

環境 DNA 分析の「い・ろ・は」

サンプリングから分析・解析まで、実践のための技術

玉田 貴, 芝田 直樹

1 はじめに

環境 DNA 分析は遺伝子解析技術を利用して生物の分布・相対量の変化を推定することのできる生物調査手法である。水や空気などの環境媒体から遺伝物質を収集・分析することで情報を得る。

本技術は 1990 年頃から微生物の検出に使われ始め、2008 年には Ficotora らによって初めて大型脊椎動物であるウシガエル (*Lithobates catesbeianus*) を検出した報告がされた¹⁾。2018 年に環境 DNA 学会が設立され、学会からは環境 DNA 分析のマニュアル²⁾ (以下、環境 DNA マニュアル) が、環境省生物多様性センターからは調査手法の手引き³⁾が発行されており、わかりやすくまとめられている。まだ環境 DNA には不明な点が多いが、生物調査手法としての有用性は広く認識されている。また、環境 DNA 分析には、より良い結果を得るための細かなノウハウが多く存在する。

そこで本稿は、これから環境 DNA 分析をはじめようとする学生や研究、企業で環境 DNA 分析を扱いたい技術者に向けて、ちょっとマニアックだが役に立つ、環境 DNA 分析の実用上の注意点をお伝えする。もし疑問点があれば気兼ねなく連絡してほしい。ここでの話題の中心は水圏生物 (主に魚類) を対象としたものとする。

2 環境 DNA 分析とは

すべての生物は遺伝情報として DNA や RNA を保有している。これらの遺伝情報は、糞や剥がれ落ちた皮膚片、分泌物の形で環境中に放出されている。広義は微生物本体を含む遺伝物質の総体を環境 DNA と呼ぶが、ここでは、狭義の意味として微生物以外のマクロ生物 (目に見えるような生物) から放出された遺伝情報を含む物質と定義する。

環境 DNA の分析技術は PCR (polymerase chain reaction) 法を中心に成り立っている。環境 DNA の主な分析方法としては 2 通りある (図 1)。一つは、1, 2 種類の在/不在や DNA 量を知るための分析法で種特異的分析と呼ばれる。もう一つは、特定の種に定めず“魚類”のような 1 分類群の種構成を推定する分析法で網羅的分析と呼ばれる。

種特異的分析では、種ごとに特異的なプライマーセット (人工合成された 20 bp 程度の塩基配列) を設計してリアルタイム PCR で検出を行う。リアルタイム PCR は、PCR 反応でプライマーが DNA を増幅する際に発せられる蛍光波長をリアルタイムにモニタリングする方法である。一方、網羅的分析では Illumina 社の Miseq のようなハイスループットシーケンサーで対象分類群の DNA 配列を並列解読する。どちらも一般的な技術だが、実際に取り組むと、思うような結果を得るまで様々

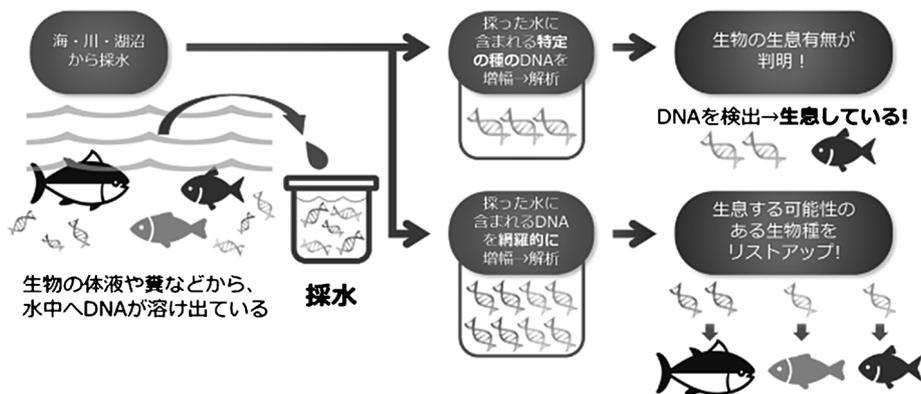


図 1 環境 DNA の分析イメージ

な問題が生じる。そんなときに本稿が問題解決の手助けになれば幸いである。

本稿の分析技術に関する解説は、環境 DNA 調査・実験マニュアルと環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引きの情報を補完するように記載している。そのため、まずは上記マニュアルを通読したうえで本稿を楽しんで頂きたい。3 章ではサンプリングから DNA 抽出までを解説し、4 章からは PCR の基本的な知識がある技術者向けに前処理を含む分析ステップのノウハウを紹介する。

