

卷末資料

(余 白)

環境 DNA 分析用サンプルの採水マニュアル

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として、小河川や水路等の農業農村環境における採水方法を示したものです。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。また、本マニュアルの内容は、基本的には、一般社団法人環境 DNA 学会の WEB サイト（<https://ednasociety.org/manual>）にて公開されている環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver2.2（2020 年 4 月 3 日発行）の中の「3-2. 採水とグラスファイバーフィルターを用いた実験室での濾過（p.26-28）」で記載されている採水方法に準拠しており、さらに広く一般の方が採水作業を行う際にわかりやすくなるように補足をを行ったものです。

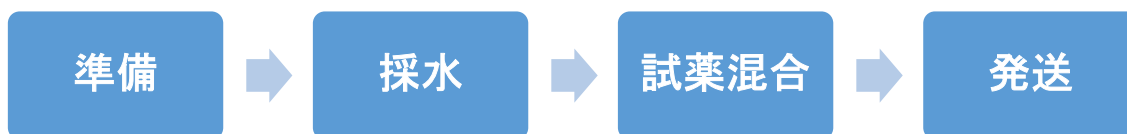
なお、本マニュアルでは、採水したサンプルの分析は、民間の分析会社や大学等の外部機関へ委託することを想定しています。環境 DNA 調査の計画段階で、分析機関を決めた上で、採水のスケジュールやその他マニュアルに記載されていない事項等については、委託する分析機関に相談しましょう。



図 1 環境 DNA 分析の概要

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、下図に示す 4 つの工程があります。



① 準備

ボトル等の採水機材は、基本的には、分析を委託する機関から有償（もしくは分析費に含まれる）で提供される場合がほとんどですので、分析機関に確認してください。自前で準備する場合は、本マニュアルの第 3 章、もしくは、環境 DNA 学会の環境 DNA 調査・実験マニュアル（p.26-28）を参照してください。その他には、長靴・胴長、デジタルカメラ、GPS ロガー、水質測定機器等を必要に応じて準備します。

② 採水

水面へのアクセスが容易な地点においては、ボトルを使って水面から直接採水しますが、それが困難な地点においては、バケツや柄杓（ひしゃく）等を準備する必要があります。バケツ等を用いた採水の方法は、環境 DNA 学会の環境 DNA 調査・実験マニュアル（p.26-28）を参照し、別の地点の環境 DNA がサンプルに混入汚染（これをコンタミネーションという）しないように、バケツ等の除染を行ってください。

③ 試薬混合

環境水サンプル中に存在する環境 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（10%塩化ベンザルコニウム溶液のこと。本マニュアルでは以下 BAC という。）をサンプルに入れ、容器の蓋を閉めたらボトルをよく振って攪拌し、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。BAC は逆性石鹼の一種であるため、サンプルに入れた後に攪拌すると、サンプルが泡立ちます。BAC の入れ忘れを防ぐためにも、適宜サンプルボトルを振って、泡立つことを確認してください。

④ 発送

採水したサンプルは、原則として冷凍保管ができません。また、BAC を入れた状態であっても、環境 DNA は少しずつ分解するため、環境水の状態ではサンプルを長期間に亘って保管することができません。しかし、サンプルをろ過し、フィルター上に環境 DNA を回収した状態であれば、このフィルターを冷凍庫で長期間保管することが可能です。したがって、分析機関においては、採水後、可能な限り速やかに、サンプルをフィルターでろ過する必要があります。そのためにも、サンプルは、基本的に採水した当日のうちに、宅配便で分析機関へ発送してください。

3. 準備

サンプルの採水及び発送に必要な機材の一例を、表 1 に示します。分析を委託する機関によって提供される機材の内容が異なるため、事前に提供される機材を確認してください。調査者自身で準備が必要なものについては、調査前に、機材の数量に不足がないかよく確認してください。



表 1 採水機材リスト

写真（例）	機材名	数量	備考（使い方等）
	採水ボトル（滅菌済み）	地点数分 + 予備	ビニールで個別包装されています。外側のビニール袋は、採水する直前に開封してください。ふたはボトルの底側にあります。
	チャック付ビニール袋	地点数分 + 予備	保冷剤とボトルを直接触れさせないため、また、万一サンプル水が漏洩した時の影響を最小限にするため、採水後のボトルを入れます。
	使い捨て手袋	地点数分 + 予備	1組（2枚）で1検体分です。必ず採水ボトルの袋を開封する前に装着し、採水後のボトルをチャック付きビニール袋に入れるまで装着しててください。
	試薬（BAC）入り使い捨てチューブ ※BAC とは、塩化ベンザルコニウム 10%溶液もしくはオスバン液と呼ばれる試薬の略称です。	地点数分 + 予備	チャック付きビニール袋に、1検体分の BAC（1mL）が分注された状態でチューブが入っています。

