

ダムにおける外来種モニタリングのための環境 DNA チップの開発について

DEVELOPMENT OF ENVIRONMENTAL DNA CHIP FOR MONITORING THE INVASIVE ALIEN FISHES IN DAM RESERVOIRS

加藤 靖広*・今村 史子**・郡司 未佳**・中尾 遼平***・赤松 良久***・岡村 浩****
Yasuhiro KATO, Fumiko IMAMURA, Mika GUNJI, Ryouhei NAKAO, Yoshihisa AKAMATSU and Hiroshi OKAMURA

Control and prevention of invasive alien species (IAS) are important issues for the environmental management of dam reservoirs. Recently, environmental DNA (eDNA) analysis has been used for monitoring IAS in aquatic ecosystems. In this study, as a simple and user-friendly eDNA method for monitoring IAS, we developed an eDNA chip analysis for monitoring three IAS, largemouth bass, smallmouth bass and bluegill sunfish, in dam reservoirs. The developed eDNA chip detected three IAS from water samples collected in five dam reservoirs, indicating that eDNA chip analysis can be used as a monitoring tool for IAS. For the establishment of an eDNA chip for biomonitoring, some challenges faced by other techniques like qPCR and metabarcoding remain, such as sensitivity at low target concentrations and “real-time” detections in the field and further improvement of performance in eDNA chip will be required.

Keywords : *eDNA, eDNA chip, Invasive alien species (IAS), reservoir, real-time qPCR*

1. はじめに

環境 DNA 技術は、生物モニタリングの新たなツールとして注目され、利用され始めている。

本稿では、中でも医療分野や衛生分野で多用されている DNA チップの環境分野への転用の可能性のひとつとして、主にダム湖等で問題となっている外来種のモニタリング等への活用を想定した DNA チップの開発結果について示す。

2. ダム湖等における外来種問題

外来種とは、国内に自然分布せず主に人為的な影響によって国外から持ち込まれた生物種の総称である。外来種は移入先の在来の生態系を脅かし、その地域の生態系および生物多様性を著しく喪失させる要因となっており、世界中で問題となっている。そのため在来の生態系の健全性を維持していくには、外来種への対策は必要不可欠な課題である。

外来種の侵入しやすい環境として、人の立ち入りが容易な人工水域であるダム湖があげられ、我が国においても外来種の侵入が確認されている。ダム湖に定着している外来種のうち有名な種としては、オオクチバス *Micropterus salmoides* やコクチバス *M. dolomieu*、ブルーギル *Lepomis macrochirus*

があげられる。これらの種は釣り等の用途のために人為的に持ち込まれ、現在では全国各地で定着している。また、魚食性が強く、在来魚を捕食することで在来の生態系を大きく改変するため、外来生物法によって特定外来生物に指定されており、積極的な防除の対象となっている。

このことから、ダム湖における外来魚の駆除と侵入の抑制は、ダム管理上の重要な課題のひとつとなっている。外来魚の駆除方法として、投網、刺し網、定置網等での捕獲が実施されている。また、繁殖および定着の抑制として、人工産卵床の設置および産卵床の破壊等が取り組まれている。しかし、これらの駆除対策はすべて人力で行われており、継続的な対策の実施には多大な労力とコストを必要とする。そのため、対策を効率的かつ継続的に進めていくためには、効果の効率的な把握と対策技術の向上に資する優れたモニタリング手法の開発が必要である。

3. 環境 DNA 分析による外来種モニタリングの課題

近年、環境中に存在する生物由来の DNA 断片を検出する環境 DNA 分析手法が、生物モニタリングの新たなツールとして注目され、利用され始めている。環境 DNA 分析手法は、現地調査では水等の環境サンプルを採集するだけでよいこと、種同定のための専門的な知識が不要であることから、時間的・コスト効率的な生物モニタリング手法であるとされている。

* 基盤技術事業本部 地球環境事業部 環境部

** 中央研究所 先端研究センター

*** 山口大学

**** 東洋鋼鉄株式会社

環境 DNA 分析手法としては、一般的にリアルタイム定量 PCR 分析が活用されており、その中でも特定の種を検出する種特異的な検出手法と、対象とする分類群の種を網羅的に検出するメタバーコーディングがある。

