



環境DNA分析の野外調査への展開（特集1 環境DNA分析を利用した水中生物のモニタリング）

山中，裕樹
源，利文
高原，輝彦
内井，喜美子
土居，秀幸

(Citation)

日本生態学会誌, 66(3):601-611

(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/20.500.14094/90003987>





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 分析の野外調査への展開

山中 裕樹¹・源 利文²・高原 輝彦³・内井 喜美子⁴・土居 秀幸⁵

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

⁴ 大阪大谷大学薬学部・⁵ 兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科

Environmental DNA analysis in field research

Hiroki Yamanaka¹, Toshifumi Minamoto², Teruhiko Takahara³, Kimiko Uchii⁴ and Hideyuki Doi⁵

¹ Faculty of Science and Technology, Ryukoku University

² Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

³ Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University

⁴ Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University

⁵ Graduate School of Simulation Studies, University of Hyogo

要旨：大型水棲動物を対象とした環境 DNA 分析は、野外調査時には水を汲むだけで済むという簡便性から、広域のかつ長期的な生態学的調査や生物相調査への適用が期待されている。環境 DNA 分析は種の分布や生物量、そして種組成の解析にまで利用され始めているが、大型水棲動物を対象とした研究が行われるようになってからまだ日が浅く、野外調査などへの適用に当たっては当然知っておくべき基礎情報の中にも、環境 DNA の水中での分解や拡散の過程など、未だ明らかとなっていないブラックボックスが残されているのが現状である。本稿ではこれまでの多くの野外適用例をレビューして、環境 DNA 分析の野外調査への適用の場面で想定される様々な疑問や課題について解説し、今後の展望を述べる。環境 DNA 分析から得られる結果は採捕や目視といった既存の調査で得られた知見との比較検討の上で適切に解釈する必要がある、この新たな手法が今後各方面からの評価と改善を繰り返して、一般的な調査手法として大きく発展することを期待したい。

キーワード：大型水棲動物、偽陽性、偽陰性、コスト、PCR

環境 DNA 分析の生態学研究への適用

環境 DNA は土壌や水に含まれるデオキシリボ核酸 (DNA) の総称であり、この環境 DNA を分析して種の存在や生物量を推定して生態学的な調査に利用する例が急激に増えて注目されている。これは Ficetola et al. (2008) がヨーロッパで侵略的外来種として問題となっているウシガエル (*Rana catesbeiana*) を環境 DNA 分析によって検出したとの報告をしたことで、環境水中には大型脊椎動物由来の DNA も分析可能な量が含まれているということが広く知られるようになったことが引き金になったと思われる。この先駆的な研究が発表されて以降、調査地

で水を汲むだけという簡便な調査 (図 1) として、2011 年頃から水棲の大型脊椎動物ならびに無脊椎動物を始めとして、水草 (Fujiwara et al. 2016) や、さらには陸棲の哺乳類 (Andersen et al. 2012) の検出など多くの研究例が報告されるようになった。本総説では環境 DNA 分析を用いた野外調査の実施方法について解説した上で、先行研究の中でも、特に水棲の大型動物を対象とした野外研究例を紹介する。最後に、環境 DNA 分析が生態学的な調査にどのように貢献できるのかについて、問題点を指摘しつつ、その可能性を示す。総説をまとめるに当たっては環境 DNA 分析を読者が興味を持つ分類群や生息場所に適用する際に参照できるよう、できる限り多くの研究例を網羅し、大型水棲動物を対象とした環境 DNA 分析手法の手引き書的な役割を果たせるものになることを目指した。

2015 年 11 月 29 日受付、2016 年 3 月 14 日受理

¹e-mail: yamanaka@rins.ryukoku.ac.jp

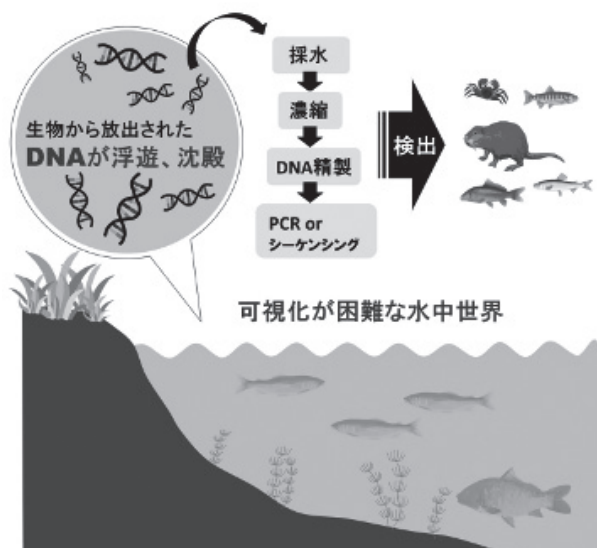


図1. 環境DNA分析による大型水棲生物の検出イメージ。調査地で採水した水試料からDNAを濃縮、精製した後、各種の分子生物学的な分析を経て生息する種を同定する。特別な採捕技術や高度な分類学的知識を必要とせず、近年生物モニタリングへの応用が急速に進みつつある。(作画：龍谷大学 辻 研月)

既存の野外研究にみられる生息場所と対象分類群

環境DNA分析は2008年に報告されたFicetola et al. (2008)の研究以降、様々な分類群と野外水域への適用が進んでいる。多くの研究は淡水域での例であるが、河川、湿地、池、湖まで多くの水域を含んでいる。海への適用例は未だ数例にとどまっているものの、今後増加すると考えられる。