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	地点数分 + 予備	採水後に採水ボトルに付いた水滴を拭くために使用します。
	油性マジックペン	1 本	ボトルとチャック付きビニール袋に地点番号やサンプルの情報を記入するために使用します。シール状のラベルをボトルに張り付けて記入してもよいです。
	保冷剤	2-5 個	事前に冷凍したものを使用してください。市販の袋入り氷でも代用可能です。クーラーボックスの大きさによって、使用する個数を調整してください。
	クーラーボックス	検体数に 応じて 1 個以上	採水サンプルの発送に使用します。発泡スチロール容器でも代用可能です。DNA がサンプルに混入汚染しないように、事前に塩素系漂白剤（例えば、泡スプレー式ハイター）で内部の除染を行ってください。

表 1 採水機材リスト (続き)

	<p>【設定されている場合のみ】 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)</p>	<p>1個</p>	<p>輸送中のサンプル間の汚染の有無を確認するため、採水ボトルに予め超純水が入っています。</p>
	<p>【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</p>	<p>地点数分 +予備</p>	<p>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のみ使用します。</p>

その他に、必要に応じて準備しておくものは、以下に示します。

- ① 水面へのアクセスが困難な地点で採水を行う場合
 - 採水用バケツ、もしくは、柄杓（ひしゃく）※使用前に塩素系漂白剤で除染する
 - バケツ内部を除染するための塩素系漂白剤（例えば、泡スプレー式ハイター）
 - ロープ
- ② 取得しておくことを推奨する情報
 - GPS ロガー（採水地点の位置情報）
 - デジタルカメラ（採水地点の写真）
 - 各種水質計等（採水地点の水質）
 - 流速計、水位計、測量用スタッフ等（採水地点の物理環境情報）
- ③ その他
 - 長靴、もしくは、胴長
 - ライフジャケット
 - ゴミ袋
 - 保冷剤、もしくは、袋入り氷を収容しておくためのクーラーボックス
 - 記録用紙、もしくは、野帳

4. 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
調査前日	<p>予め、保冷剤を十分に凍らせておいてください。保冷剤を食品や生物（魚類等）が保管されている冷凍庫に入れる場合は、保冷剤表面への DNA の付着を予防するため、保冷剤をビニール袋に入れてから冷凍庫に収容してください。</p>
調査当日	<p>採水したボトルをすぐにクーラーボックスの中で冷やしておくため、冷凍しておいた保冷剤、もしくは、市販の袋入り氷をクーラーボックス等に入れて、調査地点へ持参してください。</p> <p>汗や唾液には、DNA や DNA 分解酵素が含まれています。採水作業中は、作業員の汗や唾液の飛沫がサンプルに入らないように配慮してください。採水ボトルを扱う時や採水作業時、試薬（BAC）を入れる時などすべての採水作業中は、必ず使い捨て手袋を着用してください。</p> <p>採水地点の様子が平常時に比べて増水していたり、水が濁ったりしている状態で採水を実施すると、環境 DNA 分析の結果に影響を及ぼす場合があります。例えば、採水地点には生息しない種が検出されたり、濁り成分により分析が正しく行われなくなる場合があります。</p> <p>採捕調査と採水を同一日に行う場合、採捕調査後の強く濁った水では分析に悪影響が出る可能性があります。必ず、採捕調査を実施する前に、採水作業を行ってください。採水する順番は、調査区間内に設定された最も下流側の地点から始め、上流の地点に向かって進み、最も上流側の地点は最後に採水することで、採水作業に起因する濁りの影響を回避することができます（次ページの図 2 の例を参照）。</p>

表 2 (続き) 採水作業を行う上での注意点

タイミング	内容
調査当日	<p>採水したサンプル中の環境 DNA は、温度が高いほど早く分解していきます。また、試薬 (BAC) を入れても、完全に分解を止めることはできません。サンプルは、採水後直ちに試薬 (BAC) チューブ 1 本分の全量を入れ、容器の蓋を閉めてよく振った後で、すぐに保冷剤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には、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。なお、採水したサンプルは、絶対に凍らせてはいけません。</p>
	<p>採水する位置の周辺 (特に上流側) 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、分析結果にそれらの影響が出る場合があるため、写真及び野帳に現場の状況を記録しておくことが望ましいです。</p>
	<p>採水作業により発生した使い捨て手袋や採水用バケツを除染するための塩素系漂白剤を拭き取った後の紙製タオルなどのゴミは、必ず持ち帰り、適正な方法で処分してください。</p>

