



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（特集1 環境DNA分析を利用した水中生物のモニタリング）

高原，輝彦
山中，裕樹
源，利文
土居，秀幸
内井，喜美子

(Citation)

日本生態学会誌, 66(3):583-599

(Issue Date)

2016-11-30

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

本文データは学協会の許諾に基づきJ-stageから複製したものである。

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90003986>





特集 1 環境 DNA 分析を利用した水中生物のモニタリング

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～

高原 輝彦¹・山中 裕樹²・源 利文³・土居 秀幸⁴・内井 喜美子⁵

¹ 島根大学生物資源科学部・² 龍谷大学理工学部・³ 神戸大学大学院人間発達環境学研究科

⁴ 兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科・⁵ 大阪大谷大学薬学部

Current state of biomonitoring method using environment DNA analysis

Teruhiko Takahara¹, Hiroki Yamanaka², Toshifumi Minamoto³, Hideyuki Doi⁴ and Kimiko Uchii⁵

¹Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University

²Faculty of Science and Technology, Ryukoku University

³Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

⁴Graduate School of Simulation Studies, University of Hyogo

⁵Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University

要旨：湖沼や河川、海洋沿岸域で採取した水試料に浮遊・存在する DNA（環境 DNA）の分析により、水棲動物の生息状況（在・不在やバイオマスなど）を推定する生物モニタリング手法は、“環境 DNA 分析”と呼ばれる。これまでに、淡水域から海水域までの様々な環境において、環境 DNA 分析を用いた生物モニタリングが実施されており、目視や採捕などによる従来の調査法と比べて、低コスト・高パフォーマンスであることが報告されている。現在まで、環境 DNA の分析に必要な水試料の採取量や保存の仕方、水試料に含まれる DNA の回収・濃縮方法、DNA の抽出・精製方法、および DNA 情報の解析方法については、研究者ごとに様々な方法が採用されており、統一的なプロトコルはない。いくつかの研究では、水試料に含まれる DNA の濃縮方法や DNA 抽出方法の違いが、得られる DNA 濃度や検出率に及ぼす影響を比較・検討しており、その結果、野外環境条件や対象生物種によって、効果的なプロトコルに相違があることがわかってきた。そこで本稿では、著者らのこれまでの研究を含めた既報の論文における実験手法を概説し、環境 DNA 分析を用いた効率的な生物モニタリング手法の確立に向けて議論を展開する。本稿によって、環境 DNA 分析が広く認知されるとともに、本稿がこれから環境 DNA の研究分野に参画する研究者の技術マニュアルとして活用されることを願う。さらに、環境 DNA 分析が、様々な局面での環境調査において、採捕や目視といった既存の手法と同様に、一般的に利用される生物モニタリング手法となることを期待している。

キーワード：水棲生物、生物多様性モニタリング、プライマー・プローブ、リアルタイム PCR

はじめに

生物種の保全や管理をする上で最も基本的かつ重要な情報は、生物の生息分布域や、個体数・生物量である。つまり、水中の生物が「いつ」「どこに」「どれだけ」いるのかを迅速に把握する必要がある。近年、湖沼や河川、

海洋沿岸域で採取した水試料に浮遊・存在する DNA の情報を解析することで、水棲動物の生息状況（在・不在やバイオマス）を評価する生物モニタリング手法の開発が急速に進んでいる。この手法は、環境 DNA（英語表記では environmental DNA: eDNA）分析と呼ばれており、水試料に含まれる、対象となる生物に由来する DNA 断片を分析する。環境 DNA 分析では、水（数ミリリットルから数リットルほど）を採取してその中の DNA 情報を調べるだ

2015 年 11 月 29 日受付、2016 年 3 月 14 日受理

¹e-mail: ttakahara@life.shimane-u.ac.jp

表 1. 環境 DNA 分析を生物モニタリングに用いた場合の利点 (a) と現状で改善・考慮すべき点 (b)。

(a)

- ・水を採取するだけなので野外調査コストを大幅に削減できる。
- ・水を採取するだけなので調査による環境破壊がほとんどない。
- ・水を採取するだけなので調査者間の結果のバラツキを小さくできる。
- ・夜行性や生息密度の低い種を比較的容易に検出できる。
- ・DNA 情報から生物種を同定するので形態学的な種同定の技術が必要ない。
- ・DNA 検出手法によっては 1 つの環境 DNA 試料から多種を検出できる。
- ・水試料から抽出した環境 DNA 試料は長期冷凍保存ができる。
- ・捕獲方法が未確立の外来種の侵入を DNA の有無からすばやく検知できる。

(b)

- ・生物モニタリングにおいて必ずしも 100% の検出率ではない。
- ・対象生物とともに、近縁種や共存種の十分な塩基配列情報が必要となる。
- ・検出された対象生物由来の DNA が、いつ、どこでその生物から放出されたのか不明なことが多い。
- ・死亡個体に由来する DNA も検出してしまう。
- ・環境 DNA が検出されても集団の年齢構成やサイズ構成が分からない。
- ・偽陽性・偽陰性に対して細心の注意を払う必要がある。

けなので、従来の採捕や目視といった調査法と比較してコストや効率の面でいくつもの利点がある(表 1a) (Darling and Mahon 2011)。

環境 DNA 分析は、これまでに著名な国際誌にレビュー論文が次々と掲載されており(例えば、Bohmann et al. 2014; Rees et al. 2014b; Lawson Handley 2015; Pedersen et al. 2015; Thomsen and Willerslev 2015; Barnes and Turner 2016)、また、Science 誌の記事にも取り上げられている(Kelly et al. 2014b)。図 1 に、近年の環境 DNA 分析を用いた生物モニタリングに関する論文発表数の推移を示した。2014 年以降から掲載数が著しく増加していることがわかる。このことは、本研究分野への注目度が急速に高まっていることの証左である。

環境 DNA 分析を用いた生物種の検出には大きく 2 つの方法がある。1 つ目は、種特異的なプライマーを使ったポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法を用いて対象種の DNA が水試料に含まれるかどうかを確認する方法で、多くの研究で採用されている。2 つ目は、対象とする分類群に属する種の DNA をまとめて増幅できるユニバーサルプライマーを用いた PCR を行った後に、次世代シーケンサーで網羅的に塩基配列を決定し、データベース (GenBank など) と照合して、水試料に含まれる DNA の宿主生物を決定する方法である。前者は主に 2 つに区分でき、PCR 増幅産物を電気泳動してバンドの有無を確認する一般的な PCR の手順によるものと、近年の環境 DNA 分析の分野では主流となっているリアルタイ

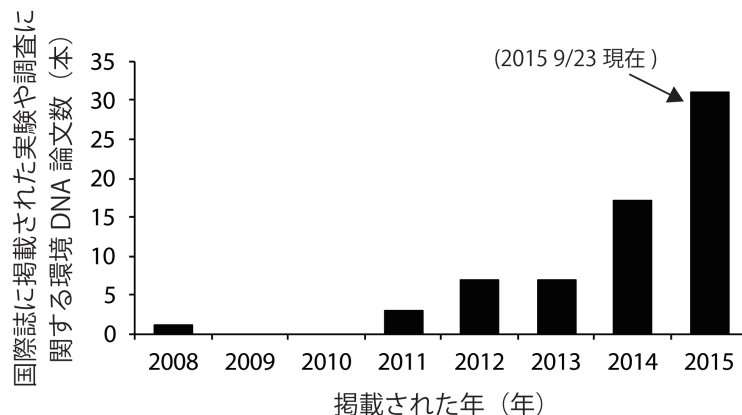


図 1. 環境 DNA 研究に関する論文発表の経年推移。ただし、論文を執筆した 2015 年 9 月 23 日の時点で印刷中だったものについては 2015 年の発表論文とした。

ム PCR を利用する方法がある。なお、これらの手法については 4. (1) ~ (4) において詳しく述べる。

環境 DNA 分析は、採水するだけで生物分布を調査することのできる非侵襲的な手法であり、調査の際に生息場所を攪乱することがないこともあり、希少種モニタリングへの実用化が検討されている [例えば、オオサンショウウオ *Andrias japonicus* (Fukumoto et al. 2015)、カワバタモロコ *Hemigrammocypripis rasborella* (福岡ほか 2016)]。また、侵入しているか否かをいち早く把握する必要がある外来種の検出にも有効である。実際に、環境 DNA 分析は、Ficetola et al. (2008) が外来の両生類 (ウシガエル *Lithobates catesbeianus*) に適用したのが始まりであり、その後、軟体動物 (Egan et al. 2013, 2015 ; Goldberg et al. 2013) や甲殻類 (Tréguier et al. 2014)、爬虫類 (Piaggio et al. 2014 ; Davy et al. 2015 ; Hunter et al. 2015) や魚類 (Jerde et al. 2013 ; Diaz-Ferguson et al. 2014 ; Keskin 2014 ; Nathan et al. 2015) など、幅広い分類群において、外来種検出の研究が進められている。さらに、外来の水草も、水試料に含まれる DNA によって検出可能であることが報告されており (Scriver et al. 2015)、動物・植物に関わらず、ほとんどの生物に環境 DNA 分析が適用できると考えられる (詳細は表 2 参照)。