環境DNA分析によって野外の水域から検出された分類群も多岐にわたる。現在までに、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類、貝類、甲殻類、水生昆虫が検出されており、今後も海域などへの適用例が増加すれば更に分類群と種数が増加すると思われる。これらの個別の研究例は本特集の高原ほか(2016)に詳しいので参照いただきたい。

野外調査の実施方法

水域における環境DNA分析は、現場での採水から始まる。野外での採水とそれに続くDNAの捕集方法は、調査対象地の環境特性に応じて決める必要があると考えられる(Rees et al. 2014a)。

採水量は研究例の間で大きく差があり、1試料あたり

15 mL(例えばFicetola et al. 2008; Foote et al. 2012; Thomsen et al. 2012a)から数リットル(例えばMinamoto et al. 2012; Takahara et al. 2012; Thomsen et al. 2012b; Mahon et al. 2013; 福岡ほか2016)、多いものでは10 Lとなっている(Goldberg et al. 2011)。15 mLといった少量の水試料の場合はエタノール沈殿に代表される塩析でのDNA回収が採用され、より大きい体積の水試料の場合は濾過により各種フィルター上に捕集した残渣からのDNA抽出、精製が行われる。これらの例の中には河川、沼、湖、海など、様々な調査地が含まれているが、多くの例では1~2 Lの採水量を採用している(Rees et al. 2014a)。調査対象となる水塊から平均的な環境DNA試料を得るためと検出率を向上させるために、多くの研究例では3か所からの採水を行っている(例えばFicetola et al. 2008; Dejean et al. 2012; Thomsen et al. 2012a; Goldberg et al. 2013; Rees et al. 2014b; Wilson et al. 2014; Laramie et al. 2015)。アメリカザリガニの例では更に検出率を上げる目的で、1つの池の周囲20地点で採水したのちに混ぜ合わせ、そこから15 mLの試料水を繰り返し数6で採取するという方法がとられている(Tréguier et al. 2014)。フロリダの湿地でビルマニシキヘビ(*Python bivittatus*)を検出した例でも、ライントランセクトに沿って複数個所で採取した水試料を混合し、そこから15 mLの試料水を繰り返し数3で採取するという手法が採用されている(Piaggio et al. 2014)。また、イギリスの池でイモリの1種(*Triturus cristatus*)を対象とした検出でも類似の手法がとられている(Biggs et al. 2015)。オハイオ州の河川でサンショウウオの1種(*Cryptobranchus alleganiensis*)を検出した例では、過去に生息が確認されている地点でPCR陽性となる反応を得るには1 Lの試料水では不十分であり、2 Lを濾過して得た試料であれば信頼できる結果が得られたと報告されている(Santas et al. 2013)。同種を河川で検出した別の例では、個体が低密度に生息している場合には分析するフィルターを増やすことで偽陰性となる危険性を減らすことができると述べている(Olson et al. 2012)。大型水槽を用いた実験例では、シクリッド科魚類の1種(*Hemichromis letourneuxi*)を様々な個体密度で飼育し、水槽水1 Lを濾過したフィルターからDNAを抽出してリアルタイムPCRで検出を行い、その検出率と分析に供したフィルター試料の枚数の関係を解析している。いずれの密度の条件においても、分析するフィルターを増やすほど検出率は上昇した(Moyer et al. 2014)。これらの例から明らかなことは採水量や繰り返し数を増やすほどに検出率は上昇するということである。ただし、環境水中から

DNA を回収、抽出すると、PCR 反応を阻害する物質（フミン酸やフルボ酸など）も同時に高濃度に濃縮される場合があるため、濾過量を増やすことが必ずしも環境 DNA 分析による種の検出率を向上させるわけではないことに注意する必要がある（McKee et al. 2015；Takahara et al. 2015）。なお、DNA の捕集方法と DNA の抽出方法については、高原ほか（2016）や Rees et al.（2014a）、Deiner et al.（2015）に詳しいので、調査地の環境等の情報とともに採水、抽出方法を検討したい読者は参照されたい。

次に現場での採水とそれに続く濾過の方法について、実務的な側面の解説を行う。もっとも重要なのは採水から DNA 抽出までのステップで環境 DNA 試料を汚染（コンタミネーション）しないことである。ほとんどすべての研究では試料水や DNA 試料と接触する容器類や調査器具を、次亜塩素酸ナトリウムを含む溶液（多くの場合ブリーチ）で処理し、意図せぬ外来の DNA 断片が紛れ込むことを防ぐ工夫がなされている。また、できる限り、調査・分析の器具は使い捨て可能な物品を使用するのが好ましい。研究グループによっては複数水域を船やカヤックで調査する場合、船体自身もブリーチ処理をしている（Jerde et al. 2011）。我々のチームでも、採水に使用するタンク、濾過器具、フィルターに触れるピンセットを毎回ブリーチ処理している。DNA 抽出まで進めば、以降は通常の分子生物学的な実験で使うようなプラスチック製の使い捨て容器やチップを使った、汚染を防ぐ手順が比較的確立されたステップへ移行できる。

