

Ⅱ

令和8年度版

河川水辺の国勢調査
基本調査マニュアル
[河川版]

(魚類環境DNA調査編)
(案)

国土交通省水管理・国土保全局河川環境課
令和7年12月 改訂

「河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル [河川版] (魚類環境 DNA 調査編) (案) について」

この「河川水辺の国勢調査 基本調査マニュアル [河川版] (魚類環境 DNA 調査編) (案)」は、「河川水辺の国勢調査[河川版]」における魚類環境 DNA 調査実施のための具体的方法をまとめたものであるが、「魚類環境 DNA 調査」は緒についたところであり、調査の方法についてもなお検討すべき点が残されていることから、本マニュアル案は当分の間(案)として試行し、今後現地での調査経験や関係の方々からのご助言等を得て、随時必要な改定を行い、より適切なものとしていくこととしている。

令和7年9月

目次

II 魚類環境 DNA 調査編 (案)	II -1
はじめに.....	II -1
1. 調査概要	II -4
2. 現地調査計画の策定	II -6
3. 現地調査	II -12
4. 分析.....	II -24
5. 調査結果とりまとめ	II -33
6. 様式集	II -39

河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル [河川版]
(魚類環境 DNA 調査編) (案) の改訂経過

表 改訂経過

年 月	内 容
令和 7 年 9 月	[魚類環境 DNA 調査編 (案) 作成]
令和 7 年 12 月	[魚類環境 DNA 調査編 (案) 改訂] <ul style="list-style-type: none">・ 調査環境の記録項目に「河川名」を追加・ プレろ過等に関する記述を追加・ 抽出に用いる試薬の液量を増量してよい (組成比は変更不可) 旨を追加・ 板鰓類用プライマーを MiFish-Ev2 に修正・ 2ndPCR の分析条件に関する記述を変更

はじめに

環境 DNA 調査について

令和 8 年度より、魚類環境 DNA 調査を『基本調査』に新たに追加して実施することとする。

環境 DNA は水、土壌、空気等の環境中に存在する生物由来の DNA の総称である。河川や湖沼における環境 DNA 調査は、従来の魚類採捕調査とは異なり、分析に必要な試料を河岸や橋上から採水する作業が中心となり、現地調査を効率よく実施することができる。そのため、従来の魚類採捕調査よりも多地点の調査を容易に行うことができ、河川管理の基本情報となる魚類の生息状況を網羅的に取得できる。

環境 DNA 調査により、河川環境を網羅的に把握することで、河川環境情報図等の各種環境基礎資料の作成、河川に関する各種計画の策定、事業の実施、河川環境の評価とモニタリング、その他河川管理の様々な局面における基本情報として、活用できるデータを取得可能である。

なお、本文中において、「環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver.3.01（一般社団法人環境 DNA 学会 令和 7 年 6 月）（以下、環境 DNA 学会マニュアル）」、「環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）第 1 版（環境省自然環境局生物多様性センター 令和 6 年 5 月）（以下、環境省手引き）」を準拠、参照するとしている箇所については、これらのマニュアルが改訂された場合には、最新版に準拠、参照するものとする。

マニュアルの適用範囲

「河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル [河川版] (魚類環境 DNA 調査編) (案)」は河川水辺の国勢調査における魚類環境 DNA 調査に適用されるものである。

環境 DNA 調査全体の注意事項

環境 DNA 調査では、微量の DNA を取り扱う調査であるため試料以外に由来する DNA が混ざり汚染される（コンタミネーション）リスクが常に存在する。そのため、環境 DNA 調査全体で、分析環境、機材等の汚染に注意して作業を行う必要がある。

参考として、環境 DNA 調査全体に関する注意事項を環境 DNA 学会マニュアルより引用し示す。

「環境 DNA 調査の注意事項」¹⁾

環境 DNA 分析は、環境中の極微量な対象 DNA をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で分析可能な量に増幅して検出・定量する技術である。そのため、組織サンプルに由来する DNA や PCR によって得られた増幅産物のような高濃度の DNA によるコンタミネーション（汚染）は結果に取り返しのつかない影響を及ぼすことが多々ある。確度の高い環境 DNA 分析の実施は、コンタミネーションとの戦いであると言ってもよい。そのために、以下のような点に特に注意する必要がある。

- 1) 試料中に混入する DNA：試料中には、採水地点近傍に生息・生育する生物種以外にも、人間活動等に伴う様々な DNA が混入する。污水处理設備からの排水、農地の用排水、養殖・養魚施設、魚市場などの他にも、屋外の焚火跡やゴミ箱、犬・猫、鶏などの糞に含まれる DNA が雨天時等に調査地点に流れ込む可能性もある。調査者の衣類等からも混入する可能性もある。人間活動だけでなく、野生動物の糞など由来する DNA が混入する可能性もある。試料への不要な DNA の混入を可能な範囲で削減することが、調査精度を高めることにつながるため、採水地点周辺の排水の流入状況等も踏まえたうえで採水地点を選定すること、衣服や長靴に触れた河川水が試料に混入しないよう立ち位置等を工夫すること、採水地点毎に新しい使い捨て手袋等を用いて採水準備、採水を行うこと等に留意して現地調査を行う必要がある。ただし、微量な DNA を扱う環境 DNA 分析では、採水地点近傍に生息・生育する生物種以外の DNA の混入とその影響を完全に防ぐことは困難である。このため、分析で得られた生物リストをそのまま使うのではなく、その種がその環境にいることへの妥当性を考え精査することも重要である。
- 2) 実験環境の整備：環境サンプルのような「薄い」DNA を扱う部屋と、PCR 産物のような「濃い」DNA を扱う部屋を物理的に隔離する。また、実験実施日において作業者は「薄い」DNA を扱う部屋から「濃い」DNA を扱う部屋へと一方通行で作業を行うことを厳守することや、空調設備も含めた実験室間の空気の流れにも気を付けるなど、コンタミネーションの危険性を可能な限り低減するべきである。
- 3) DNA フリー器具の使用：実験に使う器機は未使用の新品を基本とする。残留 DNA を除染したものをを用いる場合、除染には次亜塩素酸ナトリウム溶液（例えば、0.1%濃度）への浸漬が有効であるが、繰り返し使用する中で金属の腐食やプラスチックの劣化などを引き起こす。こうした劣化を引き起こさない DNA 除染試薬が、各種メーカーより販売されており、ウェットティッシュタイプもある。チューブラックのような周辺器具については、紫外線照射による除染も有効であるが、陰になって UV が当たらない場所が生じないよう注意が必要である。

- 4) 使い捨て手袋の着用：作業時に触れるあらゆるものからコンタミネーションの危険性があるため、清浄な表面を保つために使い捨て手袋（医療用ゴム手袋やビニール製の手袋など）を着用する必要がある。野外サンプルの採取時には、地点間のサンプルのコンタミネーションを防ぐため、採取地点ごとに新品の手袋を使用する。その後の DNA 測定までの全工程にわたって常に手袋を着用し、自らの DNA あるいは手について食品等に由来する DNA によるコンタミネーションを防ぐ。いずれの作業においても、作業中に手袋にサンプルや試薬等が付着したときにはこまめに交換する。
 - 5) フィルターチップの使用：マイクロピペットを介したコンタミネーションを防ぐために、フィルター付きチップの使用が必須である。
 - 6) DNA 低吸着製品の使用：DNA は通常のプラスチック製品に吸着する性質があるため、可能であれば全工程、特に抽出時の極低濃度環境 DNA 溶液の取り扱いには DNA 低吸着規格のマイクロチューブなどの製品を使用することを推奨する。
 - 7) 部屋や機器の除染：マイクロピペットなどの実験器具、遠心機などの機器類を介したコンタミネーションがありうるので、定期的な（できれば実験日ごとに）除染を行うことを推奨する。また、器具類についてはその後汚染されないよう、除染済みの密閉できる清浄な容器に収納することを推奨する。また、空気を介したコンタミネーションもありうるので、実験室全体の定期的な掃除や空気清浄機の設置、作業内容に応じたクリーンベンチの使用も重要である。
- 1) 一般社団法人環境 DNA 学会（2025）環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 3.01. p5-6,9. を参考に記載

1. 調査概要

1.1 調査目的

魚類の生息状況を、環境 DNA 調査を基に把握することを目的とする。

1.2 調査対象

魚類を調査対象とする。

1.3 調査区域(調査対象河川区間)

事務所等が管轄する河川の区間を調査対象河川区間とする。

1.4 調査内容

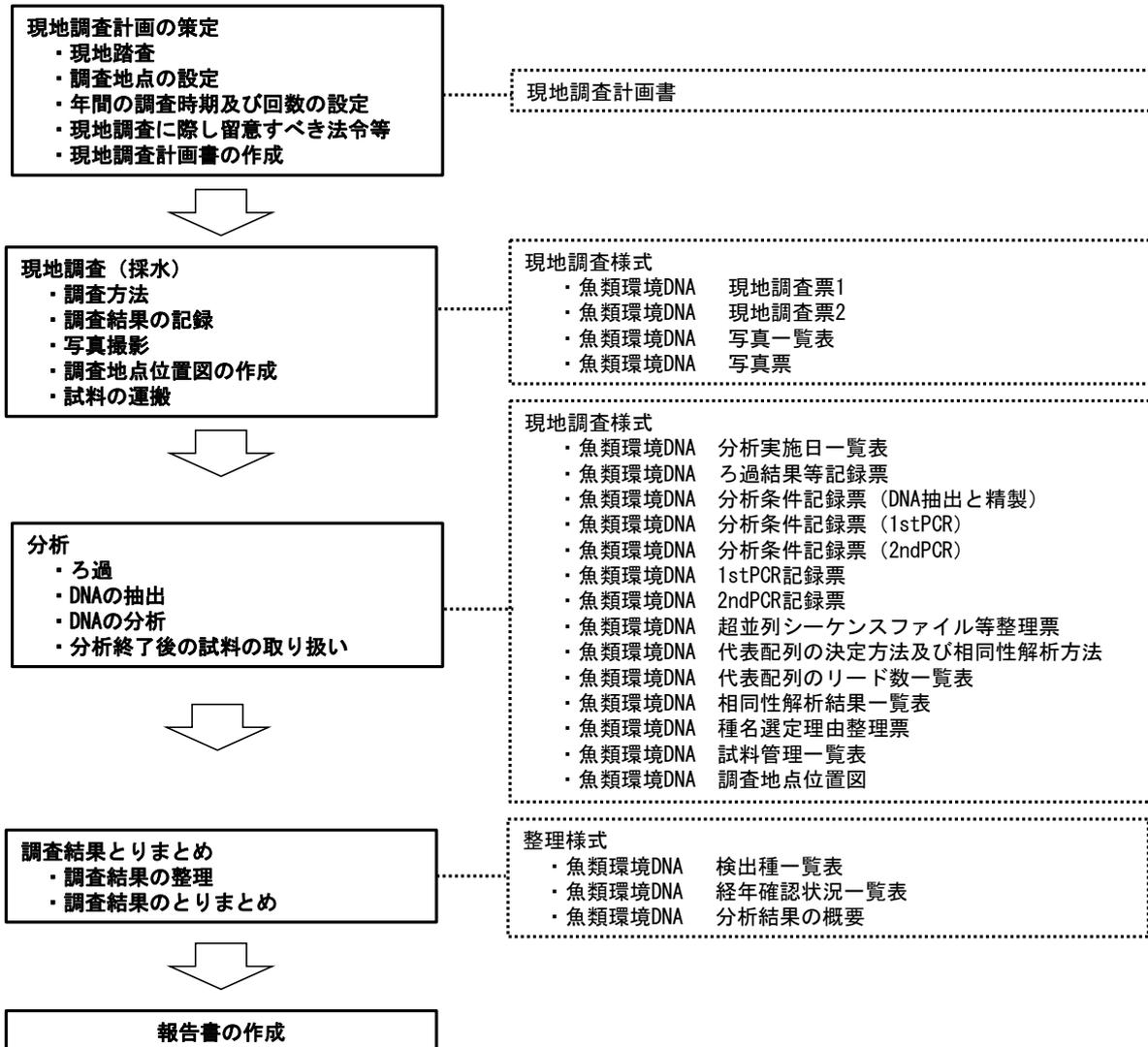
本調査では、現地調査及び分析を行う。現地調査は採水により行う。分析は魚類を対象とした環境 DNA メタバーコーディング法により行う。