以上のように、湖沼や河川などから水を採取して DNA 情報を分析すると、生物の生息の有無を高い精度で判定できることから、環境 DNA 研究の初期 (2011 年から 2013 年頃) には、その生物モニタリング調査への有用性のみが強調される傾向があった。しかし、採取した水試料に含まれる DNA の正体 (水に含まれる DNA が生物からどのような過程や状態で放出されたのか)、さらに、それら DNA の効率的な回収方法、そして、PCR などの各種 DNA 検出法の特徴に応じた DNA 検出率などについては未解明な部分が多く、解決すべき課題は現在も山積している。そこで近年では、環境 DNA 分析による最適な生物モニタリング手法の確立を目指し、これまでブラックボックスであった部分に焦点が当てられ始められている。例えば、Deiner et al. (2015) は、環境 DNA の効果的な濃縮と抽出の方法を綿密な実験により検討し、Turner et al. (2015) は、環境中の DNA の蓄積性を検討している。

そこで本稿では、現在までに公表済みの環境 DNA 分析の手法開発について概説し、そこから最適な手法確立に向けた展望について議論する。本稿によって環境 DNA 分析がより広く認知されるとともに、本稿が、これから環境 DNA の研究分野に参画する研究者の技術マニュアルとして利用されることを期待している。

1. 環境 DNA とは

環境中に存在する DNA が生物からどのような状態で放出されているのかを明らかにすることは、効率的に DNA を回収する手法の開発にとって有用な情報となる。Turner et al. (2014a) は、採取した水試料の濾過処理の際に用いる濾紙の穴径 (ポアサイズ) の違いに応じたサイズ分画によって、環境中に存在する DNA のサイズを検証した。その結果、DNA の総量は、 $0.2 \mu\text{m}$ 以下のポアサイズの濾紙を通過した分画において高いことが示された。しかしこの分画にはバクテリアなどの微生物に由来する DNA も含まれている。コイ (*Cyprinus carpio*) やカワマス (*Salvelinus fontinalis*) といった魚類に由来する環境 DNA は、おおよそ $1\text{--}10 \mu\text{m}$ ポアサイズの濾紙に最も多く捕集され、その大きさからミトコンドリアや細胞片に由来する可能性が高いと考えられた (Turner et al. 2014a ; Wilcox et al. 2015)。Merkes et al. (2014) は、死亡した魚体 (ハクレン *Hypophthalmichthys molitrix*) から高濃度の DNA が継続的に放出されることを明らかにした。このことは、魚体は、生死に関わらず環境 DNA の放出源となっていることを示している。また、ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) から水中へ放出される DNA の速度は、幼魚の方が成魚よりも速いことから、DNA の放出速度は、成長とともに減少する代謝速度に制御されていると考えられた (Maruyama et al. 2014)。加えて、対象種の排泄物にも大量の DNA が含まれていることが明らかになっており (Klymus et al. 2015)、腸壁などから剥がれ落ちた組織片もまた、環境 DNA の由来となっていることが示唆されている。

また、コクレンの仲間 (*Hypophthalmichthys* spp.) を対象にした研究では、魚類の DNA は、湖沼の表層水と比べて堆積物に高濃度で分布していることが報告された (Turner et al. 2015)。これは、環境中の DNA や細胞片が、何らかの物質に吸着されるなどして沈んだためか、堆積物中での DNA の安定性が高いためであると考えられる。一方で、シクリッドの 1 種 (*Hemichromis letourneuxi*) が実験池に放出した DNA は、池底の方が表層水より検出率が低いことも報告されている (Moyer et al. 2014)。これらの結果は、環境中の DNA は水試料の採取地点 (表層・中層・底層など) によって濃度や検出率が異なることを示唆しており、今後の更なる検証が必要である。

環境中の DNA の現存量は、閉鎖系であれば対象生物の DNA 放出量から環境中の生物学的・物理化学的作用による DNA 分解量を差し引いた量になる。それゆえ、環境中

表 2. 水棲動物を対象にした環境 DNA 研究の学術論文とその内容の概略。

No.	著 者	掲載年	対象種	学 名	研究内容	採水量 / サンプル	DNA 濃縮の方法	DNA 分析の方法
1	Ficetola et al.	2008	ウシガエル	<i>Lithobates catesbeianus</i>	実験、調査	15 mL	エタノール沈殿	PCR + 電気泳動
2	Dejean et al.	2011	ウシガエル チャウザメの 1 種	<i>Lithobates catesbeianus</i> <i>Aspenser baerii</i>	実験	15 mL	エタノール沈殿	PCR + 電気泳動
3	Goldberg et al.	2011	オオサンショウウオの 1 種	<i>Asaphus montanus</i>	調査	10 L, 5 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
4	Jerde et al.	2011	ハクレン コクレン	<i>Dicamptodon aterrimus</i> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	調査	2 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
5	Dejean et al.	2012	ウシガエル	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	調査	15 mL	エタノール沈殿	PCR + 電気泳動
6	Foot et al.	2012	ネズミイルカ	<i>Lithobates catesbeianus</i>	実験、調査	15 mL	エタノール沈殿	リアルタイム PCR
7	Minamoto et al.	2012	淡水魚 5 種	<i>Phocoena phocoena</i>	調査	120 mL	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
8	Olson et al.	2012	淡水魚 6 種	Minamoto et al. (2012) Table 1 参照	調査	2 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
9	Takahara et al.	2012	ヘルペンダー コイ	<i>Cryptobranchius alleganiensis</i> <i>Cyprinus carpio</i>	実験、調査 実験	2, 4, 8 L 20, 50 mL	限外濾過 フィルター濾過	リアルタイム PCR
10	Thomsen et al.	2012a	海水魚 15 種、鳥類 4 種 イトヨ	Thomsen et al. (2012a) Table 1 参照 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	調査	750 mL	フィルター濾過	次世代シーケンス
11	Thomsen et al.	2012b	ヨーロッパスママガレイの 1 種 両生類 1 種、甲殻類 1 種 両生類 2 種	<i>Platichthys flesus</i> Thomsen et al. (2012b) Table S1 参照 Thomsen et al. (2012b) Table S2 参照	調査 実験	15 mL	Ficetola et al. (2008) 参照	リアルタイム PCR
12	Egan et al.	2013	両生類 6 種、淡水魚 8 種、昆虫類 1 種、 甲殻類 1 種、哺乳類 2 種、鳥類 3 種	<i>Dreissena polymorpha</i> <i>Potamopyrgus antipodanum</i>	調査 実験	500 mL 250 mL	フィルター濾過	次世代シーケンス
13	Goldberg et al.	2013	ゼブラフィッシュの 1 種 コモチカワツボ	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	調査 実験	4 L 2 L	Goldberg et al. (2011) 参照	レーザー伝送分光法 リアルタイム PCR
14	Jerde et al.	2013	ハクレン コクレン	<i>Asaphus montanus</i>	調査	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
15	Pilliod et al.	2013	オガエルの 1 種 オオサンショウウオの 1 種	<i>Dicamptodon aterrimus</i>	実験、調査	1 L, 2 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
16	Santas et al.	2013	アメリカオオサンショウウオ	<i>Cryptobranchius alleganiensis</i>	調査	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
17	Takahara et al.	2013	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>	調査	6 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
18	Wilcox et al.	2013	カワマス ブルトラウト	<i>Salvelinus fontinalis</i> <i>Salvelinus confluentus</i>	調査	250 mL 900 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
19	Barnes et al.	2014	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	実験	1 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
20	Deiner and Altermatt	2014	ミジンコの 1 種 イガイの 1 種	<i>Daphnia longispina</i> <i>Unio tumidus</i>	調査	280, 900, 1080 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
21	Diaz-Ferguson et al.	2014	シクリッドの 1 種	<i>Hemichromis letourneuxi</i>	実験	15 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
22	Eichmiller et al.	2014	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	調査	50 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
23	Kelly et al.	2014a	硬骨魚 8 種、軟骨魚 3 種、海亀 1 種	Kelly et al. (2014a) Table 1 参照 *1)	調査	280, 900, 1080 mL	Deiner and Altermatt (2014) 参照	PCR + 電気泳動
24	Keskin	2014	淡水魚	<i>Lepomis macrochirus</i>	実験	15 mL	エタノール沈殿	リアルタイム PCR
25	Mächler et al.	2014	大型無脊椎動物 6 種	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	実験	50 mL	遠心分離	リアルタイム PCR
26	Maruyama et al.	2014	ブルーギル	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	実験	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
27	Merkes et al.	2014	ハクレン シクリッドの 1 種	<i>Hemichromis letourneuxi</i>	実験	2 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
28	Moyer et al.	2014	ハゼの 1 種	<i>Neogobius melanostomus</i>	実験	2 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動、リアルタイム PCR、デジタル PCR