1 日のうちに多地点で採水を行う場合、濾過器具のブリーチ処理が最も煩雑な作業となり、これによって処理作業が律速される。濾過器具は水を貯めるファンネル部分と支えとなる下部のパーツとの間にフィルターを挟んで使う形式のものが一般的であるが、この部分を丸ごと使い捨てできる製品を使用している研究例もあり、このような製品の使用は汚染の可能性とブリーチ処理の手間を省くのに有益であろう（Goldberg et al. 2011；Pilliod et al. 2014）。我々のチームではランニングコスト削減の観点から、濾過の際にはマグネチックフィルターファンネル（Pall Life Sciences, MI, USA）を繰り返し使用している。この濾過器具は洗浄をしやすい形状で、かつ、マグネットでフィルターを挟み込むことでフィルターを簡単に固定できるため、ねじ式で固定する濾過器具よりも取り扱いが容易で試料水の漏れが少ない。これを 3 連結のマニホールドに取り付けてアスピレーターで吸引し、3 試料ずつ同時に濾過を行っている（図 2）。濾過が終わるごとに濾過器具とピンセットをブリーチ処理して大量の水道



図 2. マグネチックフィルターファンネルを使用した試料水の濾過の様子。3 連のマニホールドを使用して同時に 3 つの試料を処理している。フィルターファンネル、ピンセットは試料を替えるごとにブリーチ処理を施す。

水で塩素を洗い流した後、超純水でリンスし、再使用している。

試料水中の環境 DNA 濃度は時間経過とともに急速に低下することが確認されており（Dejean et al. 2011；Thomsen et al. 2012a, 2012b；Barnes et al. 2014；Maruyama et al. 2014；Piaggio et al. 2014；Pilliod et al. 2014）、採水後できる限り速やかに濾過するか、低温で保存することが分析可能な濃度の環境 DNA をより長く保持することに繋がる（Strickler et al. 2015；高原ほか 2016）。なお、15 mL などの少量の採水の場合は酢酸ナトリウムとエタノールの添加によって保存することができるが、より大きな量の採水の場合はこの手法の適用は困難である。我々のチームでは、採水後数時間以内にはすべての水試料を濾過し、フィルターを冷凍保存することになっている。調査を遠隔地で行う場合は積極的に現場での濾過を実施しており、この場合は調査車両に発電機、アスピレーターを含めた器材一式と、濾過器具のブリーチ処理に必要な物品の一切を積み込んでいく（図 3）。濾過したフィルターは車のシガーソケットからの電源で駆動する冷凍庫（MR040F-GL；澤藤電機株式会社、太田市、群馬県）で冷凍保存している。

直接目に見える個体を捕獲するのとは異なり、環境 DNA による生物の調査では目には見えない DNA 分子を「捕集」「検出」するため、試料の汚染には細心の注意を払わねばならない。不意の汚染が起こっていないかを確認するために、環境 DNA 分析による調査では採水、濾過、



図3. 調査地での現場濾過の様子。調査車両には試料水運搬用のクーラー、発電機を含む濾過器材、洗浄用の水道水や超純水を含むブリーチ器材、フィルター試料を保存するための冷凍庫まですべてを積み込んで調査に向かう。

その後の分子生物学的な各実験ステップで適切に陰性対照（ネガティブコントロール）を設定して調査・分析の質を保証する必要がある。調査時の試料の運搬中に起こる汚染はクーラーブランクと呼ばれる陰性対照で確認されている（Jerde et al. 2011；Olson et al. 2012；Jerde et al. 2013）。これはDNAが含まれていない超純水等を採水タンクへ注ぎ入れ、調査での移動中、他の試料水が入ったタンクと共に運搬するというものである。濾過のステップでの汚染は試料水と同様の方法で同じ器材を用いてDNAを含まない超純水等を濾過し、これを陰性対照として濾過器材からの汚染の有無を確認する（例えば Jerde et al. 2011；Goldberg et al. 2013；Fukumoto et al. 2015）。これらのような陰性対照の詳細については高原ほか（2016）に詳しい。

以上のように、野外調査では試料の汚染に細心の注意を払いつつ、採取した試料中のDNAが分解されない状態にまで手早く処理してしまうことが重要である。1つの試料水の体積や繰り返し数などは個別のケースごとに検討する必要があるため、過去の先行研究を参照して予備調査を行ったうえで最良の採水計画を決定するべきである。

環境DNA分析による野外研究例

環境DNA分析による種の検出にはいくつかの方法があり、種特異的なプライマーを使ったPCRで対象種のDNAが試料水中に含まれているかを確認する方法と、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使って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解読して種同定する、いわゆるメタバーコーディング手法に大別される（これら分析手法の詳細については高原ほか（2016）を参照）。これらの方法を駆使してこれまで様々な研究が行われているが、ここでは環境DNA分析の利用目的ごとに例を示したい。