1.5 調査頻度

本調査は、5年に1回以上の頻度で実施する。

1.6 調査手順

本調査の手順は、以下に示すとおりである。



※事前調査（文献調査・聞き取り調査）、考察・評価は実施しない

図 1.1 魚類環境 DNA 調査の手順

2. 現地調査計画の策定

現地調査の実施にあたって適切な調査結果が得られるように、各水系で作成されている最新の「全体調査計画書」、既往の河川水辺の国勢調査成果を踏まえ、現地踏査、調査地点の設定、年間の調査時期及び回数を行い、現地調査計画を策定する。

現地調査を年度初めに実施する場合には、現地調査計画の策定を調査実施の前年度に行うと、現地調査を円滑に実施しやすい。

2.1 現地踏査

現地調査計画の策定にあたっては、全体調査計画を踏まえ、調査対象河川の現地踏査を行う。現地踏査では、全体調査計画で設定した各調査地点の確認を行い具体的調査地点（採水地点）の設定を行うための状況の把握を行う。また、各調査地点の特徴を整理するとともに、概観がわかる写真を随時撮影する。

全体調査計画で設定された各調査地点の確認は、以下の視点により行う。

- (ア) 環境 DNA 調査の採水の観点からの調査地点の妥当性
- (イ) 調査地点へのアプローチの容易性
- (ウ) 採水に際しての安全性
- (エ) 地形や土地利用状況等の変化や工事等の影響による調査地点変更の必要性
- (オ) 上記を踏まえた具体的調査地点（採水地点）の位置

2.2 調査地点の設定

2.2.1 環境 DNA 調査の調査地点

(1) 基本的な設定

現地踏査の結果をもとに、基本的には以下のように設定する。

1) 調査地点（採水地点）の設定

- (ア) 全川の魚類の生息状況を網羅的又は俯瞰的に把握するため、河川縦断方向の距離間隔 2km ごとに調査地点を 1 地点設定することを基本とする。調査地点は流水環境を基本とする。最下流端の調査地点は 0km を基本とする。マイナス区間がある河川では、-2km などのマイナスの調査地点を設定してもよい。2km ごとに

設定した最上流の調査地点から、河川管理区間の上流端までの距離が 1km 以上離れている場合は、河川管理区間の上流端に調査地点を設定する。河川延長が長い河川（直轄管理区間延長が 100km 前後以上を目安）においては、河川縦断方向に、同様の瀬淵・ワンド・湛水域等の水域環境や水生植物帯等の水際環境が連続している区間において、環境の縦断方向の変化に応じた距離間隔（4km ごとなど）により調査地点を設定してもよい。

- (イ) 距離間隔（2km など）は、堤防上等の距離標に基づいて距離を設定する。
- (ウ) 河川管理区間延長が 2km 未満の直轄支川の場合、基本的に支川の下流端に調査地点を 1 地点設定する。
- (エ) 支川の下流端の調査地点は、本川の河川水の影響を受けない地点とする。
- (オ) 調査地点は左右岸いずれかを基本とするが、橋上等に設定してもよい。
- (カ) 距離標付近が複列流路となっている場合は、安全性を優先した上で流量が多い流路に調査地点を設定する。
- (キ) 距離標付近が湛水域を伴う横断工作物等となっている場合は、横断工作物等の下流側に調査地点を設定する。なお、距離標付近が湛水域の場合は、湛水域に調査地点を設定する。

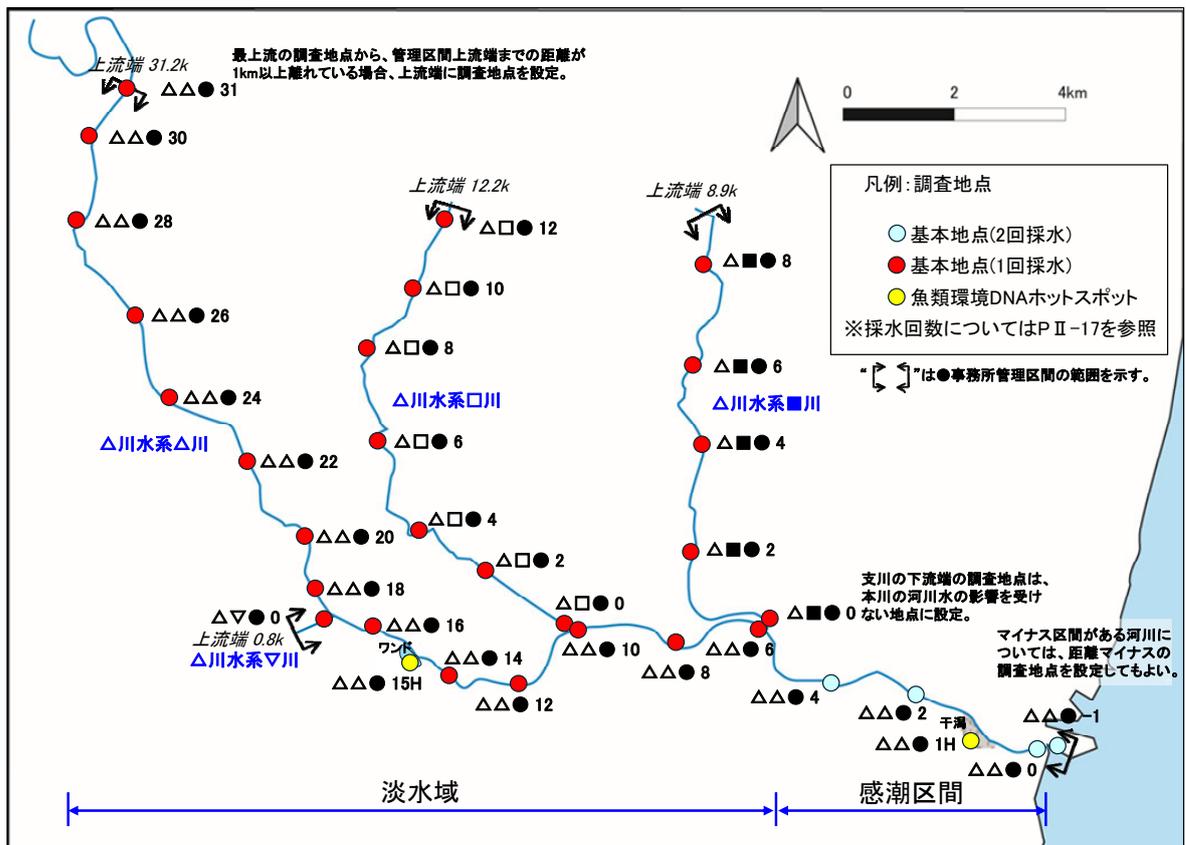


図 2.1 調査地点の設定イメージ

2) 調査地点（採水地点）を距離標付近からずらす場合

調査地点は距離間隔 2km ごとの距離標付近を基本とするが、以下に示すような場合は河川の上流側又は下流側に調査地点をずらすことができる。ずらす場合は距離標付近から上下流 500m の範囲内を目安に設定する。

(ア)安全の確保、調査の効率化等：工事による危険箇所、交通量が多く危険性を伴う又は車両の通行の妨げになる箇所、積雪が深くアクセスが困難である箇所、出水による地形の変化、植物の繁茂等で歩行困難な箇所等、安全を確保できない場合や調査効率が低下する可能性が高い場合。

(イ)偽陽性の防止：終末処理場及び生活排水流入箇所や、養殖場、食品工場等が付近にあり、水系に生息しない魚種を検出する（偽陽性が生じる）可能性が高い場合。この場合は、必ず上流側にずらす。

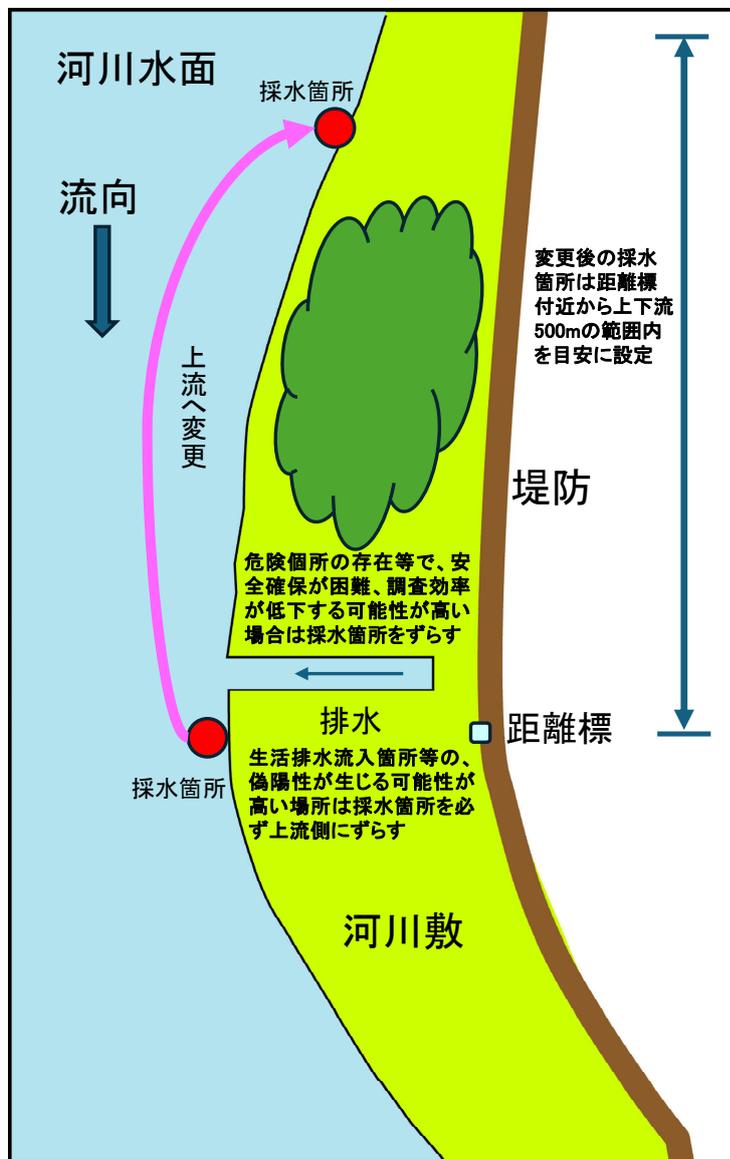


図 2.2 調査地点をずらす場合のイメージ

(2) 魚類環境 DNA ホットスポットの設定

全体調査計画を基本として、汽水域（干潮時に出現する干潟内の滞筋等）並びに、河川に特徴的な環境（ワンド・たまり等）を魚類環境 DNA ホットスポット*として、1 地点以上を調査地点として追加設定する。

※：魚類環境 DNA ホットスポットは、本川との接続に乏しいワンド・たまり、湧水及び干潟等の重要な環境に生息し、本川の調査地点では検出することが難しい魚類の生息状況の把握を目的とした調査地点である。選定にあたっては、これまでの調査結果（魚類採捕調査、魚類環境 DNA 調査等）及び現地踏査の結果を考慮して、水系におけるこれらの環境に生息する種を網羅的に検出できるように、調査区域内に 1 地点以上を設定する。