3 環境 DNA 分析の概要と手順

環境 DNA 分析は次のようなステップで行われる。①サンプリング、②ろ過・DNA 抽出、③機器分析（リアルタイム PCR/配列解読）、④データ解析（バイオインフォマティクス）である。遺伝子解析技術の技術書には、③や④を改善するための情報は多数見つかるが、経験的に環境 DNA の検出力を向上させるために最も重要な工程は他の環境分析と同様①サンプリングと②ろ過・DNA 抽出である。しかしこの点について環境 DNA 分析に特化した情報はなかなか見つかりにくい。そのため、本稿ではサンプリングとろ過・DNA 抽出の項に多くの解説を加えている。

3.1 採水

採水是最も重要ではあるが、その簡便さから解説が省略されやすい部分でもある。本項目では、どのような場所から採水すべきかから、サンプルの保存と輸送までを解説する。

3.1.1 採水地点の選択と採水

採水地点の選定で最も重要なのは、生物の生態に応じて最適な採水場所を選択することである。速水らはダム湖で魚類の種組成を把握する場合、春に沿岸域でサンプリングすると、最も効率よく生息する種を検出できたことを報告した⁴⁾。春は多くの魚類が産卵期に当たり、産卵行動によって放出された精子や体細胞が環境 DNA として通常より多く回収されたためだと考えられる。一方、生物のおおよその量が知りたい場合（後述）には、このような産卵イベント時期は予期せぬデータとなりうることに注意されたい。

また、調査水域の水量も重要なポイントとなる。雨が降ると水量が上がると環境 DNA の濃度が薄まる。可能な限り調査地が平常状態にある日を選択して調査するとよい。だが、調査水域によっては注意が必要な場合もある。これまでの経験において、目視観察と環境 DNA の結果に食い違いが生じた調査水域で一番多いのが溪流である。理由の一つとして、溪流は生物量に対して水量が多く流速も早いいため、環境 DNA が得られにくいことが考えられる。このような場所では採水のタイミングを分

けて 2 L 以上採水するなどの工夫が必要となる。だが、サンプル量を増やすと、PCR 阻害が強くなる可能性も増加するので、2, 3 L に収めておくことを推奨する。調査地点数とサンプル量が多くなり、サンプルの移動が困難と想定される場合には、現地でのろ過も視野に入れて調査計画を立てる必要がある。

採水容器は環境 DNA マニュアルでも指定はないが、一般的なプラスチック採水容器や市販の空のミネラルウォーターの容器を使うことが多い。特に初めて環境 DNA を使った調査を行う場合、容器の選択やオスパンの確保には不安が伴うかもしれない。環境総合リサーチでは、採水の手順書（図 2a）と採水キット（図 2b）を送付しているため、初めての方はぜひ一度相談していただきたい。

3.1.2 サンプルの保存・輸送

オスパンを添加したサンプルは、4℃であれば一週間程度の保管が可能であると報告されている⁵⁾。これは、オスパンの殺菌作用により DNA 分解の主要因である微生物の活動を抑制するためである。ただし、ろ過と抽出は早期に行った方がよい。採水調査からろ過・抽出までのスケジュールを管理して 48 時間以内に抽出を終えることを推奨する。環境 DNA の分解速度は温度にも依存するため⁶⁾、輸送の際はクール便で発送するとよい。ただし、サンプル水を冷凍すると解凍時に環境 DNA が物理的に分解されてしまう可能性があるため冷凍便は使用しない。また、紫外線でも分解してしまうため、直射日光には注意する。