まず、環境DNA分析の種の生息確認への利用である。これはPCRと電気泳動の組み合わせ、もしくはリアルタイムPCRによる増幅の有無の確認によって実施されている。先駆的な研究例である Ficetola et al.（2008）ではフランスの池で外来種であるウシガエルの検出を行い、既存の調査から高密度もしくは低密度でウシガエルが生息していると確認されている池から得たDNA試料ではすべてのPCRが陽性であった一方、ウシガエルが確認されていない池から得たDNA試料では全てPCRが陰性であったという整合的な結果が得られた。同じくフランスの北西部の自然公園内で外来種であるアメリカザリガニ（*Procambarus clarkii*）のDNAを検出した例では、158面の対象池のうち57面でPCRが陽性で、同時に行ったカゴ網による調査では51面というほぼ同数の池で生息が確認された（Tréguier et al. 2014）。しかし、実際に捕獲された池で必ずPCRの陽性反応が得られたわけではなく、環境DNA分析と捕獲調査とで共通して生息していると判断された池は30面のみであった。広島県の瀬戸内海沿岸部と島嶼に位置する70面の池で外来種であるブルーギル（*Lepomis macrochirus*）を対象として分布の調査を行った例では、目視調査によって生息が確認された8面全てに加え、目視でブルーギルが確認されなかった11面でもPCRが陽性となったことが報告されている（Takahara et al. 2013）。希少種を対象とした例としては兵庫県の溜池群を対象にカワバタモロコを検出した福岡ほか（2016）があり、この研究でもリアルタイムPCRを用いている。京都府の桂川水系で在来及び外来のサンショウウオを対象として実施された研究では、在来のオオサンショウウオ（*Andrias japonicus*）と外来のチュウゴクオオサンショウウオ（*Andrias davidianus*）に対して個別に設計したプライマーとプローブを用いることで、両種を識別して環境水中から検出することに成功している（Fukumoto et al. 2015）。こうした種の「在・不在」の判定を行って分布を推定しようとする例が、現在のところ最も多い環境DNA分析の利用方法である。

次に、リアルタイムPCRによって測定したDNA濃度

に基づいて、対象生物の生物量や個体数を推定しようとする試みについて研究例を紹介する。水槽と実験池でコイ (*Cyprinus carpio*) を飼育し、生物量を変化させて環境 DNA 濃度との関係を解析した例では、両者の間に有意な相関が確認され、環境 DNA の定量による生物量推定の可能性が示された (Takahara et al. 2012)。さらに、DNA 濃度と個体数との関係について解析した研究例があり、ヨーロッパに生息するカエルの 1 種 (*Pelobates fuscus*) とイモリの 1 種 (*Triturus cristatus*) について、既存の手法で推定した個体数が多い池で、より環境 DNA 濃度が高かったと報告されている (Thomsen et al. 2012a)。また、流水環境においても同様の例がみられ、カエルの 1 種 (*Ascaphus montanus*) とサンショウウオの 1 種 (*Dicamptodon aterrimus*) について、採水地点から上流の区間で捕獲調査によって推定された個体密度および生物量と環境 DNA の濃度が相関していることが確認されている (Pilliod et al. 2013)。一方で、サンショウウオの 1 種 (*Cryptobranchus alleganiensis*) での研究例のように、環境 DNA 濃度が生物量や個体数と相関していなかったとする報告もある (Spear et al. 2015)。こうした例に加え、複数回のリアルタイム PCR で得られた陽性反応の割合 (検出率) と生物量や個体数との関係を解析している例もみられる。本論文が注目している野外環境下の例ではないが、Díaz-Ferguson et al. (2014) はシクリッド科魚類の 1 種 (*Hemichromis letourneuxi*) の水槽内での個体密度と環境 DNA の検出率との間に有意な相関を見出している。野外では、Goldberg et al. (2011) によるカエルの 1 種 (*Ascaphus montanus*) および Olson et al. (2012) によるサンショウウオの 1 種 (*Cryptobranchus alleganiensis*) の例では、個体密度と環境 DNA 検出率との間に有意な相関は確認されなかった。非常に希薄な濃度の DNA を定量せねばならない環境 DNA 分析の場合、アメリカザリガニの例のように測定した試料すべてでリアルタイム PCR の定量限界を下回ってしまう場合も有り得る (Tréguier et al. 2014)。こうした特性を持つ環境 DNA 分析では、検出率を指標として相対的な生物量を推し量するようなアプローチは有用かもしれない。さらに違ったアプローチとして、より検出限界が低く、低濃度の DNA 試料でも定量できるデジタルドロップレット PCR (ddPCR) を生物量の推定に利用する技術も報告されている (Doi et al. 2015; 高原ほか 2016 に詳しい)。

最後にユニバーサルプライマーと次世代シーケンサーを用いた環境 DNA 分析によって種組成を明らかにしている研究例を紹介する。デンマークの海から得た水試料に

対して魚類一般の DNA を増幅するユニバーサルプライマー 2 組を用いて PCR を行い、次世代シーケンサーで塩基配列を決定した例では、10 種の魚類を検出し、かつ、偶発的に増幅された、4 種の鳥類に一致する塩基配列も確認された (Thomsen et al. 2012b)。これらの種の中には当該水域には定住しておらず、時折出現する魚類 1 種と鳥類 1 種も含まれていた。ただし、この水域に生息していることがわかっている魚類 5 種が検出できず、それぞれの種特異的プライマーを用いた DNA の増幅と個別のシーケンシングによって検出している。同じく Thomsen et al. (2012a) は同様のプライマーを使用してヨーロッパ各地の河川、池、湖を含む淡水域から得た環境 DNA 試料を解析し、複数種の魚類と両生類、そして水辺に生息している鳥類数種と哺乳類も検出している。これら 2 つの次世代シーケンサーを用いた研究結果は、水の中に DNA が放出される限りは、分類群に関わらず環境 DNA 分析によって検出できる可能性を示している。人工的な環境下で実施された研究であるが重要な例として、モントラレーベ水族館の水槽から採取した環境 DNA を分析した報告がある (Kelly et al. 2014)。ミトコンドリア DNA の 12S リボソーム RNA をコードする遺伝子領域を対象として設計したユニバーサルプライマーを用いて環境 DNA 試料を増幅し、水槽内で飼育されていた 5 科の魚類のうち 4 科を検出したうえで、これら 4 科の魚類の相対生物量と次世代シーケンサーによるリード数の相対割合との間に有意な順位相関を見出している。日本の研究チームは、同じく 12S リボソーム RNA の別の領域に設計したユニバーサルプライマー (MiFish プライマー) を開発した (Miya et al. 2015)。沖縄県の美ら海水族館で行なった検証実験では、100 種を超える魚類が飼育されている水槽でも 9 割以上の種を次世代シーケンサーによる分析で検出できたと報告している (Miya et al. 2015)。MiFish プライマーは非常に種の識別効率が高い領域に設計されており、野外環境水からも多くの種を検出・同定できることが確認されている。ただ、これら次世代シーケンサーによる分析においては、出力された種ごとのリード数から生物量の推定を行う場合、リアルタイム PCR で測定した DNA 濃度による推定の場合と同じように水中での環境 DNA の希釈、減耗の効果を補正する必要があるだけでなく、ユニバーサルプライマーによる DNA の増幅効率が生物種間で異なる可能性についても考慮していく必要がある。こうした補正の手法については、今後実用的なモデルが提案されることが望まれる。

