

卷末資料

(余白)

環境 DNA 分析用サンプルの採水マニュアル（ため池編）

1. はじめに

このマニュアルは、環境 DNA 分析（図 1）を行うためのサンプル（＝ため池の水）の採取方法を示したものです。サンプル中の環境 DNA は、採水した後、そのまま常温下で放置しておくと少しずつ分解してしまいます。そのため、採水後直ちに、環境 DNA の分解を遅らせる試薬（BAC と呼びます）をサンプルに混ぜ、さらにサンプルを常に保冷した状態で管理することが重要です。

採水作業を実施する前に、本マニュアルの内容をよく理解した上で、定められた手順に従って作業を行ってください。



図 1 環境 DNA 分析全体の概要

2. 採水作業全体の流れ

環境 DNA 分析用サンプルの採水作業は、下図の 4 つの工程があります。



3. 準備

分析を委託する機関等から採水機材が提供される場合は、例えば、表 1 に示すようなものが入っています。自身が用意する場合も、表 1 を参考に、市販されているもの組み合わせることで揃えることが可能です。また、調査に必要な数量分の採水機材があるかを、事前に確認します。

表 1 採水機材リスト

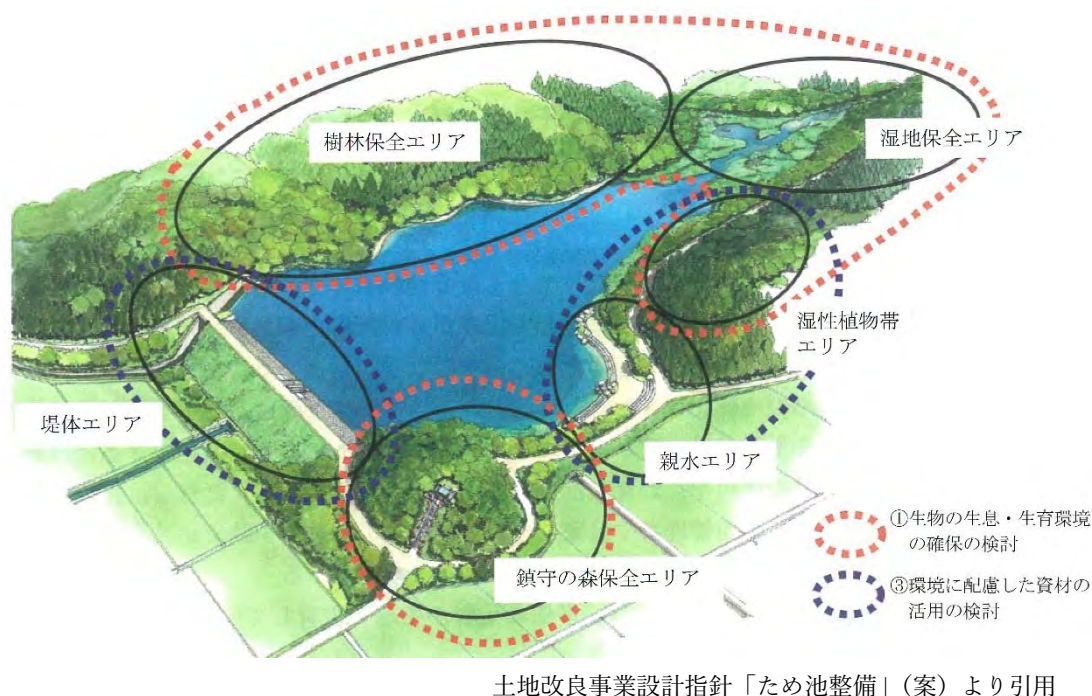
写真	機材名	数量	備考
	採水ボトル（滅菌済み）	地点数分 + 予備	容器に DNA が付着・混入することを防ぐため、ビニール袋で個別包装されているものが推奨されます。外側のビニール袋は、採水する直前に開封してください。
	チャック付ビニール袋	地点数分 + 予備	採水後のボトルを入れ、容器表面が汚染されることを防ぐためのものです。
	使い捨て手袋	地点数分 + 予備	両手分（2 枚）で 1 検体分です。採水ボトルを触る前に装着します。
	使い捨て 試薬（BAC）入りチューブ ※BAC とは、塩化ベンザルコニウム 10% 溶液もしくはオスパン液と呼ば れる試薬の通称です。	地点数分 + 予備	使い捨てマイクロチューブに 1 検体分ずつ（採水量が 1000mL の場合は 1mL）試薬を分注し、チャック付きビニール袋に入れておくと便利です。
	【水深が極端に浅い場所で採水する場合のみ使用します】 使い捨てプラスチック皿	地点数分	採水ボトルにより直接採水できないくらい <u>水深が極端に浅い場所</u> で採水する場合は、皿を使って容器に水を汲みます。