このうち、種特異的な検出は、特定の種について DNA の検出を行い、DNA 濃度から種のバイオマス量の定量評価が可能であるとされている。しかし、一度に検出できる種の数多くの場合 1 種であり、複数種の DNA を同時にかつ高精度に検出するためには、プライマー同士の相補関係やプローブ同士の干渉等の検出系の慎重な条件設定を求められる。

もうひとつの分析手法であるメタバーコーディングでは、生物群集のモニタリングにおいて高いパフォーマンスを有している一方、外来魚モニタリングにおいては、外来魚以外の種の情報も同時に検出するためコストが余分にかかること、超並列シーケンサーから出力されるデータの解析や解釈には高度な専門性を要すること等の課題もある。

そのため、外来魚モニタリングを継続的かつ簡易的に行うための新たなツール開発が求められている。

4. 環境 DNA チップの特徴

一般的に環境 DNA 分析にはリアルタイム定量 PCR 分析が活用されており、その有効性が確認されているが、上記のような課題があげられる。そのため、この課題を解決可能なダム湖における外来魚モニタリングの新規手法として、医療分野や衛生分野で多用されている DNA チップ技術を環境 DNA 分析手法に活用した、環境 DNA チップを用いることが有効であると考え、チップの開発を行った。

DNA チップ分析は、DNA マイクロアレイ技術を用いた分析手法である。今回開発した環境 DNA チップでは、シリコン基板の DNA チップ上の、複数の種それぞれの遺伝子に特異的な DNA プローブが固相化されたスポットに PCR 産物をローディングし、ハイブリダイゼーション法(相補性の高い DNA 配列と二本鎖を形成する性質を利用して特定の DNA を検出する手法)によって、対象とする DNA の有無を専用測定装置

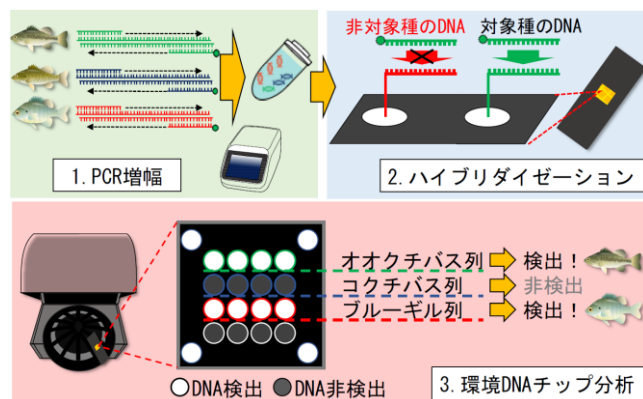


図-1 環境 DNA チップを用いた分析概要

「HySHOT」を用いて蛍光シグナルとして検出する。本手法を利用するメリットとしては、一回の計測で複数種の DNA を一度に検出できるため、リアルタイム定量 PCR より簡便にモニタリング検査が可能になる点や、メタバーコーディングでは判定が難しい種の在・不在が明確に判別できる点があげられる。

5. ダム湖における野外実証試験

(1) サンプル採取

本研究では、開発した環境 DNA チップの野外適用を目的として、ダム湖を調査地とした環境 DNA 調査を実施し、リアルタイム定量 PCR 法を用いた従来の環境 DNA 分析と比較することで、その検出性能や有効性について検討した。

野外適用の調査地として、七ヶ宿、三春、宮ヶ瀬、天ヶ瀬、布目の 5 ダムを選定した。これらのダム湖では、過去の調査で外来魚 3 種のうち一部またはすべてが採捕されていることが確認されている。

予備調査として、2019 年 12 月から 2020 年 1 月にかけて七ヶ宿 3 地点、三春 5 地点、宮ヶ瀬 4 地点で採水調査を実施した。各地点で環境水 1L を採水し、DNA の分解を抑制するために 10%塩化ベンザルコニウム水溶液を 1mL/L 添加した。その後、冷蔵状態で日本工営株式会社中央研究所へ輸送し、ステリバクスターフィルターでそれぞれのサンプルをろ過した。ろ過後のカートリッジフィルターは -20°C で保存し、その後の DNA 抽出に用いた。カートリッジフィルターからの DNA 抽出には、QIAGEN 社製の DNA 抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit)を用いた。DNA 抽出のプロトコルは、(一社)環境 DNA 学会発行の調査・分析マニュアル (Minamoto et al. 2020) に従って実施した。得られた各サンプルの抽出液は、その後の分析まで -20°C で保存した。

