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、偽陰性や偽陽性の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と考えられ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 ^{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。
	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 ^{vii} 。 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 法で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。
	環境 DNA は流れの影響を受けて移動・拡散する。種の生息密度が低いほど、採水したサンプルに種の環境 DNA が含まれる可能性は低くなる。そのため、種の検出率は必ずしも 100%ではない ^{vii} 。【▲・△】	「調査地点・時期・頻度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。
	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、少數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} 。【▲】	P.15-17

【▲】…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 は時間とともに分解、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、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 ^{xiii} 。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）部位の配列を変更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 ^{xiii} 。【△】	「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。【▲】	降雨時やその直後の採水は避けることが望ましい。	P.15	
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。（環境省に申請することで入手できます）	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。



要因① 調査地の外側から流入した水に含まれるDNAに起因する検出



要因② 採水・分析時に生じるサンプル内へのコンタミネーション（試料汚染）



要因③ シークエンス解析時に生じるエラー、データベース等に起因する誤検出・誤同定

図 1-5 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、交雑個体由來の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



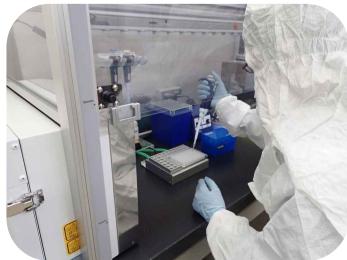
同じ調査地であっても、採水する位置や時間（時期）により生息密度などが異なることで、種の DNA を検出できる確率がばらつく可能性があります。



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



対象種が採水地点に生息していた場合でも、DNA の濃度が低い場合には、偶然の影響によって種の DNA が不検出になる可能性があります。



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対象種の DNA が含まれていた場合でも、分析時のピペット操作などの影響によって、種の DNA が不検出になる可能性があります。

図 1-6 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、種が移動できる範囲が広くなるほど、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、一般的に、種の生息密度が低いほど水中に含まれる DNA 濃度も低いため、採水サンプルにその種の DNA が含まれる可能性は小さくなり、結果的に偽陰性が起きやすくなると考えられます。

要因②による偽陰性への対策方法の一つとして、調査 1 回 1 地点当たりに採水するサンプル本数を 1 本から 2 本以上に増やす「反復採水」があります。反復採水を行うことで、種の DNA がサンプルに含まれる確率が向上し、結果的に偽陰性が生じにくくなると考えられます。反復採水の効果については、その概要が 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るなど、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クエンサー（次世代シークエ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 以上にするほか、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よいでしょう。

調査を実施する前に p.14~21

調査対象種が網羅的解析法（MiFish 法）で調べることが出来るのかをチェックします。

調査目的を踏まえて調査地点（位置・地点数）や調査時期を設定します。

事前準備として、調査地点への立ち入りや安全管理についての確認、調査機材などの準備を行います。



現地調査 p.22~26

調査地で採水を行い、フィールドデータを記録します。



分析 p.27~28

サンプルを濾過し、DNA を抽出し、網羅的解析法（MiFish 法）で分析します。

※分析業者等へ外注をすることが多いです。



分析結果の判読 p.29

分析結果（一致率が高い生物種リスト）が出来上がります。

※環境 DNA 分析での一般的な結果です。



分析結果の精査 p.30

分析結果（一致率が高い生物種リスト）を既存文献等の情報をもとに精査を行い、最終的な結果（種リスト）を作成します。

※コンサルティング業者等へ外注することもあります。

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なため、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、いざ調査地に行つてみると、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ます。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	必要に応じて、調査地の環境もしくは魚類相に詳しい専門家にヒアリングを行い、さらに詳細な情報を収集します。

3-2-2 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・頻度の設定にあたり、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・頻度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＞

- ・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）がわかっているれば、その周辺には設定しない（偽陰性の防止）。

＜調査時期＞

- ・一般的に淡水魚類の活動が盛んになる「春から秋にかけて」の時期が適している（偽陰性の防止）。→参考資料 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。
- ・優占種の産卵期に産卵場周辺で採水をすると、サンプル内に優占種の DNA 断片が多く含まれることで、DNA 断片が少ない種が検出されにくい場合があるので、留意が必要（偽陰性の防止）。

＜反復採水＞

- ・1 地点あたりの採水の反復数を 1 回から 2 ~ 3 回に増やすことで、生息密度の低い種が検出される確率が高まることが期待される（偽陰性の防止）。→参考資料 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・時期を検討されるとよいでしょう。

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^{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） ・湖沼内のみの魚類相を把握したい場合は、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"> ・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、湖沼での生息時期に調査を行う（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"> ・調査対象種の産卵時期、または活動が活発化する時期に調査を行う（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<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"> ・調査対象種の産卵時期、または活動が活発化する時期に調査を行う（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"> ・対象とする調査範囲の魚類相のみを調査する場合は、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 <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に調査を行う（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<p><調査地点></p> <ul style="list-style-type: none"> ・余水吐等の流出口周辺（効率的な DNA の採取） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） ・ため池のみの魚類相を把握したい場合は、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"> ・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）
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"> ・余水吐等の流出口周辺（効率的な DNA の採取） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） ・ため池のみの魚類相を把握したい場合は、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"> ・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）
	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"> ・調査対象種の産卵時期、または活動が活発化する時期に調査を行う（効率的な DNA の採取）
	希少種保全対策の効果検証	<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"> ・余水吐等の流出口周辺（効率的な DNA の採取） ・採水しやすい岸際（安全性の確保） ・ため池のみの魚類相を把握したい場合は、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"> ・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）
	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><調査地点></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）

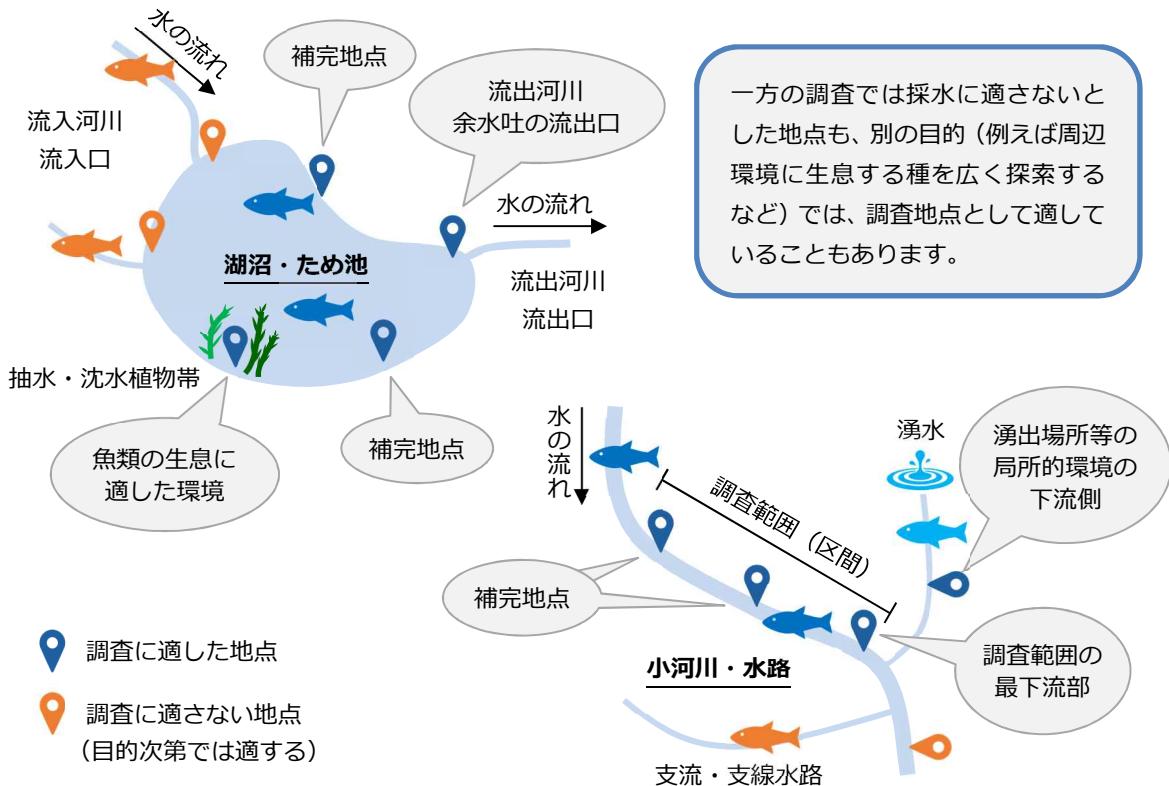


図 3-1 調査地点の配置例

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、参考となる情報は、まだ限られています。そこで、環境省では、個別の調査地における検討事例を積み重ねることで、概括的な指標となるものを求めていくことを目指し、伊豆沼・内沼をモデル地区とした環境DNA調査（重点調査）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、本章に関する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

項目	ポイント
調査地点数	<ul style="list-style-type: none"> 調査地点数が少ない場合は、地点数の増加に伴い、採水サンプルから検出される総種数は増加します。 1 地点当たりの採水反復数を、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できます。
調査時期	<ul style="list-style-type: none"> ほとんどの調査地で、5 月から 11 月の期間内では検出される種数に有意差はみられなかったため、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いえます。 ただし、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。
反復採水	<ul style="list-style-type: none"> 地点あたりの検出種数は、採水反復数を 2 回以上に増やすほど増加しますが、伊豆沼・内沼の事例では、その効果は 4 回以上では大きく変化しませんでした。 生息密度が低いと考えられる種では、反復数を 2 回以上とすることで効果的に検出できることが確認されているため、希少種の生息調査に環境 DNA 調査を適用する場合は、1 地点当たりの反復数を 2 ~ 3 回に増やすことを推奨します。
採水方法の工夫 (ブーリング採水)	<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 本にまとめるブーリング採水は、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。 ブーリング採水では、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。 一方、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、ブ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 調査にブーリング採水を適用する際は、「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、環境省が実施した調査結果からは、夜行性魚類（ニホンウナギ、ナマズなど）の検出率において、採水時間による差の程度は小さいと考えられます、今後時間帯による検出率の違い等の研究が進むことが期待されます。

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ばれるとよいでしょう。

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 ^{xiii} →手順は P.23 参照	・採水時に水中に入つ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.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

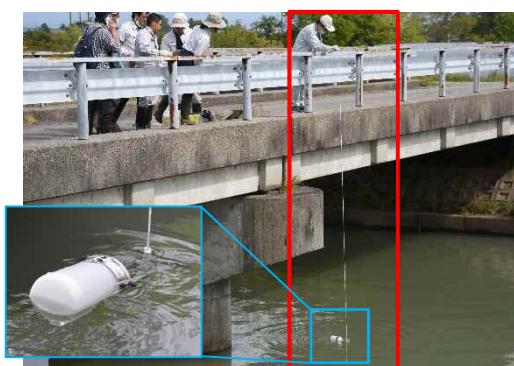


写真4 採水器採水

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、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、危険予測を行い、万が一の事故の際には迅速な対応を行えるように準備をしましょう。

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

<http://www.jma.go.jp/bosai/forecast/>



気象庁 高解像度降水ナウキャスト

[https://www.jma.go.jp/bosai/nowc/#zoom
:5/lat:35.012002/lon:135.131836/color
depth:deep/elements:amds_rain10m&hrpns](https://www.jma.go.jp/bosai/nowc/#zoom:5/lat:35.012002/lon:135.131836/colordepth:deep/elements:amds_rain10m&hrpns)



国土交通省 川の防災情報

[https://www.river.go.jp/portal/?region
=80&contents=multi](https://www.river.go.jp/portal/?region=80&contents=multi)



環境省 热中症予防情報サイト

<https://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}

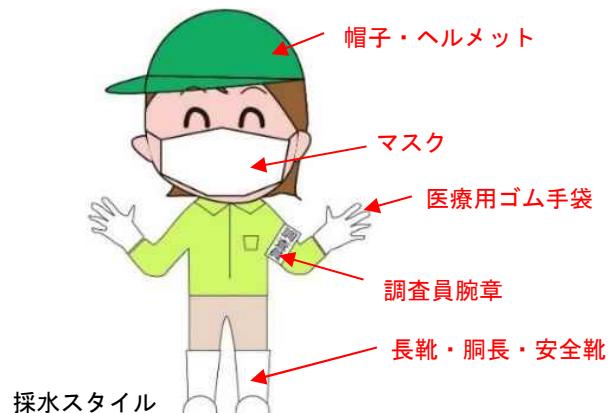
- ・滅菌済ポリ瓶（1L）
- ・10%塩化ベンザルコニウム液（1.2mLに小分けしたもの）
- ・医療用ゴム手袋（2組）
- ・マスク（2組）
- ・チャック付きビニール袋（大）

※右写真参照



<地点共通で使用する必須機材>^{xiv}

- ・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)



<場所により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、釣り人の存在（特に撒き餌を湖行っている場合）、特定の魚類が集団で産卵している、魚類の死がいがあるなど、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、場所を変更しましょう。
- 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しましょう。

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します。
- 2) 作業時には使い捨てゴム手袋をはめて下さい。

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場合、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いましょう。
- 2) 水深、水温などを計測し、表 4-1 に示すフィールドデータを記録します。

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等で保冷して実験室へ輸送して下さい。
- 2) 宅配便を利用する場合はクール便（4 ℃）として下さい。
- 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、現場でサンプルをろ過することが推奨されます。（濾過方法については分析担当者と協議して決定しましょう。）

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、底泥の巻上げによる濁り
が生じないよう留意する。
※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。
※使い捨てプラスティックカップなどを使って移し替えてよい。



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。

※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単な方法も選べます。



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。

※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。



- 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 (推奨)	任意
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、以下のような「①採水したサンプルのろ過」→「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）」の工程で処理を行います。



詳細な各分析の手順については、以下の表 5-1 に環境 DNA 学会が作成した「環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2」（2020 年 4 月 3 日発行）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 を参考にされるとよいでしょう。

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しておくとよいでしょう（令和 3 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 学会が作成、公表している「環境 DNA 調査・実験マニュアル」に従って実施するよう依頼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る（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、生物量と相関していることが多い、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る。
調べることができる種	<ul style="list-style-type: none"> ● 國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 リボソーム RNA 遺伝子領域）が登録されている種 ● 國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る。 ● 一部の種は未登録のため、個別の種の登録状況は、参考資料 1 で要確認。 	<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（参考資料 1 を参照） ● PCR プライマーが設計されていない種も、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、分析が可能となる場合がある。
利点	<ul style="list-style-type: none"> ● 一度の分析で、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、生息密度が低くなつた外来種の検出にも向いている ● 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可能
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"> ● 一度の分析で、1 種の生息情報しか得られないため、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7. 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	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。

アクセスション番号
(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があります。このため、環境DNA分析を依頼する場合には、どのような成果が必要か事前に確認しておく必要があります。なお、「一致率が高い生物種リスト」の精査には、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よいでしょう。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となりました。

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（環境省実施の試行調査）

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・学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 調査地点周辺において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。生息していないと判断（偽陽性）された場合は、「一致率が高い生物種リスト」からの削除を検討します。

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

該当する

生息可能性がある

生息の可能性が高いと判断

↓ 該当しない

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

生息可能性がある

↓ 可能性が非常に低い

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

存在しない
可能性がない

生息の可能性は保留

↓ 可能性がある（疑いも含む）

生息していないと判断：偽陽性

おわりに

二次的自然環境における淡水魚類の調査は、これまで捕獲等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、これまでになかった新たな知見を得ることが可能となりました。

環境 DNA 調査は、従来調査に取って代わるものではありませんが、得られるデータの様々な活用の仕方が期待されています。

また、環境 DNA 調査の特徴を踏まえ、目的に応じて従来の捕獲等による調査方法と環境 DNA 調査を組み合わせることで、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。

環境 DNA 分析技術を活用して行くにあたって、その有効性や得られる情報の限界等についても理解することが必要なことから、本手引きがこれから環境 DNA 調査を始める方々に役立つことができれば幸いです。

本手引きは、令和 2 年（2020 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、本手引きは、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 優生 東北大学大学院 生命科学研究科 教授（座長）
土居 秀幸 兵庫県立大学大学院 シミュレーション学研究科 准教授
源 利文 神戸大学大学院 人間発達環境学研究科 准教授
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
深谷 肇一 国立環境研究所
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

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 積 (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 Egeleyng 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 泽月ら (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.