3.2 ろ過

採水後は、環境 DNA を濃縮するためにろ過と DNA 抽出を行う。ろ過方法やフィルターの種類にはいくつかあり、環境 DNA マニュアルでも複数の方法が紹介されている。ここではよく用いられる方法と環境総合リサーチが適用している方法について実用上の使い分けを解説する。

3.2.1 オープンファンネルによるろ過

環境 DNA マニュアルで紹介されている方法の一つであるが、一般的な吸引ろ過装置を使用できる。ろ紙にはグラスファイバーフィルター（Whatman GF/F 47 mm：以下、GF/F フィルター）を用いる。上部が開放されているため、サンプル間での水の混入に由来する汚染に注意して作業を行う。器具を再利用する場合は 0.1% 以上の塩素系漂白剤で洗浄した後、超純水などで塩素を除去する。サンプルのろ過後は、超純水をろ過してブランクを作成することをお勧めする。ろ過した GF/F フィルターは、ろ過面を内側にして折り畳み、アルミホイルで遮光してから -20℃ で冷凍保存する。

3.2.2 密閉式ろ過機（環境総合リサーチ採用）

サンプル間の汚染を極力減らすため、環境総合リサー

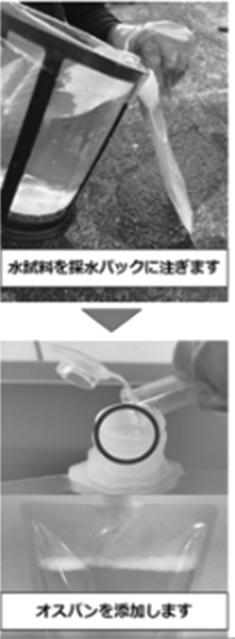
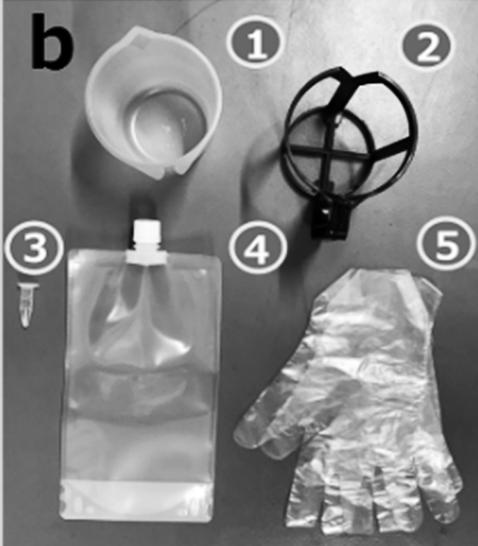
環境DNA採水キット a 利用手順書	採水	環境DNA採水キット 利用手順書	採水・保存
 <p>流水域</p> <p>止水域</p> <p>解放水域</p> <p>サンプリング場所を決定します</p> <p>流れの向き</p> <p>離れた場所で共洗った後、複数回に分けて採水</p>	<ul style="list-style-type: none"> ※ 河川であれば横断方向に数地点に分けて採水します。 ※ ため池などの止水域であれば周囲に数地点採水します。 ※ 海やなどの開放的な水域であれば水の流れの良い場所にて数地点採水します。 ※ 対象とする生物が生息してそうな地点で採水することが重要です。 ※ 高所の場合はビニール紐と重りを使うと採水がしやすいです。 ※ 同時に捕獲調査を実施する場合、環境DNAのサンプリングの後に実施するようにして下さい。 ※ 調査水域内に入る場合、採水地点の下流側へ入るようにして下さい。 ※ 河川であれば上流側、止水域であれば沖合方向に口を向けて採水します。 	 <p>水試料を採水バックに注ぎます</p> <p>オスバンを添加します</p>	<ul style="list-style-type: none"> ※ 複数回に分けて採水します。 ※ 定量分析用のサンプル以外は、おおよその量で結構です。 ※ 付属のオスバンは1Lにつき1mL添加します。 ※ オスバンの添加は環境DNAを分解する微生物の滅菌が目的なので、添加後はよく振って下さい。 ※ しっかり振っていただくと、写真(下)のように泡立ちます。
		<p style="text-align: center;">- キットの内容 -</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 採水カップ < 600mL > ② 採水カップ枠 600mL用 ③ オスバン(塩化ベンザルコニウム) (水試料1Lに対して1mL添加) ④ 採水バック < 1L > ⑤ ナイロン手袋 < サンプル数分 > 	