次に本調査として、すべてのダム湖で 2020 年 8 月に 1 回採水調査を実施し、七ヶ宿 2 地点、三春 5 地点、宮ヶ瀬 4 地点、天ヶ瀬 2 地点、布目 3 地点の採水地点を設けた。また、各

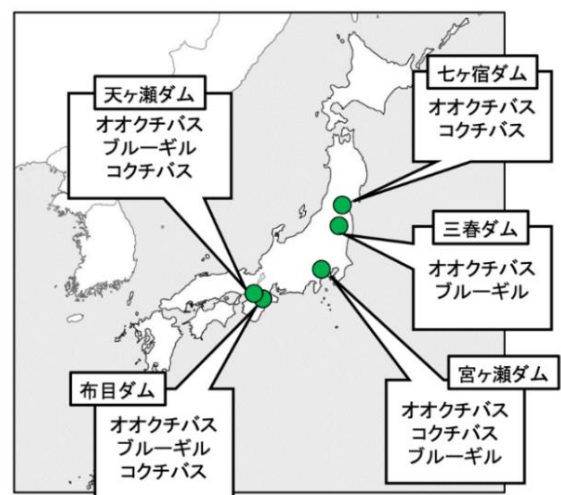


図-2 調査対象ダムと過去の調査で採捕された種

採水地点はすべてダム本湖内とし、ダム湖の水面全域に偏りなく配置した。各地点で環境水を 2L(1L×2 回)採水し、DNA の分解を抑制するために 10%塩化ベンザルコニウム水溶液を 1mL/L 添加した。ろ過および DNA 抽出については、予備調査と同様の手法で行った。

(2) 環境 DNA 分析

野外適用における種特異的な検出方法の有効性を確認することを目的として、予備調査で得られたサンプルについて、リアルタイム定量 PCR (qPCR) および環境 DNA チップによる環境 DNA 分析を実施した。qPCR では、外来魚 3 種の種特異的な検出および環境 DNA の相対定量を行った。種特異的な検出に用いるプライマーおよび TaqMan プローブ(遺伝子の定量を行うために蛍光標識を用いた一本鎖 DNA 断片)については、環境 DNA チップで用いた検出系と同様のものを使用した(Takahara et al. 2012, Jo et al. 2019)。qPCR における試薬条件は、以下の通りとした; TaqMan Environmental Master Mix (2×) 10 μL、種特異プライマーおよびプローブをそれぞれ 900nM と 125nM 含む Primer Probe Mix (20 ×) 1 μL、AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG) 0.1 μL、ミリ Q 水 6.9 μL、テンプレート DNA 2 μL を PCR 用ミックスとした。qPCR の温度条件は、50°C 2 分、95°C 10 分の熱変性の後、95°C 15 秒、60°C 1 分の増幅・伸長サイクルを 55 サイクルに設定した。また、それぞれのサンプルについて、3 回繰り返しの PCR 反復を設けた。各 PCR には、実験中のサンプル間のクロスコンタミネーションを検証するために、DNA の代わりにミリ Q 水をテンプレートに加えた PCR ブランクを作成した。

各 qPCR では、濃度既知のスタンダード DNA (3.0×10¹-10⁴ コピー/テンプレート DNA) の希釈系列を用いて検量線を作成し、環境 DNA 濃度の相対定量を行った。qPCR における各サンプルの反復数は 3 繰り返りに設定し、それらの定量値の平均値を算出することで、環境 DNA 濃度(copy /template) を推定した。また、検出/非検出(在不在)の閾値について、本研究では 1 copy/template と設定した。

環境 DNA チップでは、種特異的な検出系と MiFish プライマーの検出系(魚類の環境 DNA メタバーコーディングのためのプライマーセット)の両方を検討した。環境 DNA チップの試薬および実験条件は、種特異的な検出方法の検証と同様である。環境 DNA チップについては定量的な評価ができないため、蛍光の検出の有無による在不在の判定にとどめた。また、環境 DNA チップでは各サンプルの反復回数を 2 回とし、どちらか片方でも蛍光シグナルが閾値(S/N 比 2)以上であれば在判定とした。本調査で得られたサンプルについても、予備調査と同様の手法や条件で qPCR および環境 DNA チップ分析を行った。また、本調査ではサンプルに含まれる PCR 阻害物質