既存の手法とコストの比較

環境 DNA 分析による種の検出や種組成の推定は、手網やカゴ網、電気ショッカーによる直接の採捕と形態的な特徴に基づいた分類の組み合わせによる従来の推定方法と比べてコスト面で優位性があるのだろうか。

Jerde et al. (2011) では大掛かりな外来種駆除プログラムの対象となっている北米・五大湖周辺のコクレン (*Hypophthalmichthys nobilis*) およびハクレン (*H. molitrix*) について、従来から行われている電気ショッカーによる検出 (視認もしくは捕獲) と環境 DNA による検出 (少なくとも 1 回の PCR 陽性反応) とを単位努力量 (人日) 当たりの検出率として比較を行っている。結果として、環境 DNA 分析の方が検出力が高く、必要な努力量も小さいと評価している。また、電気ショッカーでは検出できなかった地点からも環境 DNA 分析では検出でき、後のロテノン (殺魚剤の 1 種) を使用した捕獲調査で実際の生息が確認できたと述べている。

Sigsgaard et al. (2015) はデンマークで絶滅の危機に瀕しているドジョウの 1 種 (*Misgurnus fossilis*) の分布調査について、博士課程の学生を雇用した場合を想定して網や電気ショッカーによる直接採捕による検出と環境 DNA による検出にかかるコストをそれぞれ算出した。調査地での試料採取と分析にかかる努力量 (人時) は環境 DNA 分析による検出の方が少なく済み、PCR に使用する試薬等の消耗品を考慮に入れた全体での費用も環境 DNA 分析の方が安くなったと報告されている。更に、環境 DNA 分析によってのみドジョウが検出された地点が複数個所あり、後に実際に個体が採捕されたとしている。

最後は環境 DNA 分析の話題ではないが、底生無脊椎動物、魚類、藻類について北米で実施されている各種生物相調査プログラムにかかるコストを形態分類での同定、個体ごとのサンガーシーケンスによる同定、そして次世代シーケンサーで一度に同定するという 3 種の同定方法別に算出している例である (Stein et al. 2014)。形態分類と個体ごとのシーケンスには採取した試料のソーティングと個別の保管が必要になるが、次世代シーケンサーでは個体を分けずにまとめて DNA 抽出して解析できるという、努力量上の差があった。結果として、個体ごとのサンガーシーケンスでは形態分類よりも 1.7 倍から 3.4 倍ほどの費用がかかると推定している。一方で、次世代シーケンサーによる分析は形態分類の費用と大差のない費用で済むと推定している。ただし、この例では環境 DNA 試料からの分析を想定していないため、野外調査にかかる

費用は 3 種の方法間で差がないという前提となっている。環境 DNA 分析の場合は現地での作業がほとんどの場合は採水のみで、1 地点あたりにかかる作業時間も極端に短くて済むこと、そして塩基配列決定にかかる分析コスト自体が着実に低下してきていることを考慮すれば、環境 DNA を用いた次世代シーケンサーによる同定手法は生物相調査法として一般的な選択肢の一つになるだろう (Thomsen and Willerslev 2015)。

分析結果の信頼性に関わる諸問題

環境 DNA 分析による調査は、一見すると既存の生物調査に比べて調査努力量が小さくしかも低コストで実施でき、すでに実用的な技術として確立されているように思われる。しかし、環境 DNA 分析が大型水棲生物を対象として生態学的な研究に頻繁に利用されるようになってからまだ日が浅く、野外適用に向けて知っておくべき基礎的情報の中にもブラックボックスが多く残されているのが実情である。ここでは分析結果の信頼性に関わる疑問点や問題点について議論する。

まず基本的な疑問として、個体を直接採捕せずに得た結果であるために、本当にそこにその種がいたのか、という漠然とした不安がある。ここには 2 つの不安要因が含まれている。1 つ目は種特異的なプライマーを使用したものの、誤って他種の DNA が増幅し偽陽性となったというような、分析における過誤である。2 つ目は採水した地点近傍にその種の個体がいたのではなく、他の地点から拡散してきた DNA 断片を拾って検出してしまったのではないかという調査地の環境条件に依存しておこる過誤である。

