

# 環境DNA調査マニュアル (河川調査用)



2023年6月  
Ver.1.0



# 目次

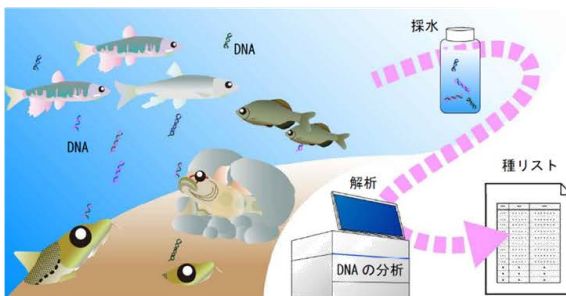
|             |        |
|-------------|--------|
| 送付物の確認      | ・ ・ 1  |
| 当日調査の流れ     | ・ ・ 2  |
| 1. 準備       | ・ ・ 3  |
| 2. 採水・ろ過    | ・ ・ 8  |
| 3. 保存・封入    | ・ ・ 13 |
| 4. 送付       | ・ ・ 18 |
| トラブルシューティング | ・ ・ 21 |

## 環境DNA調査とは

**環境DNA (eDNA)** 動植物の排泄物、組織片などに由来する水中に存在するDNA断片  
1リットルの水から、環境DNAを調べることで

環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定



出典：「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)」(環境省生物多様性センター)  
([https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish\\_tebiki2.pdf](https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_tebiki2.pdf))

### ●特徴

#### ⊗ 簡単・安全

- ✓ 現場作業は採水のみで非常に簡便かつ専門的な知識は不要
- ✓ 捕獲調査に比べて安全に作業可能

#### ⊗ 効率的

- ✓ 現場調査、ろ過・DNA抽出作業、分析作業、解析作業等の工程を分担できるため、効率的な作業が可能

#### ⊗ 高精度

- ✓ 魚類では、非常に高精度に生息状況を把握可能

#### ⊗ 保存性

- ✓ DNA抽出したサンプルは低温で長期間保管可能

#### ⊗ 解像度

- ✓ 捕獲調査ではわからない「種」や「系統」も明らかにできる場合もあるが、逆に捕獲調査よりも劣る場合もある。



# 送付物の確認



がついているものは開封しないでください——



お送りした段ボールには以下の機材が入っています。  
① 保冷剤 (1個) ←調査日前日に冷凍しておきます。  
② 保冷バッグ

(大きいチャック付きビニール袋①) ⚠

- ③ おもり・ロープ付きカップ (長さ約10m)
- ④ ろ過カートリッジ (1個)
- ⑤ 注射筒 (1本)
- ⑥ ゴム手袋 (1セット)
- ⑦ ペーパータオル(1枚)
- ⑧ 下記の小さいチャック付きビニール袋 (⑨~⑫が入っています)

(小さいチャック付きビニール袋) ⚠

- ⑨ 茶色いキャップ(出口用)
- ⑩ 黄色いキャップ (入口用)
- ⑪ スポイト (1個)
- ⑫ 保存液 (小型チューブ入り1個)

(大きいチャック付きビニール袋②)

- ⑬ 調査記録用紙
- ⑭ 調査マニュアル

⑨~⑫の拡大図



## < 注意事項 >

- ・ 大きいチャック付きビニール袋①に入っている機材は、**現場で使用するまでは開封しないでください。**
- ・ キャップは大きさが異なるものが2種類あります。確認しましょう。キャップは大変小さく、紛失しやすいので気をつけましょう。