No.	著者	掲載年	対象種	学名	研究内容	採水量 / サンプル	DNA 濃縮の方法	DNA 分析の方法
30	Piaggio et al.	2014	ビルマニシキヘビ	<i>Python bivittatus</i>	実験、調査	15 mL, 2 L	フィルター濾過、エタノール沈殿	PCR + 電気泳動
31	Pilliod et al.	2014	オオサンショウウオの 1 種	<i>Dicamptodon aerrimus</i>	実験	500 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
32	Rees et al.	2014a	イモリの 1 種	<i>Triturus cristatus</i>	調査、実験	15 mL	エタノール沈殿	リアルタイム PCR
33	Tréguier et al.	2014	アメリカザリガニ	<i>Procambarus clarkii</i>	調査	15 mL	エタノール沈殿	リアルタイム PCR
34	Turner et al.	2014a	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	実験	250 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
35	Turner et al.	2014b	コクレンの 1 種	<i>Hypophthalmichthys</i> spp.	実験	2 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
36	Biggs et al.	2015	イモリの 1 種	<i>Triturus cristatus</i>	調査	15 mL	エタノール沈殿	リアルタイム PCR
37	Davy et al.	2015	淡水亀類 9 種	Davy et al. (2015) Table 1 参照	実験、調査	1 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動、リアルタイム PCR
38	Deiner et al.	2015	甲殻類 1 種、貝類 1 種、水生昆虫 1 種、端脚類 1 種	*2)	調査	15 mL	フィルター濾過、エタノール沈殿	PCR + 電気泳動、次世代シーケンス
39	Doi et al.	2015a	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>	調査	1 L	Takahara et al. (2013) 参照	デジタル PCR、リアルタイム PCR
40	Doi et al.	2015b	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	実験	15 mL	エタノール沈殿	デジタル PCR、リアルタイム PCR
41	Egan et al.	2015	クワガタガイ	<i>Dreissena bugensis</i>	調査	250 mL	フィルター濾過	レーザー伝送分光法
42	Fukumoto et al.	2015	オオサンショウウオ	<i>Andrias japonicus</i>	調査	4 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
43	Gustavson et al.	2015	チュウゴクオオサンショウウオ	<i>Andrias davidianus</i>	調査	500 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
44	Hunter et al.	2015	ウミヤツメ	<i>Paromysyon marinus</i>	調査	950 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
45	Jane et al.	2015	ブラウントラウト	<i>Salmo trutta</i>	実験、調査	6 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
46	Janosik and Johnston	2015	ビルマニシキヘビ	<i>Salvelinus fontinalis</i>	実験、調査	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
47	Klymus et al.	2015	シクリッドの 1 種	<i>Etheostoma boschungii</i>	調査	50 mL	遠心分離	PCR + 電気泳動
48	Koizumi et al.	2015	コクレン	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	実験	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
49	Laranie et al.	2015	アブラハヤ	<i>Rhychochrysis logowskii steindachneri</i>	調査	1 L	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
50	McKee et al.	2015	マスノスケ	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	調査	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
51	Miya et al.	2015	ヘルペンダー	<i>Cryptobranchus alleganiensis</i>	実験、調査	2 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
52	Nathan et al.	2015	亜熱帯魚 232 種	Mya et al. (2015) Table 7, 10 参照	調査	250 mL	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
53	Renshaw et al.	2015	淡水魚 6 種	Nathan et al. (2015) Table 2 参照	実験	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
54	Seriver et al.	2015	ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>	実験	15 mL	フィルター濾過	PCR + 電気泳動
55	Sigsgaard et al.	2015	淡水水草 10 種	<i>Misgurnus fossilis</i>	調査	1 L	エタノール沈殿	リアルタイム PCR
56	Spear et al.	2015	ウェザーフィッシュ	<i>Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis</i>	調査	250 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
57	Strickler et al.	2015	ヘルペンダー	<i>Lithobates catesbeianus</i>	実験	1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
58	Takahara et al.	2015	ウシガエル	<i>Cyprinus carpio</i>	調査	15 mL (水), 5 mL (堆積物)	Takahara et al. (2013) 参照 (堆積物)	リアルタイム PCR
59	Turner et al.	2015	コクレンの 1 種	<i>Hypophthalmichthys</i> spp.	実験、調査	2 L	フィルター濾過	デジタル PCR
60	Wegeleiter et al.	2015	ハゼの 1 種	<i>Neogobius melanostomus</i>	実験	100 mL	フィルター濾過	リアルタイム PCR
61	Wilcox et al.	2015	カワマス	<i>Salvelinus fontinalis</i>	実験	15-4000 mL*3)	フィルター濾過、エタノール沈殿、遠心分離	リアルタイム PCR
62	Eichmiller et al.	2016	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	実験	1 L	フィルター濾過	次世代シーケンス
63	Evans et al.	2016	淡水魚 8 種、両生類 1 種	Evans et al. (2015) Table 1 参照	実験、調査	15, 100, 500 mL	フィルター濾過、エタノール沈殿、限外ろ過	リアルタイム PCR
64	Minamoto et al.	2016	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	実験、調査	500 mL, 1 L	フィルター濾過	リアルタイム PCR
65	Uchii et al.	2016	コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	実験、調査	Valentini et al. (2016) 参照	フィルター濾過	次世代シーケンス
66	Valentini et al.	2016	両生類、魚類	Valentini et al. (2016) 参照	調査			

*1) ギベリオブナ *Carassius gibelio*, ナマズの 1 種 *Clarias gariepinus*, ナイルティラピア *Oreochromis niloticus*, モツゴ *Pseudorasbora parva**2) ミジンコの 1 種 *Daphnia longispina*, イシガイの 1 種 *Unio tumidus*, カゲロウの 1 種 *Baetis buceratus*, ヨコエビの 1 種 *Gammarus pulex*

*3) 詳細は、Eichmiller et al. (2015) Table 1 参照、*4) cetyl trimethyl ammonium bromide の略

に放出された DNA の分解に関する研究も進んでいる（例えば、Thomsen et al. 2012a ; Barnes et al. 2014 ; Pilliod et al. 2014）。例えば、微生物の増殖に好適な環境で DNA の分解が促進されるとの報告がある（Strickler et al. 2015）。さらに、小規模の池（4.8 m³）でチョウザメの 1 種（*Acipenser baerii*）を 10 日間畜養してから池から取り除いたところ、環境中の DNA 濃度は経時的に低下して 17 日後に未検出になることがわかった（Dejean et al. 2011）。ガラスビーカーで 5 日間畜養されたウシガエルのオタマジャクシの場合も同様に、オタマジャクシを取り除いてから経過日数に応じて DNA 濃度が低下し、25 日後に未検出となった（Dejean et al. 2011）。コモチカワツボ（*Potamopyrgus antipodarum*）の場合においては、実験用コンテナ（1.5 リットル）からそれらを除去した後、DNA は 21 日後に未検出となった（Goldberg et al. 2013）。加えて、淡水魚から水中に放出された DNA の濃度は 1 時間あたりおよそ 10% 減少することが報告されている（Barnes et al. 2014 ; Maruyama et al. 2014）。一方で、海水魚では 5% 以下の減少率であることも明らかにされた（Thomsen et al. 2012a）。

野外の実例の一つとして、オオサンショウウオにおいては、年 4 回の野外調査で冬にもっとも環境中の DNA の検出率が高いことが明らかになっている（Fukumoto et al. 2015）。これらのことから、水温が低い方が環境中の微生物などによる DNA の分解が遅くなり、それによって、環境中の DNA の検出率が高くなったと考えられる。更なる検討は必要であるが、環境 DNA 分析を用いたオオサンショウウオのモニタリング調査は、冬期に実施することで効果的な成果を得ることができるのかもしれない。

2. サンプリングの方法

2. (1) 水試料の採取量と採取場所

環境 DNA の分析に供する水試料の量は、回収される環境 DNA の量や検出率に大いに影響を及ぼす。すなわち、一回に採取する水の量や採水回数の増加に応じて DNA の濃度や検出率も上昇することは間違いない〔詳しくは、山中ほか（2016）参照〕。しかしながら、調査や分析にかけることができる労力は限られていることから、コストパフォーマンスが最大になる計画のデザインが望まれる。また、先にも述べたように、水試料の採取地点も DNA の濃度や検出率に影響を及ぼすと考えられる。一方で、湖水から検出されるコイの DNA 濃度は水深の違いにあまり影響されないことが報告されている（Eichmiller et al. 2014）。さらに Pilliod et al.（2013）は、流水環境の溪流に

おいても、岸付近と流心の間で両生類の DNA の濃度が違うことを報告した。しかし、ため池におけるブルーギルとオオクチバス（*Micropterus salmoides*）では、岸辺と池の中心それぞれの表層から採取した水試料間で DNA の濃度や検出率が異なり、またそのパターンが魚種に応じて顕著に違うことがわかっている（Takahara et al. 未発表）。これらのことは、対象種の生態学的特性（生息場所として岸と沖のどちらを選好するかなど）や調査地の特徴（水量や止水・流水環境など）に応じて、水試料の採取量と採取地点を検討する必要性を示している。