「汽水域における魚類環境 DNA ホットスポットの採水について」

汽水域に生息するハゼ類は生息環境が限られるため、河川水の環境 DNA を分析する環境 DNA 調査では検出されにくい。魚類環境 DNA 調査では、ハゼ類を中心とした汽水域の魚類の環境 DNA を捉えるために魚類環境 DNA ホットスポットを設定する。以下に汽水域における調査上の留意事項を記載する。

- (ア) 汽水域の魚類環境 DNA ホットスポットでは、干潟に生息する魚類の環境 DNA を主な対象とするため、汽水域の干潟に存在する水域（細流、水たまり、間隙水等）で採水を行う。
- (イ) 採水は、干潟が出現する干潮時に行う。

(3) 河川の湖沼域での調査地点（採水地点）の設定

- (ア) 河川の湖沼域では、湖岸の環境に応じた魚類相の把握を目的とした調査地点を設定する。

河川の湖沼域の例：網走湖、十三湖、小川原湖、霞ヶ浦、宍道湖・中海 など

- (イ) 湖岸における距離標（延長）により、2km ごとに調査地点を 1 地点設定することを基本とする。

- (ウ) 2km ごとの調査地点は、距離標（延長）を目安に、周辺の湖岸環境を代表する箇所に設定し、現地調査時に調査地点の湖岸環境の種別を記録する。

湖岸環境：自然河岸（抽水・浮葉・沈水植物帯、樹林、草地）、人工河岸など

- (エ) 河川や水路の流入部は、多様な魚類の生息が期待される一方で、河川や水路から流下した DNA を検出することがあるため、調査地点には設定しない。ただし、これまでの魚類採捕調査において流入部付近に調査地区が設定されている場合は、調査地点として設定する。採水地点は、流入河川の河川水の影響を直接受けず、流入河川に近い箇所に設定する。

- (オ) 湖岸延長が長い場合は、同じ湖岸環境が連続する区間において、4km ごとなど湖岸環境に応じた距離間隔により調査地点を設定してもよい。

(4) 調査地点番号の付け方

環境 DNA 調査の地点番号は、本書の「はじめに」の地区番号の設定に準ずる。

ただし、環境 DNA 調査の地点番号からその地点のおおよその位置を把握しやすくするために、河川のおよその縦断距離の 0.1km 単位を四捨五入して地点番号の距離(km)数字とする。魚類環境 DNA ホットスポットの調査地点では魚類環境 DNA ホットスポットを示す記号 (H) を距離数字の後ろに付す。

(例) : 調査地点 6.8km→▲▲■7 調査地点 7.2km→▲▲■7

魚類環境 DNA ホットスポット 0.7km→▲▲■1H

2.3 年間の調査時期及び回数の設定

調査回数は原則 2 回とする。1 回は初夏から秋に実施し、1 回は河川ごとの従来の採捕調査結果を基に河川ごとに設定する。

なお、設定に際しては、必要に応じて「全体調査計画」、「河川水辺の国勢調査 基本調査マニュアル [共通版]」の「全体調査計画策定の手引き」を参考にする。また、調査時期の設定根拠を整理する。

2.4 現地調査に際し留意すべき法令等

現地調査に際しては、以下に示す法令等に十分留意する。

なお、法令等によっては、事前に申請が必要となる場合がある。申請後、許可を得るまでに日数がかかる場合があるため、調査時期を考慮して早めに準備を行う。

表 2.1 現地調査に際し留意すべき法令等

法令等	関連機関 ^{※1}
自然公園法	環境省
港則法	海上保安庁

※1: 都道府県の関係部局が担当している場合がある。

(ア) 「自然公園法」により、指定期間中、立入りが規制される区域があるため留意する。

(イ) 特定港内又は特定港の境界付近で橋梁からの採水を含め作業を行う場合は、「港則法」に基づき、作業許可等が必要な場合がある。事前に海上保安部等に確認しておき、作業許可を得る等の必要な措置を講ずる。

(ウ) 橋からの採水については、橋の管理者への作業届が必要な場合もあるため、橋の管理者に問い合わせたうえで、採水作業を実施する。

2.5 現地調査計画書の作成

以上の内容を踏まえ、現地調査計画書を作成する。

なお、現地調査計画書は、現地調査実施時の状況に応じて随時変更・充実を図るものとする。

3. 現地調査

現地調査は、採水により行い、調査地点周辺における魚類の生息状況を把握できるように努める。なお、現地調査の実施にあたっては、特に安全性に留意するとともに、生息数が少ない生物や湿地・たまり等の環境にできるだけ影響を与えないように十分配慮する。

現地調査に際しての留意事項は、以下に示すとおりである。

- (ア) 各調査者は、調査目的(「1.1 調査目的」参照)を十分理解し、適切な調査結果が得られるように努める。
- (イ) 安全管理については、現地調査計画書の記載の他、現地調査時の現地の状況を考慮し事故等ないように努める。現地調査は、1組2名以上で実施する。
- (ウ) 試料に採水地点周辺に生息する生物以外に由来する DNA が混ざり汚染される(コンタミネーション)と、採水地点に生息しない魚種を検出する(偽陽性が生じる)可能性があり、調査結果の精度に影響を及ぼす。そのため、なるべくコンタミネーションを起こさないように留意して採水するよう努める。
- (エ) 現地調査は出水時や出水後など濁りがみられる時は極力行わないようにする。また、魚類採捕調査と同時に実施する場合は、漁具や長靴などに起因するコンタミネーションの防止、採捕による濁りの発生や環境の攪乱・魚類の分散による採捕調査後の濁った水や環境の攪乱によって、環境 DNA の分析や魚類の検出に影響を及ぼす恐れがあるため、採捕調査の実施前に採水を行うようにする。

「魚類環境 DNA 調査におけるフィールドブランクの考え方」

環境 DNA 調査では、採水時にフィールドブランク（精製水や蒸留水を現地で開封し、採水した水と同様の処理を施したもの）を作成し、コンタミネーションの有無を確認する。河川水辺の国勢調査における魚類環境 DNA 調査においても採水時にフィールドブランクを作成する必要がある。

- (ア) フィールドブランクによりコンタミネーションが疑われる場合であっても、河川水辺の国勢調査においては原則調査のやり直しは行わない。河川水辺の国勢調査においては、あらかじめ指定された季節に調査を行う必要があり、フィールドブランクの分析結果が出てくるまでに1ヶ月以上を要する事を鑑みると、たとえフィールドブランクによりコンタミネーションが疑われる結果が出てきたとしても、調査のやり直しを行うことは時間的に困難であると考えられる。よって、河川水辺の国勢調査の魚類環境 DNA 調査においては、フィールドブランクは当該調査におけるコンタミネーションの有無を示すものとして取り扱うこととする。そのため、採水瓶・採水バケツ等、それぞれの調査地点で取り扱う器具は、全て同じ条件下でコンタミネーションが起こらないよう事前に準備したものを使用する。同じ条件下で準備を行った機材を使った調査に対して、フィールドブランクは1個準備し、現地調査が終わった段階で、全てのフィールドブランクを1サンプルにまとめ、これをフィールドブランクサンプルとして分析を行う。
- (イ) 調査機材は、コンタミネーションが生じないように、以降の各章で示された方法で準備する。
- (ウ) 同一の環境下で用意した調査機材のコンタミネーションリスクは一律であると考え、フィールドブランクは調査回毎にひとつ作成する。ただし、複数の環境下で準備された調査機材がある場合は、同じ環境下で準備された調査機材毎にフィールドブランクを作成する。
- (エ) 1回の調査において複数のフィールドブランクを作成した場合は、まとめて DNA を抽出し、1検体として分析を行う。

3.1 調査方法

現地調査は、採水により行う。採水した試料は、調査者のおかれた状況により、任意で「実験室へ輸送（「3.5 試料の運搬」参照）」もしくは、「現場ろ過（「4.1.2 カートリッジ式フィルターを用いたろ過」参照）」のいずれかの対応を行う。

3.1.1 機材準備

現地調査で採水を実施するために必要な機材については、下表に示す環境 DNA 学会マニュアルに必要機材の例が記載されているので参照し準備する。なお、環境 DNA 学会マニュアルの改訂があった際は、最新のものに準拠するようにする。

表 3.1 現地調査に準備する機材についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	機材準備全般	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3. 採水及びろ過」	P. 15~16
2	現場ろ過	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3-1. 採水とカートリッジ式フィルターを用いた現場濾過」	P. 17~18
3	実験室へ輸送	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3-2. 採水とガラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過」	P. 30~31

(1)機材準備における留意事項

1)採水機材に関する事項

- (ア) 採水瓶は新品を使用する。採水瓶は調達後、なるべく早い時期に、事前にコンタミネーションリスクのない環境で、作業者は使い捨て手袋を着用の上、当該期の調査で使用する予定の全ての採水瓶のキャップを閉める（採水瓶の事前準備）。コンタミネーションのリスクは、魚の水槽や調査用具（長ぐつ・漁具等）が保管してある空間内や、空調や換気を介した混入もあるため留意する。
- (イ) 採水に使用するバケツは、バケツ採水が想定される地点数分以上をあらかじめ準備する。全てのバケツは、事前に 0.1%濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 30 分浸し、使い捨て手袋を着用のうえ、水道水で塩素をすすぎ流した後、精製水や蒸留水で表面を洗い流す。その後、コンタミネーションリスクのない環境で風乾（タオル・ふきんでは拭き取らない）させビニール袋に個包する。小さな製品はペーパータオルの上に置きペーパータオルを被せた状態で風乾させビニール袋に個包する。ロープも同様に除染する。

- (ウ) 予期しない事象のためやむを得ずバケツや現地機材を地点間で使い回す場合に備え、泡状の塩素消毒剤、それを拭き取るためのペーパータオルや使い捨て手袋を用意する。塩素消毒剤以外の資材は1地点で使用する数量に個包する。
- (エ) 採水瓶は、採水予定数量の他、フィールドブランク用の採水瓶を用意する。
- (オ) 採水瓶のラベルを事前準備すれば、ラベル記載漏れのミスを防止できるとともに、効率的に採水を実施できる。
- (カ) フィールドブランク 1 検体あたり 1L の精製水や蒸留水を準備する。
- (キ) 使い捨て手袋は、採水地点・タイミング毎に取り換えられるよう、予備を含めた十分量を用意する。
- (ク) 現地で採水時に取り扱うもの（ペーパータオル、使い捨て手袋、保存に関する薬品、夾雑物（植物片やゴミ等）対策の水切りネット等）は、地点ごとに個包することを推奨する。
- (ケ) クーラーボックス、保冷剤については、環境 DNA 調査専用のものを用意する。また、異なる水系や調査時期のコンタミネーションを防ぐため、使用実態に応じて次亜塩素酸ナトリウム溶液や市販の DNA 除去剤を用いて除染する。除染後は次亜塩素酸ナトリウム溶液や DNA 除去剤は水によるすすぎ、拭き取りののち、乾燥させ完全に除去する。
- (コ) 採水した試料に DNA の分解抑制を目的として薬品を添加する場合（「3.5 試料の運搬」参照）、あらかじめコンタミネーションリスクのない室内等で 1 試料に必要な量をマイクロチューブ等に分注する。分注した薬品は想定される試料数以上準備する。