用語集

➤ 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 法

魚類の分類群全体を対象とし、それらをまとめて同時並列的に分析する環境 DNA メタバーコーディング法（多種同時並列検出法）のうちの一つ。

➤ 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。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※1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 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)※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(2020)「日本産魚類全種リスト（JAF リスト）」

・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（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 2020 「日本産魚類全種リスト（JAF リスト）」。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。

・使用する配列

2021 年 2 月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 法で識別が可能と判断された種】◎ : MiFish 法で種（もしくは亜種・系統）レベルの同定が可能な種
【MiFish 法で識別に注意を要する種】△ : MiFish 法で種（もしくは亜種・系統）レベルの同定が難しいと判断された種

【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文献等により公開されている種

【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 IA 類、EN : 絶滅危惧 IB 類、VU : 絶滅危惧 II 類、NT : 準絶滅危惧、DD : 情報不足、LP : 絶滅のおそれのある地域個体群

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

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

【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リスト

No.	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 的ブロ 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	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 sp. N</i>	◎		◎		VU		
5	スナヤツメ南方種	<i>Lethenteron sp. S</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>	◎		◎		OY		
8	スピッティッドガーフィッシュ	<i>Lepisosteus oculatus</i>		△	◎		OY		
9	ロングノーズガーフィッシュ	<i>Lepisosteus osseus</i>		△	◎		OY		
10	ショートノーズガーフィッシュ	<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（飼育型）	<i>Cyprinus carpio</i>	◎		◎	●			
20	コイ（野生型）	<i>Cyprinus carpio</i>	◎		◎	●	LP		
21	キンギョ	<i>Carassius auratus</i>		△	◎	●			
22	オオキンブナ	<i>Carassius buergeri buergeri</i>		△	◎				
23	ニゴロブナ	<i>Carassius buergeri grandoculis</i>		△	◎		EN		
24	ナガブナ	<i>Carassius buergeri subsp. 1</i>			×		DD		
25	キンブナ	<i>Carassius buergeri subsp. 2</i>		△	◎		VU		
26	ゲンゴロウブナ	<i>Carassius cuvieri</i>	◎		◎		EN		
27	ギンブナ	<i>Carassius sp.</i>		△	◎				
28	フナ属の1種（琉球列島）	<i>Carassius sp.</i>		△	◎		CR		
29	ヤリタナゴ	<i>Tanakia lanceolata</i>	◎		◎		NT		
30	ヤリタナゴ groupF (LA1)	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
31	ヤリタナゴ groupE (LA2)	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
32	ヤリタナゴ groupA (LA3)	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
33	ヤリタナゴ groupG (LA4)	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
34	ヤリタナゴ groupB	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
35	ヤリタナゴ groupC	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
36	ヤリタナゴ groupD-1	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
37	ヤリタナゴ groupD-2	<i>Tanakia lanceolata</i>			◎			◎	
38	ヤリタナゴ groupD-3	<i>Tanakia lanceolata</i>			×			◎	
39	アブラボテ	<i>Tanakia limbata</i>	◎		◎		NT		
40	アブラボテ LI1	<i>Tanakia limbata</i>			◎			◎	
41	アブラボテ LI2	<i>Tanakia limbata</i>			◎			◎	
42	アブラボテ LI3	<i>Tanakia limbata</i>			◎			◎	
43	ミヤコタナゴ	<i>Tanakia tanago</i>	◎		◎		CR		
44	イチモンジタナゴ	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>	◎		◎		CR		
45	イチモンジタナゴ clade1	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>			◎			◎	
46	イチモンジタナゴ clade2	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>			◎			◎	
47	イチモンジタナゴ clade3	<i>Acheilognathus cyanostigma</i>			◎			◎	
48	イタセンバラ	<i>Acheilognathus longipinnis</i>	◎		◎	●	CR		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
49	イタセンバラ（琵琶湖一淀川型）	<i>Acheilognathus longipinnis</i>			×				◎
50	イタセンバラ（濃尾型）	<i>Acheilognathus longipinnis</i>			◎				◎
51	イタセンバラ（富山型）	<i>Acheilognathus longipinnis</i>			×				◎
52	オオタナゴ	<i>Acheilognathus macropterus</i>	◎		◎			OT	
53	タナゴ	<i>Acheilognathus melanogaster</i>	◎		◎		EN		
54	カネヒラ	<i>Acheilognathus rhombeus</i>	◎		◎				
55	アカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira erythropterus</i>	◎		◎		EN		
56	ミナミアカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira jordani</i>	◎		◎		CR		
57	セボンタビラ	<i>Acheilognathus tabira nakamurae</i>	◎		◎		CR		
58	シロヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira tabira</i>	◎		◎		EN		
59	キタノアカヒレタビラ	<i>Acheilognathus tabira tohokuensis</i>	◎		◎		EN		
60	ゼニタナゴ	<i>Acheilognathus typus</i>	◎		◎	●	CR		
61	カゼトゲタナゴ	<i>Rhodeus atremius atremius</i>	◎		◎		EN		
62	スイゲンゼニタナゴ	<i>Rhodeus atremius suigensis</i>	◎		◎		CR		
63	ニッポンバラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	◎		◎		CR		
64	ニッポンバラタナゴ（大阪型）	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>			◎				◎
65	ニッポンバラタナゴ（山陽型）	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>			◎				◎
66	ニッポンバラタナゴ（九州型）	<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>			◎				◎
67	タイリクバラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	◎		◎		JT		
68	ハクレン	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>		△	◎	●	OT		
69	コクレン	<i>Aristichthys nobilis</i>		△	◎	●	OT		
70	ワタカ	<i>Ischikauia steenackeri</i>	◎		◎		CR		
71	バールダニオ	<i>Danio albolineatus</i>	◎		◎		OT		
72	ゼブラダニオ	<i>Danio rerio</i>	◎		◎		OT		
73	カワバタモロコ	<i>Hemigrammocyparis neglectus</i>	◎		◎	●	EN		
74	カワバタモロコ（本州一四国型）	<i>Hemigrammocyparis neglectus</i>			◎				◎
75	カワバタモロコ（九州型）	<i>Hemigrammocyparis neglectus</i>			◎				◎
76	ハス	<i>Opsariichthys uncirostris uncirostris</i>	◎		◎	●	VU		
77	オイカワ	<i>Zacco platypus</i>	◎		◎				
78	オイカワ group1	<i>Zacco platypus</i>			◎				◎
79	オイカワ group2	<i>Zacco platypus</i>			◎				◎
80	オイカワ group3	<i>Zacco platypus</i>			◎				◎
81	ヌマムツ	<i>Nipponocypris sieboldii</i>	◎		◎				
82	ヌマムツ group1	<i>Nipponocypris sieboldii</i>			◎				◎
83	ヌマムツ group2	<i>Nipponocypris sieboldii</i>			◎				◎
84	ヌマムツ group3	<i>Nipponocypris sieboldii</i>			◎				◎
85	カワムツ	<i>Nipponocypris temminckii</i>	◎		◎				
86	カワムツ group1	<i>Nipponocypris temminckii</i>			◎				◎
87	カワムツ group2	<i>Nipponocypris temminckii</i>			◎				◎
88	カワムツ group3	<i>Nipponocypris temminckii</i>			◎				◎
89	ヒナモロコ	<i>Aphyocypris chinensis</i>	◎		◎		CR		
90	ソウギョ	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	◎		◎	●	OT		
91	アオウオ	<i>Mylopharyngodon piceus</i>	◎		◎		OT		
92	ヤマナカハヤ	<i>Phoxinus lagowskii yamamotii</i>			×		DD		
93	ヤチウゲイ	<i>Phoxinus perenurus sachalinensis</i>	◎		◎		NT		
94	アブラハヤ	<i>Rhynchoscypris lagowskii steindachneri</i>	◎		◎				
95	タカハヤ	<i>Rhynchoscypris oxycephalus jouyi</i>	◎		◎				
96	タカハヤ group1	<i>Rhynchoscypris 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	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
97	タカハヤ group2	<i>Rhynchocypris oxycephalus jouyi</i>		◎	◎				◎
98	ジュウサンウゲイ	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>	◎	◎	◎		LP		
99	ジュウサンウゲイ TBB1	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>		◎	◎				◎
100	ジュウサンウゲイ TBB2	<i>Tribolodon brandtii brandtii</i>		×					◎
101	マルタ	<i>Tribolodon brandtii maruta</i>	◎	◎					
102	ウゲイ	<i>Tribolodon hakonensis</i>	◎	◎					
103	ウゲイ group1	<i>Tribolodon hakonensis</i>		◎					◎
104	ウゲイ group2	<i>Tribolodon hakonensis</i>		◎					◎
105	ウゲイ group3	<i>Tribolodon hakonensis</i>		◎					◎
106	ウゲイ group4	<i>Tribolodon hakonensis</i>		◎					◎
107	ウゲイ group5	<i>Tribolodon hakonensis</i>		◎					◎
108	ウゲイ group6	<i>Tribolodon hakonensis</i>		◎					◎
109	ウケクチウゲイ	<i>Tribolodon nakamurai</i>	◎	◎			EN		
110	エゾウゲイ	<i>Tribolodon sachalinensis</i>	◎	◎		●	LP		
111	モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>	◎	◎					
112	モツゴ group1	<i>Pseudorasbora parva</i>		◎					◎
113	モツゴ group2	<i>Pseudorasbora parva</i>		◎					◎
114	モツゴ group3	<i>Pseudorasbora parva</i>		◎					◎
115	モツゴ group4	<i>Pseudorasbora parva</i>		◎					◎
116	ウシモツゴ	<i>Pseudorasbora pugnax</i>	◎	◎			CR		
117	シナイモツゴ	<i>Pseudorasbora pumila</i>	◎	◎			CR		
118	アブラヒガイ	<i>Sarcocheilichthys biwaensis</i>	◎	◎			CR		
119	ビワヒガイ	<i>Sarcocheilichthys variegatus microculus</i>		△	◎				
120	カワヒガイ	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>		△	◎		NT		
121	カワヒガイ（東海型）	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>		○					◎
122	カワヒガイ（西日本型）	<i>Sarcocheilichthys variegatus variegatus</i>		○					◎
123	ムギツク	<i>Pungtungia herzi</i>	◎	◎					
124	ホンモロコ	<i>Gnathopogon caerulescens</i>		△	◎		CR		
125	タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>		△	◎				
126	タモロコ E1（西日本型）	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>		○					◎
127	タモロコ E2（東海型）	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>		○					◎
128	タモロコ E3（伊那型）	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>		○					◎
129	スワモロコ	<i>Gnathopogon elongatus suwae</i>		×			EX		
130	ヨドゼゼラ	<i>Biwia yodoensis</i>	◎	◎			EN		
131	ゼゼラ	<i>Biwia zezera</i>	◎	◎			VU		
132	ゼゼラ（岐阜型）	<i>Biwia zezera</i>		○					◎
133	ゼゼラ（琵琶湖型）	<i>Biwia zezera</i>		○					◎
134	ゼゼラ（山陽型）	<i>Biwia zezera</i>		×					◎
135	ゼゼラ（九州型）	<i>Biwia zezera</i>		×					◎
136	ナガレカマツカ	<i>Pseudogobio agathonectris</i>	◎	◎					
137	カマツカ	<i>Pseudogobio esocinus</i>	◎	◎					
138	スナゴカマツカ	<i>Pseudogobio polystictus</i>	◎	◎					
139	ツチフキ	<i>Abbottina rivularis</i>	◎	◎			EN		
140	ツチフキ（大陸型）	<i>Abbottina rivularis</i>		○					◎
141	ツチフキ（日本在来型）	<i>Abbottina rivularis</i>		○					◎
142	ニゴイ	<i>Hemibarbus barbus</i>		△	◎				
143	コウライニゴイ	<i>Hemibarbus labeo</i>		△	◎				
144	ズナガニゴイ	<i>Hemibarbus longirostris</i>	◎	◎					