特定の DNA 断片の有り無しによって種を検出する環境 DNA 分析では、試料の DNA 汚染によって簡単に間違った結果の解釈をもたらすため、十分に注意をしなければならない。なお、野外調査時における汚染の防止に関しては、山中ほか（2016）が詳しい。

2. (2) 水試料の採取後の取扱い

野外で採取した水試料を実験室に持ち帰るまでの取扱いには大きく分けて 3 つの方法がある。1 つ目は、水試料をクーラーボックスなどに入れて、できるだけ低温状態を保ちながら実験室まで持ち帰り、その後の処理を行う方法である。低温状態を維持することにより、DNA 分解に関わる酵素（例えば、DNase など）の働きを軽減することができる。4℃におかれた水試料は、24 時間以内では DNA の検出率に違いが出ないことが報告されているが（Pilliod et al. 2013）、冷蔵で持ち帰った水試料は、可能な限り早く次段階の処理（濾過や試薬添加など）を行うことが望ましい。

2 つ目は、野外の現場で水試料に処理を加える場合であり、この処理は更に 2 つに区分される。まず、少量の水試料（15 ミリリットル程度）を採取した場合は、その試料にエタノールなどの試薬を添加して、試料に溶解している DNA を沈殿させた後、実験室に持ち帰る方法である（例えば、Ficetola et al. 2008 ; Dejean et al. 2012）。一方で、比較的大容量の水試料を採取する場合では、その場で濾過処理を行い、水試料に含まれる DNA を濾紙に捕集して（詳細は後述）、その濾紙を冷蔵あるいは試薬添加をするなどして実験室に持ち帰る方法である。野外における濾過処理の手順や注意点などについての詳細は、山中ほか（2016）を参照されたい。

3 つ目は、ポリ瓶などに入れて持ち帰った水試料をそのまま冷凍保存する方法である（例えば、Takahara et al. 2013 ; Deiner and Altermatt 2014 ; Rees et al. 2014a ; Deiner et al. 2015）。この方法は、試薬添加や濾過などの処理を

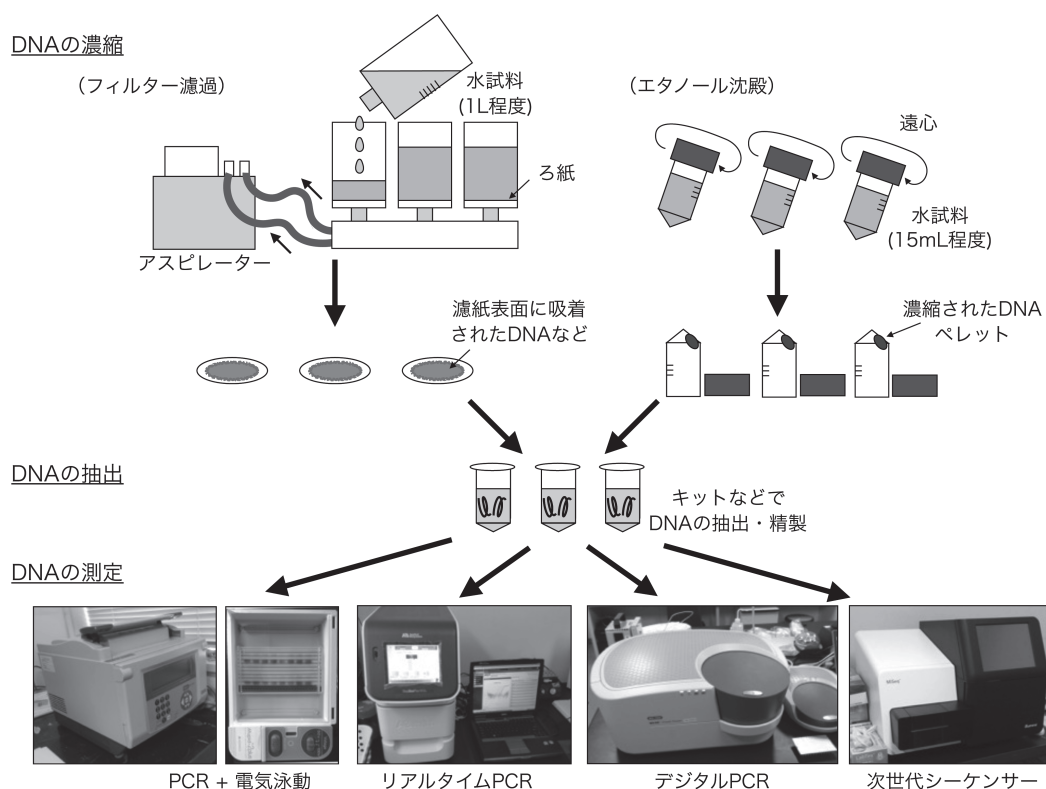


図 2. 水試料から DNA を濃縮・抽出・測定するまでの実験手順の概略図。

速やかに実行できない場合に採用することが多い。そして後日、それらのポリ瓶を常温の水道水にさらすなどして水試料を解凍した後、濾過処理などを行う。一般市民参加型のようなボランティア活動をベースにした環境調査では、現場において水試料の濾過処理を行うことは困難なので、水試料を冷凍保存する本手法の有用性は高い。しかし、原因はまだ明らかになっていないが、水試料を一旦冷凍すると、後述するリアルタイム PCR 実験の際に PCR 阻害が起きやすくなり、DNA の検出率が低下する場合がある (Takahara et al. 2015)。したがって、PCR 阻害を軽減する手法を併用するなど、水試料の冷凍保存については更なる検討が必要である (詳細は 5. (3) 参照)。

3. 水試料中の DNA の濃縮・抽出

3. (1) DNAの濃縮

水試料に含まれる DNA を濃縮する方法は、大きく 2 つに区分される。1 つ目は、上述の 2. (2) でも少し触れたように、少量の水試料 (一般的に 15 ミリリットル) に含まれる DNA をエタノール沈殿によって凝集する方法である (図 2 右上)。この手法の長所と短所については表 3 を参

照されたい。

2 つ目の方法は、水試料の容量が大きい場合に用いられる。これは、フィルター濾過法によって、水試料に含まれる DNA を濾紙に捕集することで DNA を濃縮する方法である (図 2 左上) (例えば、Takahara et al. 2012 ; Santos et al. 2013)。上述の 2. (1) で述べたように、水試料の量は回収される環境 DNA の濃度や検出率に大いに影響を及ぼす。よって、エタノール沈殿法などに比べて、容積の大きい水試料の処理が可能なフィルター濾過法の方が回収できる DNA の濃度が高くなる。しかし、後述の 3. (2) にあるように、濾過に必要な使用機材一式の入念な洗浄などが必要であり、エタノール沈殿法に比べて、それらの作業に時間と手間を要する。

フィルター濾過法に使用する濾紙の孔径 (ポアサイズ) は研究者間で異なり、すでに上述したコイの研究例では、1 から 10- μ m のポアサイズの濾紙にコイの DNA が捕集されやすいことがわかっている (Turner et al. 2014a)。一般的に、ポアサイズが小さい濾紙の方が水試料に含まれる DNA を多く捕集すると考えられるが、濁度が高く有機物を多く含む水試料の場合は目詰まりを起こしやすく、十分量的水試料を濾過できないことがある。また、濾紙の

表 3. 水試料から DNA を濃縮・抽出・測定するまでの各実験手法の長所と短所。

長所		短所
<u>DNA の濃縮</u>		
・フィルター濾過法	回収できる DNA の量が多い。	濾過処理ごとに機材一式の入念な洗浄が必要である。
・エタノール沈殿法	現場で DNA を保存できる。 作業が簡便である。 試薬類が安価である。	環境 DNA 濃度が低いとき、検出限界を下回る可能性がある。 大容量（例えば、500 mL）を遠心分離できる機器は高額である。
・市販の限外濾過ユニットを用いた限外濾過法	試薬添加が必要なく、遠心処理だけで良い。	手法の有用性について更なる検証が必要である。 大容量（例えば、500 mL）を遠心分離できる機器は高額である。 限外濾過ユニットは高額である。 不純物が多い試料では目詰まりを起こしやすい。
<u>DNA の抽出</u>		
・市販のカラム式キット類	手順などがマニュアル化されている。	キット間で抽出される DNA の回収率が異なる。
・有機溶媒による液相分離	古典的手法として広く利用されている。	フェノールやクロロホルムなどの試薬は劇物であり、廃液処理が必要である。
<u>DNA の測定</u>		
・PCR + 電気泳動	広く普及している手法である。	DNA の定量性が低い。 PCR 増幅産物間の汚染や混入を起こしやすい。
・リアルタイム PCR	プローブの使用により種特異性の高い検出が可能である。 DNA の定量性が高い。 PCR 増幅産物間の汚染や混入が起きにくい。	機器が高額である。
・デジタル PCR	プローブの使用により特異性の高い検出が可能である。 とくに低濃度 DNA の定量性が優れている。 PCR 増幅産物間の汚染や混入が起きにくい。 PCR 時の阻害物質の影響を軽減できる。	ランニングコストが高い。 機器が高額で、まだ普及していない。 PCR 増幅産物を回収できないため、増幅産物の塩基配列が特定できない。
・次世代シーケンサーによるメタバーコーディング	1 回の測定で種組成の網羅的な解析が可能である。	生物種間で PCR 増幅効率が異なる。 出力されたデータ解析に専門的な技術を要する。