表1 採水機材リスト（続き）

写真	機材名	数量	備考
	使い捨て紙製タオル	1 束	採水後に容器の表面付着した水滴や汚れを拭くために使用します。
	油性マジックペン	1 本	容器表面に採水した地点番号や採水日、その他の情報を記入するために使用します。
	保冷材	2-5 個	採水したサンプルを保冷するため、予め冷凍したものを使用します。市販の袋入り氷でも代用可能です。保冷材の数はクーラーボックスの大きさに合わせて調整します。
	クーラーボックス	1 個	採水サンプルの発送に使用します。宅配便で発送する場合、クーラーボックス本体、サンプル、保冷材の総重量が宅配業者の重量制限内に納まるように注意してください。
	【分析を外部機関に委託する際に、機関から設定されている場合】 ブランクサンプル （＝ネガティブコントロールとも言います）	1 個	輸送中のサンプル間の汚染の有無を確認するため、ブランクサンプル（超純水が入った採水ボトル）が提供された場合は、採水サンプルと同様に処理を行って、クーラーボックスに同封して分析機関に返送します。

4. 採水地点の選定

生物から放出された環境 DNA は、水の流れてから拡散し、徐々に分解されながら消失します。ため池では、一般的に水の流れや混合がほとんど生じないため、採水する場所によって検出される生物種が異なる可能性があります。そのため、できるだけ環境の異なる複数の地点で採水することで、ため池から検出される生物種の総数を増やすことができると期待されます。図 2 を参考に、調査を行うため池の環境特性（大きさ、生物の生息場等）を考慮して採水地点を設定して下さい。



- ① ため池の水が流出する「樋門」付近
- ② 樋門のある「堤体エリア」とは異なる生態系を形成している可能性が高い「湿地保全エリア」もしくは「湿性植物帯エリア」
- ③ 上記の 2 地点とは異なる生態系を形成している可能性が高い「樹林保全エリア」もしくは「鎮守の森保全エリア」
- ④ 上記の 3 地点とは異なる生態系を形成しているエリア
- ⑤ 同様の生態系を形成しているエリアしかなければ、すでに設定した 3 地点とは距離が離れている地点
- ⑥ ため池内以外の生物種を検出する可能性がある「流入部分」

図 2 ため池における採水地点の選定例

5. 採水

採水作業を行う前に、表 2 に示す注意点を必ず確認してください。

表 2 採水作業を行う上での注意点

タイミング	内容
採水地点の選定	採水地点をため池内に 1 地点のみ設定する場合は、 <u>樋門（水が流れ出す場所）周辺を優先して採水すること</u> で検出される生物種数が最大化することが期待されます。複数地点を設定できる場合は、樋門周辺に加えて、図 2 の例を参考に、生物多様性が高いと考えられる「 <u>生物の生息・生育に適した環境</u> 」において <u>採水すること</u> が望ましいでしょう。
採水補助機材の準備	ため池によっては、水深が極端に浅く、ボトルを使った採水が難しい場合があります。また、堤体上から採水する必要がある場合や、岸部がぬかるんでおり水辺に近づけない場合も考えられます。そのような場合には、 <u>バケツや採水補助ポール、柄杓等の機材を使用すること</u> で、安全、かつ、効率的に採水が可能となります（次ページを参照のこと）。採水を行う地点の状況を事前に調べておくといでしょう。
調査当日	採水したボトルをクーラーボックスの中で保冷しておくため、冷凍した保冷剤、もしくは、市販の袋入り氷をクーラーボックスに入れて、調査地点へ持参します。 ヒトの汗や唾液には、DNA が含まれています。採水作業中は、作業員の汗やつばの飛沫がサンプルに入らないように配慮してください。また、ヒトの皮膚上には環境 DNA を分解する原因となる細菌類が付着しています。採水ボトルを扱う時や採水作業時、試薬を入れる時など、採水作業中は使い捨て手袋を必ず着用してください。 環境 DNA 分析用のサンプルは、強く濁った水では分析できなくなる可能性があります。<u>採捕調査を同時に実施する場合は、ため池の水が濁らないように、採捕調査を行うよりも前に、採水作業を行ってください。</u> 採水したサンプル中の環境 DNA は、温度が高いとより早く分解していきます。サンプルには、採水後直ちに、採水量 1000mL に対して 1mL の試薬(BAC)を入れ、よく攪拌した後で、すぐに保冷材の入ったクーラーボックス内で冷やしてください。特に、気温が高い夏期の調査時では、サンプルを野外や車内に放置しないよう十分に注意してください。ただし、保冷目的であっても、<u>採水したサンプル自体は、絶対に凍らせないでください。</u> 採水する位置の周辺に、生活排水の流入、生物（特に魚類）の死骸の存在、油膜や浮遊ゴミの有無などが確認された場合は、任意の記録用紙に現場の状況を記載し、分析機関に提供してください。