図2 (a) 環境 DNA 採水手順 (b) 採水キット内容

チでは密閉したままろ過を行うシステムを導入している(図3a)。採水容器をボトルではなくパックにすることで、密閉状態でのろ過が可能である。自作ろ過機の作成方法に関しては山中らの報告⁷⁾か岡らの報告⁸⁾をを参照されたい。ろ過フィルターはGF/Fフィルターを使用し、パックは使い捨てにすることで、ろ過時の汚染リスクは大幅に低減される。また、ボトルと比べて、パックはかさばらないため持ち運びが容易で、多地点での採水や山岳部での採水時に威力を発揮している。採水パックが密封式であるため、ろ過器はそれに合わせて制作しているが、それ以外の注意点はオープンファンネルによるろ過と同じである。ろ過後のGF/Fフィルターはろ過面を内側に折りアルミホイルで遮光し、冷凍保管する。



図3 (a) 密閉式のろ過装置 (b) 自動カートリッジ式フィルターろ過装置

3・2・3 現地ろ過(カートリッジ式フィルター)

環境DNAマニュアルでは、汲んだ水を現地でろ過する方法も紹介されている。現地でのろ過はカートリッジ式フィルター(Stervex-HV 孔径 0.45 μm:

SVHV010RS)を使用する。カートリッジ式フィルターはGF/Fフィルター(0.7µm)より孔径が小さく環境DNAの捕集能力が高い一方、目詰まりを起こしやすい。特に淡水・汽水域は、不純物が多いため、カートリッジ式フィルターを手動でろ過しようとする苦勞することも多い(目詰まりでシリンジのピストンが動かない)。そのため、現地でろ過を行う場合は自動ろ過器(図3b)を使用するもよい。

3.3 DNA抽出

DNA抽出は検出力確保のために重要である。ここではGF/FフィルターからDNAを抽出する流れを解説する。DNA抽出の方法は環境DNAマニュアルに準拠するが、環境総合リサーチでは山中らの手法⁷⁾を採用している(環境DNAマニュアルにも別法として記載あり)。

DNA抽出の流れは次の通りである。①解凍したフィルターをDNA溶出液で処理後、DNeasy Boold and Tissue kit (Qiagen)のプロトコルに従い、②DNA吸着カラムでDNAを選択的に吸着、③DNAが結合したカラムを洗浄、④DNAを溶出する。

環境DNAマニュアルと環境総合リサーチで採用している方法の違いは主に①の部分となる。環境DNAマニュアルではサリベット(図4a:15mLチューブと同じ太さの唾液採取容器のコットンが入っていないもの)を使用するが、変法では1.5mLチューブの大きさで処理することができる(図4b:エコノスピン空カラムEP-31201)。これだけの違いでも、処理検体数を大幅に増加可能である。

また、マニュアルには記載されていないが、ろ過フィルターに含まれる水分の除去は重要である。フィルターに残っている水分はサンプルごとに異なるため、①の部分で水分を遠心で除去しておくことでフィルターに添加した試薬の濃度が安定しやすい。また、フィルターからDNAを溶出させる際、DNA溶出液を添加した後に熱処理を行うが、このときはできるだけヒートブロックやウォーターバスなどの接触型の加温装置を使用する。インキュベーターを使用する場合、静置するだけでは熱が伝わりにくいため、事前に温めておいたアルミブロックなどを使用するとよい。