材質（例えば、ポリカーボネート製やガラス繊維製など）も、水試料の濾過処理による DNA の吸着作用に影響を及ぼすことが報告されている（Liang and Keeley 2013 ; Renshaw et al. 2015）。さらに、Eichmiller et al. (2016) は、環境 DNA 分析を適用する目的が、対象動物（この場合、コイ）の在・不在の検出か、あるいは、バイオマスの定量によって、最適な濾紙が違うことを報告している。濾過処理に適した濾紙は、対象種や野外環境（流水か止水か、濁度の度合いなど）によって相違があると考えられるため、予備的な実験を行うなど綿密な検討が必要である。

濾過処理によって DNA が捕集された濾紙は、次の行程である DNA 抽出までの間、DNA フリーのアルミホイルに包むなどし、冷凍して保管することが多い（例えば、Takahara et al. 2012, 2013）。あるいは、そのフィルターを試薬（エタノールなど）に浸漬させる方法も提案されている（Goldberg et al. 2011 ; Renshaw et al. 2015 ; Minamoto et al. 2016）。Wegleitner et al. (2015) は、試薬 “Longmire’s buffer (Longmire et al. 1997)” に浸漬したフィルターの DNA 濃度は、室温（20℃）で 150 日間は変化しないことを報告している。

また、研究例は少ないが、試薬の添加をせずに遠心分離のみによって DNA を濃縮する方法（例えば、Klymus et al. 2015）や、限外濾過ユニットによって水試料に含まれる DNA を濃縮する方法も実施されている（Takahara et al. 2012）。なお、各方法の長所と短所については表 3 にまとめた。

3. (2) DNAの混入防止

濾過による DNA 濃縮過程の際、使用する濾過機材から DNA 汚染が起こっていないことを確認するために、DNA が含まれていない蒸留水などを水試料と同様に濾過する陰性対照（ネガティブコントロール）を使用した研究は多い（例えば、Goldberg et al. 2013 ; Jerde et al. 2013）。現在では、陰性対照を用いて汚染や混入が起こっていないことを確認することが強く推奨されているので、実際に環境 DNA 分析を行う際には必ず実施すべきである。さらに実験時における手袋の着用や、使用機材一式を次亜塩素酸処理することによる DNA の除去によって、サンプル間の混入を防止できる。また、水道水と蒸留水を用いた入念な洗浄とすすぎにより、次亜塩素酸処理なしでも DNA を検出限界以下まで除去できることも報告されている（Fukumoto et al. 2015）。環境 DNA 分析を取り入れた生物モニタリング調査の強みの一つは、例えば市民参加型のイベントなどと連携することで、大規模な一斉調査

が実施できることである（Biggs et al. 2015）。そのような連携調査において次亜塩素酸処理を行うのが困難な場合には、上述のような入念な洗浄を取り入れることで汚染や混入のリスクを減らすことができる。この場合は陰性対照の実施がとくに重要となる。

3. (3) DNAの抽出・精製

水試料から濃縮された DNA を抽出・精製する際には、いくつかの市販のカラム式キットが汎用されている。Eichmiller et al. (2016) は、6 種類の DNA 抽出キットを用いて DNA の濃度や検出率の検証を行っている。例えば、Fast DNA SPIN Kit（MP Biomedicals 社）で処理された環境 DNA 試料では、わずかに PCR の阻害反応がみられたにもかかわらず、コイが放出した DNA の検出感度が最も高いことを報告した。一方、PowerSoil DNA Isolation Kit（MoBio 社）では、PCR の阻害反応がなく、コイの DNA を定量する際に適していることが報告されている。また、キアゲン社の DNeasy Blood and Tissue Kit は多くの研究者に使用されており、他のキット（例えば、MoBio 社の PowerWater DNA Isolation Kit など）と比べて、DNA を効率的に抽出・精製できるとの報告もある（Deiner et al. 2015）。

その他にも、古典的手法である CTAB（cetyl trimethyl ammonium bromide）法やフェノール-クロロフォルム-イソアミルアルコール（phenol-chloroform-isoamyl alcohol: PCI）法のような液相分離とエタノール沈殿法を併用した方法も用いられている（Deiner and Altermatt 2014 ; Deiner et al. 2015 ; Minamoto et al. 2016）。とくに CTAB 法は、従来、植物片などの組織由来の DNA を抽出するのに用いられることが多かったが、環境 DNA にも適用可能であることが報告されている（Turner et al. 2014b, 2015）。PCI 法もまた、環境 DNA 分析に利用されている（例えば、Minamoto et al. 2016）。しかし、フェノールやクロロフォルムは劇物指定されており、実験後に大量の廃液を処理する必要があることが難点としてあげられる。水試料の保管方法と DNA 抽出法の組合せによっても DNA の検出率が変化するため（Deiner et al. 2015）、今後、更なる検討が必要である。なお、各方法の長所と短所については表 3 にまとめた。

4. 環境 DNA の検出方法

ここでは、これまでの環境 DNA 研究で採用されている DNA 検出方法を 4 つに区分して紹介する（図 2、表 3 参照）。

4. (1) 電気泳動によるPCR増幅産物の判別

環境 DNA 研究の初期から現在まで、通常の PCR 法による DNA の増幅、ゲル電気泳動による増幅産物の確認、そしてシーケンス解析による増幅産物の塩基配列の決定によって、対象種に由来する DNA が環境中に存在していたかどうかを確認する手法が広く用いられている（例えば、Olson et al. 2012 ; Mächler et al. 2014 ; Janosik and Johnston 2015 ; Koizumi et al. 2015）（表 2）。このような、電気泳動を伴う一般的な PCR においても、増幅産物のバンドの濃さや、繰り返しの PCR のうち何度バンドが検出されるかによって、対象種の DNA 濃度を半定量的に推定することも可能である。古典的な PCR は、下記に述べるリアルタイム PCR といった他の方法に比べて安価に実施できる利点がある。しかし、DNA の増幅確認のために電気泳動を行う際に、PCR チューブを開栓して PCR 増幅産物を取り出す必要があるため、他のサンプルや実験器具への汚染をおこしやすい短所がある。そのため、PCR 前後で作業する実験室を分けるなどの対策を講じる必要がある。

4. (2) リアルタイムPCR

近年の環境 DNA 研究では、リアルタイム PCR を用いた手法が主流になっている（例えば、Pilliod et al. 2013 ; Gustavson et al. 2015 ; Spear et al. 2015）（表 2）。従来の PCR に比べて、リアルタイム PCR は DNA の検出感度や特異性、定量性を向上させることができる（Wilcox et al. 2013 ; Díaz-Ferguson et al. 2014 ; Turner et al. 2014b）。簡潔に説明すると、リアルタイム PCR は、種特異的なプライマーにて増幅された DNA 断片との作用によって生じる蛍光色素のシグナルを経時的（リアルタイム）に検出することで、DNA 濃度を測定できる。

蛍光色素を用いるリアルタイム PCR の方法は、主として 2 種類ある。まず、インターカレーション法では、二本鎖 DNA の間に入り込んで（インターカレート）蛍光を発する色素（インターカラーター：SYBR Green I など）を用いる。この方法は低コストで簡便であるが、蛍光物質がすべての二本鎖 DNA に結合するため、非特異的増幅が起こらないプライマーの設計と反応条件の十分な検討が重要になる。一方、ハイブリダイゼーション法では、蛍光物質で標識した、標的配列に特異的に結合するオリゴヌクレオチド（プローブ）を使って目的の DNA を検出する。つまり、特異的なプライマーで増幅した DNA 断片に、特異的なプローブがさらにハイブリダイズした場合にのみ蛍光シグナルが検出されるので、前述のインター

カレーション法よりもさらに特異性が高い測定方法である。TaqMan[®] プローブは、1 つのオリゴヌクレオチドの両端にそれぞれ蛍光するレポーターとクエンチャー（レポーターの蛍光を消光する）を結合させたプローブであり、ハイブリダイゼーション法で最も一般的に用いられている。PCR のアニーリングのステップにおいて標的とする DNA にハイブリダイズした TaqMan[®] プローブが、DNA 伸長反応を行う Taq DNA ポリメラーゼが持つ 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性によって分解されると、レポーターとクエンチャーが乖離し、消光作用が働かなくなつて蛍光が発せられる仕組みである。