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
145	コウライモロコ	<i>Squalidus biwae tsuchigae</i>		△	◎				
146	スゴモロコ	<i>Squalidus chankaensis biwae</i>		△	◎		VU		
147	イトモロコ	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>	◎		◎				
148	イトモロコ group1	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>			◎			○	
149	イトモロコ group2	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>			◎			○	
150	イトモロコ group3	<i>Squalidus gracilis gracilis</i>			◎			○	
151	デメモロコ	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>		△	◎		VU		
152	デメモロコ (琵琶湖型)	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>			◎			○	
153	デメモロコ (濃尾型)	<i>Squalidus japonicus japonicus</i>			◎			○	
154	アカヒレ	<i>Tanichthys albonubes</i>	◎		◎			OT	
155	ドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	◎		◎	●	NT		
156	ドジョウ (往来系統)	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>			◎			○	
157	ドジョウ (大陸系統)	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>			◎			○	
158	キタドジョウ	<i>Misgurnus sp. (Clade A)</i>	◎		◎		DD		
159	シノビドジョウ	<i>Misgurnus sp. IR</i>	◎		◎		DD		
160	ヒヨウモンドジョウ	<i>Misgurnus sp. OK</i>	◎		◎		DD		
161	カラドジョウ	<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	◎		◎			OT	
162	アリアケスジシマドジョウ	<i>Cobitis kaibarai</i>	◎		◎		EN		
163	オオガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis magnostriata</i>	◎		◎		EN		
164	ヤマトシマドジョウ	<i>Cobitis matsubarae</i>	◎		◎		VU		
165	サンヨウコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii minamorii</i>	◎		◎		CR		
166	ビワコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii oumiensis</i>		△	◎		EN		
167	サンインコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii saninensis</i>	◎		◎		EN		
168	トウカイコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii tokaiensis</i>		△	◎		EN		
169	ヨドコガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis minamorii yodoensis</i>			×		CR		
170	オオヨドシマドジョウ	<i>Cobitis sakahoko</i>	◎		◎		EN		
171	ヒナイシドジョウ	<i>Cobitis shikokuensis</i>	◎		◎		EN		
172	オオシマドジョウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type A</i>	◎		◎				
173	ニシシマドジョウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type B</i>	◎		◎				
174	ヒガシシマドジョウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type C</i>	◎		◎				
175	トサシマドジョウ	<i>Cobitis sp. BIWAE type D</i>	◎		◎		VU		
176	ヤマトシマドジョウ A型	<i>Cobitis sp. 'yamato' complex Type A</i>	◎		◎				
177	オンガスジシマドジョウ	<i>Cobitis striata fuchigamii</i>		△	◎		EN		
178	ハカタスジシマドジョウ	<i>Cobitis striata hakataensis</i>		△	◎		CR		
179	チュウガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis striata striata</i>		△	◎		VU		
180	イシドジョウ	<i>Cobitis takatsuenensis</i>	◎		◎		EN		
181	タンゴスジシマドジョウ	<i>Cobitis takenoi</i>	◎		◎		CR		
182	アジメドジョウ	<i>Niwaella delicata</i>	◎		◎		VU		
183	アジメドジョウ G (太平洋側型)	<i>Niwaella delicata</i>			◎			○	
184	アジメドジョウ S (日本海側型)	<i>Niwaella delicata</i>			◎			○	
185	フクドジョウ	<i>Barbatula oreas</i>	◎		◎				
186	ヒメドジョウ	<i>Lefua costata</i>	◎		◎				
187	エゾホトケドジョウ	<i>Lefua costata nikkonis</i>	◎		◎		EN		
188	ホトケドジョウ	<i>Lefua echigonia</i>	◎		◎		EN		
189	ホトケドジョウ (北陸型)	<i>Lefua echigonia</i>			×			○	
190	ホトケドジョウ (近畿型)	<i>Lefua echigonia</i>			◎			○	
191	ホトケドジョウ (東海型)	<i>Lefua echigonia</i>			◎			○	
192	ホトケドジョウ (山形型)	<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	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
193	ホトケドジョウ（東北型）	<i>Lefua echigonia</i>		◎					◎
194	ホトケドジョウ（北関東型）	<i>Lefua echigonia</i>		◎					◎
195	ホトケドジョウ（南関東型）	<i>Lefua echigonia</i>		◎					◎
196	ホトケドジョウ（岩手型）	<i>Lefua echigonia</i>		◎					◎
197	ナガレホトケドジョウ	<i>Lefua sp. 1</i>	◎	◎			EN		
198	ナガレホトケドジョウ（紀伊一四国型）	<i>Lefua sp. 1</i>		◎					◎
199	ナガレホトケドジョウ（山陽一山陰型）	<i>Lefua sp. 1</i>		◎					◎
200	トウカイナガレホトケドジョウ	<i>Lefua sp. 2</i>	◎	◎			EN		
201	アユモドキ	<i>Parabotia curtus</i>	◎	◎	●	CR			
202	アリアケギバチ	<i>Tachysurus aurantiacus</i>	◎	◎		VU			
203	ネコギギ	<i>Tachysurus ichikawai</i>	◎	◎		EN			
204	ギギ	<i>Tachysurus nudiceps</i>	◎	◎					
205	ギバチ	<i>Tachysurus tokiensis</i>	◎	◎		VU			
206	コウライギギ	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	◎	◎			OT		
207	ナマズ	<i>Silurus asotus</i>		△	◎				
208	ビワコオオナマズ	<i>Silurus biwaensis</i>	◎	◎					
209	イワトコナマズ	<i>Silurus lithophilus</i>		△	◎	NT			◎
210	タニガワナマズ	<i>Silurus tomodai</i>		△	◎				◎
211	アカザ	<i>Liobagrus reini</i>	◎	◎	●	VU			
212	アカザ Group1	<i>Liobagrus reini</i>		◎					◎
213	アカザ Group2	<i>Liobagrus reini</i>		◎					◎
214	チャネルキャットフィッシュ	<i>Ictalurus punctatus</i>	◎	◎					
215	ヒレナマズ	<i>Clarias fuscus</i>	◎	◎			OT		
216	マダラロリカリア	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	◎	◎			OT		
217	シシャモ	<i>Spirinchus lanceolatus</i>	◎	◎	●	LP			
218	キュウリウオ	<i>Osmerus dentex</i>	◎	◎					
219	ワカサギ	<i>Hypomesus nippensis</i>	◎	◎					
220	イシカリワカサギ	<i>Hypomesus olidus</i>	◎	◎		NT			
221	アユ	<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	◎	◎	●				
222	リュウキュウアユ	<i>Plecoglossus altivelis ryukyuensis</i>	◎	◎	●	CR			
223	アリアケシラウオ	<i>Salanx ariakensis</i>	◎	◎		CR			
224	アリアケヒメシラウオ	<i>Neosalanx reganius</i>		×		CR			
225	イトウ	<i>Hucho perryi</i>	◎	◎	●	EN			
226	ブラウントラウト	<i>Salmo trutta</i>	◎	◎			SK		
227	カワマス	<i>Salvelinus fontinalis</i>	◎	◎			OT		
228	ゴギ	<i>Salvelinus leucomaenoides imbrius</i>		△	◎	VU			
229	ヤマトイワナ	<i>Salvelinus leucomaenoides japonicus</i>		△	◎	LP			
230	アメマス	<i>Salvelinus leucomaenoides leucomaenoides</i>		△	◎	●			
231	ニッコウイワナ	<i>Salvelinus leucomaenoides pluvialis</i>		△	◎	DD			
232	オショロコマ	<i>Salvelinus malma krascheninnikovi</i>		△	◎	●	VU		
233	ミヤベイワナ	<i>Salvelinus malma miyabei</i>		△	◎	VU			
234	レイクトラウト	<i>Salvelinus namaycush</i>	◎	◎			SK		
235	カラフトマス	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	◎	◎					
236	クニマス	<i>Oncorhynchus kawamurai</i>		×			EW		
237	サケ	<i>Oncorhynchus keta</i>		△	◎				
238	サツキマス（アマゴ）	<i>Oncorhynchus masou ishikawai</i>		△	◎		NT		
239	サクラマス（ヤマメ）	<i>Oncorhynchus masou masou</i>		△	◎		NT		
240	ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	◎	◎	●		SK		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
241	ベニザケ（ヒメマス）	<i>Oncorhynchus nerka</i>	◎		◎		CR		
242	ビワマス	<i>Oncorhynchus sp.</i>	◎		◎		NT		
243	タウナギ（本土産）	<i>Monopterus albus</i>	◎		◎				
244	タウナギ（沖縄産）	<i>Monopterus sp.</i>	◎		◎		CR		
245	イトヨ	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>		△	◎	●			
246	イトヨ（降海型）	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>			×				◎
247	イトヨ（福井型）	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>			×				◎
248	イトヨ（那須型）	<i>Gasterosteus aculeatus aculeatus</i>			◎				◎
249	太平洋系陸封型イトヨ	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 1</i>	◎		◎		LP		
250	ハリヨ	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 2</i>		△	◎		CR		
251	ハリヨ（濃尾型）	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 2</i>			◎				◎
252	ハリヨ（近江型）	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 2</i>			◎				◎
253	イトヨ湖沼型（福島県）	<i>Gasterosteus aculeatus subsp. 3</i>	◎		◎				
254	ニホンイトヨ	<i>Gasterosteus nipponicus</i>	◎		◎		LP		
255	ミナミトミヨ	<i>Pungitius kaibarae</i>	◎		◎		EX		
256	トミヨ属淡水型	<i>Pungitius sp. 1</i>		△	◎		LP		
257	トミヨ属汽水型	<i>Pungitius sp. 2</i>		△	◎		NT		
258	トミヨ属雄物型	<i>Pungitius sp. 3</i>		△	◎		CR		
259	ムサントミヨ	<i>Pungitius sp. 4</i>	◎		◎		CR		
260	エゾトミヨ	<i>Pungitius tenuis</i>	◎		◎		VU		
261	アミメカワヨウジ	<i>Hippichthys heptagonus</i>	◎		◎		EN		
262	ホシイッセンヨウジ	<i>Microphis argulus</i>			×		CR		
263	ヒメテングヨウジ	<i>Microphis jagorii</i>			×		CR		
264	タニヨウジ	<i>Microphis retzii</i>			×		CR		
265	カワボラ	<i>Cestrus plicatilis</i>	◎		◎		CR		
266	ナガレフウライボラ	<i>Crenimugil heterocellos</i>			×		EN		
267	オニボラ	<i>Ellochelon vaigensis</i>	◎		◎		DD		
268	アンビンボラ	<i>Chelon subviridis</i>	◎		◎		DD		
269	モンナシボラ	<i>Moolgarda engeli</i>	◎		◎		DD		
270	カマヒレボラ	<i>Moolgarda pedaraki</i>	◎		◎		DD		
271	ペヘレイ	<i>Odontesthes bonariensis</i>	◎		◎		OT		
272	ネットタイソイワシ	<i>Atherinomorus duodecimalis</i>	◎		◎		DD		
273	ミナミギンイソイワシ	<i>Hypoatherina temminckii</i>	◎		◎		DD		
274	グリーンソードテール	<i>Xiphophorus hellerii</i>	◎		◎				
275	カダヤシ	<i>Gambusia affinis</i>	◎		◎		JT		
276	グッピー	<i>Poecilia reticulata</i>	◎		◎		OT		
277	ミナミメダカ	<i>Oryzias latipes</i>	◎		◎	●	VU		
278	ミナミメダカ（ヒメダカ）	<i>Oryzias latipes</i>	◎		◎				
279	キタノメダカ	<i>Oryzias sakaiyamii</i>	◎		◎	●	VU		
280	コモチサヨリ	<i>Zenarchopterus dunckeri</i>	◎		◎		NT		
281	クルメサヨリ	<i>Hyporhamphus intermedius</i>	◎		◎		NT		
282	アゴヒゲオコゼ	<i>Tetrarogue barbata</i>	◎		◎		CR		
283	ヒゲソリオコゼ	<i>Tetrarogue nigra</i>			×		CR		
284	アカメ	<i>Lates japonicus</i>	◎		◎		EN		
285	インドタカサゴインモチ	<i>Pseudambassis ranga</i>	◎		◎				
286	ナンヨウタカサゴインモチ	<i>Ambassis interrupta</i>	◎		◎		DD		
287	ハナダカタカサゴインモチ	<i>Ambassis macracanthus</i>			×		DD		
288	オヤニラミ	<i>Coreoperca kawamebari</i>	◎		◎	●	EN		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
289	オヤニラミ group1	<i>Coreoperca kawamebari</i>			×				◎
290	オヤニラミ group2	<i>Coreoperca kawamebari</i>			×				◎
291	スズキ	<i>Lateolabrax japonicus</i>		△	◎	●	LP		
292	シラヌイハタ	<i>Epinephelus bontoides</i>	◎		◎		DD		
293	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>	◎		◎	●		KT	
294	コクチバス	<i>Micropterus dolomieu</i>	◎		◎	●		KT	
295	オオクチバス	<i>Micropterus salmoides</i>	◎		◎	●		KT	
296	カガミテンジクダイ	<i>Yarica hyalosoma</i>	◎		◎		CR		
297	ワキインモチ	<i>Fibramia lateralis</i>			×		DD		
298	ヒルギヌメリテンジクダイ	<i>Pseudamia amblyuroptera</i>	◎		◎		DD		
299	ウラウチフエダイ	<i>Lutjanus goldiei</i>			×		CR		
300	ダイダイコショウダイ	<i>Plectrohinchus albovittatus</i>			×		DD		
301	ナンヨウチヌ	<i>Acanthopagrus pacificus</i>	◎		◎		VU		
302	アオギス	<i>Sillago parvisquamis</i>	◎		◎		CR		
303	アトクギス	<i>Sillaginops macrolepis</i>	◎		◎		EN		
304	テッポウウオ	<i>Toxotes jaculator</i>	◎		◎		CR		
305	カワスズメ	<i>Oreochromis mossambicus</i>	◎		◎		OT		
306	ナイルティラピア	<i>Oreochromis niloticus</i>	◎		◎		OT		
307	ジルティラピア	<i>Tilapia zillii</i>	◎		◎		OT		
308	ニセシマイサキ	<i>Mesopristes argenteus</i>	◎		◎		CR		
309	ヨコシマイサキ	<i>Mesopristes cancellatus</i>	◎		◎		CR		
310	シミズシマイサキ	<i>Mesopristes iravi</i>	◎		◎		CR		
311	トゲナガユゴイ	<i>Kuhlia munda</i>			×		EN		
312	ヤマノカミ	<i>Trachidermus fasciatus</i>	◎		◎		EN		
313	エゾハナカジカ	<i>Cottus amblystomopsis</i>	◎		◎				
314	カンキヨウカジカ	<i>Cottus hangiongensis</i>	◎		◎		LP		
315	カマキリ	<i>Cottus kazika</i>	◎		◎		VU		
316	ハナカジカ	<i>Cottus nozawae</i>	◎		◎		LP		
317	ハナカジカ（北海道型）	<i>Cottus nozawae</i>			◎			◎	
318	ハナカジカ（北東北型）	<i>Cottus nozawae</i>			×			◎	
319	ハナカジカ（山形型）	<i>Cottus nozawae</i>			◎			◎	
320	カジカ	<i>Cottus pollux</i>		△	◎		NT		
321	カジカ小卵型	<i>Cottus reinii</i>			×		EN		
322	ウツセミカジカ（琵琶湖型）	<i>Cottus reinii</i>			◎			◎	
323	ウツセミカジカ（回遊型）	<i>Cottus reinii</i>			◎			◎	
324	カジカ中卵型	<i>Cottus sp.</i>		△	◎		EN		
325	ウラウチヘビギンポ	<i>Enneapterygius cheni</i>			×		CR		
326	ヒルギギンポ	<i>Omomox biporus</i>			×		CR		
327	ゴマクモギンポ	<i>Omobranchus elongatus</i>	◎		◎		DD		
328	カワギンポ	<i>Omobranchus ferox</i>			×		CR		
329	ナリタイトヒキヌメリ	<i>Pseudocallirichthys ikedai</i>			×		DD		
330	ツバサハゼ	<i>Rhyacichthys aspro</i>	◎		◎		CR		
331	イシドンコ	<i>Odontobutis hikimius</i>	◎		◎		VU		
332	ドンコ	<i>Odontobutis obscura</i>	◎		◎				
333	ドンコ（西九州型）	<i>Odontobutis obscura</i>			◎			◎	
334	ドンコ（西瀬戸内海型）	<i>Odontobutis obscura</i>			◎			◎	
335	ドンコ（東瀬戸内海型）	<i>Odontobutis obscura</i>			◎			◎	
336	ドンコ（山陰－琵琶湖－伊勢型）	<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	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 的ブロ マイマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
337	タナゴモドキ	<i>Hypseleotris cyprinoides</i>	◎		◎		EN		
338	オウギハゼ	<i>Bunaka gyrinoides</i>		△	◎		NT		
339	テンジクカワアナゴ	<i>Eleotris fusca</i>	◎		◎				
340	カワアナゴ	<i>Eleotris oxycephala</i>	◎		◎				
341	エリトゲハゼ	<i>Belobranchus belobranchus</i>			×		DD		
342	ヤエヤマノコギリハゼ	<i>Butis amboinensis</i>	◎		◎		CR		
343	ジャノメハゼ	<i>Bostrychus sinensis</i>	◎		◎		EN		
344	ホシマダラハゼ	<i>Ophiocara porocephala</i>	◎		◎		VU		
345	タメトモハゼ	<i>Giuris sp. 1</i>	◎		◎		EN		
346	ゴシキタメトモハゼ	<i>Giuris sp. 2</i>			×		EN		
347	ドウクツミミズハゼ	<i>Luciogobius albus</i>			×		CR		
348	ネムリミミズハゼ	<i>Luciogobius dormitoris</i>			×		DD		
349	ナガレミミズハゼ	<i>Luciogobius fluvialis</i>			×		NT		
350	ユウスイミミズハゼ	<i>Luciogobius fonticola</i>	◎		◎		NT		
351	イドミミズハゼ	<i>Luciogobius pallidus</i>	◎		◎		NT		
352	ミナミヒメミミズハゼ	<i>Luciogobius ryukyuensis</i>		△	◎		VU		
353	ヒモハゼ	<i>Eutaeniichthys gilli</i>	◎		◎		NT		
354	シロウオ	<i>Leucopsarion petersii</i>	◎		◎		VU		
355	ワラスボ	<i>Odontamblyopus lacepedii</i>	◎		◎		VU		
356	アサガラハゼ	<i>Caragobius urolepis</i>	◎		◎		VU		
357	チワラスボ	<i>Taeniooides cirratus</i>		△	◎		EN		
358	ヒゲワラスボ	<i>Trypauchenopsis intermedia</i>	◎		◎		VU		
359	トカゲハゼ	<i>Scartelaos histophorus</i>	◎		◎		CR		
360	ムツゴロウ	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	◎		◎		EN		
361	タビラクチ	<i>Apocryptodon punctatus</i>	◎		◎		VU		
362	トビハゼ	<i>Periophthalmus modestus</i>	◎		◎		NT		
363	ヒメトサカハゼ	<i>Cristatogobius aurimaculatus</i>			×		CR		
364	トサカハゼ	<i>Cristatogobius lophius</i>	◎		◎		EN		
365	クロトサカハゼ	<i>Cristatogobius nonatoae</i>	◎		◎		CR		
366	シマサルハゼ	<i>Oxyurichthys sp. 2</i>			×		CR		
367	ミスジハゼ	<i>Callogobius sp.</i>			×		CR		
368	ハゼクチ	<i>Acanthogobius hasta</i>	◎		◎		VU		
369	ミナミアシショロハゼ	<i>Acanthogobius insularis</i>	◎		◎		VU		
370	ヨロイボウズハゼ	<i>Lentipes armatus</i>	◎		◎		CR		
371	カエルハゼ	<i>Smilosicyopus leprurus</i>	◎		◎		CR		
372	ヒノコロモボウズハゼ	<i>Sicyopus auxilimentus</i>			×		DD		
373	アカボウズハゼ	<i>Sicyopus zosterophorus</i>	◎		◎		CR		
374	ボウズハゼ	<i>Sicyopterus japonicus</i>	◎		◎				
375	ルリボウズハゼ	<i>Sicyopterus lagocephalus</i>	◎		◎		VU		
376	ヒスイボウズハゼ	<i>Stiphodon alcedo</i>	◎		◎		CR		
377	コンテリボウズハゼ	<i>Stiphodon atropurpureus</i>			×		CR		
378	ハヤセボウズハゼ	<i>Stiphodon imperiorientis</i>	◎		◎		CR		
379	トラフボウズハゼ	<i>Stiphodon multisquamus</i>			×		DD		
380	ニライカナイボウズハゼ	<i>Stiphodon niraikanaiensis</i>			×		DD		
381	ナンヨウボウズハゼ	<i>Stiphodon percopterygionus</i>	◎		◎				
382	カキイロヒメボウズハゼ	<i>Stiphodon surrufus</i>			×		DD		
383	ワカケサラサハゼ	<i>Amblygobius linki</i>			×		NT		
384	シラヌイハゼ	<i>Silhouettea dotui</i>			×		NT		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
385	ニセシラヌイハゼ	<i>Silhouettea sp.</i>			×		NT		
386	ギンボハゼ	<i>Parkraemeria saltator</i>	◎		◎		VU		
387	マングローブゴマハゼ	<i>Pandaka lidwilli</i>	◎		◎		VU		
388	ゴマハゼ	<i>Pandaka sp.</i>			×		VU		
389	カブキハゼ	<i>Eugnathogobius mindora</i>			×		NT		
390	ホホグロハゼ	<i>Mugilogobius cavifrons</i>	◎		◎		EN		
391	フタホシハゼ	<i>Mugilogobius fuscus</i>			×		DD		
392	ムジナハゼ	<i>Mugilogobius mertoni</i>			×		VU		
393	コクチスナゴハゼ	<i>Pseudogobius gastrospilos</i>			×		DD		
394	マサゴハゼ	<i>Pseudogobius masago</i>	◎		◎		VU		
395	シマエソハゼ	<i>Schismatogobius ampluvinclus</i>	◎		◎		EN		
396	エソハゼ	<i>Schismatogobius roxasi</i>	◎		◎		EN		
397	ドウケハゼ	<i>Stenogobius ophthalmoporus</i>			×		DD		
398	タネカワハゼ	<i>Stenogobius sp.</i>	◎		◎				
399	クロミナミハゼ	<i>Awaous melanocephalus</i>	◎		◎				
400	ショウキハゼ	<i>Tridentiger barbatus</i>	◎		◎		NT		
401	シモフリシマハゼ	<i>Tridentiger bifasciatus</i>	◎		◎				
402	ヌマチチブ	<i>Tridentiger brevispinis</i>		△	◎				
403	ナガノゴリ	<i>Tridentiger kuroiwae</i>		△	◎				
404	シロチチブ	<i>Tridentiger nudicervicus</i>	◎		◎		NT		
405	チチブ	<i>Tridentiger obscurus</i>		△	◎				
406	アカオビシマハゼ	<i>Tridentiger trigonocephalus</i>	◎		◎				
407	タスキヒナハゼ	<i>Redigobius balteatus</i>	◎		◎		DD		
408	カワクモハゼ	<i>Bathygobius sp.</i>			×		CR		
409	ビワヨシノボリ	<i>Rhinogobius biwaensis</i>	◎		◎		DD		
410	クロヨシノボリ	<i>Rhinogobius brunneus</i>		△	◎				
411	カワヨシノボリ	<i>Rhinogobius flumineus</i>	◎		◎				
412	カワヨシノボリ group1	<i>Rhinogobius flumineus</i>			×			◎	
413	カワヨシノボリ group2	<i>Rhinogobius flumineus</i>			◎			◎	
414	カワヨシノボリ group3	<i>Rhinogobius flumineus</i>			◎			◎	
415	オオヨシノボリ	<i>Rhinogobius fluviatilis</i>		△	◎				
416	クロダハゼ	<i>Rhinogobius kurodai</i>		△	◎				
417	ルリヨシノボリ	<i>Rhinogobius mizunoi</i>		△	◎				
418	シマヨシノボリ	<i>Rhinogobius nagoyae</i>		△	◎				
419	オガサワラヨシノボリ	<i>Rhinogobius ogasawaraensis</i>	◎		◎		EN		
420	ゴクラクハゼ	<i>Rhinogobius similis</i>	◎		◎				
421	アオバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. BB</i>		△	◎		CR		
422	シマヒレヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. BF</i>		△	◎		NT		
423	ヒラヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. DL</i>		△	◎				
424	カズサヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. KZ</i>		△	◎				
425	アヤヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. MO</i>		△	◎				
426	オウミヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. OM</i>		△	◎				
427	旧トウヨシノボリ類	<i>Rhinogobius sp. OR</i>		△	◎				
428	トウカイヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. TO</i>	◎		◎		NT		
429	キバラヨシノボリ	<i>Rhinogobius sp. YB</i>	◎		◎		EN		
430	コンジキハゼ	<i>Glossogobius aureus</i>	◎		◎		CR		
431	アゴヒゲハゼ	<i>Glossogobius bicirrhosus</i>			×		CR		
432	スダレウロハゼ	<i>Glossogobius circumspectus</i>	◎		◎		NT		