の影響が考えられたため、阻害に耐性のある酵素 (qPCR と同様のマスターミックス)を用いた環境 DNA チップによる検討を実施した。その際の PCR 試薬条件は、以下の通りとした; TaqMan Environmental Master Mix (2 ×) 10 μL、Primer Mix 5.7 μL (Msa primer mix (F and R) 0.7 μL、Mdo primer mix (F and R) 2 μL、Lma primer mix (F and R) 3 μL)、ミリ Q 水 1.3 μL、テンプレート DNA 3 μL を PCR 用ミックスとした。PCR の温度条件、およびハイブリダイゼーション反応条件は、種特異的な検出方法の検証と同様とした。

また、qPCR は環境 DNA の量的評価が可能であるため、環境 DNA 濃度と環境 DNA チップの在判定の関係を解析し、環境 DNA 濃度がどの程度あれば環境 DNA チップで検出できるのかについても検討した。比較の方法として、qPCR で検出された 3 種の環境 DNA 濃度について、環境 DNA チップで検出された地点とされなかった地点で分類し、ウィルコクソンの順位と検定を用いて両地点間の差異を検討した。

(3) 結果

1) 分析プロトコルの検討結果

環境 DNA チップによる現地サンプルの分析に先立ち、対象種(外来魚 3 種)の組織 DNA を用いて種特異的な検出方法の検討を行った。組織 DNA を用いた種特異性の検討では、種特異的な検出系および MiFish プライマーの両方の環境 DNA チップにおいて、3 種すべての種特異性を確認することができ、組織 DNA では対象種のみを増幅・検出していることが示された(図-3)。

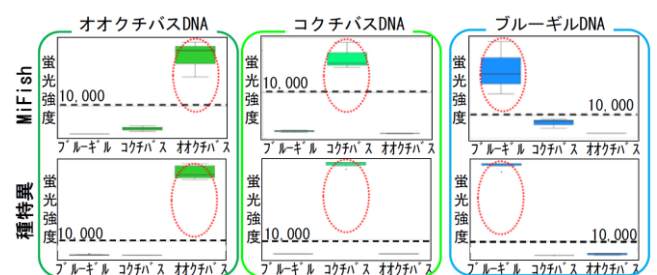


図-3 環境 DNA チップを用いた種特異性の確認結果

種特異的な検出および MiFish プライマーの環境 DNA チップを用いて、予備調査で得られた DNA サンプルから外来魚 DNA の検出を試みた。その結果、種特異的な検出の環境 DNA チップではほとんど対象種が検出されなかった一方で、MiFish プライマーの環境 DNA チップでは多数の地点で検出された(表-1)。

なお、表中では検出地点を+とし、非検出地点を-として示している。さらに、qPCR でも同様のサンプルを用いて種特異的な検出を実施したところ、多くの地点で検出されたものの、その DNA 濃度は非常に低くなっていた。qPCR とそれぞれの環

境 DNA チップの結果を比較したところ、MiFish プライマーでは地点数との大幅な乖離が見られたため、本調査に使用する環境 DNA チップは種特異的検出系が妥当であると考えた。

2) 現地サンプルによる環境 DNA チップの検出精度

本調査で得られた DNA サンプルを用いた環境 DNA 分析の結果を表-2 に示す。qPCR の結果では、七ヶ宿ダムを除くすべてのダム湖からオオクチバスの環境 DNA が検出されており、すべてのダムからブルーギルの環境 DNA が検出されていた。また、どちらの種も布目ダムで高い環境 DNA 濃度が検出されていた。オオクチバスおよびブルーギルの環境 DNA 濃度は天ヶ瀬ダムおよび七ヶ宿では非常に低く、qPCR でも定量限界を下回っていた。また、三春ダムおよび宮ヶ瀬ダムでは検出された地点間で環境 DNA 濃度の違いが大きく開いていることが確認された。一方で、コクチバスは宮ヶ瀬ダムと七ヶ宿ダムで