リアルタイム PCR は、DNA の増幅後の電気泳動を必要としないため、従来の PCR と比べて簡便であり、また汚染や混入の可能性を低くできる利点がある。また、リアルタイム PCR では、既知濃度の DNA 試料をスタンダードとして未知試料と同時に分析することで、検量線から DNA 濃度を定量することができる。定量精度が高いため、環境 DNA 分析を野外から得た水試料に適用した場合、DNA 定量値から対象生物の生物量や個体数の推定が可能であり（Takahara et al. 2012 ; Thomsen et al. 2012b ; Pilliod et al. 2013 ; Moyer et al. 2014）、その推定精度の向上が期待されている。ただし、種特異的なプライマーを使用するこの方法では、一度の PCR で対象とする 1 種の検出しかできない。野外から得た水試料の中には多種の DNA が混在していることが普通である。複数種を検出したい場合には、各種に特異的なプライマーを作成後、同一試料を個別に分析したり、一つの PCR 反応系において複数のプライマーを同時に使用することで、複数種を同時に増幅・検出するマルチプレックス PCR を行ったりする必要がある。

一方で、リアルタイム PCR を用いた手法においては、その検出感度の高さゆえに、微量の汚染・混入に由来する DNA も検出してしまうおそれがある。そこで実験の前提として、PCR の前処理（水試料の濾過から DNA 抽出・精製まで）を行う実験室とリアルタイム PCR を行う実験室は別々にすることが強く推奨されている。加えて、PCR 反応によって生成した増幅産物が次回以降の PCR 反応液に混入してしまうキャリーオーバーによって誤って陽性と判定してしまうことを防止する手段として、dUTP と Uracil-N-Glycosylase（UNG: 一本鎖あるいは二本鎖 DNA のウラシルとデオキシリボースの結合を分解する酵素）を使用した PCR 系も適用されている（Díaz-Ferguson et al. 2014 ; Moyer et al. 2014）。この系ではまず、PCR 反応時に dUTP を含む基質を用いることで、増幅産物にウ

ラシルを取り込ませる。次の PCR 反応を行う際に、UNG に汚染・混入した増幅産物を分解させる前処理を行うことにより、ウラシルを含まない試料由来の DNA のみが鋳型となるため、PCR 産物のキャリーオーバーを防止できる。なお、リアルタイム PCR を用いた実験デザインについては、5. (1) ~ (3) において詳しく述べる。

最後に少し特殊なリアルタイム PCR 法を紹介しておく。これは、DNA と RNA からなるプローブ（キメラプローブ）と RNA 分解酵素 H（RNase H）を用いた方法（Cycleave[®]PCR、タカラバイオ株式会社）で、環境 DNA 分析への適用例がある（Uchii et al. 2016）。キメラプローブは TaqMan[®] プローブと同様に 2 つの蛍光物質（レポーターとクエンチャー）で標識されている。標的配列に特異的なプライマーにより増幅した DNA 断片にキメラプローブがハイブリダイズすると、RNase H によって、鋳型 DNA と結合しているプローブ中の RNA 部分が分解され、蛍光シグナルが発せられる仕組みである。この方法は、標的配列中の一塩基多型を区別して定量できるため、非常に検出特異性の高い方法として活用が期待される。

4. (3) デジタルPCR

リアルタイム PCR は従来の PCR を上回る検出感度をもつことから、環境 DNA 研究でも広く用いられている。さらに近年では、第 3 世代 PCR と呼ばれるデジタル PCR 法が実用化され、環境 DNA 研究に用いられつつある（表 2）。デジタル PCR 法とは、DNA 試料を数万の極少量の溶液に小分けして分析する手法である。バイオ・ラッド社のデジタル PCR システム QX-100 および QX-200 では、数マイクロリットルの DNA 試料が約 2 万個の 2 ピコリットルの油膜で区切られた粒（ドロップレット）に分けられる。ひとつのドロップレットには通常 0 から数コピーの DNA が含まれる。それらのドロップレット内で、ターゲットとする生物種の DNA が PCR 増幅される。ドロップレット内で DNA が増幅した場合、蛍光プローブが各ドロップレット内で蛍光を発する。フローサイトメーターを用い、ひとつのドロップレットごとに蛍光シグナルの有無を測定することで、各ドロップレット内にターゲット種の DNA が含まれているか (1) 否か (0) を判別し、それらのドロップレットの数によって、DNA の濃度を定量する。このように、0 か 1 で判別するため“デジタル”PCR 法と呼ばれている。たくさんに小分けされたドロップレット内で DNA を個別に増幅させることで、絶対定量ができることから、リアルタイム PCR よりも高精度に DNA 濃度を定量できると考えられている。

これまでに、デジタル PCR の環境 DNA 分析における有用性を検証した研究が数例ある（Nathan et al. 2014 ; Doi et al. 2015a, b）。ひとつは環境 DNA の定量精度についての研究である。この研究では、野外水槽におけるコイの飼育実験により、個体数・生物量と環境 DNA 濃度の関係を解析した。水中の環境 DNA が低濃度である場合、リアルタイム PCR よりもデジタル PCR の方が、高精度に環境 DNA を定量できることが明らかとなった（Doi et al. 2015b）。また、リアルタイム PCR の結果と比較して、デジタル PCR では同一サンプルの反復測定値のばらつきが小さいこともわかった（Doi et al. 2015b）。さらに、ため池から採取した水試料を用いて環境 DNA の検出感度について検証したところ、リアルタイム PCR よりもデジタル PCR で検出感度が高いことが明らかとなった（Doi et al. 2015a）。これは、DNA を小分けされた極少量の溶液中で増幅するデジタル PCR は、リアルタイム PCR に比べ、PCR 阻害物質の影響を受けにくいからだと考えられる。したがって、デジタル PCR は、環境 DNA の定量精度および検出感度において、リアルタイム PCR よりも優れている可能性が高い。しかし、デジタル PCR を用いた研究例は非常に少なく、ランニングコストも高いため、今後の進展に期待したい。

4. (4) メタバーコーディング

次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング手法を用いた環境 DNA 研究も始まっている（Thomsen et al. 2012a, b ; Kelly et al. 2014a ; Miya et al. 2015 ; Evans et al. 2016 ; Valentini et al. 2016）（表 2）。Minamoto et al. (2012) は次世代シーケンサーこそ用いていないが、環境 DNA のメタバーコーディングに関する最初の論文である。この論文では、魚類全般に共通する縮退プライマーを作成して、水試料から複数の魚種を同時に検出できる手法を開発し、実際の河川生物相調査に適用できることを示した。このようなメタバーコーディング手法を用いた解析は、群集レベルの生物多様性を迅速に解明できる可能性をもつ。

メタバーコーディングでは、対象とする分類群が共通してもつ DNA 塩基配列に特異的なユニバーサルプライマーを使い、環境 DNA 試料の中から興味のある種の DNA を（理想的には）全て増幅するため、網羅的な生物情報の解析が可能となる。1 本の DNA 断片から得られる塩基配列情報は 1 リードという単位でカウントされるが、データ解析によって得られた種ごとのリード数から生物量や個体数を推定する試みもなされている。

ただ、使用するシーケンサーの機種にもよるが、一度

に数百万～数億の DNA 断片の塩基配列が決定されるために、得られるデータ量は膨大なものとなり、データベースとの照合による生物種の同定には、高度な専門技能と計算機が必要となる。さらに、環境 DNA 試料に含まれる DNA をユニバーサルプライマーで増幅する際、生物種間で増幅効率が異なると考えられるため、リード数による生物量や個体数の推定は半定量的であるとの認識が一般的である。しかし Miya et al. (2015) は、種レベルの解像度をもつ領域を対象として、増幅にかかるバイアスを軽減させたユニバーサルプライマーを開発することに初めて成功しており、メタバーコーディングによる従来の種組成の解明のみでなく、生物量や個体数の把握の実現が期待される。

5. リアルタイム PCR の実験デザイン

表 2 は、リアルタイム PCR が環境 DNA 研究に関する学術論文 66 報のうち 39 報で使用され、全体の研究のおよそ 6 割を占めていることを示している。従来の PCR に比べて、高い DNA 検出感度と優れた定量性をもつリアルタイム PCR は、環境 DNA 研究の発展には欠かすことができない。そこで、本研究分野において主流となっているリアルタイム PCR について詳細に説明する。

5. (1) プライマーの作成

対象種に特異的なプライマーの開発では、対象種の近縁種や、生息場所における共存種を誤って検出しないものを作成する必要がある。したがって、高い種特異性をもつプライマーセットを使用するのが肝要である。そのために、対象種の特定の DNA 領域のみを増幅するようなプライマーを設計する必要がある。そこで、プライマー設計プログラム [例えば、Primer Express (ライフテクノロジー社)、Primer3Plus (<http://primer3plus.com>)] を用いて対象 DNA 領域を増幅するプライマー候補を多数設計したうえで、調査地に生息している非対象種の DNA とは塩基のミスマッチが多いプライマーを選択することになる。このとき、プライマーの 3' 末端付近に 1 つ以上のミスマッチを含むのが良いとされている (Wright et al. 2014)。

ほとんどの研究では、設計したプライマーセットの特異性を確認するために、近縁種の組織から抽出した DNA をテンプレートとして PCR しても増幅がみられないことや、データベース上の塩基配列情報に対して仮想的に PCR を実行しても非特異的な増幅が起きないことを確認している (*in silico* 解析) (例えば、Jerde et al. 2011 ;