二次的自然環境に生息する淡水魚類リスト

No.	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 的ブロ イマー	環境省 RL2020	外来種 リスト	地域個 体群
433	フタゴハゼ	<i>Glossogobius sp.</i>			×		DD		
434	ニセツムギハゼ	<i>Acentrogobius audax</i>			×		NT		
435	ホクロハゼ	<i>Acentrogobius caninus</i>	◎		◎		NT		
436	ホホグロスジハゼ	<i>Acentrogobius suluensis</i>			×		NT		
437	キララハゼ	<i>Acentrogobius viridipunctatus</i>	◎		◎		VU		
438	ジュズカケハゼ	<i>Gymnogobius castaneus</i>		△	◎		NT		
439	キセルハゼ	<i>Gymnogobius cylindricus</i>		△	◎		EN		
440	イサザ	<i>Gymnogobius isaza</i>	◎		◎		CR		
441	エドハゼ	<i>Gymnogobius macrognathos</i>		△	◎		VU		
442	ヘビハゼ	<i>Gymnogobius mororanus</i>	◎		◎		DD		
443	コシノハゼ	<i>Gymnogobius nakamurae</i>			×		CR		
444	シマウキゴリ	<i>Gymnogobius opperiens</i>	◎		◎				
445	スミウキゴリ	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>	◎		◎		LP		
446	クボハゼ	<i>Gymnogobius scrobiculatus</i>	◎		◎		EN		
447	ムサシノジュズカケハゼ	<i>Gymnogobius sp. 1</i>	◎		◎		EN		
448	ホクリクジュズカケハゼ	<i>Gymnogobius sp. 2</i>		△	◎		CR		
449	ホクリクジュズカケハゼ group1	<i>Gymnogobius sp. 2</i>			×			◎	
450	ホクリクジュズカケハゼ group2	<i>Gymnogobius sp. 2</i>			◎			◎	
451	シンジコハゼ	<i>Gymnogobius taranetzi</i>		△	◎		VU		
452	チクゼンハゼ	<i>Gymnogobius uchidai</i>	◎		◎		VU		
453	ウキゴリ	<i>Gymnogobius urotaenia</i>	◎		◎				
454	ウラウチソハゼ	<i>Eviota ocellifer</i>	◎		◎		CR		
455	ナミノコハゼ	<i>Gobirichinotus radiocularis</i>			×		NT		
456	トンガスナハゼ	<i>Kraemeria tongaensis</i>			×		DD		
457	クジャクハゼ	<i>Parioglossus caeruleolineatus</i>			×		DD		
458	ヒメサツキハゼ	<i>Parioglossus interruptus</i>			×		CR		
459	マイコハゼ	<i>Parioglossus lineatus</i>			×		DD		
460	ボルネオハゼ	<i>Parioglossus palustris</i>	◎		◎		VU		
461	コビトハゼ	<i>Parioglossus rainfordi</i>			×		EN		
462	コマチハゼ	<i>Parioglossus taeniatus</i>			×		CR		
463	チヨウセンブナ	<i>Macropodus ocellatus</i>	◎		◎				
464	タイワンキンギョ	<i>Macropodus opercularis</i>	◎		◎		CR		
465	カムルチー	<i>Channa argus</i>	◎		◎	●			
466	コウタイ	<i>Channa asiatica</i>	◎		◎				
467	タイワンドジョウ	<i>Channa maculata</i>	◎		◎				
468	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.
	TaqMan	Takahara T, Taguchi J, Yamagishi S, Doi H, Ogata S, Yamanaka H, Minamoto T (2020) Suppression of environmental DNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride. Limnology and Oceanography: Methods 18, 437-445.
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 スズキ	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 オショロコマ 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 ミナミメダカ	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.
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.