大きいチャック付きビニール袋①





# 調査の流れ

現場に行くまでには、道具の準備、採水場所の選定などが必要です。  
現場で行う川の環境DNA調査は、以下の4つのステップになります。



## <当日の現場の作業手順>

送：送付物 自：自分で用意するもの

### 1. 準備 → 3ページ

送：調査記録用紙

自：鉛筆又はボールペン・携帯またはカメラ



採水場所の選定



調査内容の記録

### 2. 採水・ろ過 → 8ページ

送：調査記録用紙・調査キット一式

自：鉛筆又はボールペン



採水



ろ過

### 3. 保存・封入 → 13ページ

送：調査キット一式

自：油性マジック



保存・封入

### 4. 送付 → 18ページ

送：段ボール・使用済み調査機材一式・カートリッジ

調査記録用紙・保冷剤・保冷バッグ

自：ガムテープ・送り状



保冷バッグ



クール宅急便



# 1. 準備

## 重要な点

- 現場での作業は、30分～1時間ほどかかります。
- 調査経験者以外は、複数名で調査してください。
- 基本的には橋の上から採水してください。安全に川に近づける場合には川沿いから調査することも可能です。
- 採水の直前からゴム手袋をします。カートリッジを保冷バッグに入れるまで、必ず手袋をはめたまま行います。ゴム手袋をしたら、マニュアルや道具以外（体や地面など）は触らないようにしましょう。
- 安全が第一です！万が一、事故が起きてしまった場合は、110番(警察)・119番(消防)に緊急連絡！

## 使用するもの

- ☐ 調査記録用紙
- ☐ 鉛筆又はボールペン
- ☐ 携帯またはカメラ





# 1. 準備

## < 採水場所・方法の選定 >

- ✓ 河川においては安全かつ精度の高い調査を実現するために調査地点に応じた調査方法を選定することが重要です。
- ✓ 河川は護岸がコンクリート等で整備されていたり、水際まで植物に覆われていたり、河原があったりとその構造は様々です。
- ✓ これらの河川構造に応じて適切な採水方法を選択する必要がありますが、安全面などを考慮すると調査地点周辺に橋があるのであれば、**橋の上からロープ付き採水カップを用いて採水することが第一の選択肢になります。**
- ✓ 次ページ以降には、水際へのアクセスが困難な事例とアクセス可能な場合の事例を紹介しているので、調査予定地点の状況と照らし合わせて適切な採水方法を選択してください。
- ✓ 河川は水深が浅くても、流れが強いところでは溺れる可能性が十分にあります。安全を第一に考え、川の中に入っの採水は原則実施しないように心がけましょう。



**安全第一**



# 1. 準備

## < 採水場所・方法の選定 >

### ○水際へのアクセスが困難な例①



- ✓ 上記のような河川では両側がコンクリート護岸や矢板鋼板になっており、水際までアクセスすることは危険を伴います。
- ✓ このような場所で採水する場合には、近くの橋の上から、おもり・ロープ付き採水カップを落として採水することが有効です。
- ✓ なお、橋から採水する場合には、車に注意し、歩行者の邪魔にならないように採水することを心がけましょう。



# 1. 準備

## <採水場所・方法の選定>

### ○水際へのアクセスが困難な例②



- ✓ 上記のような河川では高さのあるコンクリート護岸等はないものの、水際が植物に覆われており、河川と陸地との境界がわかりづらいため、採水のために近づくと誤って川に落ちてしまう危険性があります。
- ✓ このような場所で採水する場合についても前ページ<河川へのアクセスが困難な例①>と同様に近くの橋から採水カップを使って調査することが有効です。



# 1. 準備

## <採水場所・方法の選定>

### ○水際へのアクセスが可能な例①



- ✓ 河川によっては親水等を目的として水際まで安全に近づける階段などを整備している場合があります、このような場所では川の近くまでいき、採水カップを用いて採水することが可能です。

### ○水際へのアクセスが可能な例②



- ✓ 調査対象の河川が護岸整備されていない河原であれば、水際までのアクセスが容易なため採水カップを用いて直接採水することが可能です。
- ✓ このような場所で採水する場合は、ロープ付きの採水カップを投げるなどして、流れのある場所の水を採水するようにしましょう。



# 1. 準備

## ＜採水場所到着後の作業＞



1. 調査場所についたら調査記録用紙をチャック付きビニール袋から取り出します。
2. 調査場所の様子を写真に撮ります。採水地点と上流、下流の写真があるのが望ましいです。
3. 川を観察して、調査記録用紙の必須項目を記入していきます。