Takahara et al. 2012 ; Laramie et al. 2015)。さらに、対象種とは別の種を入れた水槽の水から環境 DNA を抽出し、DNA の増幅が確かにみられないことを確認するなど、プライマーの特異性について入念に検証している研究例もある (Eichmiller et al. 2014)。

これまでに、4. (2) で述べた TaqMan[®] プローブ法を用いたリアルタイム PCR によって、サケ科の近縁な 2 種 (カワマス *Salvelinus fontinalis* とブルトラウト *Salvelinus confluentus*) の DNA が混在する中から一方 (対象種) の DNA を検出する場合に、その検出感度に対して他方 (非対象種) の DNA 塩基配列とプライマーとのミスマッチの数がどのように影響するかを調べた研究例がある (Wilcox et al. 2013)。結果として、プライマーと非対象種の DNA の塩基配列のミスマッチ数が多いほど、感度良く対象種を検出できることが示されている。

最終的に、PCR によって環境 DNA 試料から増幅された DNA 断片が、対象種の DNA 配列と一致するかどうかをシーケンス解析によって確認することで、対象種に対する環境 DNA 検出技術の確立が成される (例えば、Goldberg et al. 2013 ; Takahara et al. 2013 ; Sigsgaard et al. 2015)。このとき、PCR 産物 (アンプリコン) が短すぎるとダイレクトシーケンスが困難であり、長すぎるとリアルタイム PCR の増幅効率が低下するため、増幅長が 100-150bp 程度となるプライマーを設計するのが一般的である。

5. (2) PCR の実験条件

リアルタイム PCR によって対象とする DNA を増幅させる際に、テンプレート DNA に対して「熱変性—アニーリング—伸長反応」を繰り返すサイクル数は、最少で 35 サイクル (Moyer et al. 2014)、最大で 55 サイクル (例えば、Foote et al. 2012 ; Biggs et al. 2015) が採用されており、多くの場合、50 ～ 55 サイクルに設定されている。例えば、Takahara et al. (2015) では、PCR サイクル数を増加させると、DNA を検出できる確率が増加することが報告した。しかし、リアルタイム PCR のサイクル数は、偽陽性 (対象種が居ないのに居ると判定する間違い) や偽陰性 (対象種が居るのに居ないと判定する間違い) をもたらす確率とも関係があるため (Bustin et al. 2009)、適切に設定しなければならない。

リアルタイム PCR 実験の際に同一の DNA 試料を独立に複数回測定する反復数 (PCR プレート中のウェル数) もまた重要な実験条件の一つであり (Takahara et al. 2015)、その反復数は研究者間で異なる。先にも述べたよ

うに、採取する水試料の量や測定回数を増やせば、DNA の検出率が上昇することは間違いない (Thomsen et al. 2012b ; Takahara et al. 2015)。反復数の増加は DNA の検出率を上昇させ (Takahara et al. 2015)、最少で 2 反復 (Merkes et al. 2014 ; Klymus et al. 2015)、最大で 12 反復が採用されている (Tréguier et al. 2014 ; Biggs et al. 2015)。少ない反復数は偽陰性をもたらす可能性を高める。一方、多すぎる反復数は、偽陽性をもたらす可能性があり、さらに、PCR 試薬や環境 DNA 試料の消費量の増大など、コストが大きくなることから、十分な検討が必要である。

また、PCR 実験の際にも先の 3. (2) で述べたような汚染や混入が生じていないかどうかを確認するために、陰性対照による確認をすることは重要である。

5. (3) DNA増幅の阻害要因

環境 DNA 試料には、PCR を阻害する物質がしばしば含まれており、それは腐葉土などに由来するフミン酸などであると考えられている。PCR 阻害を回避する方法として、リアルタイム PCR に供する DNA 試料を希釈し、阻害物質をその影響が現れない濃度まで薄める方法がある (例えば、McKee et al. 2015 ; Takahara et al. 2015)。しかし、そもそも環境 DNA 試料に含まれる対象種の DNA 濃度は低いことが多いので、サンプルの希釈によって対象種の DNA の検出率も低下してしまうことが懸念される。そこで、PCR 阻害物質の影響を軽減する PCR 試薬 (例えば、Environmental Master Mix 2.0、ライフテクノロジー社) を使用することで、DNA 検出率が十分に改善されることが実証されている (Doi et al. 2015a ; Jane et al. 2015 ; Takahara et al. 2015)。しかし、本 PCR 試薬には、4. (2) に示した UNG (PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性防止策の 1 つとして利用される) が含まれていないので注意が必要である。また、既知濃度の内部標準 DNA を添加することで、PCR の際に阻害が起こっているかどうかを確認する手法も推奨されている (Laramie et al. 2015 ; McKee et al. 2015 ; Sigsgaard et al. 2015 ; Turner et al. 2015)。あるいは、DNA 試料の精製の過程で阻害物質を除去するキット (OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit、Zymo Research 社) の併用や (McKee et al. 2015)、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を微量加えることで阻害を軽減する手法も用いられている (例えば、Barnes et al. 2014 ; Eichmiller et al. 2014 ; Deiner et al. 2015)。これらの手法は、PCR 阻害を軽減できる可能性があるが、各実験段階において作業工程が増えるなどのコストが発生する場合があるので、実験条件などに応じて

適宜使い分けることが望ましいと考えられる。

将来への展望

最近、Roussel et al. (2015) は、環境 DNA 分析を利用した生物モニタリング手法の有用性にいくつかの疑問を呈した。彼らの論文における議論も含め、環境 DNA 分析の問題点を表 1b に示している。Roussel et al. (2015) はとくに、環境 DNA 分析を用いた生物モニタリングの有効性は、生物種間で異なるため、新たな種を対象にした環境 DNA 分析を行う前に、まずは自然に近い環境下における対象種の DNA 検出率について、予備的検証を行う必要があると指摘している。さらに、従来の採捕調査などと同様に、環境 DNA 分析もまた、必ずしも対象種を 100% の確率で検出できるわけではないことも挙げている。それゆえ、環境 DNA 分析が優れていることを実証するためには、それら複数の生物モニタリング手法を用いた調査結果を十分に比較・検討する必要があると結論付けている。これらの課題に加え、本稿で述べたように、水試料の採取から DNA 測定までの、最適な環境 DNA 分析のプロトコルを確立することもまた、喫緊の課題である。

前項で述べたように、環境 DNA 分析やメタバーコーディングには、対象種やその近縁種の DNA 配列情報が充実していることが大前提である。したがって、環境 DNA を用いた手法開発と並行して、種々の生物 DNA 情報のデータベース整備も進めなければならない。そのためには、多数の動植物試料からの地道なデータ (配列情報) の取得がますます重要である。これによって、環境 DNA 分析の適用を望む保全対象種や外来種などの DNA 配列情報も明らかになっていくだろう。今後、環境 DNA 分析の適用可能な生物種が増加し、本モニタリング手法が多くの場合面で活躍することは間違いない。

野外の水試料から得た環境 DNA 試料は、冷凍することで DNA の変性を抑えて、長期間、安定的に保管することが可能である。これらの環境 DNA 試料は、水試料を採取した場所の生物群集情報をリアルタイムで保持していることから、将来的に様々な活用が見出される貴重なサンプルになると考えられる。例えば、過去、現在、将来のサンプルの DNA 情報を比較することで、生物群集がどのように変化しているのかを明らかにすることもできるだろう。外来種がいつ頃侵入したのか、あるいは侵入する可能性が高まっているか、など、生物群集の将来予測にも活用できることが期待される。今後は、国内外において積極的に環境 DNA 試料を収集しておくことが重要で

あると考えられる。環境 DNA 試料の収集と保管に関わる整備を進めることで、環境 DNA 試料のアーカイブ化を実現できる。これは、生物多様性保全に向けた効率的な将来予測を可能にする大規模なプロジェクトに発展する可能性を秘めていると言っても過言ではないだろう。

以上のような環境 DNA 分析に着目した手法は、淡水域の調査のみに留まることなく、すでに海水に生息する生物種でもその有用性が実証されつつある (Foote et al. 2012 ; Thomsen et al. 2012a ; Kelly et al. 2014a ; Miya et al. 2015)。今後、本稿で述べた課題が 1 つ 1 つ解決されていくことによって、環境 DNA 分析が学術研究の発展のみならず、行政における環境保全に関する施策の立案や、一般社会におけるボランティアも含めた環境調査までの幅広い分野でますます利用されるようになることを期待する。