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
アユモドキ	T0aqMan	Sugiura K, Tomita S, Minamoto T, Mishina T, Iwata A, Abe T, Yamamoto S, Watanabe K (2020) Characterizing the spatial and temporal occurrence patterns of the endangered botiid loach <i>Parabotia curtus</i> by environmental DNA analysis using a newly developed species-specific primer set. Ichthyological Research, 1-6.
コクチバス ミナミメダカ 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.
リュウキュウアユ	TaqMan	Akamatsu Y, Kume G, Gotou M, Kono T, Fujii T, Inui R, Kurita Y (2020) Using environmental DNA analyses to assess the occurrence and abundance of the endangered amphidromous fish <i>Plecoglossus altivelis ryukyuensis</i> . Biodiversity Data Journal 8: e39679.
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>). Environmental DNA, 2:130-139.
オオウナギ	TaqMan	Itakura H, Wakiya R, Sakata MK, Hsu HY, Chen SC, Yang CC, Huang YC, Han YS, Yamamoto S, Minamoto T (2020) Estimations of riverine distribution, abundance, and biomass of anguillid eels in Japan and Taiwan using environmental DNA analysis. Zoological Studied, 59:1-17.

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 関連情報	濾過者	◎		
2		濾過日時	◎		
3		濾過水量	◎		
4		フィルターの種類	◎		
5		フィルターの数（個）	◎		
6		濾過後の保管	◎		
7	分析 関係情報	分析日時	◎		
8		分析会社名	○		
9		DNA抽出の試薬情報	◎		
10		使用機材	PCR	○	
11			NGS	△	
13		試薬情報	精製	△	
14			NGS	△	
15		プライマー情報	プライマーネーム 1stF:	配列情報（5'→3'）	◎
16			プライマーネーム 1stR:	配列情報（5'→3'）	◎
17			プライマーネーム 2ndF:	配列情報（5'→3'）	◎
18			プライマーネーム 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			ライプラリーの濃度・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。参考になると良いでしょう。

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	◎
	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(ライプラリ調製・NGS)	treatingProtocol	◎
分析情報	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	◎
	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	◎
解析情報	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 入力の重要度：●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	●	biotic:eDNA:s003:smp10001:tr1:an01	eventID	◎
	2	OTU 番号	●	biotic:eDNA:s003:smp10001:tr1:an01:otu0001	occurrenceID	◎
	3	サイズ（リード数）	●	10258	occurrenceSize	◎
	4	塩基配列	●	CACCGCGTTAGACGAGAGGCCCTAGTTG ATATTACAACGGCGTAAAGGG…	organismNuotideSequence	◎
	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 入力の重要度：●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

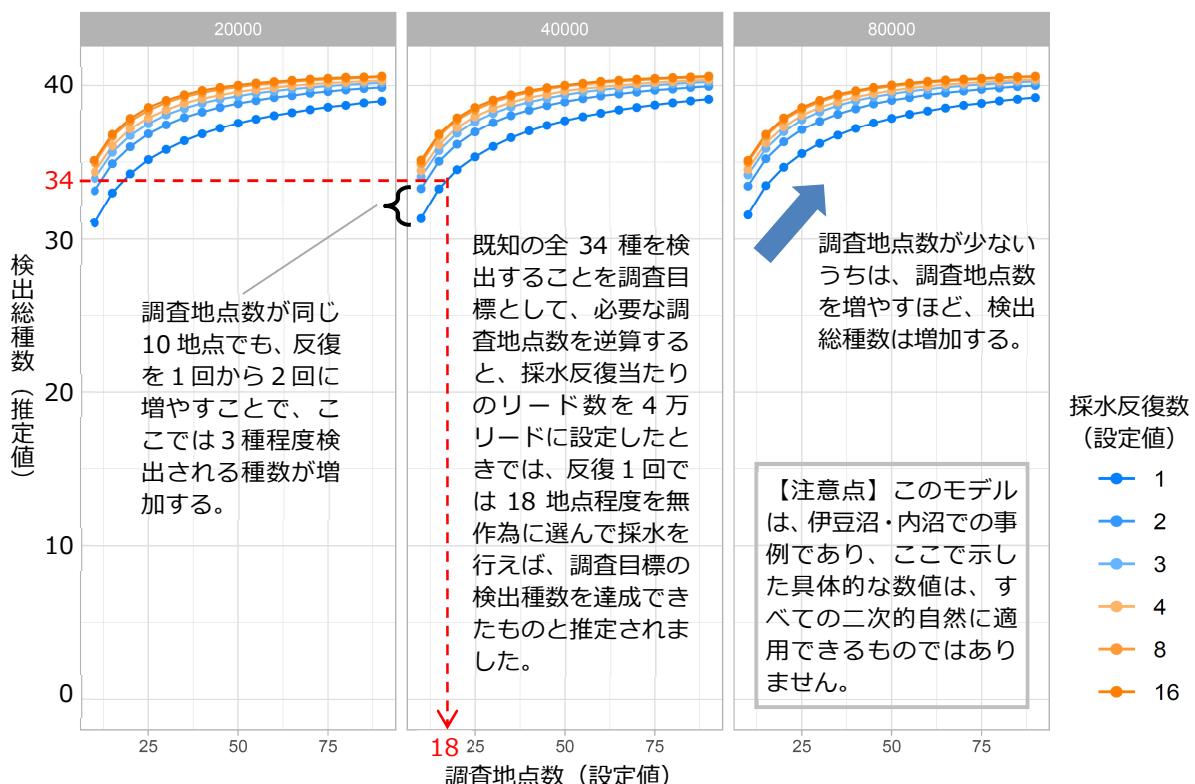
参考資料4 調査計画を検討する上での参考情報

(1) 調査地点数

ある調査地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調査計画の際の重要なポイントに対して、それを検討するための情報は、まだ非常に限られています。また、調査地点数を考える上では、調査範囲の広さ、環境タイプ、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ることは難しいと言えます。

そこで、個別の調査地における検討事例を積み重ねることで、概括的な目標値を求めていくことを目指し、環境省では、伊豆沼・内沼をモデル地区とした環境DNA調査を実施しました。調査結果は、統計モデリングの手法を用いて解析を行い、調査地点数を増やした時に地区全体から検出される総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。

その結果、調査地点数が少ない場合は、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が1回のときよりも、反復を2回以上とすることで、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と推定されました。なお、今回の調査結果では、採水反復当たりのリード数を増やすことに対する検出種数の増加効果は、2～8万リードでは限定的でした。



※調査地点数は、最小が10、最大が90として、5地点ずつ増やした時の条件で設定していますが、地点数が1から10までは単調増加します。

※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。

調査地点数に対する検出総種数（推定値）の変化

調査を行った伊豆沼・内沼では、今回の環境 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、今回の検討結果を基に、1 回の環境 DNA 調査で 34 種以上を検出することを調査目標として、必要な調査地点数を逆算しました。採水反復当たりのリード数を 4 万リードに設定したときでは、反復 1 回では約 18 地点、反復 2 回では約 12 地点、反復 3 回では約 10 地点を無作為に選んで採水を行えば、調査目標の検出種数を達成できたものと推定されました。なお、この地点数の結果は、調査を行った伊豆沼・内沼エリアにおける数値であり、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変わるものと考えられます。

以上のことから、調査地全体から検出される種数を最大化するには、地点当たりの反復数を 2 ~ 3 回程度取った上で、調査地点数は、調査範囲内に可能な限り多く設定することが望ましいと言えます。一方で、地点数が増えるほど、調査や分析にかかるコストが増えるため、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、その上でできるだけ地点数を多く設定する方向で検討することを推奨します。

また、調査予算などの都合上、設定できる調査地点数が限られてしまう際の調査地点選定の考え方としては、基本的には捕獲調査で地点を選ぶ時と同様に、調査対象種の生息環境や一般的に魚類の生息に適する環境等に対して地点を設定することが望ましいと言えます。

調査内容に関する補足説明

伊豆沼・内沼で実施したこの調査では、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、1 地点あたりの採水反復数（調査 1 回あたりにその地点で採水する検体数）を 4 回としてサンプルを採取し、環境 DNA 分析を行いました。



その結果を基に、「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を行い、調査地点数を増やした時に、地区全体から検出される総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研究員に委託し、実施したものです。

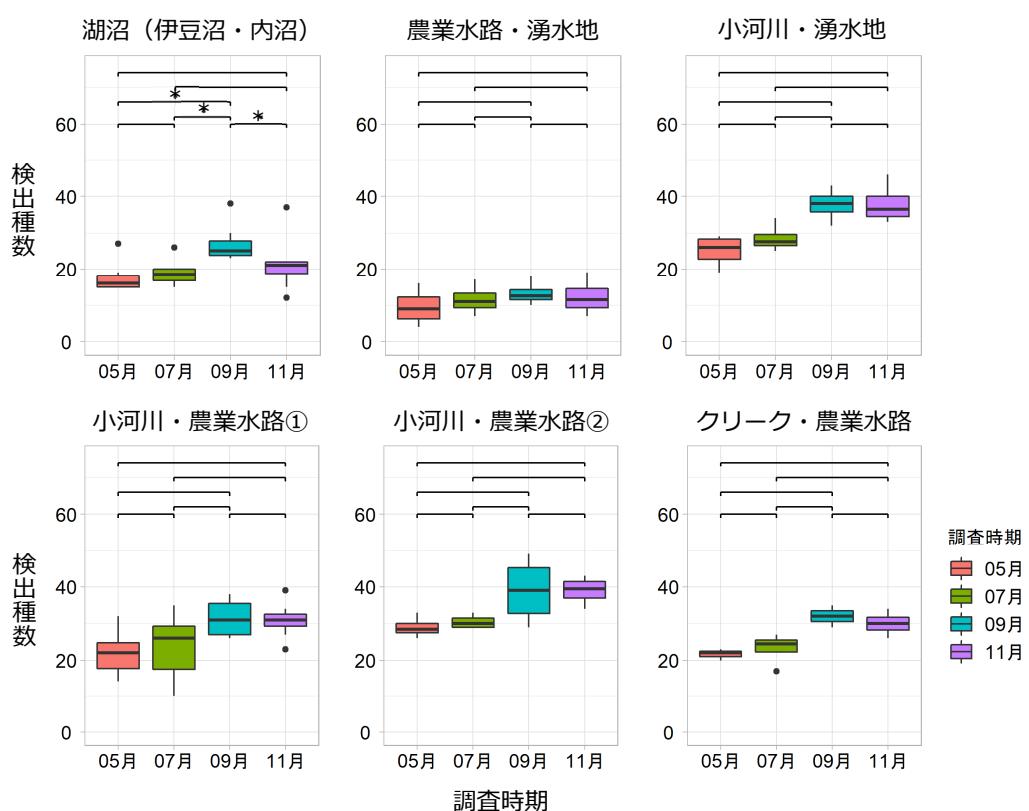
(2) 調査時期

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べきが考えられました。

そこで、様々なタイプの二次的自然環境において環境省が行った調査結果から、最適な調査時期を調べました。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、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。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（有意水準5%）。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、調査地の上流側に生息する魚種（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、個別の種が季節によって入れ替わっていることも考えられますので、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。



※調査時期ごとの比較は、Kruscal-Wallis testにより行い、Bonferroni 法で p 値を補正してグラフ上部に表記しました。p 値の表記は次の通り。*: p<0.05

調査時期による検出種数の比較

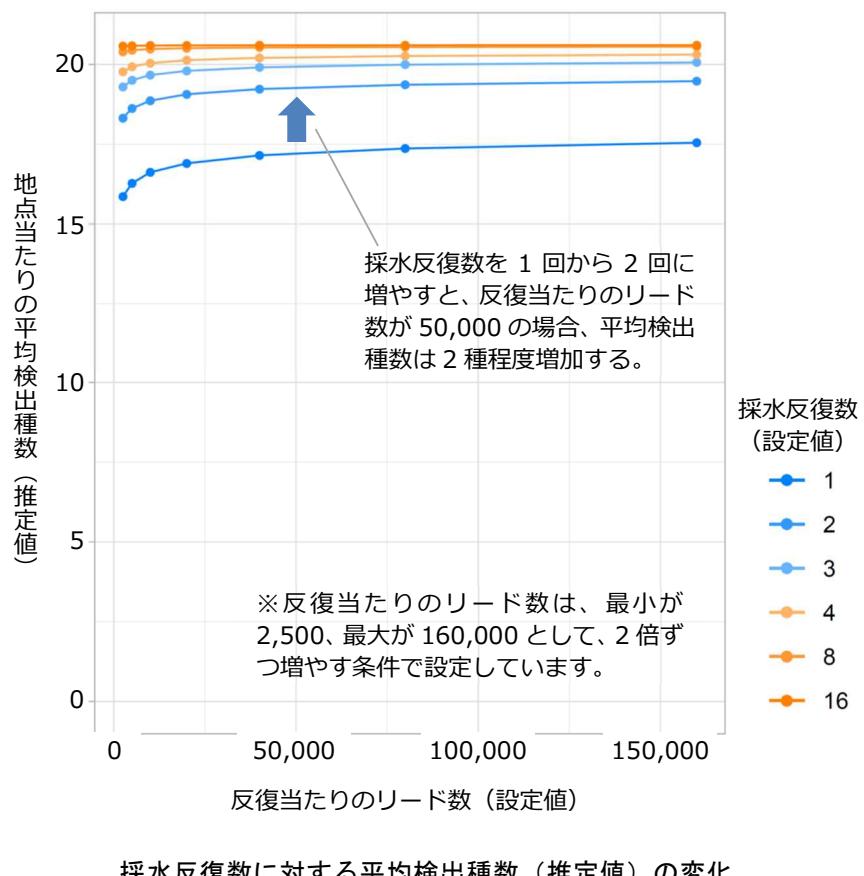
(3) 反復採水の効果

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 が存在しています。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、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。希少種のように生息密度が低い種では、環境 DNA の存在量や分布範囲のばらつきが結果に与える影響は、小さくないと予想されます。