しか検出されず、濃度も非常に低くなっていた。また、qPCR において、すべてのサンプルで PCR 阻害は確認されなかった。

環境 DNA チップにおいても、各ダム湖で外来魚 3 種の環境 DNA を検出することができた(表-2)。また、この検出結果は qPCR と同様の傾向を示したが、qPCR に比べて検出地点数は低くなっていた(オオクチバス 36.3%、コクチバス 50.0%、ブルーギル 41.6%)。コクチバスの検出は 1 地点のみの確認であったが、qPCR の地点とは一致していた。

一方で、PCR 酵素を阻害耐性の強いものに変更した環境 DNA チップ分析(環境 DNA チップ+)では、オオクチバスとブルーギルにおいて大幅な検出感度の改善がみられた(オオクチバス 63%、ブルーギル 83%)(表-2 の赤矢印)。コクチバスでは同一ダム湖内において qPCR で検出されていない地点からコクチバスの DNA が検出されたが、検出地点の一致数は 0 地点となった。

表-1 予備調査における環境 DNA チップの分析結果

ダム湖名	地点番号	オオクチバス			コクチバス			ブルーギル		
		環境DNAチップ		qPCR	環境DNAチップ		qPCR	環境DNAチップ		qPCR
		MiFish	種特異		MiFish	種特異		MiFish	種特異	
三春	St. 1	+(在)	+(在)	-	+(在)	-	-	+(在)	-	-
	St. 2	-	-	-	+(在)	-	-	+(在)	-	-
	St. 3	-	-	+(在)	-	-	-	-	-	+(在)
	St. 4	-	-	-	+(在)	-	-	-	-	-
	St. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
七ヶ宿	St. 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	St. 7	+(在)	-	-	+(在)	-	+(在)	+(在)	-	-
	St. 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
宮ヶ瀬	St. 9	+(在)	-	-	+(在)	-	-	+(在)	-	-
	St. 10	+(在)	-	-	+(在)	-	-	+(在)	-	-
	St. 11	+(在)	+(在)	-	+(在)	-	-	+(在)	-	-
	St. 12	-	+(在)	-	-	-	-	-	-	-

* +(在) : それぞれの手法で検出された地点を示す
 * DNAチップではS/N比2以上、qPCRでは1copy/template以上を在とした

表-2 本調査における環境 DNA チップの分析結果

ダム湖名	地点番号	調査日	オオクチバス			コクチバス			ブルーギル		
			環境DNAチップ	環境DNAチップ+	qPCR	環境DNAチップ	環境DNAチップ+	qPCR	環境DNAチップ	環境DNAチップ+	qPCR
布目	1	2020/8/5	-	→ +(在)	+(在)	-	-	-	+(在)	+(在)	+(在)
	2	2020/8/5	+(在)	+(在)	+(在)	-	-	-	+(在)	+(在)	+(在)
	3	2020/8/5	-	-	+(在)	-	-	-	-	+(在)	+(在)
三春	4	2020/8/6	+(在)	+(在)	+(在)	-	-	-	+(在)	+(在)	+(在)
	5	2020/8/6	-	-	+(在)	-	-	-	-	-	-
	6	2020/8/6	-	-	+(在)	-	-	-	+(在)	+(在)	+(在)
	7	2020/8/6	-	→ +(在)	+(在)	-	-	-	-	→ +(在)	+(在)
	8	2020/8/6	-	-	+(在)	-	-	-	-	-	-
宮ヶ瀬	9	2020/8/13	-	→ +(在)	+(在)	-	-	-	+(在)	+(在)	+(在)
	10	2020/8/13	+(在)	+(在)	+(在)	-	→ +(在)	-	-	→ +(在)	+(在)
	11	2020/8/13	-	-	+(在)	+(在)	-	+(在)	-	→ +(在)	+(在)
	12	2020/8/13	+(在)	+(在)	+(在)	-	-	-	-	→ +(在)	+(在)
天ヶ瀬	13	2020/8/25	-	-	-	-	→ +(在)	-	-	-	+(在)
	14	2020/8/25	-	-	+(在)	-	-	-	-	-	+(在)
七ヶ宿	15	2020/8/27	-	-	-	-	-	-	-	-	+(在)
	16	2020/8/27	-	-	-	-	-	+(在)	-	-	+(在)