2)現場ろ過の機材に関する事項

- (ア) 現場ろ過を行った試料は、組織を安定させる試薬の添加、ドライアイスによる冷凍が必要となる。その後、試料のコンタミネーションが生じないように、個別に個包する。
- (イ) 現場ろ過で使用する消耗品類、試料に接する部分の資材は、コンタミネーションのリスクを低減させるために、あらかじめ地点毎に個包する。
- (ウ) ろ過試料の保存に RNA 安定化溶液や DNA 抽出用のバッファの添加を行う場合は、予め必要数分個包する。なお、組織用 RNA 安定化溶液は水生環境有害性（急性）物質である硫酸アンモニウムを含むため取扱には注意が必要である。
- (エ) 実験室外でろ過を行う場合の機材等の取扱いも、この項に準じた配慮を行う。

3.1.2 採水方法

(1)採水方法

現場での採水は、採水瓶で直接採水する方法と、バケツを用いて採水する方法がある。水際にアプローチできる地点では採水瓶を用いて直接採水する。水際にアプローチできない橋上等の場所で採水する場合はバケツ等を用いる。

採水量は採水瓶 1L の採水を基本とする。バケツを用いる場合は環境水で共洗いした後、1～複数回に分けて採水し採水瓶に移し替え、1L の採水を行う。なお、バケツにより複数回に分けて採水する場合でも、同一地点であればバケツの交換や消毒は不要である。

採水時には常に使い捨て手袋を着用し、コンタミネーション防止のため採水地点ごとに取り替える。使用する機材も、適宜塩素系漂白剤を用いて除染する。

なお、採水時のコンタミネーションの有無を確認するために、実験室へ輸送する場合も、現場ろ過を実施する場合も、フィールドブランク（精製水や蒸留水を現地で開封し、採水した水と同様の処理を施したもの）を作成する。

現地調査中の試料は、保冷剤や氷を用いて 10℃以下を目安に冷暗条件で保管する。

採水方法の詳細は、下表に示す、環境 DNA 学会マニュアルの「採水および実験室への輸送」、環境省手引きの「環境 DNA 試料の採水手順」に準拠する。なお、環境 DNA 学会マニュアル及び環境省手引きの改訂があった際は、最新のものに準拠するようにする。

表 3.2 採水方法についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	採水	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3. 採水及び濾過」	p. 15～37
2	採水	環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）第 1 版	「4. 現地調査（採水）」	p. 35～43

(2)採水回数

各調査回における調査地点の採水回数は以下のとおりとする。

基本地点（1回採水）：淡水域及び感潮区間のうち干潮時に干潟がみられない区間（河口を除く）では、調査回毎に1地点あたり1回採水する。感潮区間のうち干潮時に干潟がみられない区間では、採水は下げ潮時または干潮時（順流時）に行う。

基本地点（2回採水）：河口及び感潮区間のうち、河口から干潮時に干潟がみられる区間までは、調査回毎に1地点あたり2回採水する。採水は上げ潮時と下げ潮時に行う。

魚類環境 DNA ホットスポット：調査回毎に1地点あたり1回採水する。汽水域の干潟に設定された魚類環境 DNA ホットスポットでは干潮時に1回採水する。

(3)採水における留意事項

- (ア) 出水直後等の河川の濁りが強い場合は採水しない。
- (イ) ワンド・たまりを除いた水深が浅く流れのない水際等での採水は避け、上下流、流心、対岸などの流れのある箇所での採水を行う。
- (ウ) 採水は使い捨て手袋を着用して行い、採水地点毎に取替える。
- (エ) 採水瓶を用いて採水する際は、採水前に現地の水で2～3回以上共洗いする。
- (オ) 共洗いに使用した水は採水地点の下流側や周辺の陸地等、採水試料に混ざらない場所に捨てる。
- (カ) 採水は、河川の表層（概ね0～20cm程度）で実施する。
- (キ) 採水時には、底泥の巻き上げによる濁水が試料に混ざらないように採水する。
- (ク) 目に見えるサイズの夾雑物（植物片やゴミ等）が採水瓶に混入しないように留意する。
- (ケ) 河岸からの採水を基本とし、流れのあるところで上流側を向いて採水する。
- (コ) 河岸からでは流れのあるところでの採水できない場合は、川に入り調査者の長靴等に触れた河川水が試料に混入しないよう、上流側を向いて採水するか、もしくはバケツを用いて採水する。
- (サ) 現地の記録として水質を計測する際は試料に水質計測による影響が出ないように計測する（採水と計測の実施をずらす、影響のない位置（採水者の下流側等）で計測する等を行う）。
- (シ) 採水後の採水瓶は地点毎にビニール袋等で個包することを推奨する。

(4) フィールドブランク作成に関する留意事項

- (ア) フィールドブランク用の精製水や蒸留水は現地で開栓する。
- (イ) 採水瓶のみを用いて採水する場合（バケツを用いない場合）は、フィールドブランク用の採水瓶に精製水や蒸留水 1 L 注ぐ。調査回毎に 1 検体を基本とし、調査が複数日にまたがる場合は最終日に作成する。ただし、採水瓶の事前準備（3.1.1(1)機材準備における留意事項 参照）するタイミングが異なる、または異なる製品の採水瓶を用いる場合は、タイミング・製品の組み合わせ毎にフィールドブランクを作成する。
- (ウ) バケツを使用する場合は、バケツを使用する地点数 + α のバケツを事前に準備し、これを使用する。バケツをビニール袋から取り出し、精製水や蒸留水を 1 L 程度入れてバケツの表面をまんべんなくすすいだ後、フィールドブランク用の採水瓶に移す。バケツに対するフィールドブランクは調査回毎に 1 試料を基本とし、最初にバケツで採水を行う地点で作成する。調査が複数日にまたがる場合も 1 回作成すればよい。ただし、異なるタイミングで除染を行ったバケツを用いる場合は、除染タイミング毎にフィールドブランクを作成する。
- (エ) 採水バケツは、地点数分をあらかじめ用意することを基本とするが、やむを得ない事情により現地でバケツを塩素剤にて除染して使用する場合は、あらかじめ準備した精製水や蒸留水で 2~3 回以上バケツの表面をまんべんなくすすぎ、塩素が残留しない状態としたうえで、精製水や蒸留水 1 L 以上をバケツに注ぎ採水瓶に移す。この時のフィールドブランクは、他のフィールドブランクとは分けてる過を行い、個別に DNA の抽出・分析を行う。また、当該地点のサンプルが、除染使用したバケツを使用したものである旨、現地調査様式 1 の備考欄にその旨記載する。

3.2 調査結果の記録

現地調査における調査環境及び調査結果について、以下のとおり記録する。

3.2.1 調査環境の記録

現地調査を行った調査地点について、周辺環境(天気、水質等)を記録する(現地調査様式 1)。

(1) 調査地点

調査地点の地点番号、河口からの距離、採水場所等について、以下の項目を記録する。

- (ア) 地点番号: 調査地点の番号を記録する。

- (イ) 試料名: 試料名 (半角英数字で任意に設定) を記録する。試料名は調査回、調査地点、採水回 (採水タイミング) が異なる場合は別の名前を付け、業務内で重複しない固有のものとする。
- (ウ) 河川名: 採水箇所の河川名 (本川または支川) を記録する。
- (エ) 距離 (km): 採水箇所の河口からの距離を記録する。
- (オ) 汽水域の有無: 採水箇所について、汽水域の該当有無を記録する。
- (カ) 採水箇所: 採水箇所を川岸、橋上、湖岸から記録する。
- (キ) 左右岸: 採水箇所の位置情報 (左岸、右岸、中央) を記録する。採水箇所が湖岸の場合は湖岸と記録する。
- (ク) 採水環境: 採水箇所の環境を、早瀬、平瀬、淵、とろ、ワンド、たまり、干潟、湛水域から記録する。湖岸で採水を行う場合に、湖岸環境を自然河岸 (抽水・浮葉・沈水植物帯)、自然河岸 (樹林)、自然河岸 (草地)、人工河岸から記録する。
- (ケ) 緯度・経度: 採水箇所の緯度・経度を記録する。測地系は JGD2024/ (B, L) とする (10 進法)。

(2) 調査時の状況

調査時期、調査時刻、天候等について、以下の項目を記録する。

- (ア) 調査回、季節、採水年月日: 調査回、季節、採水年月日 (年は西暦) を記録する。
- (イ) 採水時刻: 採水を行った時刻 (24 時間表示) を記録する。
- (ウ) 潮汐: 調査地点が汽水域の場合、調査時の潮汐 (上げ潮、下げ潮、干潮、満潮) を記録する。
- (エ) 気温: 採水時の気温を 1°C 単位で計測し、記録する。
- (オ) 天候: 採水時の天候を記録する。

(3) 水質等

水温、透視度等について、以下の項目を記録する。

- (ア) 水温: 採水箇所の表層水温を 0.1°C 単位で計測し、記録する。
- (イ) 透視度: 採水箇所の透視度を、50cm 以上の透視度計を用いて 1cm 単位で計測し、記録する。用いる透視度計の高さは業務内で統一する。
- (ウ) pH: 採水箇所の pH を計測し、記録する。
- (エ) 電気伝導度 (EC): 採水箇所の電気伝導度 (mS/cm) を計測し、記録する。
- (オ) 流速: 採水箇所の表層の流速を①遅い (0.3m/s 未満)、②普通 (0.3~0.6m/s)、③速い (0.6m/以上) の 3 段階を目安に目視で記録する。
- (カ) 塩分濃度 (%): 調査地点が汽水域の場合、採水箇所の塩分濃度を記録する。

3.2.2 試料に関する記録

現地調査において採水した試料の情報を記録する(現地調査様式 1)。

(1) 採水方法等

採水方法、採取容器等について、以下の項目を記録する。

- (ア) 採水機材: バケツを用いた採水、直接採水のどちらを用いたか記録する。
- (イ) 採水容器: 採水に用いた容器を記録する。
- (ウ) 採水水深: 採水水深を cm 単位で記録する。
- (エ) 魚影等の有無: 採水を行った際の、採水箇所付近の魚影の有無を記録する。

(2) 試料の情報

採水量等について、以下の項目を記録する。

- (ア) 採水量: 採水量を mL 単位で記録する。
- (イ) DNA 分解抑制対策: DNA 分解抑制対策の有無を記録する。対策を行った場合、使用した薬品名と添加量を mL 単位で記録する。
- (ウ) 保管方法: 現地調査中の試料の保管方法を保冷、冷凍の内から選択して記録する。採水後一時保管し、別の場所で現場ろ過を実施する場合、輸送～ろ過までの保管方法を保冷、冷凍から選択して記録する。

3.2.3 フィールドブランクに関する情報の記録

現地調査で作成したフィールドブランクについては、「調査環境の記録」及び「試料に関する記録」に示す項目のうち、以下の項目について記録する(現地調査様式 1)。

表 3.3 フィールドブランクに関して記録する項目

記録項目		記録する内容
調査環境の記録	調査地点	試料名
	調査時の状況	調査回、季節、採水年月日、採水時刻、気温、天候
	水質等	(本項目は記録しない)
試料に関する記録	採水方法等	採水機材、採水容器
	試料の情報	採水量、DNA 分解抑制対策、保管方法

また、フィールドブランクの情報として以下の項目を記録する(現地調査様式1のうち、フィールドブランクに関する情報)。

- (ア) 試料名(作成時):フィールドブランク作成時の試料名(半角英数字で任意に設定)を記録する。試料名は業務内で重複しない固有のものとする。
- (イ) 試料名(ろ過時):ろ過時の試料名を記録する。複数のフィールドブランクを1枚のフィルターでろ過した場合は、必ずろ過時に新たに業務内で重複しない固有の試料名(半角英数字で任意に設定)を命名する。
- (ウ) 試料名(抽出以降):DNA抽出以降の試料名を記録する。DNA抽出時にフィールドブランクを統合した場合は、必ずDNA抽出時に新たに業務内で重複しない固有の試料名(半角英数字で任意に設定)を命名する。
- (エ) 備考:1回の調査において複数のフィールドブランクを作成した場合は、複数作成した理由を記載する。例)バケツ採水、異なる状態の採水瓶を使用 など