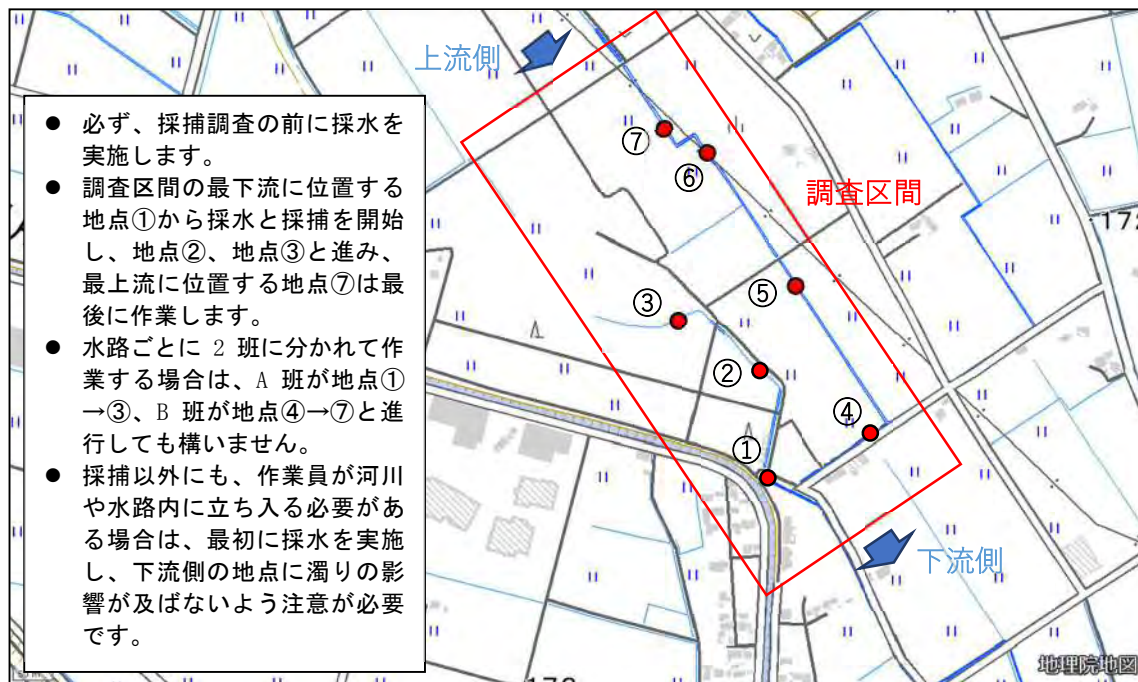






図 2 採水作業の進行順の例

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	<ul style="list-style-type: none"> ● サンプル 1 検体につき、以下を使用します。 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 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	<ul style="list-style-type: none"> ● 採水位置の上流側に生活排水の流入、生物（特に魚類）の死骸の存在などが確認された場合は、それよりも上流側に採水位置をずらすか、状況を写真や野帳等に記録してください。 ● 胴長等を着用して河川や水路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、濁りが収まるまで 1 分間程度待ちます。
採水中	(3) 使い捨て手袋を着用します 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。サンプル間で使いまわしてはいけません。 ● 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。


採水作業手順（続き）

作業区分	作業内容	注意事項
採水中	<p>(4) 採水ボトルの外袋を開封します</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
採水中	<p>(5) 表層水を採水します</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。 ● ボトルの目盛りを参考に表層水を 1000mL 採水してください。 ● 採水の際は、ゴミや植物片などが入らないように注意してください。万が一、容器内に入ってしまった場合は、陸上もしくは下流側に水を静かに捨てて、もう一度採水し直してください。
<p>【オプション】 採水中</p>	<p>【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</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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のみ、使い捨てプラスチック皿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
採水中	(6) 試薬（BAC）を入れます 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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る場合がありますが、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。
採水中	(7) 採水ボトルのふたを閉め、サンプルをよく攪拌します 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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攪拌します（※泡が出ます）。 ● ボトルの外側が濡れている場合は、紙製タオルでふき取ってください。
採水後	(8) 採水ボトルにサンプル名を記入します 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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	<ul style="list-style-type: none"> ● 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てください。 ● ボトルのふたにビニールテープ等を巻かないでください。 ● ビニール袋内の空気を抜きながらチャックを閉じます。

採水作業手順（続き）

作業区分	作業内容	注意事項
採水後	<p>(10) サンプルをすぐに保冷します</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。 ● 使い捨て手袋は、この手順が終了した時点で外し、ゴミとして適切に廃棄してください。
【オプション】 採水後	<p>【blankサンプルが設定されている場合】</p> <p>(11) blankサンプルの処理を行います</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 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、blank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。 ● blank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。

5. 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、冷蔵指定の宅配便で分析機関へ発送してください。利用する宅配便の業者により、荷物の制限重量が異なるため、クーラーボックスに収容するボトルの本数と保冷剤の合計重量に注意してください。