* +(在) : それぞれの手法で検出された地点を示す → : 検出感度が向上した地点を示す
 * 環境DNAチップ+は、PCR疎外に強いTaq(Environmental Master Mix)を使用
 * 環境DNAチップ、環境DNAチップ+では蛍光強度5000以上、qPCRでは1copy/template以上を在とした

また、qPCRで推定された環境 DNA 濃度の環境 DNA チップ分析における検出/非検出間の比較を図-4 に示す。オレンジ色と青色は、それぞれ環境 DNA チップで検出された地点の環境 DNA 濃度と、環境 DNA チップで非検出であった地点の環境 DNA 濃度を示している。環境 DNA チップにおける検出と非検出のデータ間には、統計的に有意な差が見られた(ウィルコクソン順位和検定、 $p < 0.05$)。コクチバスは検出された地点数が少なく、環境 DNA チップと qPCR 間の一致もなかったため、除外した。その結果、環境 DNA チップで対象種の検出された地点では、環境 DNA チップで検出されなかった地点よりも qPCR の環境 DNA 濃度が有意に高くなっていることが示唆された(図-4; $p < 0.05$)。

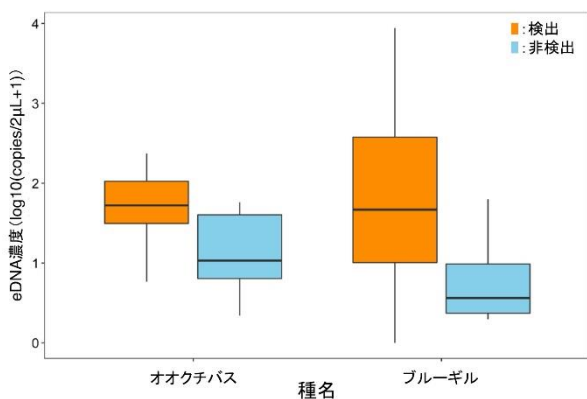


図-4 qPCRで推定された環境 DNA 濃度の環境 DNA チップ分析における検出/非検出間の比較

6. 考察

環境 DNA 分析を用いた新規のモニタリング手法として、環境 DNA チップの開発を行い、環境 DNA チップを用いて外来魚の環境 DNA を検出できることが示された。

種特異的検出系とユニバーサルプライマーである MiFish の 2 種類の検出系の環境 DNA チップへの適用を試みた結果、MiFish プライマーの環境 DNA チップでは組織 DNA では利用できたものの環境 DNA では野外適用は難しいことが分かった。一方、qPCR で利用されている種特異的検出系の環境 DNA チップは、組織 DNA およびダム湖の予備調査の両方で利用可能であった。

これには、(1) MiFish プライマーが対象種以外の魚類(たとえばコイ科等)や他の分類群(哺乳類や微生物)を増幅していること、(2) 蛍光検出のためのプローブの種特異性が低かったことが考えられた。(1) では、MiFish プライマーは魚類の DNA に加えて微生物等の非対象分類群の DNA を増幅することが知られており、非対象種である魚類や微生物の DNA が増幅されることで、対象種となる外来魚の環境 DNA の増幅効率が落ち、検出力の低下が起きたと考えられた。特に野外サンプルでは環境中の様々な生物が含まれているため、この影響

がより顕著になると考えられる。(2) では、種特異的に作成したプローブの特異性を担保できていなかったということである。これは、MiFish で増幅できる DNA 配列の中でプローブを作成したが種特異性の担保ができておらず、対象種以外の DNA や微生物等の DNA を環境 DNA チップで誤検出してしまった(偽陽性を示した)と考えられた。

よって、MiFish プライマーを環境 DNA チップに用いるのは、現状では不相当であると結論づけ、野外への適用には種特異的検出系の環境 DNA チップが妥当であることを確認した。

この種特異的検出系の環境 DNA チップを国内のダム湖 5 箇所の計 16 地点で野外適用した結果、それぞれのダム湖において外来魚 3 種の DNA を検出することができた。これにより、環境 DNA チップを用いてオオクチバス等の外来魚の生息モニタリングが可能であることが示された。

モニタリングにおける検出感度は、従来の環境 DNA 分析手法で外来魚検出に用いられている qPCR と比較すると、対象魚 3 種において、qPCR と環境 DNA チップの両手法で環境 DNA が検出できた地点を共有していた。