1 つ目の非特異的な誤った増幅については、分子生物学的な実験ステップで生じるものであり、まずはしっかりと高い種特異性が担保されたプライマーセットを使用するのが重要である。プライマー設計の注意点や種特異性の確認の仕方等については高原ほか (2016) で詳しく議論されているので参照されたい。2 つ目の偽陽性については流水域で特に問題となる。ケージに入れたカワマス河川内に設置して放出された環境 DNA の流下に伴う希釈を測定した実験では、流速が遅い場合は下流に向かって DNA 濃度が低下する一方で、流速が早い場合は下流側でも上流側と変わらぬ濃度であった (Jane et al. 2015)。また、ハリナガミジンコ (*Daphnia longispina*) とイシガイの 1 種 (*Unio tumidus*) が生息するダム湖から下流に向けて両種の環境 DNA の検出を続けたところ、10

km 程度離れていても検出できたと報告している例もある (Deiner and Altermatt 2014)。これらの例が示すのは、検出対象種の個体を実際にいる場所から相当に離れても DNA を検出する場合があるということで、その空間的な範囲は対象とする種や、調査地ごとの水理特性などに強く影響されるだろうということである。放出源となる個体が生息している場所からどれほど遠くまで検出可能な濃度で DNA が広がるのかについては個別にしっかりと検討する必要があるだろう。また、系外からの対象種の DNA 持ち込みも偽陽性を生む可能性があり、五大湖におけるコクレンの例では、偽陽性となる可能性がある要因としてコクレンの死骸やその残滓が航行する船舶によって偶発的に運ばれることや、コクレンを食べた鳥類の糞の混入などを挙げている (Merkes et al. 2014)。調査対象種についての基本的な生活史や生息場所選好性などが先行研究によって明らかになっていれば、それらをよく吟味したうえで環境 DNA 分析の結果を解釈する必要がある。特に基礎的知見が乏しい種を環境 DNA 分析で初めて調査する場合には、捕獲や目視といった既存の手法を併用して、結果の妥当性の評価を行うことが望まれる。

環境 DNA 手法は個体を直接採捕しない手法であるため、不確実に感じられる要素は他にもある。それは採水したその時点で個体がいいたのかどうか、という疑問である。これは前述の水の動きという空間的な要因からも影響を受けるが、それと同時に、放出された DNA の経時的な分解という時間的な要因からも影響を受ける。放出された DNA がごく短時間で分解してしまう場合には偽陰性という過誤を生じ、また、長期間にわたって検出可能な濃度の DNA が残存する場合は実際には個体が生息していないのに検出してしまうという偽陽性という過誤を生じると考えられる。生物個体を除去した後の水から DNA が検出可能な期間をレビューした最近の報告 (Turner et al. 2015) によると、多くが最大 25 日ほどであったが、ウシガエルの環境 DNA で水温 5℃ の条件下で観測した例では 58 日経過しても検出できたとの報告もなされている (Strickler et al. 2015)。後者の例では温度以外にも UV-B の強度と pH についても環境 DNA の分解に対する効果を測定しており、低温で、紫外線量が少なく、アルカリ性の条件下で最も長く環境 DNA が残存すると結論している。1 日以内に検出できなくなるとされている例もあることを考慮すると (Thomsen et al. 2012b)、環境 DNA の分解も対象水域の環境条件に強く依存していると思われる。水中を漂っている環境 DNA がこのような時間スケールで消失する一方で、水底の堆積物に含まれる魚類由来

の環境 DNA は 132 日に渡って検出できたと報告されている (Turner et al. 2015)。これは魚の排泄物が水底に沈んで蓄積されるなど水中よりも濃度自体が高いことと、堆積物中では分解速度も遅くなることが影響していると考察されている。堆積物の巻き上げが起こっているような条件下での採水は個体がいなくなっても偽陽性を生じさせる要因となるかもしれない。対象とする生物の移動速度や昼夜での行動および利用場所の変化などの既存情報を十分考慮したうえで、環境 DNA 分析による検出結果がどのような生態を反映しているのか推察することが、間違っ了解釈を避けるために必要である。

環境 DNA 分析はあくまでも対象種から放出された DNA 分子が有るのか無いのか、そしてどれくらいあるのかを調べる技術であるため、その分子を放出した個体の生死は分析結果に影響しない。よって、前述のコクレンの死骸の例のように (Merkes et al. 2014)、人為的、もしくは他の捕食者を介して対象種の DNA 断片が調査地内に持ち込まれた場合は偽陽性を生じて誤った推定結果をもたらす可能性がある。また、生物量や個体密度を推定したいときには大きな誤差を生むかもしれない。例えば、産卵後の斃死個体が多くいるような河川で DNA 濃度を測定しても、量的な意味では解釈が不可能なデータしか取得できないであろう。ただし、どのような状態であっても DNA が放出されてさえいれば検出できるということが環境 DNA 分析の強みともいえ、イモリの 1 種 (*Triturus cristatus*) の分布調査のように、親個体が池に現れる時期を狙って行われているライトを使った夜間の調査や産み付けられた卵塊を探すといった、実施に当たって季節的制限があった既存の調査よりも、環境 DNA の方が検出できる時期が広がって調査の自由度が高まった例もみられる (Rees et al. 2014b)。対象種の生活史を考慮して環境 DNA 分析を実施するのに適した時期や発育段階を選んで適用することで、この手法の強みをいかす工夫が必要である。