### スマートフォンでの緯度経度の調べ方



1. グーグルマップを開きます。
2. 調査地点を画面上で長押しして、指定した地点を表示します。
3. Android：緯度経度が表示されます。iPhone：上に向かってスワイプして探してください。

**10進法**の緯度経度を記入します  
10進法は、小数点で表示されます  
60進法は、 $\sim^{\circ} \sim' \sim''N, \sim^{\circ} \sim' \sim''E$ と表示されるので、注意！

現場で緯度経度が調べられなくても、大丈夫です。**採水する場所（住所や橋の名前など）**を記録しておいてください。家に帰って、パソコンでグーグルマップを開き、採水した場所を表示します。右クリックし「この場所について」という項目を選べば、緯度経度が表示されます。表示できない場合は、採水した場所の名前とグーグルマップの画像を送ってください。



## 2. 採水・ろ過

### 重要な点



- 注射筒やろ過カートリッジの袋を開封します。素手で触ったり、手袋でも水が出入りする場所を触らないでください。
- ろ過カートリッジを使って、合計でカップ採水5回・最大500mLの水のろ過を目指します。
- カップ採水1回につき、 $50\text{mL} \times 2 = 100\text{mL}$ をろ過します。
- ろ過する量が増えるにつれて、注射筒を押すのが硬くなります。硬くて押せなくなったら500mL未満でも終了し、ろ過量を必ず調査記録用紙に記録します。

### <採水・ろ過に係る基本的な注意事項>



**注意点：**現場でカートリッジや注射筒を開封しますが、カートリッジや注射筒は**素手で触らない**でください。必ず**ゴム手袋**をはめましょう。ゴム手袋をはめていても、**水が出入りする箇所は触らない**でください。ゴム手袋で道具以外のもの（体や地面）も触らないようにしましょう。



## 2. 採水・ろ過

### <使用するもの>

- 大きいチャック付きビニール袋①

↑採水・ろ過に必要な機材が全て入っています

- 調査記録用紙
- 鉛筆又はボールペン



### <採水・ろ過手順>



1. カートリッジと注射筒を開封します。
2. 開封後は、地面などに置かないでください。機材一式は同梱のペーパータオルを広げ、その上に置くとなくす心配がなく便利です。



3. 橋の上からおもり付きのカップを下ろし、水を採水します。。
4. 注射筒でカップから水を多めに吸い上げます。
5. 注射筒を真上に向けて、空気を上に集めます。
6. 注射筒を下から押し、空気を出します。
7. 黒い部分を50mLに合わせます。