②以降はDNeasy Boold and Tissue kitのプロトコル

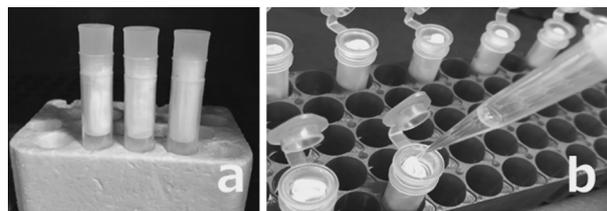


図4 (a) サリベットを用いたDNA抽出 (b) スピんカラムを用いたDNA抽出

に従い抽出を行う。最終的な溶出液量は100µLに設定することが多いが、複数の種や分類群を対象に分析を実施する場合、使用するDNA抽出液量が多くなるため、1地点で複数サンプル用意し、それぞれを抽出するなどの工夫が必要である。

4 分析方法

ここから先は遺伝子分析の技術に関する内容となる。環境DNAマニュアルに詳細な手順が記載されているため、注意点だけを記載していく。基本的には種特異的分析も網羅的分析もどちらもPCR法を利用しているため、注意点は共通している。

4.1 種特異的分析

種特異的分析では、対象種に固有のDNA配列部分にプライマーセットを設計してリアルタイムPCRによる検出を行う。主にミトコンドリアDNAのCytochrome bや12S rRNA, 16S rRNA領域が使われることが多い。これらの遺伝子領域は種や地域特性を反映することが多いため、DNA配列のデータが豊富である。また、核にコードされているDNA領域を利用する場合、ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域などが用いられる。環境DNA分析ではミトコンドリアDNAがよく使用されるが、反復配列が多いITS領域を使用すると検出感度が高くなることがある。必要な配列データが存在する場合、使用を検討してみるとよい。

4.1.1 プライマープローブの設計

プライマー設計では、まずNCBI nucleotide データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に対象種と見分ける必要がある近縁種のDNA配列が存在するかを数領域で確認する。その後、各種のDNA配列を複数用意してDNA配列の比較を行う。比較には無料ツールであるMEGA (<https://www.megasoftware.net/>) が便利である。

設計の際に考慮する条件は、①増幅長が180bp以内、②近縁種と異なる配列を3'末端側5塩基以内を含む、③対象種内では変異が無い配列、である。また、プライマーのT_m値(プライマーの半数が鋳型に結合する温度)は60℃程度で温度差は2℃以内設定、プライマーの長さは18~25bpに設計する。また、種を分ける箇所の塩基配列の選択はT/Gボンドを考慮し、フォワード側はAかC、リバーズ側はTかGを変異箇所として選択する。設計後はNCBIのデータを使って疑似的にPC内でPCRを実施できるPrimer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)で、他にどんな種が増幅されるかをチェックする(in silico)。対象種以外で3'末端側の5塩基以内にひとつも変異が入っておらず、同所的に生息する種が候補として挙げた場合は再度作成する。このチェックで同所的に生息す

る見分けたい種がなければ、個体から抽出した DNA サンプルで増幅の確認をする。

リアルタイム PCR で使用する Taqman プローブは設計したプライマーが増幅する配列内に設計する。Taqman プローブは DNA 断片に蛍光色素と消光物質を付与したものであり、検出の特異性を向上させる役割も果たしている。設計時に考慮する条件はフォワードプライマーと同様だが、 T_m 値は 70°C を目標とし、蛍光修飾を両端に付与する。もし、 T_m 値が 70°C 付近で設計できない場合は MGB (Minor Groove Binder) 修飾によって T_m 値を上げることができる。

4.1.2 リアルタイム PCR

環境 DNA 分析のリアルタイム PCR は希薄な対象種の DNA を増幅させるため、一般的に使用されている方法に工夫を加えている。

まず、環境媒体から得たサンプルを利用するため、腐植酸に代表される PCR 阻害物質への耐性が高い試薬 (Ex. Environmental Master Mix 2.0: Applied Biosystems) を使用することは重要である⁹⁾。また、サイクル数を多くすると希薄な DNA が増幅される可能性が上がるため、PCR の増幅ステップは 55 サイクルが基準とされている。分析結果によっては、増幅後の産物をサンガーシーケンスにて確認する場合がある。増幅後の PCR 産物は非常に高濃度であり、空气中に舞うとコンタミの大きな原因となるため、試薬を扱う部屋と区画を分けるなどの工夫が必要である。