何をどれくらい検討すればはっきりと「いる」もしくは「いない」と言えるのだろうか。特に「いない」という判定は既存の視認や捕獲による調査と同じで、どれだけ PCR で陰性反応が続いたとしても確実に「いない」という証拠にはならない。こうした判断をする上で最も注意すべき偽陽性、偽陰性は、これまで見てきたように対象種の生活ステージや調査地の環境によって生じるもののほかに実験室での分析ステップ内で生じるものもある。これらの過誤が起こる要因についての詳細は、すでに良くまとめられた論考があるので参照していただきたい

(Darling and Mahon 2011 ; Ficetola et al. 2014 ; 高原ほか 2016)。ここでは偽陽性や偽陰性という過誤に特に注意せねばならない希少種と外来種の検出の例を挙げて、どのようにこれらの過誤を小さくすべく工夫がされているかを紹介したい。

北米ワシントン州のコロンビア川で絶滅危惧種に指定されているマスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) の河川内での分布を調査した例では、まず各調査地点において繰り返し数3で採水を行ったうえで、それぞれから抽出したDNA試料ごとに種特異的プライマープローブを用いた繰り返し数3のリアルタイムPCRでDNAの定量を行っている (Laramie et al. 2015)。つまり、1地点について合計9反復のPCRがなされている。更に、それぞれのフィルターからの3つの繰り返しのPCRが全て陽性、もしくは陰性とならなかった場合は再度繰り返し数3でPCRを行い、1度目のPCRの陽性反応が他の試料からの汚染によるものではないことを確認している。2度目でも陽性反応と陰性反応が混在して見られた場合は合計6反復のPCRでのDNA濃度の平均値を採用している。また、プローブの蛍光強度の増幅曲線を確認し、明瞭な指数関数的な増加がみられない場合は再度のPCRを実施している。前述の通り、ヨーロッパにおける外来種アメリカザリガニの例では (Tréguier et al. 2014)、1つの池で20地点の採水を行い、これらをよく混ぜた試料水から繰り返し数6の試料を得ることで、偶発的に対象種のDNAを採取できないという危険性を低下させたうえで、PCRでは12回の繰り返しを採用して検出の可能性を高める工夫がなされている。Fukumoto et al. (2015) は外来種と在来種両方のオオサンショウウオを扱っていることが特徴的であるが、この例では対象調査地で1年間に4回の調査を実施しており、採取時期が異なる試料を繰り返し得ることで結果の確実性を高めている。Jane et al. (2015) は落葉の時期にPCR阻害が起こりやすいことを指摘しており、時期によって変化する過誤の起こりやすさに結論が影響されないようにするためにも、繰り返しの調査は非常に有効であろう。

ここまで環境DNA分析を野外調査に適用する際に懸念の残るいくつかの問題点について議論した。様々な過誤が起こる要因の多くはすでに多数の先行研究によって指摘されている。対象種や調査対象地に依存してこれらの要因のうちどれに特に注意せねばならないかは変わるはずであるが、同じような条件の先行研究を参考にすれば、個別のケースごとにクリアできる問題が多いと考えている。簡便かつ迅速にデータが得られることは環境DNA分

析による野外調査の利点ではあるが、多くの不確実性が含まれうることを常に意識して結果を解釈せねばならない。

将来的な展望

前段で述べたように環境DNA分析による調査には注意せねばならないことが多々あるものの、既存の調査手法よりも相当に小さな努力量で広域調査、長期調査が可能になる本手法の魅力は非常に大きい。生態学的研究への更なる応用的展開を望む方々からは、期待を込めた疑問をぶつけられることがある。ここではこれらの質問について現状の知見を基に答えつつ、今後の本手法の発展可能性について議論してまとめとしたい。

大きい個体と小さい個体は区別できるのか、とは多くの方が抱く疑問である。残念だが今のところ両者を区別することはできない。DNAの塩基配列を種固有の情報として扱っている環境DNAでは、大きいか小さいかという誕生後の環境条件に依存して決まる獲得形質といえるような情報を識別することは不可能である。ただし、大型個体と小型個体ではDNAの放出速度に差があることが明らかになっている (Maruyama et al. 2014)。ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) では単位体重あたりに換算すると小型個体の方がDNAの放出速度が速く、環境DNA濃度を基に生息量や個体密度を推定する際にはこの差も考慮せねばならないと指摘されている。アユのようにほとんどの個体が1年で死亡するような年魚の場合、ある時間断面での個体群内でのサイズのばらつきは他の長寿命な種よりも小さいはずで、こうした種では別の採捕調査によって平均サイズを把握することで環境DNA濃度からの生物量推定はある程度の正確性をもって可能であろうと思われる。また、種レベルよりも解像度の高い情報を得るという点に関連するアイデアとして、環境DNA分析の個体群遺伝学研究への応用がある。Uchii et al. (2016) では、ミトコンドリアDNAの一塩基の違いに基づき、環境DNA分析によってコイ個体群におけるハプロタイプ頻度を推定している。このような、環境DNA分析を用いて個体群遺伝構造を明らかにする研究が将来発展するかもしれない。

どのような種がどこに、どのくらいいるかが明らかにできるとすれば、次に知りたいのはその「状態」である。イモリの1種 (*Triturus cristatus*) の調査事例 (Rees et al. 2014b) では複数回調査地を訪れて環境DNAによる検出をしているが、環境DNA濃度の定量はしていない。別の研究で同種の環境DNAは1~2週間で検出不能な濃度ま