採水補助機材（参考）

【バケツ】



左の写真は、折り畳みが可能な釣り用の水汲みバケツですが、一般的なバケツの持ち手部分にロープを縛り付けたものも使用できます。堤体や橋の上など、水面まで距離がある場所から採水する際に便利です。複数地点でバケツを使用する場合は、地点が変わるごとにバケツの内部に付着した DNA を塩素系漂白剤等で除染する必要があります。

【採水補助ポール】



写真の採水補助ポールは、「サンプルテイキングポール」及び「PP ビーカーアタッチメント」という商品名称で市販されている採水用器具を組み合わせて使用しています。水際がぬかるんでいたり、植生が繁茂して作業者が容易に水面に近付けない状況であっても、ボトルを使って直接採水することが可能です。そのため、バケツや柄杓のように、機材本体を除染する必要がありません。

【柄杓】



採水補助ポールの代用としては、ホームセンターやワンプライスショップ等でも販売されている安価な柄杓も使用できます。1つの柄杓を複数地点で使いまわす場合は、バケツの時と同様に、柄杓表面に付着した DNA を塩素系漂白剤等で除染する必要があります。現場での除染の手間を避けたい場合は、必要本数の柄杓を準備しておくといでしょう。

採水作業手順

作業区分	作業内容	注意事項
採水前	(1) 採水に使用する機材が揃っていることを確認します	● サンプル 1 検体につき、以下を使用します。 ✓ 採水ボトル 1 本 ✓ チャック付ビニール袋 1 枚 ✓ 使い捨て手袋 1 組 ✓ 試薬 (BAC) 入りチューブ 1 本 ✓ 紙製タオル 1 枚
採水前	(2) 実際に採水する位置を確認します	● 採水位置の周辺に生活排水の流入、生物 (特に魚類) の死骸の存在などが確認された場合は、採水位置をずらすか、状況を記録シートに記載してください。 ● 胴長等を着用してため池内に入る必要がある時は、この時点で静かに水の中に入り、濁りが治まるまで待ちます。
採水中	(3) 使い捨て手袋を着用します 	● 作業が完了するまで常に着用してください。 ● 別の地点のサンプルを扱う時は、新しい手袋に交換してください。異なるサンプル間で使いまわすと、試料汚染の原因となります。 ● 作業中に手袋が汚れたときや破れたときは、新しいものに交換してください。
採水中	(4) 採水ボトルの外袋を開封します 	● ふたを落とさないように開封します。 ● ふたは手順 (7) で使用するまでの間は、外袋に入れたままで保持してください。 ● ふたを閉めた後の外袋は、ゴミとして適切に廃棄してください。

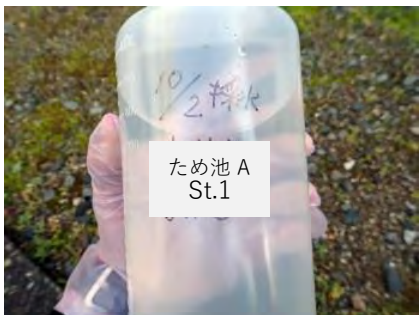
採水作業手順（続き）

作業区分	作業内容	注意事項
採水中	(5) 表層水を採水します 	● 流れがある場所の場合は、採水ボトルの口を上流側に向けて表層水を採水します。 ● 長靴や胴長に付着した DNA が混入するのを防ぐため、可能な限り、採水の際は水中に立ち入らないで行ってください。 ● ボトルの目盛りを参考に表層水を正確に 1000mL 採水してください。 ● 採水の際は、ゴミや植物片などが容器内に入らないように注意してください。万が一、容器内にゴミや植物片が入ってしまった場合は、陸上に水を静かに捨てて、もう一度採水し直してください。
【参考】 採水中	【水深が極端に浅い場所で採水する場合】 (5') 表層水を採水します 	● 採水ボトルで直接採水できないくらい水深が極端に浅い場所で採水する場合は、使い捨てプラスチック皿のようなものを使用して水を汲みます。 ● 底質を巻き上げないように（水を濁らせないように）、静かにプラスチック皿を水中に入れ、表層水を採水します。 ● 採水した皿内の水は、静かに採水ボトルに注ぎ、ボトルの目盛りを参考に 1000mL になるまで複数回採水してください。