3.2.4 採水地点の状況

採水地点の水域の状況及び水際の状況を、最新の河川環境基図等の既存資料を参考にしながら、河川環境基図等背景図に記録し、採水地点を記録する(現地調査様式2)。

なお、調査時の状況が、河川環境基図等の既存資料と異なる場合には、おおむねの水際線の位置を記録する等しておく。河川環境基図等がない場合は最新の平面図を用い、平面図がない場合は空中写真等を利用する。

3.3 写真撮影

3.3.1 写真撮影

現地調査実施時に採水地点、採水状況の写真撮影する。

(1) 採水地点の状況

各調査地点及び周辺の概観がわかるような写真を地点ごと、調査回ごとに撮影する。

(2) 採水状況

採水時の状況がわかるような写真を地点ごと、調査回ごとに1枚以上撮影する。この際に、河川の濁りの状況が分かるよう、光の反射等に留意して撮影をする。



図 3.1 採水に関する写真の撮影例（左：採水地点の状況、右：採水状況）

3.3.2 写真の整理

撮影された写真について、以下の項目を記録する(現地調査様式 3 及び 4)。

- (ア) 写真番号: 写真票を整理する際につけた番号を記録する。
- (イ) 写真区分記号: 撮影した写真について以下の写真区分記号のいずれかを記録する。

表 3.4 写真区分記号

写真区分記号	撮影対象
p	調査地点等
c	調査実施状況
o	その他

- (ウ) 写真表題: 写真表題を記録する。
- (エ) 説明: 撮影状況についての補足情報等を記録する (例: ○○橋より下流方向)。
- (オ) 撮影年月日: 写真を撮影した年月日 (年は西暦) を記録する。
- (カ) 地点番号: 写真を撮影した地点番号を記録する。
- (キ) 距離 (km): 河口からの距離 (支川・支々川の場合は合流点からの距離) (km) を記録する。
- (ク) ファイル名: 写真 (電子データ) のファイル名を記録する。ファイル名の先頭には、写真区分記号 (「表 3.4 写真区分記号」参照) を付記し、撮影対象がわかるような名前を付けるようにする。なお、禁則文字及び半角カタカナは使用しない。

3.4 調査地点位置図の作成

当該調査区域における調査地点の位置が把握できるように、主要な堰、橋梁、ダム等を記入した概要図や管内図等に調査地点の位置を記録する。また、調査対象河川、直轄管理区間、河川環境縦断区分を記録する。なお、スケールと方位を必ず記録する(現地調査様式 2、16)。

3.5 試料の運搬

採水した試料を実験室へ輸送する場合、採水後の試料中の DNA は時間の経過とともに分解されていくので、分解抑制のための対策を講じる必要がある。

DNA の分解抑制手法として、試料は直射日光、高温を避けるためクーラーボックスに入れ、保冷剤や氷等で冷蔵した状態で運搬する方法がある。なお、実験室が遠方の場合、試料を段ボール等に移し替えたうえで冷蔵便を使用して輸送する。

また、試料に対して、採水直後に薬品を添加することで DNA の分解を抑制する処理方法もある。ただし、特許が取得されている技術で、特許使用料が発生する場合もあるため、事前に確認したうえで、任意に実施してもよい。また、薬品を添加した場合でもなるべく冷暗条件で保管・輸送することが望ましいため、使用条件をよく確認する。さらに薬品を添加した場合にはろ過や DNA の抽出において前処理が必要になる場合もあるため留意する。使用する薬品は事前にコンタミネーションリスクのない環境で分注する。

試料運搬方法については、環境 DNA 学会マニュアル「採水および実験室への輸送」を参照する。なお、環境 DNA 学会マニュアルの改訂があった場合は、最新のものに準拠するようにする。

表 3.5 試料の運搬についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	試料の運搬	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3-2-2. 採水及び実験室への輸送」	p. 32~33

(1) 試料の運搬に関する留意事項

- (ア) 採水からろ過の開始までは 2 日 (48 時間) 以内を基本とし、最大でも 3.5 日 (84 時間 金曜朝採水～月曜夕方ろ過を想定) 以内に実施する。3.5 日を超えることが想定される場合は基本的に現場ろ過を行う。
- (イ) 冷蔵便による輸送を行う場合、特に連休を挟む場合は配達までに 3.5 日を超過する場合もあるため、事前に確認し調査を実施する。

4.分析

分析の工程は「ろ過」、「DNA の抽出」、「DNA の分析」に大別される。各分析工程においてもコンタミネーションリスクが存在するため、環境 DNA 学会マニュアルを参照し、細心の注意を払って作業を行う。

分析の各工程の実施日は工程毎に記録する。また、各工程の作業が複数回にわたる場合は分析回を記録する（現地調査様式 5）。

4.1 ろ過

採水した試料のろ過は現場で行う場合と実験室に輸送後に行う場合がある。ろ過に用いるフィルターの素材はグラスファイバーやメンブレンなどがあり、専用のホルダーに収めて使用するものや、カートリッジ式のフィルターなどがある。

フィルターの孔径は環境 DNA 学会マニュアルに準拠し、 $0.45\mu\text{m}$ または $0.70\mu\text{m}$ のものを使用する。なお、同一調査水系内では、分析条件を統一するためにフィルターの種類や孔径が同じものを用いる。

なお、コンタミネーション防止の観点からカートリッジ式フィルター以外を用いたろ過は、コンタミネーションリスクのない実験室等の環境下でろ過作業に習熟した者が行うことを基本とする。

4.1.1 ディスクフィルターを用いたろ過

ディスクフィルターを用いたろ過は、試料を実験室に輸送し行う。河川水辺の国勢調査では、ろ過量は 1 試料につき 1L を基本とする。

水の濁り等で 1L のろ過が困難な場合でも複数枚のフィルターを用いて可能な限り 1L をろ過し、DNA の抽出作業時にひとつのサンプルとして統合する。

水中の混濁物が多い場合は、目合いの大きいフィルターによるプレろ過を行い、そのろ液をろ過することで、ろ過水量を増やす事ができる。プレろ過を行った場合は、プレろ過に用いたフィルターも DNA の抽出に供する。なお、プレろ過フィルターを用いた場合や、フィルターの枚数が 3 枚以上のような場合は、サンプル中に分析阻害物質が多く含まれていることが想定されるため、DNA の抽出後に阻害物質除去キット等による阻害物質の除去を行う。

詳細な実験室でのろ過方法は、環境 DNA 学会マニュアル「グラスファイバーフィルターを用いた濾過」に準拠する。なお、環境 DNA 学会マニュアルの改訂があった際は、最新のものに準拠するようにする。

なお、フィールドブランクをろ過する際に、同一日に作成したフィールドブランクが複数ある場合は、まとめて1枚のフィルターでろ過する。

表 4.1 ディスクフィルターを用いたろ過についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	実験室でのろ過	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3-2-3. グラスファイバーフィルターを用いた濾過」	p. 33~34

4.1.2 カートリッジ式フィルターを用いたろ過

カートリッジ式フィルターを用いたろ過は、現地調査において現場でろ過を行う場合と試料を実験室に輸送し行う場合がある。

ろ過は、シリンジやアスピレーターによる加圧ろ過または吸引ろ過により行う。ろ過量は、1試料につき1Lを基本とする。水の濁り等で1Lのろ過が困難な場合でも複数枚(個)のフィルターを用いて可能な限り1Lをろ過し、DNAの抽出において統合する。

実験室においてフィールドブランクをろ過する際に、同一日に作成したフィールドブランクが複数ある場合は、まとめて1枚のフィルターでろ過する。

現地調査において現場でろ過を行う際は特にコンタミネーションに留意し実施する。現場ろ過後の試料はビニール袋等に個包し、輸送時の分解を抑制するためにドライアイスによる冷凍保管、もしくはろ過後に組織用RNA安定化溶液やDNA抽出用のバッファーなどを添加し保冷剤や氷を用いて10°C以下を目安に保管することで、DNAの分解を抑制し輸送する。なお、フィールドブランクについても同様に現場でろ過を行う。

詳細なカートリッジ式フィルターを用いたろ過の方法については、環境DNA学会マニュアル「採水およびシリンジを用いた現場濾過」及び「アスピレーターを用いた現場濾過」に準拠する。なお、環境DNA学会マニュアルの改訂があった際は、最新のものに準拠するようにする。

シリンジやアスピレーターを用いたろ過以外にも重力ろ過手法もあるが、ろ過に長時間かかるためDNAの分解が進む可能性もあるため注意が必要である¹⁾。

表 4.2 カートリッジ式フィルターを用いたろ過についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	カートリッジ式フィルターを用いたろ過	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3-1-2. 採水およびシリンジを用いた現場濾過」	p. 19~21
2	カートリッジ式フィルターを用いたろ過	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「3-1-3. アスピレーターを用いた現場濾過」	p. 21~22

1) Oka, S. I., Miya, M., & Sado, T. (2022). Gravity filtration of environmental DNA: A simple, fast, and power-free method. *MethodsX*, 9, 101838.

ろ過の実施時には、下表のとおりろ過の状況を記録する（現地調査様式 6）。

表 4.3 ろ過の際に記録する項目

No.	記録項目		内容
1	試料名		試料名を記録する。フィールドブランクの場合は試料名（ろ過時）を記録する。
2	ろ過場所		ろ過を行った場所（室内または野外）を記録する。
3	フィルター種類		ろ過に使用したフィルターの種類を記録する。
4	孔径（ μm ）		使用したフィルターの孔径を記録する。
5	ろ過量（mL）		採水試料のろ過量を記録する。複数のろ紙を用いてろ過した際は合計ろ過量を記録する。
6	使用したろ紙等の数（枚）		ろ過に使用したろ紙、カートリッジフィルターの枚数、個数を記録する。
7	保管方法	現地ろ過時の現地～室内までの輸送	輸送中の保管方法（保冷材の入ったクーラーボックス等）を記録する。
		DNA 抽出まで	ろ過終了後のフィルターの保管温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）を記録する。

4.2 DNA の抽出

ろ過を行ったディスクフィルター及び、カートリッジ式フィルターより DNA を抽出する。

詳細な DNA 抽出方法は、ディスクフィルターを用いた場合は環境 DNA 学会マニュアル「グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出」に準拠し、カートリッジ式フィルターを用いた場合は、環境 DNA 学会マニュアル「カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出」に準拠する。抽出に用いる試薬の液量はフィルターの種類や使用する器具に合わせて増量してもよい。ただし、組成比は変更してはならない。溶出量は 100 μL を基本とする。なお、環境 DNA 学会マニュアルの改訂があった際は、最新のものに準拠するようにする。

フィールドブランクのフィルターが複数ある場合は、DNA 抽出過程における DNA の精製の段階（環境 DNA 学会マニュアル Ver. 3.01 「4-1-4（4-2-3） DNeasy カラムを用いた DNA の精製」参照）時にひとつの試料にまとめる。

また、DNA の抽出後に PCR 阻害の対策を目的とした DNA の精製を行ってもよい。PCR 阻害の対策については「4.3 DNA の分析」を参照すること。

表 4.4 DNA の抽出についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	ディスクフィルターからの DNA 抽出	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「4-2. グラスファイバーフィルターからの DNA 抽出」	p. 52~62
2	カートリッジ式フィルターからの抽出	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「4-1. カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出」	p. 40~51

DNA の抽出については、下表のとおり使用した抽出キット、溶出バッファー量（ μL ）、プロトコル上の代替法の使用、保管温度等を記録する。また、抽出後に DNA の精製を行った場合は精製方法を記録する。（現地調査様式 7-1）。