一方で、当初は従来の医療用の DNA チップに用いられる試薬を用いていたこともあり、環境 DNA チップの外来魚検出地点数は qPCR の地点数に比べて少なくなっており、qPCR よりも検出感度が若干落ちていることが示唆された。これは、湖水に含まれる腐植酸やアオコ等の懸濁物が PCR を阻害したことで、ターゲットの DNA の増幅効率が落ちてしまったためであると考えられ、再検査で qPCR と同様の阻害物による影響を受けにくい試薬により検出感度の大幅な改善がみられた(表-2、環境 DNA チップ+)。

ダム湖等の野外サンプルでは環境 DNA チップ分析を適用する際には、PCR 阻害の影響を考慮して分析手法を工夫することにより検出精度が向上することが確認できた。

7. 実用に向けて

開発した環境 DNA チップは、qPCR による種特異的な検出よりも多くの種を同時に検出でき、メタバーコーディングよりも簡易的に環境 DNA 分析を行えるツールとなると考えられる。

また、qPCR やメタバーコーディングでは分析者の専門性や技量によって得られる結果(定量値のばらつきや検出種数)や解釈(検出の閾値判定や種分類の精度)が異なることから、最終的な手法の統一化は困難な課題である。一方で、環境 DNA チップはすべて同一の製造ラインで作製される一定のクオリティをもった DNA チップであり、チップ上で指定した対象種のみを検出すること、種の在不在のみを判定する手法であることから、同じ環境 DNA チップを用いる限り、分析結果や解釈がほぼ一定になるという利点がある。また、一定のクオリティの環境 DNA チップで継続的な調査が可能であることから、ダム

湖の管理における外来魚の定期モニタリングを実施するうえで非常に有用なツールとなりえる。

一方で、環境 DNA チップでは、種特異的検出で実施可能な定量的な評価が実施できない。また、環境 DNA チップでは、多様な種を一度に解析できるメタバーコーディングとは異なり、対象種以外の分布は把握できない。そのため、ダム湖におけるモニタリングを行う際には、対象種（例えば外来魚）のみの分布をスクリーニングしたいのか、定量的な情報が欲しいのか、魚類相全体の情報が欲しいのか、といったように必要とする情報を得るための手法の使い分けが重要になってくるであろう。

なお、環境 DNA チップは最大 32 種を分析対象とすることが可能であるため、今後は重要種や魚類以外の分類群も含めて、モニタリングの目的に応じた対象種を検討し、汎用性の高い技術としていくことが重要であると考ええる。

表-3 環境 DNA チップ活用の利点と課題

利点	<ul style="list-style-type: none"> ・qPCR による種特異的な分析と同程度の検出精度が得られる ・一回の計測で複数種の DNA を一度に検出できるため効率的にモニタリングが可能 ・メタバーコーディングでは成果のばらつきが見られるが、同じ環境 DNA チップを用いる限り、分析結果や解釈がほぼ一定になる ・1 枚のチップで最大 32 種を分析対象とできるため多様な用途に対応可能
課題	<ul style="list-style-type: none"> ・定量的な評価ができない ・環境 DNA チップに乗せた対象種以外の分布を把握できない
対応策	<ul style="list-style-type: none"> ・モニタリングにおいて必要とする情報を得るための手法の使い分けが重要

謝辞：本研究は、水源地環境センター（Water Resources Environment Center）応用生態研究助成を受けて山口大学との共同研究により実施されたものである。研究に用いた環境 DNA チップの制作にあたっては東洋鋼板株式会社のご協力をいただき、現地調査の実施にあたっては仙台支店、大阪支店の協力を得た。記して感謝を示す。

参考文献

- 1) Jo T., Fukuoka A., Uchida K., Ushimaru A., & Minamoto T.: Multiplex real-time PCR enables the simultaneous detection of environmental DNA from freshwater fishes: a case study of three exotic and three threatened native fishes in Japan, *Biol Invasions* 22, 455–471, 2020
- 2) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., & Iwasaki, W.: 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* Volume 2, Issue 7, 2015

- 3) Takahara T., Minamoto T., & Doi H.: Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds, *PLoS ONE* 8(2), 2013