謝 辞

本論文の一部は、環境省の環境研究総合推進費 (4RF - 1302) の成果を元にして執筆された。

引用文献

- Barnes MA, Turner CR (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17:1-17
- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM (2014) Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 48:1819-1827
- Biggs J, Ewald N, Valentini A, Gaboriaud C, Dejean T, Griffiths RA, Foster J, Wilkinson JW, Arnell A, Brotherton P, Williams P, Dunn F (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183:19-28
- Bohmann K, Evans A, Gilbert MT, Carvalho GR, Creer S, Knapp M, Yu DW, de Bruyn M (2014) Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29:358-367
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55:611-622
- Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111:978-988
- Davy CM, Kidd AG, Wilson CC (2015) Development and validation of environmental DNA (eDNA) markers for detection of freshwater turtles. *PLOS ONE*, 10:e0130965
- Deiner K, Altermatt F (2014) Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLOS ONE*, 9:e88786
- Deiner K, Walser J-C, Mächler E, Altermatt F (2015) Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183:53-63
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, Pellier-Cuit S, Pompanon F, Taberlet P, Miaud C (2011) Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6:e23398
- Dejean T, Valentini A, Miquel C, Taberlet P, Bellemain E, Miaud C (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49:953-959
- Díaz-Ferguson E, Herod J, Galvez J, Moyer G (2014) Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Management of Biological Invasions*, 5:121-131
- Doi H, Takahara T, Minamoto T, Matsuhashi S, Uchii K, Yamanaka H (2015a) Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environmental Science & Technology*, 49:5601-5608
- Doi H, Uchii K, Takahara T, Matsuhashi S, Yamanaka H, Minamoto T (2015b) Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *PLOS ONE*, 10:e0122763
- Egan SP, Barnes MA, Hwang C-T, Mahon AR, Feder JL, Ruggiero ST, Tanner CE, Lodge DM (2013) Rapid invasive species detection by combining environmental DNA with light transmission spectroscopy. *Conservation Letters*, 6:402-409
- Egan SP, Grey E, Olds B, Feder JL, Ruggiero ST, Tanner CE, Lodge DM (2015) Rapid molecular detection of invasive species in ballast and harbor water by integrating environmental DNA and light transmission spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 49:4113-4121
- Eichmiller JJ, Bajer PG, Sorensen PW (2014) The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLOS ONE*, 9:e112611
- Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW (2016) Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 16: 56-68
- Evans NT, Olds BP, Renshaw MA, Turner CR, Li Y, Jerde CL, Mahon AR, Pfrender ME, Lamberti GA, Lodge DM (2016) Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16: 29-41
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species

- detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4:423-425
- Foot AD, Thomsen PF, Sveegaard S, Wahlberg M, Kielgast J, Kyhn LA, Salling AB, Galatius A, Orlando L, Gilbert MTP (2012) Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE*, 7:e41781
- Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T (2015) A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*, 52:358-365
- Goldberg CS, Pilliod DS, Arkle RS, Waits LP (2011) Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS ONE*, 6:e22746
- Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, Baumgardt J, Waits LP (2013) Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32:792-800
- Gustavson MS, Collins PC, Finarelli JA, Egan D, Conchúir RÓ, Wightman GD, King JJ, Gauthier DT, Whelan K, Carlsson JE, Carlsson J (2015) An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology*, 87:1254-1262
- 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
- Hunter ME, Oyler-McCance SJ, Dorazio RM, Fike JA, Smith BJ, Hunter CT, Reed RN, Hart KM (2015) Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive burmese pythons. *PLOS ONE*, 10:e0121655
- Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Schwartz MK, Lowe WH, Letcher BH, Whiteley AR (2015) Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15:216-227
- Janosik AM, Johnston CE (2015) Environmental DNA as an effective tool for detection of imperiled fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 98:1889-1893
- Jerde CL, Chadderton WL, Mahon AR, Renshaw MA, Corush J, Budny ML, Mysorekar S, Lodge DM (2013) Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70:522-526
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4:150-157
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB (2014a) Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLOS ONE*, 9:e86175
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Martone RG, Lowell N, Thomsen PF, Mach ME, Bennett M, Prahler E, Caldwell MR (2014b) Harnessing DNA to improve environmental management. *Science*, 344:1455-1456
- Keskin E (2014) Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56:68-74
- Klymus KE, Richter CA, Chapman DC, Paukert C (2015) Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, 183:77-84
- Koizumi N, Takahara T, Minamoto T, Doi H, Mori A, Watabe K, Takemura T (2015) Preliminary experiment for detection method of fish inhabiting agricultural drainage canals using environmental DNA. *農業農村工学会論文集*, 83:IV_7-IV_8
- Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS (2015) Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*, 183:29-37
- Lawson Handley L (2015) How will the 'molecular revolution' contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society*, 115:750-766
- Liang Z, Keeley A (2013) Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental Science & Technology*, 47:9324-9331
- Longmire JL, Maltbie M, Baker RJ (1997) Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. *Museum of Texas Tech University*, 163:1-3
- Mächler E, Deiner K, Steinmann P, Altermatt F (2014) Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshwater Science*, 33:1174-1183
- Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T (2014) The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLOS ONE*, 9:e114639
- McKee AM, Spear SF, Pierson TW (2015) The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*, 183:70-76
- 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
- Minamoto T, Naka T, Moji K, Maruyama A (2016) Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17: 23-32
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13:193-197
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes:

- detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2:150088
- Moyer GR, Díaz-Ferguson E, Hill JE, Shea C (2014) Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. PLOS ONE, 9:e103767
- Nathan LM, Simmons M, Wegleitner BJ, Jerde CL, Mahon AR (2014) Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. Environmental Science & Technology, 48:12800-12806
- Nathan LR, Jerde CL, Budny ML, Mahon AR (2015) The use of environmental DNA in invasive species surveillance of the Great Lakes commercial bait trade. Conservation Biology, 29:430-439
- Olson ZH, Briggler JT, Williams RN (2012) An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. Wildlife Research, 39:629-636
- Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Der Sarkissian C, Haile J, Hellstrom M, Spens J, Thomsen PF, Bohmann K, Cappellini E (2015) Ancient and modern environmental DNA. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 370:20130383
- Piaggio AJ, Engeman R, Hopken MW (2014) Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. Molecular Ecology Resources, 14:374-380
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP (2014) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. Molecular Ecology Resources, 14:109-116
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP, Richardson J (2013) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 70:1123-1130
- Rees HC, Bishop K, Middleditch DJ, Patmore JR, Maddison BC, Gough KC (2014a) The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. Ecology and Evolution, 4:4023-4032
- Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, Patmore JRM, Gough KC, Crispo E (2014b) The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. Journal of Applied Ecology, 51:1450-1459
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, McVeigh MM, Lodge DM (2015) The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. Molecular Ecology Resources, 15:168-176
- Roussel J-M, Paillisson J-M, Tréguier A, Petit E, Cadotte M (2015) The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. Journal of Applied Ecology, 52:823-826
- Santas AJ, Persaud T, Wolfe BA, Bauman JM (2013) Noninvasive method for a statewide survey of eastern hellbenders *Cryptobranchus alleganiensis* using environmental DNA. International Journal of Zoology, 2013:1-6
- Scriver M, Marinich A, Wilson C, Freeland J (2015) Development of species-specific environmental DNA (eDNA) markers for invasive aquatic plants. Aquatic Botany, 122:27-31
- Sigsgaard EE, Carl H, Møller PR, Thomsen PF (2015) Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. Biological Conservation, 183:46-52
- Spear SF, Groves JD, Williams LA, Waits LP (2015) Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. Biological Conservation, 183:38-45
- Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS (2015) Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. Biological Conservation, 183:85-92
- 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
- Takahara T, Minamoto T, Doi H (2015) Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). Biological Conservation, 183:64-69
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. PLoS ONE, 7:e35868
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012a) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE, 7:e41732
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MT, Orlando L, Willerslev E (2012b) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 21:2565-2573
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation, 183:4-18
- Tréguier A, Paillisson JM, Dejean T, Valentini A, Schlaepfer MA, Roussel JM (2014) Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. Journal of Applied Ecology, 51:871-879
- Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM, Gilbert M (2014a) Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. Methods in Ecology and Evolution, 5:676-684
- Turner CR, Miller DJ, Coyne KJ, Corush J (2014b) Improved Methods for Capture, Extraction, and Quantitative Assay of Environmental DNA from Asian Bigheaded Carp (*Hypophthalmichthys* spp.). PLOS ONE, 9:e114329
- Turner CR, Uy KL, Everhart RC (2015) Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface

- water. Biological Conservation, 183:93-102
- Uchii K, Doi H, Minamoto T (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. Molecular Ecology Resources, 16: 415-422
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. Molecular Ecology, 25:929-942
- Wegleitner BJ, Jerde CL, Tucker A, Chadderton WL, Mahon AR (2015) Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. Conservation Genetics Resources, 7: 789-791
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Jane SF, Lowe WH, Whiteley AR, Schwartz MK (2013) Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. PLOS ONE, 8:e59520
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Lowe WH, Schwartz MK (2015) Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). Conservation Genetics Resources, 7:639-641
- Wright ES, Yilmaz LS, Ram S, Gasser JM, Harrington GW, Noguera DR (2014) Exploiting extension bias in polymerase chain reaction to improve primer specificity in ensembles of nearly identical DNA templates. Environmental Microbiology, 16:1354-1365
- 山中 裕樹, 源 利文, 高原 輝彦, 内井 喜美子, 土居 秀幸 (2016) 環境DNA分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, 66:601-611