採水作業手順（続き）

作業区分	作業内容	注意事項
【参考】 採水中	【水面から人が直接採水できない場合】 （5”）表層水を採水します   	- 水面までの距離が遠く、作業員が直接採水できない場合、バケツや採水補助ポール等を使用して採水を実施してください。 【バケツ採水】 - 使用前にバケツ及びロープ先端部を泡洗淨ハイターにより除染してください。 - ハイターをペーパータオルできれいにふき取り、十分に（最低3回以上）採水地点の環境水で共洗いを行ってから、サンプルを採水してください。 - バケツからボトルへ採水した水を静かに注ぎ入れてください。 【採水補助ポール（柄杓もこれに準じる）】 - 伸ばしたポールの先端のアタッチメントに直接ボトルを取り付け、ポールを操作して静かに水面から採水します。
採水中	（6）試薬（BAC）を入れます 	- チューブのふたを開け、試薬の全量をサンプルに加えます。 - チューブの構造上、ごく少量の試薬がチューブ内に残りますが、問題ありません。 - 空のチューブは、ゴミとして適切に廃棄してください。

採水作業手順（続き）

作業区分	作業内容	注意事項
採水中	(7) 採水ボトルのふたを閉め、サンプルをよく撈拌します 	● 試薬を入れたら素早くボトルのふたをしっかりと閉め、試薬が完全に混合するように容器をよく振って撈拌します（※試薬由来の泡が出ます）。 ● ボトルの外側が濡れている場合は、紙製タオルでしっかりとふき取ります。
採水後	(8) 採水ボトルにサンプル名を記入します 	● サンプルが入ったボトルの側面に油性マジックで「採水日」「地点名」「サンプル番号」等を記入します。 ● 手順 (9) のチャック付ビニール袋にも同様に、「採水日」「地点名」「サンプル番号」等を記入します。
採水後	(9) 採水ボトルをチャック付ビニール袋に入れます	● チャック付ビニール袋にボトルを入れる前に、もう一度、ふたがしっかりと閉まっていることを確認します。 ● ビニール袋内の空気を抜きながらチャックを閉じます。
採水後	(10) サンプルをすぐに保冷します 	● サンプルをクーラーボックスに収容し、容器の上部もしくは側面に当たるように保冷剤を置いて保冷します。 ● 夏期はクーラーボックス内の温度が上がりやすいため、必要に応じて、簡易保冷剤や市販の袋入り氷などを追加し、サンプルの保冷に努めてください。

採水作業手順（続き）

作業区分	作業内容	注意事項
【参考】 採水後	【ブランクサンプルが設定されている場合】 (11) ブランクサンプルの処理を行います	- 最後の地点の採水が終わったあとに、新しい使い捨て手袋を着用し、ブランクサンプルのボトルのふたを開け、試薬（BAC）を入れて、すぐにフタを閉じます。 - ブランクサンプルが入っていたチャック付ビニール袋に戻し、チャックを閉じて、サンプルと同様にクーラーボックスに収容します。

6. 発送

クーラーボックスに収容したサンプルは、調査当日のうちに、宅配便で分析機関へ発送します。発送方法の詳細は、分析を委託する機関と相談の上、指定された方法に従ってください。特に、外気温が高い時期は、通常便で発送すると、クーラーボックス内の保冷材だけでは到着まで保冷効果が持続しない可能性があるため、冷蔵指定のクール便で発送することが望ましいです。

7. 環境 DNA サンプルの採水作業に関するその他の補足事項

1) できるだけ陸上側から採水してください。

安全面への配慮から、できるだけため池内には入らずに、陸上側（もしくはボート上）から採水を行ってください。

ただし、陸上側からの採水が困難な地点については、安全に十分配慮した上で、ため池内に入って採水しても構いません。ため池内に入った直後に採水を実施すると、巻き上げられた底質等がサンプルに混入する可能性が高くなるため、巻き上げられた底質が沈むまでしばらく静止して待機して下さい。ある程度巻き上げられた底質が沈んだのを確認した後、ボトルの口を外側（作業者と反対側）に向け、作業者の胴長等に付着した生物由来成分（粘液、血液や鱗片）がサンプルに混入しないよう、腕を伸ばしながら、体からできるだけ離れた位置で採水するよう心掛けてください。

2) 水面から直接採水が困難な場合は、バケツ等の補助機材を使用して採水してください。

現場の状況から水面に近づけない等の理由により、作業員が直接水面から採水することが困難な地点では、バケツ等の道具を使用して採水を行ってください。バケツを使った採水方法については、本マニュアルの他、環境 DNA 学会から発行されている「環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver.2.2（2020 年 4 月 3 日発行版）」を参考にし、使用後のバケツは環境 DNA 学会のマニュアル

P.16 の「バケツの除染」を必ず実施してください。また、バケツの除染に使った洗浄剤が、続いて採水するサンプルに混入しないように、十分に（最低 3 回以上）採水地点の水で共洗いを行って洗浄剤をすすいでから、分析用のサンプルを採水してください。

なお、前述の環境 DNA 調査・実験マニュアルは、以下の URL から無償でダウンロードが可能です。https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA_manual_ver2_2.pdf