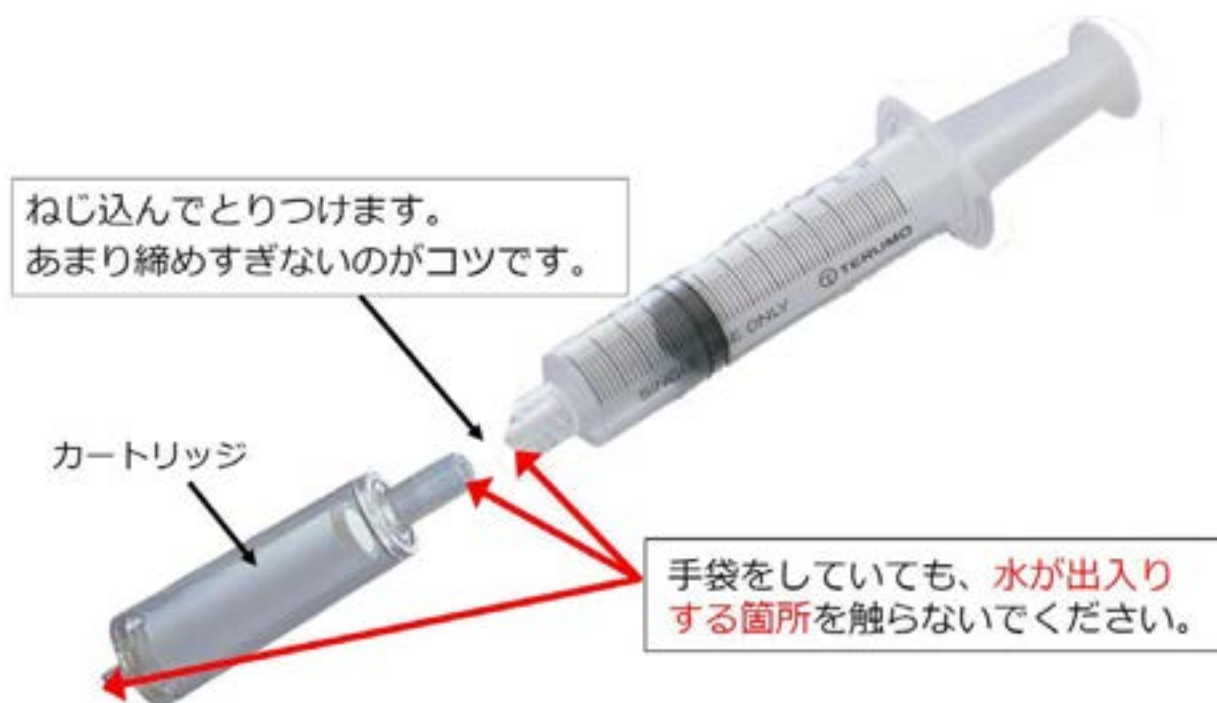




## 2. 採水・ろ過

### <採水・ろ過手順>

8. 注射筒にカートリッジを取りつけます。



9. 注射筒を押し、50mLをろ過します。ろ過した水が下流側に落ちるようにしましょう。

10. 押しきって水がでなくなったら、いったん注射筒からカートリッジを取り外します。取り外したカートリッジは、ペーパータオルの上に置き、**地面などには直接置かない**でください。

11. 再び水を注射筒で吸い上げ、カートリッジを取り付けて、注射筒を押し、50mLをろ過すること（4～10）を**合計で2回**繰り返します。**1回のカップ採水で100mLろ過**してください。



## 2. 採水・ろ過

### ＜採水・ろ過手順＞



12. 余ったカップの水を下流側に捨てます。

13. 新しく水を採水します。同じろ過カートリッジで、**採水1回ろ過100mL**（3～12）の作業を**合計で5回**繰り返し、**500mL**の水をろ過することを目指します。

14. 5回手前でも、途中でピストンが硬くて押せなくなったら、そこで終了です。必ず、**ろ過量をmL単位で調査記録用紙に記録**します。

15. ろ過カートリッジのろ過が終わったら、**保存・封入**に進んでください。



### 3. 保存・封入

#### 重要な点

- カートリッジの中に残っている水を、できるだけ取り除きます。
- カートリッジの排出孔（水の出る口）に、小さくて細長い差し込むタイプのキャップ（茶色）をはめます。
- カートリッジの注入孔（水を入れる口）からスポイトで保存液を注入します。
- カートリッジの注入孔（水を入れる口）に、大きくてねじ込むタイプのキャップ（黄色）をはめます。
- キャップを間違えると、はめられません。



#### 使用するもの

- ゴム手袋(採水・ろ過作業の時から着用)
- カートリッジ
- 注射筒
- キャップ（茶色、黄色）
- 保存液
- スポイト
- ペーパータオル
- 油性マジック





### 3. 保存・封入

#### <フィルター内の液抜き手順>



1. カートリッジを注射筒から外します。
2. 注射筒に水が残っていたら、水を抜いてください。
3. ピストンを引いて注射筒に空気を入れます。
4. カートリッジを注射筒に取り付けます。