リアルタイム PCR は既知濃度の DNA 配列を使って検量線を書くことで、サンプル中の DNA 濃度を推定することができる (定量 PCR: 以下, qPCR)。qPCR は検量線の精度が重要になるため、検量線作成には人工合成遺伝子サービスを利用するとよい。これは自分で配列と長さを指定して発注すると、プラスミドの状態での納品される。人工合成遺伝子を発注する際は、NCBI に登録されている対象種の配列を使い、プライマー配列の両端は 10 bp 程度の余裕を設けるほか、可能な限り制限酵素による切断の後、精製を行うことでエラー配列の無い検量線用の DNA 断片を手に入れることができる。コストを下げる場合、組織片から得た PCR 産物を検量線に用い

ることもできる。その際には、長い PCR 産物 (1500 bp 程度) で検量線用の DNA 断片を作成すると、短い配列と比べて DNA 濃度調整時の誤差低減が期待できる。ただし、組織片由来の検量線は人工遺伝子のものより検量線がばらつく傾向にあるため、正確性を期す場合は人工合成遺伝子の使用を推奨する。リアルタイム PCR を用いた環境 DNA 分析については高原らの報告¹⁰⁾などを参考にするとよい。

4.2 網羅的分析

網羅的分析ではハイスループットシーケンサーを使った配列解読を行う。網羅的分析で最もよく行われるのが魚類の種構成の検出であり、魚類の検出用プライマーは宮らが開発した MiFish が使われる¹¹⁾。他にも潮らが開発した哺乳類 (MiMammal)¹²⁾や駒井らが開発した甲殻類 (MiDeca)¹³⁾、酒井らが開発した小型サンショウウオ類 (Hynobius_12s)¹⁴⁾などが存在する。このような幅広い種を増幅させるプライマーのことをユニバーサルプライマーとも呼ぶ (図 5)。

網羅的分析は以下のように進める。①1stPCR: 対象分類群の DNA 配列をユニバーサルプライマーで増幅、②2ndPCR: サンプルに固有な DNA 配列と機械分析のための DNA 配列の付与、③濃度調整後、ハイスループットシーケンサーで配列の決定、④出力データを処理して結果を出力する。

4.2.1 1st PCR

1st PCR は対象となる種群・分類群の DNA 配列をユニバーサルプライマーにて増幅するステップである。1st PCR は、PCR サイクルで変化する熱を伝わりやすくするため、可能であれば薄く成形されたチューブやプレートを使用すると増幅がかかりやすくてよい。うまく増幅すると 38 サイクルで $30\sim 40\text{ ng}/\mu\text{L}$ 程度の DNA 濃度になる。また、1 サンプルあたりの反復数も重要である。網羅的分析では 1st PCR の反復数を 8 反復とすることが多い。反復数を減らすと検出種数が低下することがあるため¹⁵⁾、試料の節約目的などで減らす場合には注意が必要である。

1st PCR 後は残ったプライマーなどの夾雑物を除去

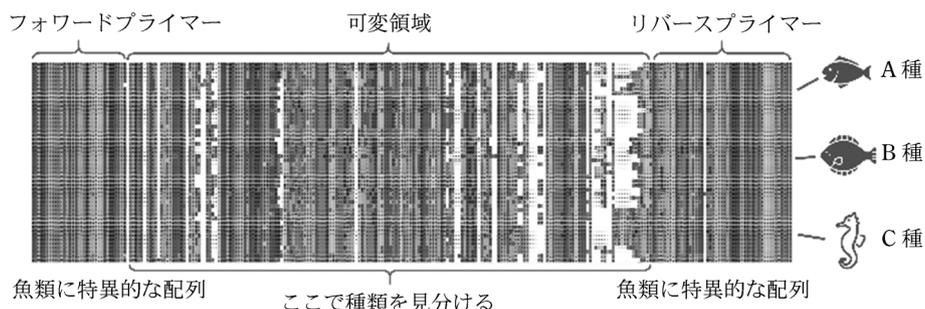


図 5 網羅的解析の増幅領域のイメージ

するために磁気ビーズを用いた精製を行う。環境総合リサーチでは AMPureXP (Beckman) を使用しているが、Roland らの方法¹⁶⁾に従い自作することで、AMPureXP と比較して試薬コストを約 1/6 程度に抑えることもできる。