表 4.5 DNA の抽出の際に記録する項目

No.	記録項目	内容
1	使用キット	DNA 抽出キットの種類を記録する。
2	溶出バッファー量（ μL ）	溶出バッファー量を記録する。
3	プロトコル上の代替法等の使用	代替法等を使用した場合に記録する。

表 4.6 DNA の精製の際に記録する項目

No.	記録項目	内容
1	精製方法	使用キット及びプロトコル、溶出量等を記録する

4.3 DNA の分析

環境 DNA 分析は MiFish プライマー（Miya et al. 2015）を用いたメタバーコーディング法により実施する。分析は環境 DNA 学会マニュアルに準拠し、2-step Tailed PCR によるライブラリ調整、ライブラリ精製、次世代シーケンサーによる超並列シーケンスを実施する。

なお、ライブラリ調整では試料中に含まれる腐食物質等の PCR 阻害物質により分析が不調となる場合がある（PCR 阻害）。PCR 阻害が起きると試料中に DNA が含まれているにも関わらず非検出となる場合があり、検出種を過小評価する可能性がある。PCR 阻害が発生しないように阻害物質除去キットによる鋳型 DNA の精製、PCR の酵素の変更など任意の対策を講じ、可能な限り多くの種を検出できるよう努める。なお、鋳型 DNA の希釈については検出感度を下げる場合もあるため推奨しない。鋳型 DNA の精製を実施した場合は使用したキット及び手順を記録する（現地調査様式 7-1）。

詳細な DNA 分析の方法は、環境 DNA 学会マニュアル「環境 DNA メタバーコーディング」に準拠する。なお、環境 DNA 学会マニュアルの改訂があった際は、最新のものに準拠するようにする。

表 4.7 DNA の分析についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	DNA の分析	環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 3.01	「5-2. 環境 DNA メタバーコーディング」	p. 67~110

4.3.1 環境 DNA の分析条件

環境 DNA の分析の各工程においては、以下に示す条件にて実施するものとする。

(1)1stPCR

(ア) 1stPCR に用いる MiFish プライマーは、TE バッファーを用いて 5 μ M に希釈する。

(イ) 希釈済みの各種 MiFish プライマーを以下に示す比率で混合したものの使用を基本とする。

MiFish プライマーの混合比率 : U:U2:Ev2:L=4:2:2:1

U : MiFish-U 硬骨魚類用① (硬骨魚類全般に適用可能なユニバーサルプライマー)

U2 : MiFish-U2 硬骨魚類用② (アナハゼ類に最適化したプライマー)

Ev2 : MiFish-Ev2 板鰓類用 (サメ・エイ類に最適化したプライマー)

L : MiFish-L スナヤツメ用 (スナヤツメ類に最適化したプライマー)

また、一部の分類群では MiFish プライマーのプライマー配列に塩基の不一致が含まれており、これによる偽陰性が生じる可能性がある。環境省手引きに、塩基の不一致が確認されている分類群が整理されているので参照し、各河川の既往調査において、塩基の不一致がみられる魚類が確認されているのであれば、対象魚種の不一致部位を改変したプライマーを混合してもよい。混合する際は、MiFish-U が最大の比率となるよう留意する。

表 4.8 プライマー配列に含まれる塩基の不一致についての既往マニュアル記載箇所

No.	項目	マニュアル	マニュアル該当箇所項目	ページ
1	改変プライマーについて	環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き (淡水魚類・両生類) 第 1 版	「参考資料 6 環境 DNA 分析に関する参考情報」	p. 104~105

(ウ) 試薬の組成は、反応容量は 12 μ L (テンプレート量 2 μ L) を基本とする。

(エ) プライマーの終濃度は、フォワードプライマーミックス、リバースプライマーミックスそれぞれ 583nM 程度を目安とする。

(オ) 試料あたりの PCR レプリケートは 8 とする。

(カ) 試料間の濃度差から濃度の低い試料の検出感度が下がるため、1stPCR 産物の精製と濃度調整 (濃度 0.1ng/ μ L) は必ず実施する (環境 DNA 学会マニュアル「5-2-1-2. 1stPCR 産物の精製と濃縮」「5-2-1-3. 精製・濃縮済み 1stPCR 産物の定量と希釈」を参照)。

(キ) 1stPCR の結果、増幅が確認されなかった試料は、PCR 酵素を変える等の条件を調整のうえで再分析 (DNA 抽出した検体の再分析) を行う。再分析後もデー

タが得られない場合は、分析不調としデータが得られなかった要因を記載する。

(2)2ndPCR

- (ア) 試薬の組成は、反応容量 15 μ L (テンプレート量 1.86 μ L (濃度 0.1ng/ μ L) を含む) を基本とする。
- (イ) 室内に残存する過去のライブラリーに起因するコンタミネーションや、次世代シーケンサーのラン間のキャリーオーバーを防止するため、分析室の環境や使用する分析機器等に応じた適切なインデックス配列の設定を行うものとする。(環境 DNA 学会マニュアル「5-2-2-4. インデックス関連情報」を参照)。
- (ウ) インデックスホッピング (試料識別のために付加したタグの入れ替わり) 対策のため、Unique Dual Index 方式 (環境 DNA 学会マニュアル「5-2-2-1. 2ndPCR」を参照) を採用することを推奨する。なお、パターンドフローセルを採用している次世代シーケンサーを用いて超並列シークエンスを行う場合は、Unique Dual Index 方式を採用する。
- (エ) 2ndPCR 産物に含まれる非特異産物の影響で良好な結果が得られない場合があるため、ゲルの切り出し等による 2ndPCR 産物の精製を必ず実施する。(環境 DNA 学会マニュアル「5-2-2-2. 2ndPCR 産物の精製」を参照)。

(3)ライブラリ精製・超並列シークエンス

- (ア) 試料あたり 100,000 リード以上を得ることを目安として調整する。

4.3.2 環境 DNA の分析条件の記録項目

環境 DNA 分析の 1stPCR、2ndPCR の分析条件について、以下を記録する。

(1) 1stPCR 分析条件

1) 1stPCR 反応液組成

1stPCR で調整した反応液について使用した試薬等について、試薬名等 (DNA ポリメラーゼ、プライマーミックス、滅菌水等)、終濃度 (必要に応じて記載)、使用量 (μ L)、を記録する。また、備考欄に使用したプライマーの情報等を記載する (現地調査様式 7-2)。

2) 1stPCR 反応条件

1stPCR の過程における各ステップの温度 ($^{\circ}$ C)、時間 (s)、サイクル数を記録する (現地調査様式 7-2)。使用する DNA ポリメラーゼの特性に合わせ、適宜記載する。

3) 1stPCR 産物の精製

1stPCR 産物の精製方法、使用した製品等を記録する (現地調査様式 7-2)。

4) 1stPCR 産物の定量

1stPCR 産物の定量に使用した機材、使用した製品等を記録する（現地調査様式 7-2）。

(2) 2ndPCR 分析条件

1) 2ndPCR 反応液組成

2ndPCR で調整した反応液について使用した試薬等について、試薬名等（DNA ポリメラーゼ、プライマーミックス、滅菌水等）、終濃度（必要に応じて記載）、使用量（ μL ）、を記録する。また、備考欄に使用したプライマーの情報等を記載する（現地調査様式 7-3）。

2) 2ndPCR 反応条件

2ndPCR の過程における各ステップの温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）、時間（s）、サイクル数を記録する（現地調査様式 7-3）。使用する DNA ポリメラーゼの特性に合わせ、適宜記載する。

3) 2ndPCR 産物の精製

2ndPCR 産物の精製方法、使用した製品等を記録する（現地調査様式 7-3）。

4) 2ndPCR 産物の定量

2ndPCR 産物の定量に使用した機材、使用した製品等を記録する（現地調査様式 7-3）。

4.3.3 環境 DNA の分析結果の記録項目

環境 DNA の 1stPCR、2ndPCR の結果と分析方法について以下の項目を記録する。

(1) 1stPCR の結果の記録

1stPCR の結果について、下表の項目を記録する（現地調査様式 8）。

表 4.9 1ndPCR の結果で記録する項目

No.	記録項目	内容
1	試料名	試料名を記録する。フィールドブランクの場合は試料名（抽出以降）を記録する。
2	1stPCR 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	1stPCR 産物の精製後の魚類 DNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) を記録する。
	産物 ピーク (bp)	1stPCR 産物の精製後の魚類 DNA ピーク (bp) を記録する。

(2) 2ndPCRの結果の記録

2ndPCRの結果について、下表の項目を記録する（現地調査様式9）。

表 4.10 2ndPCRの結果で記録する項目

No.	記録項目	内容	
1	試料名	試料名を記録する。フィールドブランクの場合は試料名(抽出以降)を記録する。	
2	1stPCR産物	濃度 (ng/ μ L)	2ndPCRに用いた1stPCR産物の濃度 (ng/ μ L)を記録する。
		使用量 (μ L)	2ndPCRに用いた1stPCR産物の使用量を記録する。
3	インデクス配列	フォワード	使用したインデクス配列(フォワード)を記録する。
		リバース	使用したインデクス配列(リバース)を記録する。

(3) 分析方法等の整理

超並列シーケンスについて、下表の項目を記録する。（現地調査様式10）。

表 4.11 超並列シーケンスの際に記録する項目

No.	記録項目	内容
1	試料名	試料名を記録する。フィールドブランクの場合は試料名(抽出以降)を記録する。
2	使用機器	使用機器の種類を記録する。
3	試薬キット	使用した試薬キットの種類を記録する。
4	出力ファイル名	出力されたファイル名を記録する。

4.4 分析終了後の試料の取り扱い

「4.3 DNA の分析」に供した使用済みの抽出 DNA 試料は、業務完了まで-18℃以下で受注者が冷凍保管し、記録を行う（現地調査様式 15）。なお、試料を保管する際は環境 DNA 専用の冷凍設備で保管する。PCR 産物、魚類等の生物の個体や生物の組織等から抽出した DNA と同所では保管しない。

試料は業務の完了時に河川管理に資する環境 DNA 分析技術の調査・研究への活用を目的に土木研究所へ譲渡することを基本とする。

表 4.12 試料管理に関して記録する項目

No.	記録項目	内容
1	地点番号	地点番号を記録する。
2	試料名	試料名を記録する。フィールドブランクの場合は試料名(抽出以降)を記録する。
3	分析に供した量(μL)	分析に供した抽出 DNA の液量(μL)を記録する
4	保管温度(℃)	試料の保管温度(℃)を記録する。
5	管理責任者	管理責任者を記録する。

5. 調査結果とりまとめ

5.1 調査結果の整理

5.1.1 環境 DNA メタバーコーディング解析

「4.3 環境 DNA の分析」が完了すると、FASTQ ファイルが作成される。この FASTQ ファイルのデータを解析することにより、得られた塩基配列の由来となった魚類を同定する。

環境 DNA メタバーコーディングデータ解析は、不要な配列の除去や、エラーの補正等のデータ処理を行ったうえで、リファレンスデータベース（対象とする分類群の塩基配列情報を有するデータベース）と照合することで魚種を同定する。解析は複数のソフトウェアを組合せて実行するため「パイプライン」と呼ばれる。

環境 DNA メタバーコーディングデータ解析に使用されるパイプラインは MiFish や Claident 等が知られているが解析結果に大きな差はないと考えられ、それぞれのパイプラインには一長一短がある。そのため河川水辺の国勢調査では、環境 DNA メタバーコーディング解析に特定のソフトウェア（パイプライン）の使用を定めず、使用したソフトウェアを記録することとする。下表に代表的なものを紹介する。

表 5.1 環境 DNA メタバーコーディング解析に使用されるソフトウェア¹⁾

No.	ソフトウェア名	ソフトウェアが紹介されている文献
1	BLAST+ (blastn)	Camacho C. et al. (2009) BLAST+:architecture and applications. BMC Bioinformatics, 10:421.
2	Claident	Tanabe A. S. and Tojo H. (2013) Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A Benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants. PLOS ONE, 8(10):e76910
3	DADA2	Callahan B. et al. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods 13:581-583.
4	MiFish Pipeline	Sato Y. et al. (2018) MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. Molecular Biology and Evolution, 35(6):1553-1555
5	QIIME2	Bolyen E. et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37:852-857
6	USEARCH	Edgar R. C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 26(19):2460-2461
7	PMiFish ver. 2.4	Miya M. et al. (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. Fishries Science 86:939-970.