そこで、(1) と同じサイト占有モデルから、反復採水の効果を検証し、地点当たりの最適な採水反復数を推定しました。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 4 本分の採水行為を連続的に繰り返す採水方法であり、調査日や調査地点をずらした上で、繰り返し採水した場合とは意味が異なることに注意してください。

地点当たりの検出種数は、地点当たりの採水反復数を増やすほど増加しますが、伊豆沼・内沼のモデルにおいては、その効果は 4 回以上では大きく変化しませんでした。また、反復当たりのリード数を増やすことでも種の検出効率は改善しましたが、反復数を増やすことに比べると、リード数を増やすことのメリットは限定的でした。総合的に考えると、地点当たりの検出種数を効率的に高めるには、地点当たりの反復数を 2 ~ 3 回程度取り、かつ、反復あたりのリード数を 4 万 ~ 8 万程度とることが望ましいと言えます。

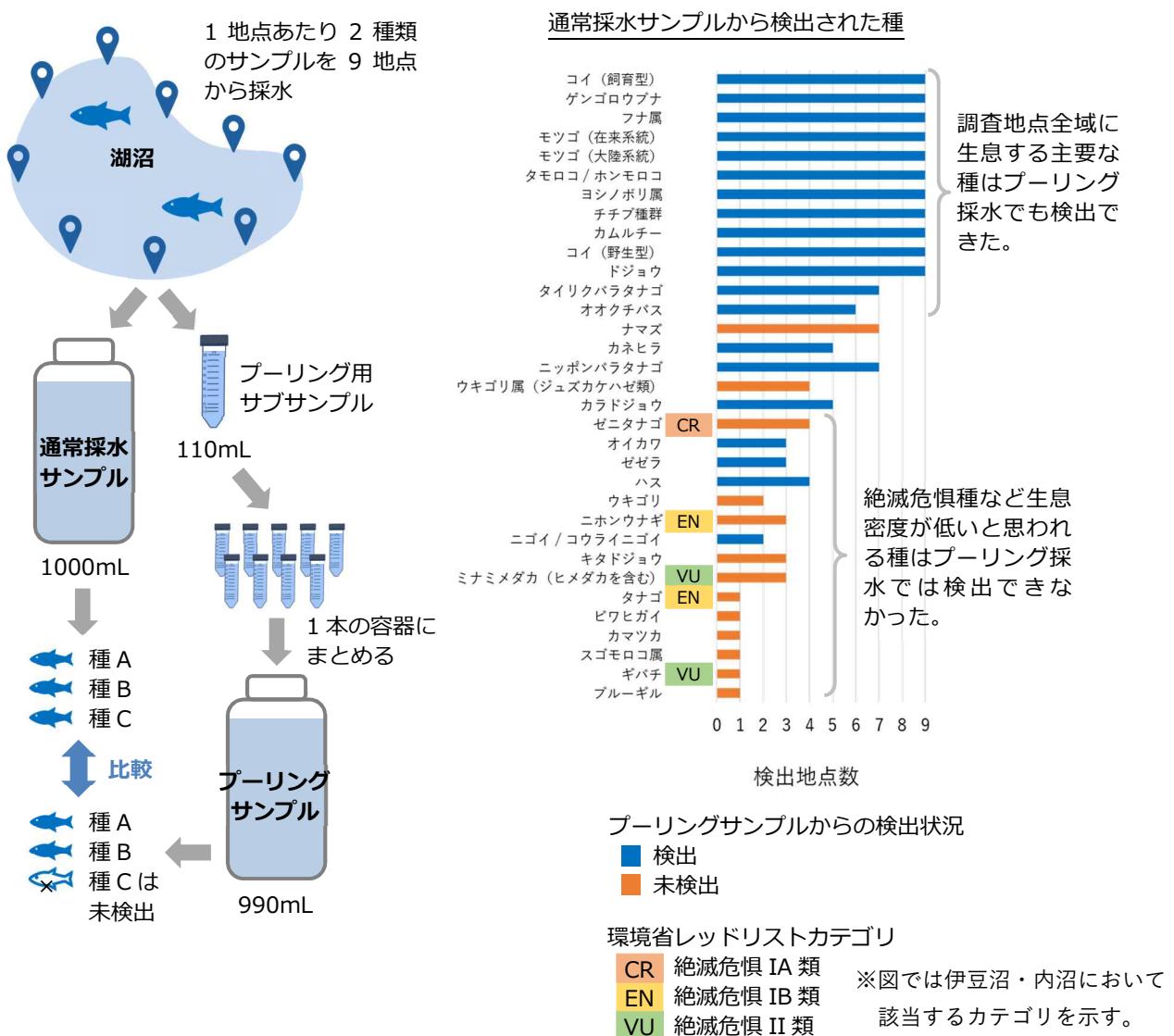
また、反復 4 回のそれぞれの回の検出結果を確認すると、調査地における生息密度が低いと考えられる種では、反復数を 2 回以上とることで効果的に検出できていたことが確認されました。このことから、希少種の生息調査に環境 DNA 調査を適用する場合は、1 地点当たりの反復数を 2 回以上とることを推奨します。



(4) 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本にまとめるプーリング採水があります。

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。その結果、通常採水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」が生じやすいことに十分な注意が必要です。



(5) 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は、夜行性であると言われています。夜行性魚類は、昼間は石や構造物の間隙に隠れており、夜になるとそこから出てきて活動することから、環境DNAの挙動も昼間と夜間では異なることが考えられました。

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る伊豆沼の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。その結果、夜間に採水を行っても、夜行性魚類（ニホンウナギ、ナマズ）の検出感度が向上するという結果は得られませんでした。したがって、今回の結果からは、淡水魚類を対象とした環境DNA調査においては、夜行性魚類の検出に対する採水時間の影響は小さいと考えられますが、今後さらに採水時間の効果に関する研究が進むことが期待されます。

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

夜間採水により夜行性魚類の検出効率が良くなる傾向はみられなかった

凡例



※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。

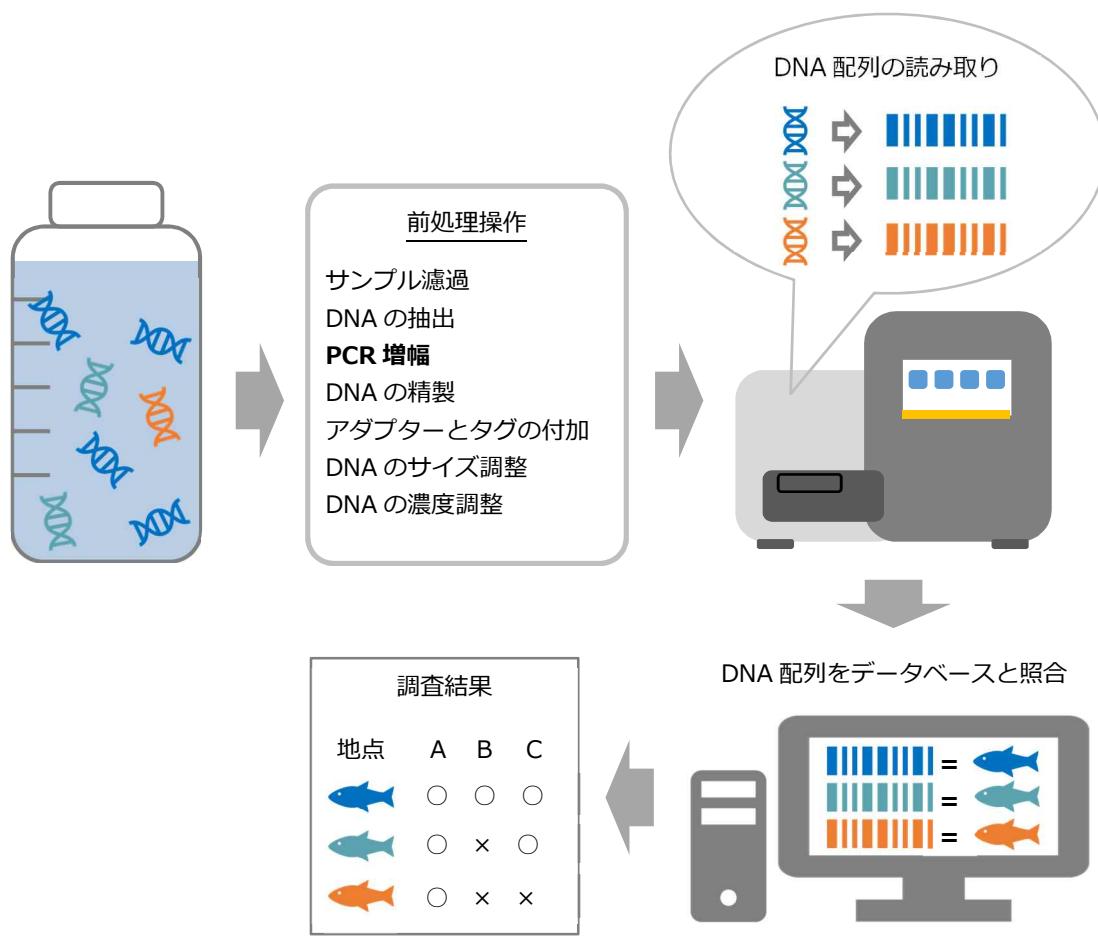
昼間採水と夜間採水の比較

参考資料 5 環境 DNA 分析に関する参考情報

(1) 分析手法の解説（網羅的解析法）

網羅的解析法とは、超並列シークエンサー（次世代シークエ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。

下図に示すように、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、超並列シークエンサーにかけられます。超並列シークエンサーは、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を、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かれば、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。



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、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。

網羅的解析法により検出できる分類群とその文献

検出できる分類群	分析方法が記された文献
魚類	Miya M. 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(7): 150088. (通称：MiFish法) 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. (MiFish解析用改変プライマーの情報)
哺乳類	Ushio M. et al. (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. Molecular ecology resources, 17(6): e63–e75. (通称：MiMammal法)
鳥類	Ushio M. et al. (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. Scientific Reports, 8: 4493. (通称：MiBird法)
十脚目甲殻類 (エビ・カニ類)	Komai T. et al. (2019) Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. Metabarcoding and Metagenomics, 3: e33835. (通称：MiDeca法)

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増幅の際に鑄型DNA(サンプル中の環境DNA)とプライマーが結合できないため、DNAの増幅が起こりません。すなわち、プライマー配列とのミスマッチがある種は、その種の環境DNAがPCRで増えないため、DNAが存在していても検出できることになり、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場所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簡単に整理しました。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。

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

	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 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,カマスペラ	MiFish-07-F	G C C G G T T A A T T T C G T G C C A G C
9	ボラ,シモフリシマハゼほか	MiFish-08-F	G C C G G T A A A T C T C G T G C C A G C
10	タウナギ,レピソステウス科ほか	MiFish-09-F	G T C G G T C A A A C T C G T G C C A G C
11	ボラ科,メダカ科ほか	MiFish-10-F	A C C G G T A A A A C T C G T G C C A G C
12	メダカ科,アンピンボラ,ヒナハゼ	MiFish-11-F	A C C G G T T A A A C T C G T G C C A G C
13	カダヤシ科,ハゼ科,アカメほか	MiFish-12-F	G C C G G T T A A A C T C G T G C C A G C
14	カダヤシ科	MiFish-13-F	G C C G G T C A A A T T C G T G C C A G C
15	メバル科,ハゼ科,ヘラヤガラほか	MiFish-14-F	G C C G G T A A A C 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,二ベ科,沖縄産タウナギほか	MiFish-17-F	G C C G G T C A A A C T C G T G C C A G C
19	ハゼ科,リボンスズメダイ	MiFish-18-F	G C C G G T C A A C C T C G T G C C A G C
20	ミナミウシノシタ	MiFish-19-F	C C G G T A A A A C C T T G T G C C A G C
21	セトウシノシタ	MiFish-20-F	C T G G T C A A A T C T C G T G C C A G C
22	シマウシノシタ	MiFish-21-F	T C G G T A A A A A C T C G T G C C A G C
23	カワハギ	MiFish-22-F	G C C G G T A A A A C C C G T G C C A G C

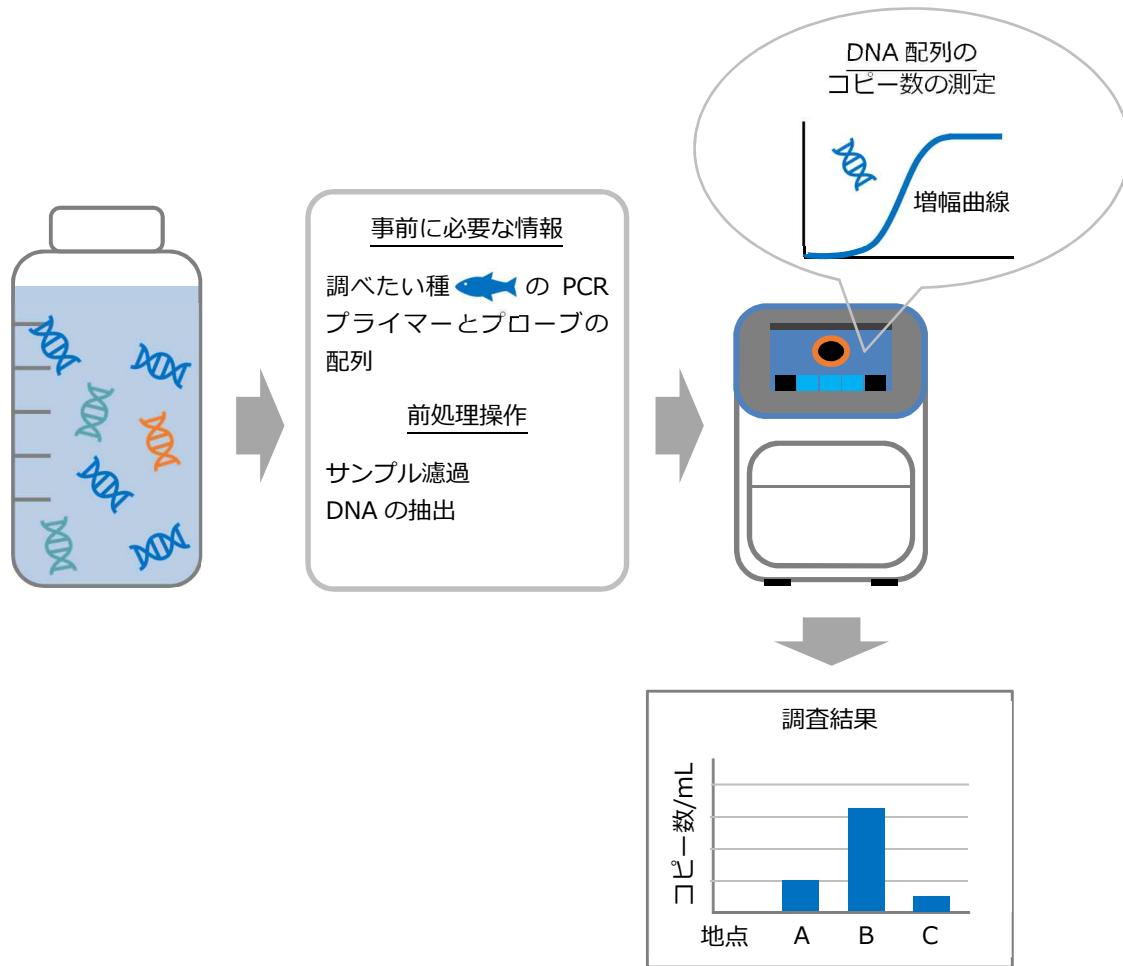
	Reverse Primer	MiFish-U-R	C A T A G T G G G G T A T C T A A T C C C G G T T T G
No.	該当する主な分類群や種 (一部のみ抜粋)	プライマー名 (仮称)	塩基配列 (5' → 3')
1	ヤツメウナギ科	MiFish-L-R	C A T A G C G G G G T A T C T A A T C C C G G T T T G
2	アリゲーターガー	MiFish-02-R	C A T A G T G G G G T A T T T A A C C C C A G T T T G
3	アナゴ科	MiFish-03-R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