**注意点：**作業中、カートリッジや注射筒を**地面などには直接置かない**でください。地面にペーパータオルを敷いて、その上に使用するものを置いておくと、紛失や汚れる心配がなくなります。



5. ピストンを押し、カートリッジに空気を入れて、余分な水を抜きます。
6. 1～5を数回繰り返します。カートリッジを斜めにした時、角にわずかに水が残るくらいまで少なくなれば、大丈夫です。

**注意点：**カートリッジに水分が多く残っていると、せっかく採取した環境DNAが壊れやすくなってしまいますので、できるだけ水分を抜きましょう。



### 3. 保存・封入

#### <フィルター内の液抜き手順>



7. 水抜きを終えたら、**排出孔（水の出る口）**に、**小さくて細長い差し込むタイプのキャップ（茶色）**をはめます。排出孔とキャップの種類を間違えないようにしましょう。
8. 回し入れるのではなく、しっかりと差し込んで取り付けます。

**注意点：**排出孔とキャップは間違えやすいので、気をつけてください。キャップは小さくて取り扱いにくいので、落とさないように注意しましょう。



### 3. 保存・封入

#### <フィルター内への保存液注入手順>



1. カートリッジの排出孔（水が出る口）がキャップでふさがれていることを確認します。
2. スポイトで、チューブから保存液を吸います（一度に全部は吸えません）。

**注意点：**スポイトを落としたり、なくしてしまったら、注射筒で保存液を入れます。（トラブルシューティングのページ参照）



3. カートリッジの注入孔（水を入れる口）から、フィルターに触れる程度まで、深く差し込みます。カートリッジの入り口に引っかかるかもしれませんが、少しゆすりながら、奥まで差し込みます。
4. カートリッジに保存液をゆっくり注入します。保存液が入っていくのを確認しながら、注入してください。

**注意点：**カートリッジに保存液を急いで入れると、保存液があふれてしまいます。ゆっくり入れましょう。あふれてしまった保存液は、カートリッジに入れないでください。



### 3. 保存・封入

#### <フィルター内への保存液注入手順>



5. 2～4を繰り返します。
6. チューブ内の保存液が残り少なくなると、チューブを傾けないと吸えなくなります。水平近くに傾けて吸いましょう。
7. 保存液が少しチューブに残っていても大丈夫です。だいたい全部の量を入れたら、**注入孔に大きい方のキャップ（黄色）が入っている容器のシールをはがし、容器のままねじ込みます。ねじ込んだら容器は外します。**



8. 保存液が入っていて、両方の口がふさがれていることを確認したら、カートリッジを水平にして、2～3回くるくる回します。これにより保存液がフィルター部分に浸透します。
9. カートリッジに調査日と調査場所(230729〇〇橋、等)を油性マジックで記入します。
10. カートリッジを小さいチャック袋に入れ、チャックをします。



## 4. 送付

### 重要な点

- ・ サンプリングに使用した機材については再利用できるものはこちらで洗浄の上再利用しますので、使用済み機材一式を送られてきた段ボールに詰めてクロネコヤマトのクール宅急便(冷凍)で着払いで送ってください。また、直接神奈川県環境科学センターに持ち込んでいただいても構いません。なお、コンビニでは送れませんので、注意しましょう。
- ・ 調査当日に送れない場合は、冷凍庫等で保管します。
- ・ 保管の際は、カートリッジを魚に近づけないようにしてください。魚が入っていた冷蔵庫やクーラーボックスに入れると、調査と関係のないDNAが混入する可能性があります。



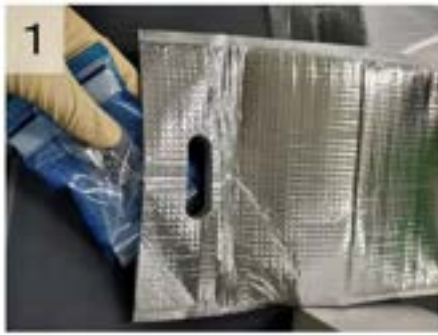
### 使用するもの

- 調査キットが入っていた段ボール
- 使用済みの調査機材一式
- カートリッジ
- 調査記録用紙
- 保冷剤
- 保冷バッグ
- ガムテープ
- クロネコヤマトの送り状（伝票）