で分解するとされており (Thomsen et al. 2012a)、もしも先の例で季節を違えて環境 DNA 濃度を定量していれば、産卵期に池を訪れる親個体に由来する環境 DNA 濃度の変化を捉えることで産卵の開始を推定できたかも知れない。こうした分析が可能であるとしても、これは既存の調査から明らかになった対象種の生活史の情報との組み合わせで結果の解釈が必要である。

水を汲むだけで種組成がわかってしまうなら、手間のかかる従来の様な直接捕獲の調査はもう必要ないのではないかという意見も時折聞かれる。実際のところ、ユニバーサルプライマーによる環境 DNA の増幅とそれに続く次世代シーケンサーによる種同定のシステムは、今後の野外調査の方法論を一変させてしまうような潜在的可能性を秘めている。ただし、前述のように種間で DNA の増幅効率が違うという問題があり、事実、Kelly et al. (2014) によるモントレーベイ水族館の水槽を使った魚類相に対する先駆的研究では検出できない分類群があった。彼らの使用したユニバーサルプライマーは属や科レベルの識別しかできない遺伝子領域に設計されており、種同定はそもそも困難であるという別の問題もあった。Miya et al. (2015) が開発した MiFish プライマーは増幅効率の種間差がより小さく、更に種の分解能が高いため、今後多くの研究で利用されることになる見込みが強い。そうした研究例の積み重ねの中で MiFish プライマーの増幅効率の種間差や PCR 阻害物質の影響等の検証と補完が進めば、バケツ一杯ほどの水から水中の魚類相を知るという調査手法が一般的なものになるだろう。

ただし、環境 DNA 分析技術が今後さらに発展しても、これまでの既存の調査・分析手法の必要性を排除するものではない (Laramie et al. 2015 ; Thomsen and Willerslev 2015)。この章で述べたような将来へ向けての研究例をみるだけでもわかるように、環境 DNA 分析は既存の調査で得られた知見の下地があって初めて有効に利用できる技術である。また、得られた結論が正しいのかどうかを確認するのもまた、既存の調査手法によってのみ可能である。保全生態学の分野においても、簡便迅速な調査が可能な環境 DNA 分析によって広域を調査して重要な保全対象地域を選び出したうえで、限られた保全のための予算や人的資源を集中投下して活動を行うなど、環境 DNA 分析の利点を生かした合わせ技での有効な利用と発展が期待されている (Rees et al. 2014b)。なお、環境 DNA 分析に関連する優れた総説がすでに多数公表されているため、より広範な情報を得るために参考にして頂きたい (Blanchet 2012 ; Shokralla et al. 2012 ; Taberlet et al. 2012 ;

Bohmann et al. 2014 ; Díaz-Ferguson and Moyer 2014 ; Rees et al. 2014a ; Pedersen et al. 2015 ; Thomsen and Willerslev 2015)。

謝 辞

本研究は、環境省の環境研究総合推進費 (4RF - 1302) により実施された。

引用文献

- Andersen K, Bird KL, Rasmussen M, Haile J, Breuning-Madsen H, Kjaer KH, Orlando L, Gilbert MT, Willerslev E (2012) Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21:1966-1979
- 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
- Blanchet S (2012) The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. *Fisheries Management and Ecology*, 19:120-132
- 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
- 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
- Deiner K, Altermatt F (2014) Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLOS ONE*, 9:e88786
- Deiner K, Walser JC, 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
- Diaz-Ferguson EE, Moyer GR (2014) History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Revista de Biología Tropical*, 62:1273-1284
- Doi H, Uchii K, Takahara T, Matsuhashi S, Yamanaka H, Minamoto T (2015) Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *PLOS ONE*, 10:e0122763
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4:423-425
- Ficetola GF, Pansu J, Bonin A, Coissac E, Giguët-Covex C, De Barba M, Gielly L, Lopes CM, Boyer F, Pompanon F, Rayé G, Taberlet P (2014) Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15:543-556
- 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
- Fujiwara A, Matsuhashi S, Doi H, Yamamoto S, Minamoto T (2016) Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. *Freshwater Science*, 35:748-754
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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 (2014) Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLOS ONE*, 9:e86175
- Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS (2015) Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*, 183:29-37
- Mahon AR, Jerde CL, Galaska M, Bergner JL, Chadderton WL, Lodge DM, Hunter ME, Nico LG (2013) Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLOS ONE*, 8:e58316
- 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, 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, Diaz-Ferguson E, Hill JE, Shea C (2014) Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. *PLOS ONE*, 9:e103767
- 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 (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
- 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
- Rees HC, Bishop K, Middleditch DJ, Patmore JR, Maddison BC, Gough KC (2014b) 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 (2014a) 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
- 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, 17456
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21:1794-1805
- 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
- Stein ED, Martinez MC, Stiles S, Miller PE, Zakharov EV (2014) Is DNA barcoding actually cheaper and faster than traditional morphological methods: results from a survey of freshwater bioassessment efforts in the United States? *PLOS ONE*, 9:e95525
- 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
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012) Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21:1789-1793
- 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
- 高原 輝彦, 山中 裕樹, 源 利文, 土居 秀幸, 内井 喜美子 (2016) 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～. *日本生態学会誌*, 66:583-599
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012b) 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 (2012a) 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, 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
- 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*, 5:225-231