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

(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。

下図に示すように、分析機関に運ばれた採水サンプルは、濾過と DNA 抽出が行われます。抽出した DNA は、分析用試薬と混合調整され、リアルタイム PCR 装置にかけられます。リアルタイム PCR では、種特異的なプライマーと蛍光プローブが、サンプルに含まれていた検出対象種の DNA にのみ反応し、PCR 増幅が起こることで、増幅曲線として可視化されます。増幅曲線は、サンプル中の検出対象種の DNA が多いほど早く立ち上がり、指數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。



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

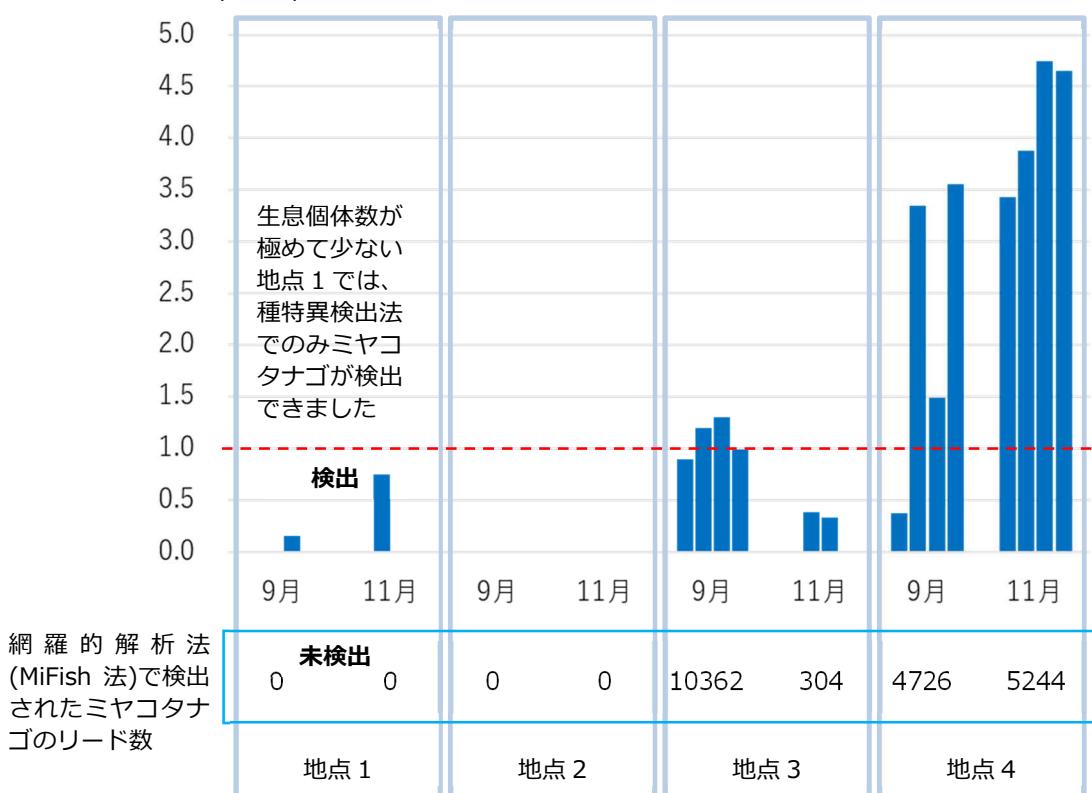
とで、検出する種を任意に変えることができます。種特異的検出法のための PCR プライマーがすでに設計されている種の一覧は、参考資料 1 で確認してください。

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。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。

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

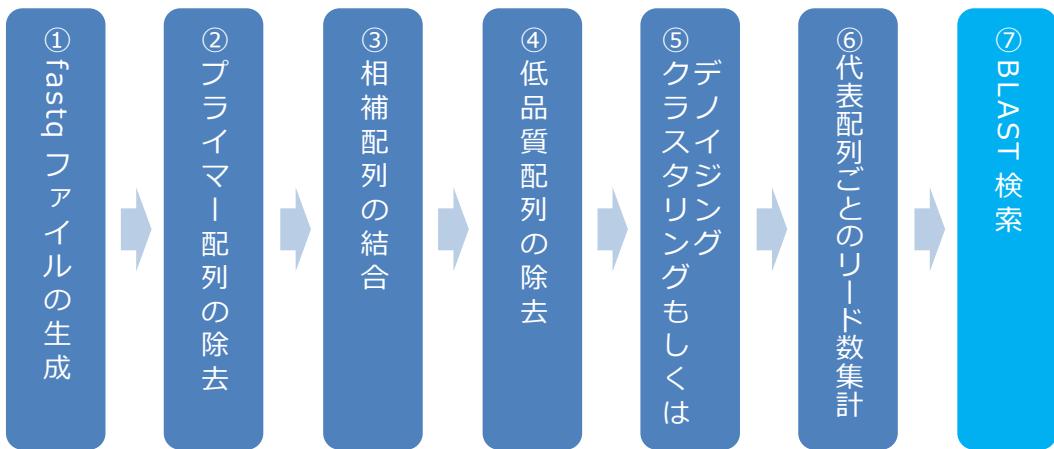
網羅的解析法（MiFish 法）では、超並列シークエンサーから取得した環境 DNA の配列情報データから分析結果（一致率が高い生物種リスト）を得るまでの間に、不要な配列を取り除いたり、読み取り時のエラーを補正するなどのデータ処理が必要になります。データ処理の工程は、いくつかのソフトウェアを組み合わせて、流れ作業のように実行されるため、「パイプライン」とも呼ばれます。

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、下表にその代表的なソフトウェアを紹介するにとどめます。解析パイプラインや解析条件等に関する情報は、必要に応じて、分析を委託した機関から入手してください。

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. <i>BMC Bioinformatics</i> , 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. <i>PLOS ONE</i> , 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. <i>Nature Methods</i> 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. <i>Molecular Biology and Evolution</i> , 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. <i>Nature Biotechnology</i> , 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. <i>Bioinformatics</i> , 26(19): 2460–2461. (ソフトウェアの入手先) http://drive5.com/usearch/

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



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

最後に、得られた代表配列が、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、得られた代表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。この時に登録配列と代表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の判断については、代表配列ごとの一致率を基準に行うことになりますが、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、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。

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。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こともあります。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では、別のパイプラインを使って再解析を行い、データを比較検討することで、偽陰性を確認できる可能性があります。

(4) 誤同定が生じる要因（精査の必要性について）

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

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

① データベースの登録情報が間違っている

国際塩基配列データベースには、誰でも塩基配列情報を登録することが可能ですが。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、間違った種名となってしまいます。

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。

一致率							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudorasbora parva mitochondrion_complete genome モツゴ	313	313	100%	2e-81	100.00%	KJ135626.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	KF856965.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio 'wananensis' mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	KF856964.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio color mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	JX188253.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio wuyuanensis mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105357.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio wuyuanensis x Carrassius auratus mitochondrion_complete genome コイ(雑種個体)	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105356.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio haematopterus mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105354.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio xingguonensis mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105353.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio carpio mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	JN105352.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio var. balsensis mitochondrion_complete genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	MT780875.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cyprinus carpio complete mitochondrial genome コイ	313	313	100%	2e-81	100.00%	X61010.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Carassius 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"/>	Carrassius auratus 'Ginbuna' CBM-ZF-19573 mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	308	308	100%	1e-79	99.42%	LC552368.1
<input checked="" type="checkbox"/>	この例の場合、正解は「コイ」であるが、間違って「モツゴ」の学名が付けられている配列					367.1	
<input checked="" type="checkbox"/>	と100%一致し、それが検索最上位に来ているため、精査を行わないと「モツゴ」として誤同定されることになります。					366.1	

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 の中の 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、結果的に種レベルの識別ができません。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）において識別に注意が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。

一致率							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius fluviatilis CBM_ZF-18425 mitochondrial gene for 12S rRNA	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC385178_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. CBM_ZF-18431 CBM_ZF-18431 mitochondrial gene	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC385135_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. KZ mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278232_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. BF mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278226_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius fluviatilis mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC278211_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193445_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193444_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. CO mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193346_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193300_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193280_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. OM mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193279_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. OR mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC193165_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. CBM_ZF-15797 mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	LC092051_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius brunneus mitochondrial_complete_genome	306	306	100%	3e-79	100.00%	KT601096_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius brunneus note CO type 12S ribosomal RNA gene_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	KM030473_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius brunneus 12S ribosomal RNA gene_partial sequence	306	306	100%	3e-79	100.00%	KM030471_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius sp. KZ mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence specimen_voucher CBM_ZF-17575	301	301	100%	1e-77	99.41%	LC278231_1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhinogobius brunneus mitochondrial gene for 12S rRNA_partial sequence specimen_voucher CBM_ZF-17575	301	301	100%	1e-77	99.41%	LC278231_1

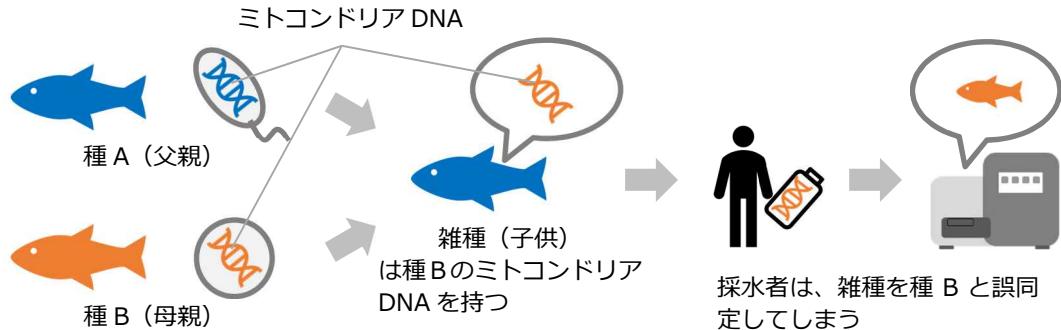
この例の場合、代表配列との一致率が 100%となる種が複数該当しており、近縁種間で塩基配列の違いがないために、網羅的解析法（MiFish 法）では種レベルの識別ができないと推定されます。したがって、種同定結果としては「ヨシノボリ属」と表記するべきですが、精査を行わないと、検索最上位に来た「オオヨシノボリ」として誤同定されることになります。

BLAST 検索で誤同定が生じた例②

③ 雜種個体が生息している可能性がある

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

そのため、下図に示すように、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。



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、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。