1) 環境省自然環境局生物多様性センター (2024) 環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き (淡水魚類・両生類) 第1版. p108.

環境 DNA メタバーコーディング解析結果の記録項目については、以下の内容を記録する。

(1) 代表配列の決定

代表配列 (相同性解析に供する塩基配列データ) の決定の際は、自由記述とし、主に下記の項目について記録する (現地調査様式 11)。

- (ア) 使用したソフトウェア (品質チェックソフト、配列の結合用ソフト、キメラ・ノイズ配列の除去ソフト) の名称
- (イ) リード配列の抽出方法 (例: プライマー配列に変異があるリード配列を除く等)
- (ウ) 抽出したリード配列の処理 (例: プライマー配列のみ削除、リード配列の後半○塩基を削除、○塩基以下となった配列を削除等)
- (エ) リード配列の結合 (例: 最小の重なりを○塩基とした等)
- (オ) 代表配列の抽出方法 (キメラ・ノイズ配列等の除去方法等)

(2) 相同性解析

代表配列をリファレンスデータベースと照合する相同性解析の際は、自由記述とし、主に下記の項目について記録する（現地調査様式 11）。

- (ア) 使用したソフトウェアの名称
- (イ) 相同性解析を実施した日付
- (ウ) 参照したデータベース（バージョン情報、参照した日付等）
- (エ) その他記載しておくべき解析条件（パラメーター設定等）等

(4) 代表配列のリード数の記録

得られた代表配列について、各代表配列の代表配列番号、代表配列、試料毎のリード数を記録する（現地調査様式 12）。

(5) 相同性解析結果の記録

相同性解析の結果、各代表配列についてリファレンスデータベースとの一致率の高い種の情報が得られる。相同性解析結果について以下の項目を記録する（現地調査様式 13）。

表 5.2 相同性解析結果について記録する項目

No.	記録項目	内容
1	代表配列番号	現地調査様式 12 で記録した代表配列番号を記録する。
2	配列の長さ (bp)	代表配列の配列長を記録する。
3	一致率 (%)	代表配列に対して、リファレンスデータベースとの一致率が第一～十位となる種の一一致率を記録する。
4	クエリカバレッジ (%)	代表配列に対して、リファレンスデータベースとの一致率が第一～十位となる種のクエリカバレッジを記録する。
5	アクセッション番号	代表配列に対して、リファレンスデータベースとの一致率が第一～十位となる種のアクセッション番号を記録する。
6	学名	代表配列に対して、リファレンスデータベースとの一致率が第一～十位となる種の学名を記録する。

5.1.2 解析結果の精査

環境 DNA メタバーコーディング解析の結果、「代表塩基配列」、「代表塩基配列のリード数」、「一致率の高い生物種リスト」が出力される。

「一致率の高い生物種リスト」はリファレンスデータベースとの照合により得られる結果である。このリストは、環境 DNA メタバーコーディング解析では種まで同定できない種群、リファレンスデータベースの誤登録等により同定結果に注意を要する種及び、採水を行った水系に生息していない種(偽陽性の疑いのある種)等が含まれる場合があるため、結果の精査を行う必要がある。

精査の方法は以下に示す手順で実施する。

①「一致率の高い生物種リスト」の中から一致率98.5%以上かつクエリカバレッジが90%以上の配列を抽出する。抽出されなかった配列については、リファレンスデータベースの更新等により将来的に同定可能になる可能性があるため、河川水辺の国勢調査入出力システムに配列を登録し、登録した配列について記録を行う。

②「河川水辺の国勢調査 MiFish 種名リスト (仮称)」と①で抽出した種名を照合し記録する(現地調査様式 14)。「河川水辺の国勢調査 MiFish 種名リスト (仮称)」では掲載種を「種名確定(種特定)」、「種名確定(高次分類群止め)」、「注意を要する種」の3つに分類する。

「種名確定(種特定)」: 環境 DNA により種まで同定可能な種

「種名確定(高次分類群止め)」: 環境 DNA では種まで同定できない種群

「注意を要する種」: リファレンスデータベースの誤登録等により、誤同定を引き起こすおそれのある種

「注意を要する種」については、系統樹の作成あるいは、「環境省誤同定チェックシート」を参照し種名を確定する。なお、「注意を要する種」は種名選定理由を記載する(現地調査様式 14)。

「河川水辺の国勢調査 MiFish 種名リスト (仮称)」に未記載の種については、「一致率の高い種リスト」の結果を使用し、「一致率の高い種リスト」の結果を使用したことを現地調査様式 14 の種名選定理由欄に記載する。

また、当該河川および当該水系における既往の河川水辺の国勢調査(魚類採捕調査及び魚類環境 DNA 調査)における出現状況を確認し、未確認の種などについては、偽陽性の疑いについて現地調査様式 14 に偽陽性が疑われる理由とともに記載することとし、リストからは除外しない。

5.1.3 解析結果の登録

河川水辺の国勢調査入出力システムに以下の3ファイルを登録する。

- ①塩基配列に関する生データ (FASTQ形式のファイル)
- ②一致率が高い生物種リスト (現地調査様式14)
- ③環境DNA一致率が高い生物種リスト (②に対して種名の精査及び注釈を付けたリスト)
(整理様式1)

5.2 調査結果のとりまとめ

現地調査結果及び調査結果の整理を踏まえ、今回の河川水辺の国勢調査で得られた結果のとりまとめを行うことが望ましい。

とりまとめの参考となる整理様式一覧は、以下に示すとおりである。なお、各様式の記入例については、「6.様式集」に示す。

表 5.3 整理様式一覧

様式名	概要	様式番号
魚類環境DNA 検出種一覧表	今回の河川水辺の国勢調査において確認された種について整理する。	整理様式1
魚類環境DNA 経年確認状況一覧表	既往及び今回の河川水辺の国勢調査において確認された種について整理する。	整理様式2
魚類環境DNA 分析結果の概要	今回の河川水辺の国勢調査の調査結果の概要を整理する。	整理様式3

5.2.1 検出種の整理

今回の河川水辺の国勢調査において検出された魚類について以下の項目を整理する (整理様式1)。

表 5.4 検出種の整理の際に記録する項目

No.	記録項目	内容
1	No.	整理番号を記録する。
2	目名	検出された魚類の目名を記録する。
3	科名	検出された魚類の科名を記録する。
4	種名	検出された魚類の種名を記録する。
5	注意を要する種	偽陽性の可能性がある種、フィールドブランクの試料から検出された種、コンタミネーション由来の疑いがある種について記録する。
6	試料名	確認された試料について記録する。フィールドブランクの場合は試料名(抽出以降)を記録する。

5.2.2 経年確認状況の整理

既往及び今回の河川水辺の国勢調査において検出された魚類について、以下の項目を整理する（整理様式 2）。

表 5.5 経年確認種の整理の際に記録する項目

No.	記録項目	内容
1	No.	整理番号を記録する。
2	種名	検出した魚類の種名を和名で記録する。
3	重要種	重要種に該当する場合にその指定区分を記録する。
4	外来種	外来種に該当する場合にその指定区分を記録する。
5	採捕で確認	過年度の魚類調査（採捕）にて確認されている種について記録する。
6	環境 DNA 分析	確認された魚類環境 DNA 調査の実施年度(西暦)を記録する。

5.2.3 調査結果の概要

今回の河川水辺の国勢調査における調査結果の概要について整理する（整理様式 3）。

6. 様式集

とりまとめる様式一覧は、以下に示すとおりである。また、各様式の記入例を次頁以降に示す。

表 6.1 様式一覧

様式名	様式番号
魚類環境 DNA 現地調査票 1	現地調査様式 1
魚類環境 DNA 現地調査票 2	現地調査様式 2
魚類環境 DNA 写真一覧表	現地調査様式 3
魚類環境 DNA 写真票	現地調査様式 4
魚類環境 DNA 室内分析実施日一覧表	現地調査様式 5
魚類環境 DNA ろ過結果等記録票	現地調査様式 6
魚類環境 DNA 分析条件記録票 (DNA 抽出と精製)	現地調査様式 7-1
魚類環境 DNA 分析条件記録票 (1stPCR)	現地調査様式 7-2
魚類環境 DNA 分析条件記録票 (2ndPCR)	現地調査様式 7-3
魚類環境 DNA 1stPCR 記録票	現地調査様式 8
魚類環境 DNA 2ndPCR 記録票	現地調査様式 9
魚類環境 DNA 超並列シーケンスファイル等整理票	現地調査様式 10
魚類環境 DNA 代表配列の決定方法及び相同性解析方法	現地調査様式 11
魚類環境 DNA 代表配列のリード数一覧表	現地調査様式 12
魚類環境 DNA 相同性解析結果一覧表	現地調査様式 13
魚類環境 DNA 種名選定理由整理票	現地調査様式 14
魚類環境 DNA 試料管理一覧表	現地調査様式 15
魚類環境 DNA 調査地点位置図	現地調査様式 16
魚類環境 DNA 検出種一覧表	整理様式 1
魚類環境 DNA 経年確認状況一覧表	整理様式 2
魚類環境 DNA 分析結果の概要	整理様式 3

魚類環境DNA 現地調査票 1

地方整備局等 ○地方整備局	事務所等 ■河川事務所	水系名 ▲▲川	河川名 ▲▲川	調査年度 20XX
------------------	----------------	------------	------------	--------------

地点番号	試料名	河川名	調査地点							調査時の状況								水質等					採水方法等				試料の情報					備考		
			距離(km)	汽水域の有無	採水箇所	左右岸	採水環境	緯度	経度	調査回	季節	採水年月日	採水時刻	潮汐	気温(°C)	天候	水温(°C)	透視度(cm)	pH	電気伝導度(EG)(mS/cm)	流速	塩分濃度(‰)	採水機材	採水容器	採水水深(cm)	魚影等の有無	採水量(mL)	DNA分解抑制対策			保管方法			
																												有無	薬品名等	添加量(mL)	現地		輸送～る過	
▲▲■8	Abc008	▲▲川	7.8	有	川岸	左岸	早瀬	35.1234567	139.1234567	1	夏	20XX/07/07	10:00	上げ潮	25	晴れ	20.1	60	6.7	40	遅い(0.3m/s未満)	32	直接採水	PE容器	0	無	1000	無				保冷	保冷	
		◆◆川		無	橋上	中央	平瀬							下げ潮							普通(0.3~0.6m/s)		バケツ採水			有:コイ	有	○○	100			冷凍	冷凍	
		▼▼川			湖岸	右岸	自然河岸(抽水・浮葉・沈水植物帯)							干潮							早い(0.3m/s以上)													
						湖岸								満潮																				
	NC1									1	夏	20XX/07/08	10:00		25	晴れ							直接採水	PE容器			1000	有	○○	100			冷凍	冷凍
	NC2									1	夏	20XX/07/08	15:00		25	晴れ							直接採水	PE容器			1000	有	○○	100			冷凍	冷凍
	NC3									1	夏	20XX/07/09	10:00		25	晴れ							直接採水	PE容器			1000	有	○○	100			冷凍	冷凍
	NC4									1	夏	20XX/07/09	15:00		25	晴れ							直接採水	PE容器			1000	有	○○	100			冷凍	冷凍
	NC5									2	秋	20XX/10/01	15:00		20	晴れ							直接採水	PE容器			1000	有	○○	100			冷凍	冷凍