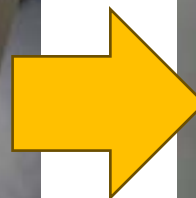
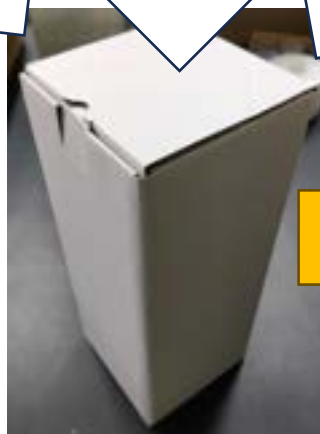
## 4. 送付

### <送付手順>



1. 小さいチャック袋に入ったカートリッジを保冷剤とともに保冷バッグに入れます。
2. 調査記録用紙は大きなチャック付き袋に入れます。
3. 使用済みの調査機材一式は一部再利用するので、元のビニール袋に戻してください。
4. 1, 2, 3を調査キットが入っていた段ボールに戻し、クロネコヤマトのクール宅急便(冷凍)の着払いでお送りください。

4





## 4. 送付

### <送付手順>

- クロネコヤマトのクール宅急便を利用する場合、直営店に荷物を持ち込むか、自宅などでドライバーさんに集荷を頼む必要があります。コンビニでは送れませんので、注意してください。
- カートリッジは、クロネコヤマトの**クール宅急便の冷凍タイプ**で送ってください。送付者の住所・氏名を書き入れ、品名はろ過フィルターとし、ワレモノ欄にチェック。

送付先：〒254-0014

神奈川県平塚市四之宮1-3-39

神奈川県環境科学センター調査研究部

電話：0463-24-3311（担当：長谷部）

090-8050-9349

- 不明な点があれば、メールでご連絡ください。

メールアドレス：hasebe.1cpk@pref.kanagawa.lg.jp

**注意点**：ろ過したその日のうちに、クロネコヤマトの**クール宅急便**で送ってください。送れない場合は、冷暗所に保存しておいてください。





# トラブルシューティング

- 小型スポイトをなくした！  
→ スポイトを使わない方法(ページの下の方法)もあります。
- カートリッジや注射筒に素手で触ってしまった！または落としてしまった！  
→ すぐに新しいペーパータオルなどで拭いてください。そのことを調査記録用紙の備考に書いておいてください。
- カートリッジを冷暗所に保存していなかった！  
→ 調査記録用紙の備考に書いておいてください。
- 調査当日に、サンプルを送付できなかった！  
→ その日はサンプルを自宅の冷暗所に置いておきます。ただし魚には近づけないようにしてください。翌日、なるべく早くクール宅急便の冷蔵タイプで送ります。
- 困った！どうしても誰かに相談したい！  
→ 神奈川県環境科学センター長谷部090-8050-9349まで、お電話ください。

## スポイトをなくした場合



1. カートリッジの排出口（水が出る口）に小さくて細長い差し込むキャップ（注：写真では別タイプのキャップを使用していますが、同封の茶色のものを使用する）がはめられていることを確認します。
2. 注射筒からピストンを取り外します。
3. カートリッジを注射筒に取り付け、注射筒に保存液を入れます。
4. ピストンを注射筒に取り付けて、下向きに押します。押し戻される感がありますが、グッと押し込むと、保存液がカートリッジに入ります。
5. カートリッジを注射筒から取り外し、注入孔（水が入る口）を大きくてねじ込むキャップ(黄色のキャップ)でふたをします。



本マニュアルはNPO法人アースウォッチジャパン様よりご提供いただいた「環境DNAを用いた魚類調査プロジェクトマニュアル」を基に神奈川県環境科学センターが作成したものであり、写真、文章の無断転載を禁止します。  
写真の著作権は神奈川県環境科学センター、笠井亮秀、一般社団法人サステナビリティセンターまたは環境DNA学会に属しています。