参考資料 6 環境 DNA 調査の事例紹介

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

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

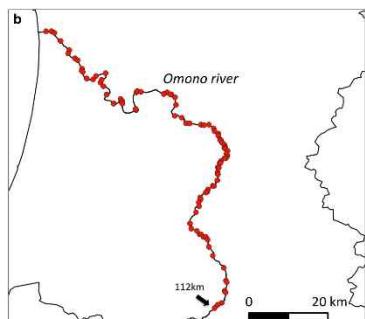


図 環境DNA調査が行われた
雄物川沿いの99地点

※論文Fig. 1bより転載

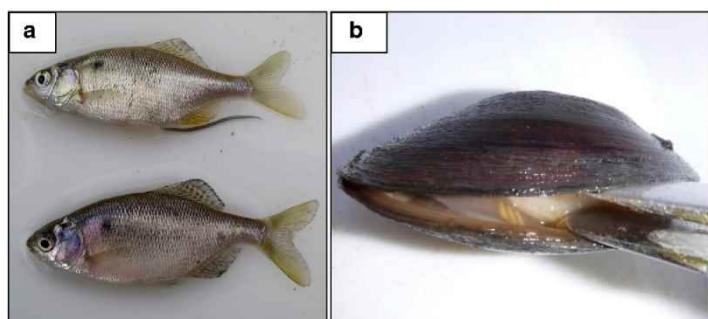


図 環境DNAが検出された地点で捕獲されたゼニタナゴの成魚と産卵された二枚貝

※論文Fig. 3より転載

(2) 絶滅危惧種アユモドキの調査事例

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

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

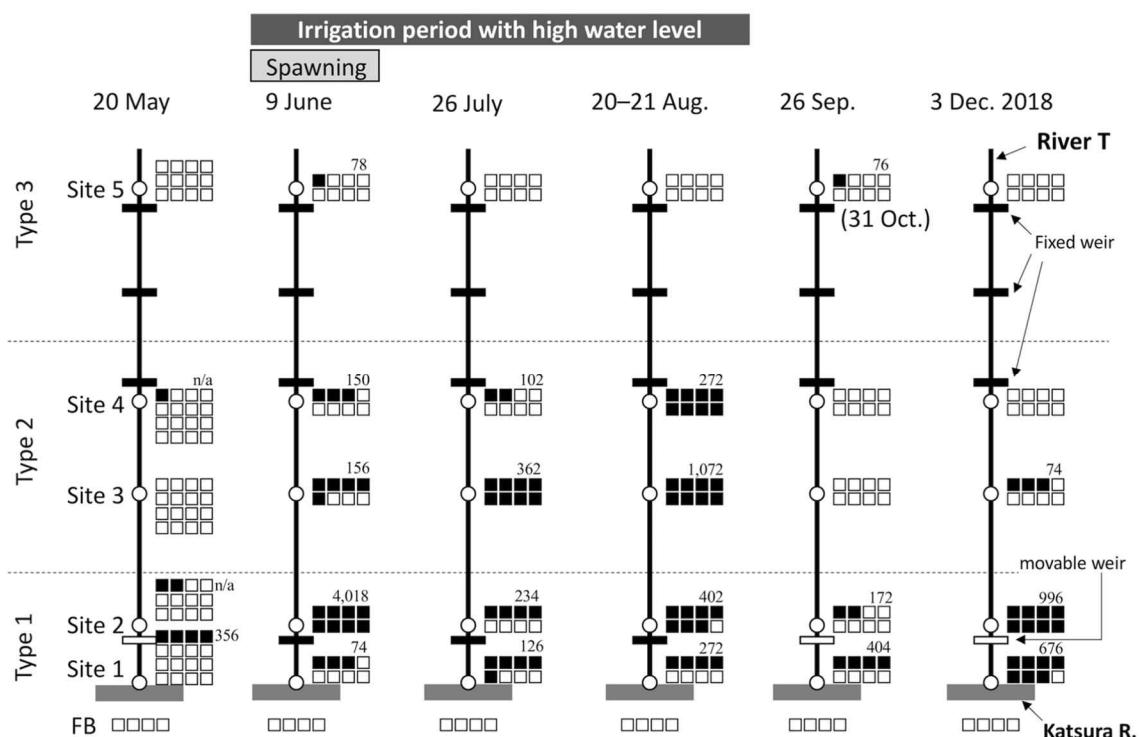


図 京都府亀岡市の生息地で採水したサンプルからのアユモドキの環境DNA検出結果

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

※論文 Fig. 3 より転載

(3) 琵琶湖に流入する 51 河川 102 地点における調査事例

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

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

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

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

メタ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。

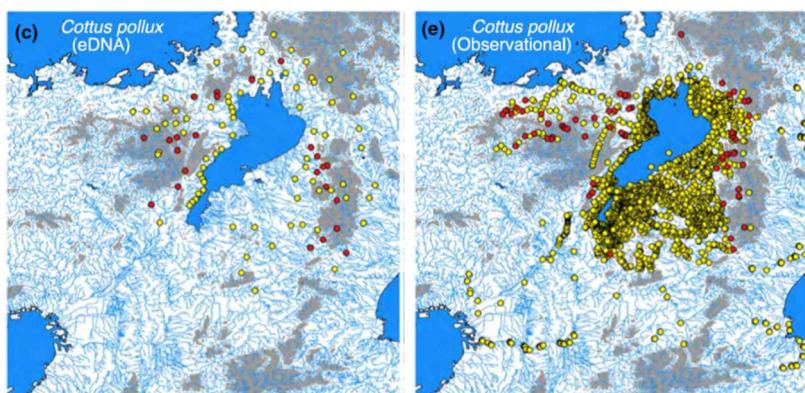


図 カジカの検出結果

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 $76.9 \pm 17.1\%$ (平均士標準偏差)、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されました。

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されました。

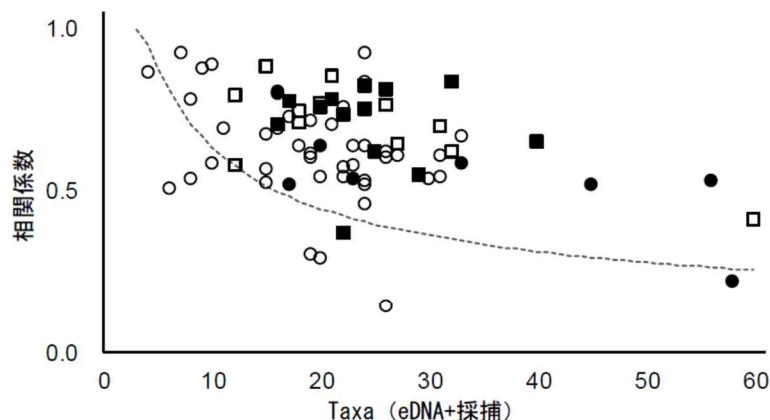


図-1 メタバーコーディング解析と直接採捕の結果に見られた相関. 点線以上には有意な正の相関関係(○:1 検体/1 季, ●:複数検体/1 季, □:1 検体/2 季合算, ■:複数検体/2 季合算. 破線: $p < 0.05$, cor-2 test).

※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。

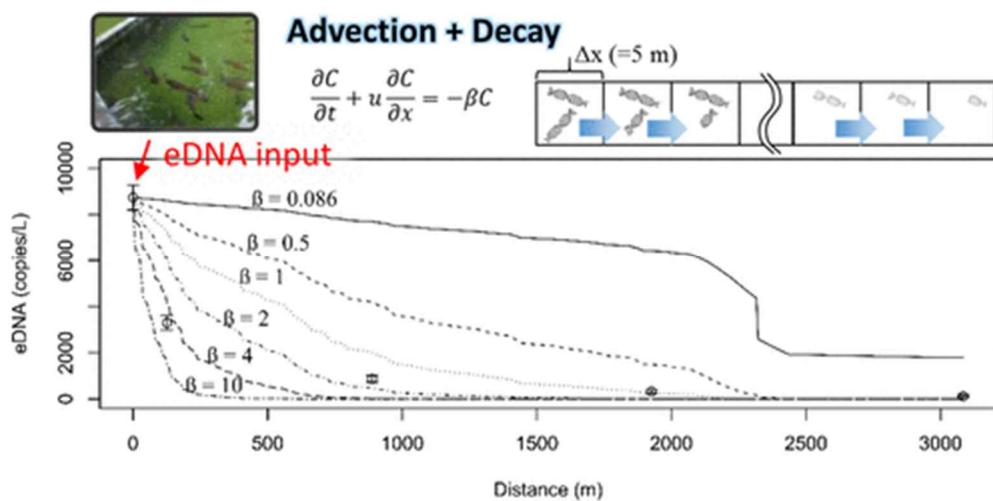


図 様々な減衰パラメータを用いて調査対象河川に沿ってシミュレーションされた環境 DNA ダイナミクス

※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在不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)の違いと相關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が、これは繁殖期や幼生の生態特性の違いに起因するものと考えられました。

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

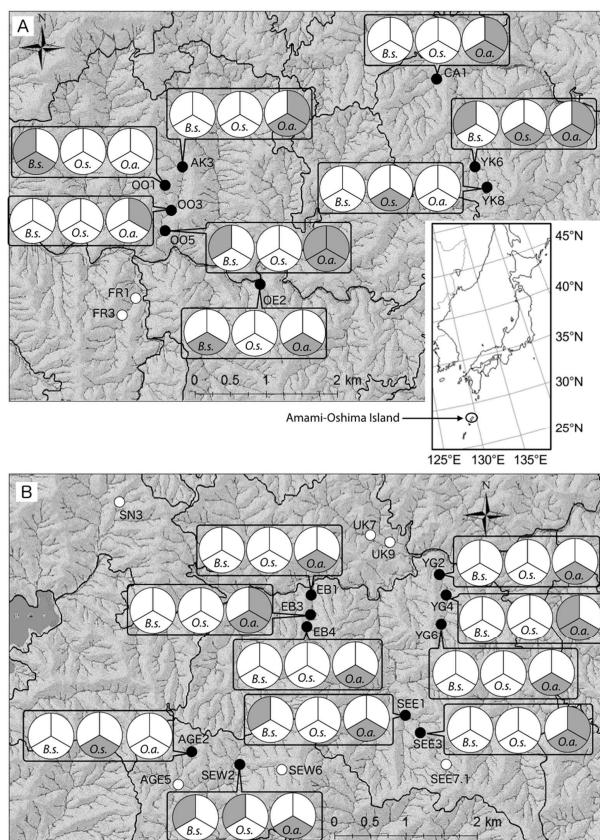


図 調査エリアの地図 (A 北部エリア、B 南部エリア)

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

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

B. s. はオットンガエル、O. s. はアマミイシガワガエル、O. a. はア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

参考資料7 データ公表に対する考え方

(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。

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では、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。

なお、本手引きを利用して調査、分析を実施し、結果に希少種等の情報が含まれる場合には、環境

省の位置情報公開レベル等を参考としていただき、情報の取扱い及び公表には細心の注意を払っていただきますよう、お願ひいたします。

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

(1) 本参考資料について

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法（以降、MiFish 法といいます）を推奨しています。MiFish 法では、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、リファレンスといいます）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 配列と最も相同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、相同性検索や 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 法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場合がある（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 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。
- ③ 雜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 法を含む）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 法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 法で用いる 12S リボゾーム RNA 遺伝子の一部領域（以降、MiFish 配列といいます）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。

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、「サンプルから取得されたこの環境 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」は、この分析結果表に記載されたアクセッション番号をキーにして、誤同定の有無を精査することができます。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る配列固有の識別番号です。

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、以下のリストに掲載されている種から重複を除いた 1859 種を基本としました。さらに、MiFish 法による種の識別性をより明確にするため、以下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。

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	468 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	86 種	ガ一科 7 種、パイク科 5 種、国外外来種 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 2 年度版)	1038 種	魚類版の掲載種全種
⑥日本産魚類全種目録 ver. 7 (2021 年 1 月 18 日版)	1150 種	登録 4592 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）」	694 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	232 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 1859 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、2021 年 1 月 21 日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にしています。ダウンロードの際は、前述の 1859 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、以下の 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。

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（下表参照）。

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	A_A	
○	×	○	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 法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を示した場合）、そこに該当する種は、MiFish 法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。

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、データベース上の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。

下の図は、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 配列と最も相同意（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。

No.	アクセッション番号	一致率	科名	和名	学名	採水日	2020/4/30	2020/5/30	2020/6/29	
							一二次的自然			
							No.1	No.2	No.4	
						確認種類数	14	8	10	11
						総リード数	240,540	63,128	90,381	87,031
1	LC552361.1	100	コイ科	コイ(飼育型)	<i>Cyprinus carpio</i>	13,192	1,488	3,842	7,862	
2	LC552360.1	100	コイ科	コイ(野生型)	<i>Cyprinus carpio</i>	1,299	0	865	434	
3	LC049911.1	100	コイ科	フナ属	<i>Carassius sp.</i>	22,489	21,525	964	0	
4	LC494269.1	100	コイ科	キタノアヒレタビラ	<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	タイリクハラタナゴ	<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	26,548	0	26,548	0	
7	LC552399.1	100	コイ科	カワムツ	<i>Nipponocypris temminckii</i>	2,167	0	0	2,167	
8	LC552387.1	100	コイ科	モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>	33,728	6,804	6,414	20,510	
9	LC552383.1	100	コイ科	タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>	119	0	0	119	
10	LC492322.1	100	ドジョウ科	ドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	15,086	2,919	5,487	6,680	
11	LC069457.1	100	ドジョウ科	キタドジョウ	<i>Misgurnus 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（Excel ファイル）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。分析結果表自体が 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、アクセッション番号チェックシートの「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。

MiFish 法に係る誤同定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、本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。本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。

下の図は、MiFish 法に係る誤同定チェックシートの出力結果（一部のみ抜粋）の例です。本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 データベース上の登録学名・和名（下の図では省略）
出力名② 付帯情報から修正されたデータベース上の登録学名・和名
出力名③ 日本産全魚種リストの学名和名・和名（下の図では省略）
出力名④ MiFish 法の結果として採用を推奨する学名・和名

MiFish 法に係る誤同定チェックシート出力結果例（一部抜粋）

No.	アクセッショ番号	出力名②		出力名④		
		付帯情報から修正されたデータベース上の登録学名から取得した和名	付帯情報から修正されたデータベース上の登録学名	MiFish 解析の結果として採用を推奨する和名	MiFish 解析の結果として採用を推奨する学名	
1	LC552361.1	コイ	Cyprinus carpio	コイ（飼育型）	Cyprinus carpio	AA
2	LC552360.1	コイ	Cyprinus carpio	コイ（野生型）	Cyprinus carpio	Ex
3	LC049911.1	ギンブナ	Carassius langsdorffii	ギンブナ / キンブナ / オオキンブナ / ニゴロブナ / キンギョ / ナマコ属の1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	B_Loc
5	LC193307.1	ゼニタナゴ	Acheilognathus typus	ゼニタナゴ	Acheilognathus typus	AA
6	AP012986.1	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	AA
8	LC552387.1	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E1（西日本型）	Gnathopogon elongatus elongatus	タモロコ / ホンモロコ	Gnathopogon elongatus elongatus / Gnathopogon caerulescens	AA
10	LC492322.1	ドジョウ	Misgurnus anguillicaudatus	ドジョウ（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)	AA
12	LC552443.1	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	AA
14	LC385178.1	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

出力名①のセル（MiFish 法に係る誤同定チェックシートの C, D 列）には、データベース上の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（MiFish 法に係る誤同定チェックシートの E, F 列）には、データベース上の学名に修正が必要と判断された場合、その修正され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（MiFish 法に係る誤同定チェックシートの 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（MiFish 法に係る誤同定チェックシートの I, J 列）には、出力名③の情報を基本としつつ、分子系統樹からの確認結果やエキスパートチェックの結果を反映した MiFish 法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、MiFish 法に係る誤同定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 法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」として單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 法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表示されています。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 (2021) 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. 7. <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はなく、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 法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ものですが、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

- * 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 3 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 2 版

発行日 令和 3 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（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.keeja.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（改訂第 2 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/>