1stPCR でうまく増幅されない場合、サンプル内の環境 DNA が低濃度であるか、PCR 阻害による影響を受けている可能性が考えられる。PCR 阻害が疑われる場合は抽出 DNA に対して磁気ビーズによる精製・濃縮を行うか、希釈することで増幅される場合がある。

4・2・2 2nd PCR

2nd PCR は、サンプルを区別するためのタグ配列を付与するステップである。2nd PCR には精製後の PCR 産物を使用する。サンプルごとのデータ量を均一化するため、ここで 1st PCR 産物の濃度を 0.1 ng/μL に調整してから 2nd PCR を行う。2nd PCR 後の産物は、電気泳動やフラグメントアナライザーで 2nd PCR 産物の品質を確認するとよい。2nd PCR 産物は E-Gel システム (Thermo 社) などで目的のバンドのみを抽出するが、精製後の PCR 産物を希釈しないと図 6a,b のようにうまく目的のバンドが分離されないことが多い。

抽出後の 2nd PCR 産物は、サンプル量などを踏まえて 10–12 pM に濃度調整し、ハイスループットシーケンスにて配列を決定する (図 7)。

4・2・3 NGS 解析

調整したライブラリをハイスループットシーケンスにセットし、分析を開始する。使用するキットによるが結果は 1–3 日程度で出力される。出力された結果は

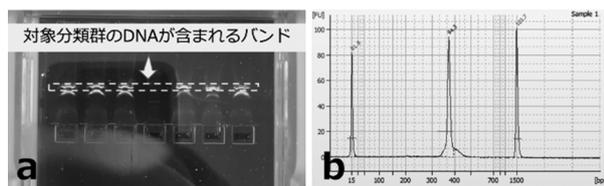


図 6 (a) E-gel sizeselect による泳動図 (b) Bioanalyzer による精製配列長の図



図 7 MiSeq でのシーケンス作業

Fastq 形式で表記されており、これは解読された DNA 配列 1 塩基ごとに読み取り品質スコア (以下、クオリティスコア) が付与されたものである。

データ中には、本来存在しないエラー配列などが含まれているため、データ解析処理を行う。詳細は割愛するが、データ解析の主な流れは以下の通りである。①プライマー配列部分の除去、②一定以下のクオリティスコアを含むリードの除去、③出現率が低くエラー配列と思われるリードの除去、④同一配列の統合 (代表配列の作成)、⑤データベースとの照合、である。これらの解析は複数の方法が存在するが、WEB 上で公開されている解析パイプライン (MiFish pipeline : <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/>) は MiFish プライマーを用いた網羅的分析のデータ解析で簡単に利用できるものである。魚類以外の分類群を対象に解析を行う場合、宮らの報告などを参考にして解析パイプラインを組むと良い¹⁷⁾。

5 今後への期待と展望

生物調査手法としての環境 DNA 分析は、2015 年に魚類の網羅的な検出用プライマー (MiFish) が開発されてから一気に広まった。すでに多くの調査で使われてきたが、まだまだ新しい技術であり、データベースの拡充や今後の発展が期待される。環境 DNA は捕獲調査も含めた生態調査の代替技術と誤解されることも多いが、あくまで生態調査のひとつのツールという位置づけである。各調査法の偽陰性や擬陽性については避けようがない部分もあるため、目的に応じて適切な手法を選択することが重要である。今後の展望としては、DNA データベースの拡充や魚類以外の分類群への拡張、生物資源管理への応用などが期待される。環境 DNA の強みは採捕調査では困難な地点の調査や、多地点化の容易さであるため、環境 DNA の良さを生かして環境評価などに役立てられるよう、今後もこの分野の発展に寄与していきたい。もし案件などで相談したい場合はぜひご連絡していただければ幸いです。