フィールドブランクに関する情報

試料名(作成時)	試料名(ろ過時)	試料名(抽出以降)	備考*
NC1	NCF1	NCE1	採水瓶の事前準備のタイミングが異なる
NC2	NCF1	NCE1	採水瓶の事前準備のタイミングが異なる
NC3	NCF2	NCE1	採水瓶の事前準備のタイミングが異なる
NC4	NCF2	NCE1	採水瓶の事前準備のタイミングが異なる
NC5	NC5	NC5	

特記事項	
------	--

項目	氏名	所属機関
調査責任者		
採水担当者		
現地ろ過担当者		

*:1回の調査において複数のフィールドブランクを作成した場合は、複数作成した理由を記載例)バケツ採水、異なる状態の採水瓶を使用 など

魚類環境DNA 現地調査票 2

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
〇〇地方整備局	■ ■ 河川事務所	▲ ▲ 川	▲ ▲ 川	20XX

調査時の状況	調査回	季節	採水年月日	採水時刻	潮汐	気温(°C)	天候
	1	夏	20XX/07/07	10:00	上げ潮	25	晴れ

調査地点の記録	地点番号	試料名	河川名	距離(km)	汽水域の有無	採水箇所	左右岸	採水環境
	▲ ▲ ■ 8	Abc008	▲ ▲ 川	7.8	有	川岸	左岸	早瀬

魚類環境DNA 写真票

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
〇〇地方整備局	■ ■ 河川事務所	▲ ▲ 川	▲ ▲ 川	20XX

写真番号	1		
写真区分記号	p		
写真表題	調査地点の状況		
説明	地点全景		
撮影年月日	20XX/07/07		
地点番号	▲ ▲ ■ 8		
距離(km)	7.8		
ファイル名	p ▲ ▲ ■ 8全景7月.jpg		
写真番号			
写真区分記号			
写真表題			
説明			
撮影年月日			
地点番号			
距離(km)			
ファイル名			
写真番号			
写真区分記号			
写真表題			
説明			
撮影年月日			
地点番号			
距離(km)			
ファイル名			

写真区分記号

p: 調査地区等、c: 調査実施状況、s: 生物種、o: その他

魚類環境DNA 分析条件記録票 (DNA抽出と精製)

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
〇〇地方整備局	■ ■ 河川事務所	▲ ▲ 川	▲ ▲ 川	20XX

フィルターからのDNA抽出

使用キット	溶出 バッファー量 (μ L)	プロトコール上の代替法等の使用等	備考
製品名	100	● ● の処理を□ □ に変更した。	

鋳型DNAの精製

精製方法	備考
上欄でDNAを抽出したのち、DNAの精製のために使用した場合、その試薬やキット(分析阻害物質除去キットを含む)を記載する。	

魚類環境DNA 分析条件記録票(1stPCR)

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
〇〇地方整備局	■■河川事務所	▲▲川	▲▲川	20XX

1stPCR反応液組成

試薬名等	終濃度	使用量(μL)	備考
自由記載	必要に応じて記載		自由記載
			使用したプライマーの情報等を記載
			MiFish-E-F/R-v2 : MiFish-U-F/R : MiFish-U2-F/R=1:2:1
			など

1stPCR反応条件

ステップ	温度(°C)	時間(s)	サイクル数	備考
自由記載				自由記載
				DNA変性～伸長を繰り返して35サイクル
DNA初期変性	95	180	1	
DNA変性	98	20	35	
アニーリング	65	15	35	
伸長反応	72	15	35	
最終伸長	72	300	1	

1stPCR産物の精製

精製方法	使用した製品等	備考
自由記載		
カラム法、磁性ビーズ法など		

1stPCR産物の定量

使用機材	使用した製品等	備考
自由記載		

魚類環境DNA 分析条件記録票(2ndPCR)

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
○○地方整備局	■■河川事務所	▲▲川	▲▲川	20XX

2ndPCR反応液組成

試薬名等	濃度	使用量(μL)	備考
自由記載	必要に応じて記載		

2ndPCR反応条件

ステップ	温度(°C)	時間(s)	サイクル数	備考
自由記載				

2ndPCR産物の精製

精製方法	使用した製品等	備考
自由記載		

2ndPCR産物の定量

使用機材	使用した製品等	備考
自由記載		

魚類環境DNA 代表配列の決定方法及び相同性解析方法

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
〇〇地方整備局	■ ■ 河川事務所	▲ ▲ 川	▲ ▲ 川	20XX

代表配列(相同性解析に供する塩基配列データ)の抽出・整理方針

- ・使用したソフト等
- ・リード配列の抽出方法(プライマー配列に変異があるリード配列を除く等)
- ・抽出したリード配列の処理(プライマー配列を除くのみ、リード配列の後半○塩基配列削除、○塩基以下となった配列は削除等)
- ・リード配列の結合(最小の重なりを○塩基とした等)
- ・代表配列の抽出方法(キメラ配列等の除去方法等)

を記載する。

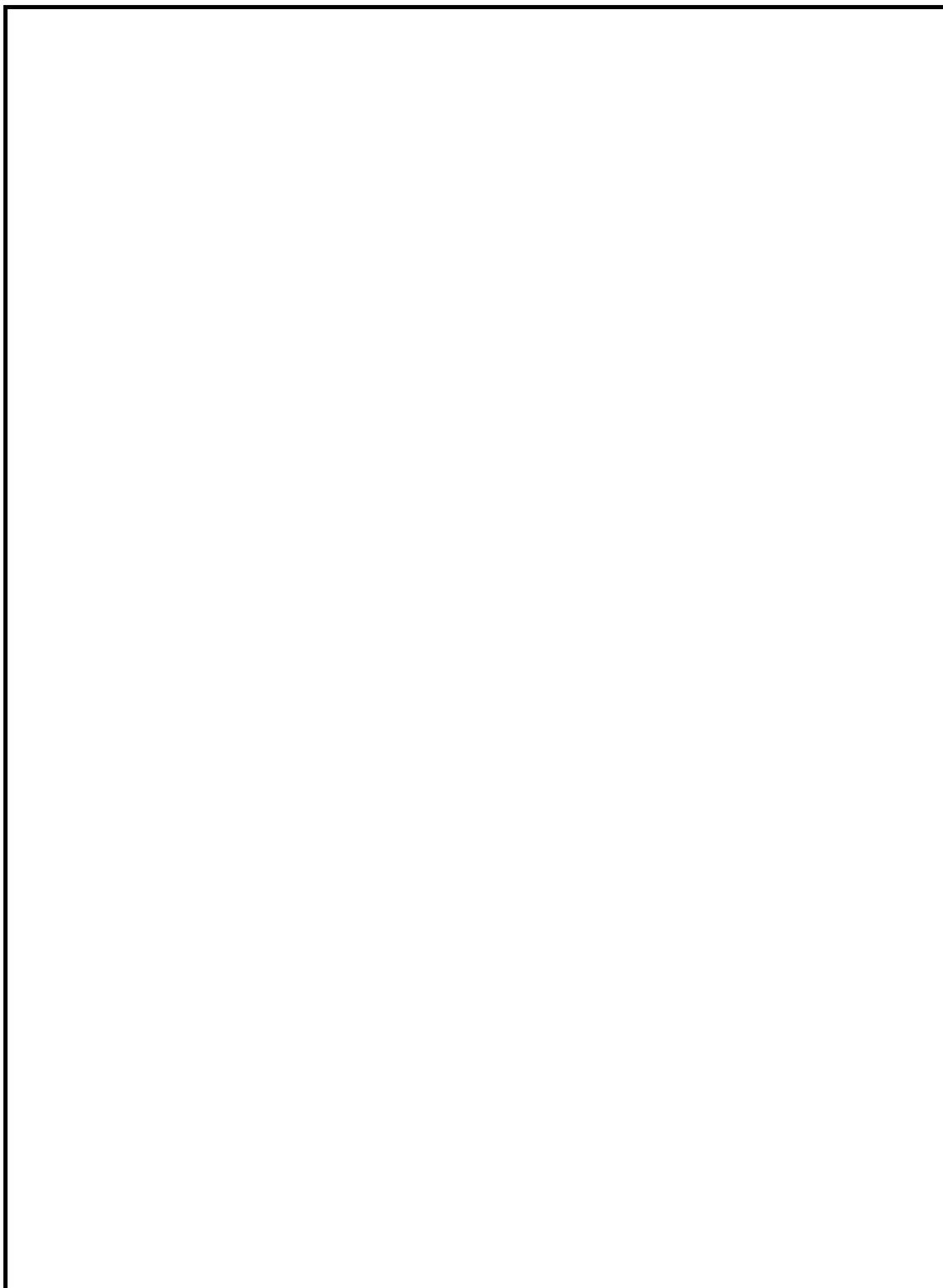
相同性解析方法

- ・使用したソフト等
- ・参照したデータベース(バージョン情報、参照した日付等)
- ・その他記載しておくべき解析条件等

を記載する。

魚類環境DNA 調査地点位置図

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
○○地方整備局	■ ■ 河川事務所	▲ ▲ 川	▲ ▲ 川	20XX



魚類環境DNA 分析結果の概要

地方整備局等	事務所等	水系名	河川名	調査年度
○○地方整備局	■■河川事務所	▲▲川	▲▲川	20XX

分析結果の概要	
重要種及び外来種等に関する情報	

令和7年9月の本マニュアルの検討にあたっては、「河川水辺の国勢調査に関する検討会」委員及び関係者の方々にご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

河川水辺の国勢調査に関する検討会 委員会

【委員】

大澤 剛士	東京都立大学 都市環境学部
◎萱場 祐一	名古屋工業大学 大学院工学研究科 社会工学専攻
中村 圭吾	国立研究開発法人土木研究所 流域水環境研究グループ
西廣 淳	国立研究開発法人国立環境研究所 気候変動適応センター
服部 敦	国立研究開発法人土木研究所
細谷 和海	近畿大学 名誉教授
○三宅 洋	愛媛大学 大学院理工学研究科
森 照貴	国立研究開発法人土木研究所 自然共生研究センター

(五十音順 ◎委員長 ○副委員長)
(委員の所属は令和7年3月時点)

【事務局】

国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課
国土交通省 国土技術政策総合研究所 河川研究部 河川研究室
公益財団法人 リバーフロント研究所

令和7年9月の本マニュアルの検討にあたっては、「河川水辺の国勢調査に関する検討会 魚類WG」委員及び関係者の方々にご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

河川水辺の国勢調査に関する検討会 魚類WG

【委員】

乾 隆帝	福岡工業大学 社会環境学部 社会環境学科
小泉 逸郎	北海道大学 大学院環境科学院 生物圏科学専攻
中島 淳	福岡県保健環境研究所 環境生物課
◎細谷 和海	近畿大学 名誉教授
源 利文	神戸大学 大学院人間発達環境学研究科
森 照貴	国立研究開発法人 土木研究所 自然共生研究センター

(五十音順 ◎委員長)
(委員の所属は令和7年8月時点)

【オブザーバー】

国立研究開発法人土木研究所 流域水環境研究グループ 流域生態チーム
田中 孝幸／村岡 敬子／中島 颯大／菅野 一輝／篠原 隆佑／釣 健司

(オブザーバーは前任者を含む)

【事務局】

国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課

公益財団法人 リバーフロント研究所
都築 隆禎／山元 優里奈／鈴木 敏弘／小林 慶浩／山下 博康

一般財団法人 水源地環境センター
安達 孝実／大杉 奉功／岡田 浩輔／川崎 敦

(事務局は前任者を含む)