文 献

- 1) G. F. Ficetola, C. Miaud, F. Pompanon, P. Taberlet : *Biology letters*, 4, 423 (2008).
- 2) 環境 DNA 学会 (2020) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver2.2.
- 3) 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.
- 4) K. Hayami, M. K. Sakata, T. Inagawa, J. Okitsu, I. Katano, H. Doi, K. Nakai, H. Ichiyangi, O. R. Gotoh, M. Miya, H. Sato, H. Yamanaka, T. Minamoto : *Ecology and evolution*, 10, 5354 (2020).
- 5) H. Yamanaka, T. Minamoto, J. Matsuura, S. Sakurai, S. Tsuji, H. Motozawa, M. Hongo, Y. Sogo, N. Kakimi, I. Teramura, M. Sugita, M. Baba, A. Kondo A : *Limnology*, 18, 233 (2017).
- 6) S. Tsuji, M. Ushio, S. Sakurai, T. Minamoto, H.

- Yamanaka : *PLoS One*, **12**, e0176608 (2017).
- 7) H. Yamanaka, H. Motozawa, S. Tsuji, R. C. Miyazawa, T. Takahara, T. Minamoto : *Ecological Research*, **31**, 963 (2016).
 - 8) S. I. Oka, H. Doi, K. Miyamoto, N. Hanahara, T. Sado, M. Miya : *Environmental DNA*, **3**, 55 (2021).
 - 9) K. Uchii, H. Doi, T. Okahashi, I. Katano, H. Yamanaka, M. K. Sakata, T. Minamoto : *Environmental DNA*, **1**, 359 (2019).
 - 10) T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi : *PloS one*, **8**, e56584 (2013).
 - 11) M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh, W. Iwasaki : *Royal Society open science*, **2**, 150088 (2015).
 - 12) M. Ushio, H. Fukuda, T. Inoue, K. Makoto, O. Kishida, K. Sato, K. Murata, M. Nikaido, T. Sado, Y. Sato, M. Takeshita, W. Iwasaki, H. Yamanaka, M. Kondoh, M. Miya : *Molecular Ecology Resources*, **17**, e63-e75 (2017).
 - 13) T. Komai, R. O. Gotoh, T. Sado, M. Miya : *Metabarcoding and Metagenomics*, **3**, e33835 (2019).
 - 14) Y. Sakai, A. Kusakabe, K. Tsuchida, Y. Tsuzuku, S. Okada, T. Kitamura, T. Minamoto : *Environmental DNA*, **1**, 281 (2019).

- 15) H. Doi, K. Fukaya, S. I. Oka, K. Sato, M. Kondoh, M. Miya : *Scientific Reports*, **9**, 1 (2019).
- 16) N. Rohland, D. Reich : *Genome research*, **22**, 939 (2012).
- 17) M. Miya, R. O. Gotoh, T. Sado : *Fisheries Science*, **2020**, 1 (2020).



玉田 貴 (Takashi TAMADA)
株式会社環境総合リサーチ (〒619-0237
京都府相楽郡精華町光台二丁目3番9)。
名古屋大学大学院。修士 (理学)。《趣味》PC 組み立て。
E-mail : t-tamada@ctiers.co.jp



芝田直樹 (Naoki SHIBATA)
株式会社環境総合リサーチ (〒619-0237
京都府相楽郡精華町光台二丁目3番9)。
龍谷大学大学院。修士 (工学)。《現在の
研究テーマ》環境 DNA 分析の技術検討と
新技術開発。《趣味》ロードバイク, 生物
採取, 釣り。
E-mail : n-shibata@ctiers.co.jp

会社ホームページURL :

<http://www.ctiers.co.jp/>

原稿募集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象 : 以下のような分析機器, 分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術, 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術, 3) 分析機器および分析手法の応用例, 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説, 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項, 6) その他, 分析機器の性能を十分に引き出すために有用な

情報など

新規性 : 本記事の内容に関しては, 新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく, 既存の装置や技術に関わるもので構いません。また, 社会的要求が高いテーマや関連技術については, データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先 :

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会
[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]