

環境 DNA 分析における PCR 阻害物質の影響低減・除去実験

伊藤 哲也

1. はじめに

環境 DNA 分析において、試験水に含まれる腐植酸（フミン質と呼ばれる高分子有機化合物の総称）が PCR 時に DNA 増幅を阻害する物質として働くことが知られている（高橋ら，2016）。これら PCR 阻害物質の影響を軽減もしくは除去するため、すでに多くの除去キットや PCR 試薬が知られており、その効果が確認されている（Uchii *et al.*, 2019）。しかし、これらキットの導入は、追加コストや追加の作業（場合によっては、その効果を確認するための追加試験）など、効果は認められるものの、労力・コスト・納期を重視する企業では取り入れるにはやや厳しいところがある（山川・宮，2019）。

一方で、市販の阻害物質除去キットを使用しない方法として、サンプルを希釈し、阻害物質濃度を下げて分析を行う方法などが知られている。この方法では、希釈した分 DNA 濃度も低くなり、DNA 検出感度が低下する弊害があるため、更に DNA 検出率を増幅させる PCR 試薬を使用する等対応策が報告されている。追加コストに関してはいぶ改善されるため企業として導入し易さを感じるが、実際のサンプルでは、どの生物の DNA がどれほど含まれているのか、またどれくらいの濃度で阻害物質が含まれているのかはわからないため、適正な希釈率を探る必要がある点では簡便な方法とは言い難い。

本研究では、安価で追加労力の少ない新しい方法で阻害物質の影響を軽減・除去できないものか実験を試みた。また、既知の希釈法に関して、どの程度希釈することで DNA の検出が難しくなるのか合わせて実験を行った。

2. 材料と方法

先に述べたように、「腐植酸」はそもそも単一物質から構成されているわけではなく、フミン質と呼ばれる高分子有機化合物の総称である。そのため、野外で採水したサンプルに阻害物質として腐植酸が含まれている場合、これら

阻害物質が単一種類のみ含まれるわけではなく、複雑に混ざり合ったものが存在していることになる。また、野外で採水したサンプルにどのような阻害物質がどの程度含まれているのかは千差万別である。そこで、自然状態に近い PCR 阻害物質を再現するため、腐植酸の他、タンニンなどの様々な物質が溶け込んでいる市販の園芸用肥料（腐植酸入り）を実験に供する阻害物質として使用し以下の 3 つの実験を行った。

実験 1. サンプル希釈による阻害物質影響の低減実験

実験 2. サンプル濾過済みフィルターの洗浄による阻害物質影響の低減実験

実験 3. 活性炭による阻害物質除去実験

今回の実験ではニホンザリガニを想定して実験を行った。ニホンザリガニは山間部の源流域を含む小川または湖沼に生息している（中田・松原，2011）。餌としては落葉や落枝が報告されており、その生息水域での腐植酸等による阻害物質の影響の可能性が十分考えられる。

2.1 PCR 阻害物質

PCR 阻害物質として、市販の園芸用腐植酸「地力の素 カナディアンフミン リキッド 12」（株式会社ピィアイシー・バイオ）を使用した。本肥料は黒色溶液で、腐植酸濃度として 15.97% と表記されている。実際に本肥料原液に DNA を添加し PCR 阻害物質として働くかどうかを検討したところ、8 反復中陽性反応が全く検出されないことから、PCR 阻害物質として働くことが確認された。

2.2 ニホンザリガニの筋肉からの DNA 抽出

DNA 抽出の対象とする筋肉組織は無水エタノールに保存していたため、まず 1 検体ずつエタノール除去のため蒸留水を用いて洗浄・エタノール除去した後、筋肉を採取した。なお、DNA 抽出作業はゴム手袋、マスクを着用し行った。また、検体ごとに使用器具（ピンセット）はガスバーナーであぶり蒸留水で入念に洗浄した。DNA 抽出には DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) を用いた。抽出作業は標準プロトコルに従い、最終的に 200 μ L の DNA 抽出液を得た。

2.3 各実験水の調製

2.3.1 試験水

上記で抽出した DNA 抽出液 200 μ L を 1L の蒸留水に添加し、ベンザルコニウム塩物液 オスバン S (日本製薬株式会社) 1mL を添加したものを試験水とした。試験水は実験 1 および実験 2 で使用する量を考慮し 3L (200 μ L の DNA 抽出液 3 つを混合し添加) 調製した。

2.3.2 腐植酸添加液

上記試験水に腐植酸肥料原液を添加したものを腐植酸添加液とした。腐植酸肥料原液の添加量は、実際のニホンザリガニが生息しうる環境において環境 DNA サンプルとして採水を断念する程度の濃度 (透視度 10cm 程度) になるように濃度調整を行った結果、試験水 1L に対し腐植酸肥料原液 1.5mL の添加が妥当であると判断した。この調製した腐植酸添加液は、実験 1 では希釈原液として使用し、また実験 2 ではそのまま使用した。

2.3.3 腐植酸希釈液

蒸留水に腐植酸肥料原液を添加したものを腐植酸希釈液とした。この腐植酸希釈液は実験 3 での水槽水として使用した。蒸留水に対する腐植酸肥料原液の添加量は、活性炭の目詰まりによる阻害物質除去効果の低下を考慮し、1L 蒸留水に対し腐植酸肥料原液 0.15mL 添加とした。

2.4 各実験方法

2.4.1 実験 1 サンプル希釈による阻害物質影響の低減実験

水溶性の阻害物質の影響を軽減するため、採水サンプルを希釈することはいくつかの文献で報告されている (高橋ら, 2016; 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver.2.2, 2020)。今回、どの程度の希釈で効果があるのかを確認するために、先に調製した試験水ならびに腐植酸添加液を原液 (1 倍希釈) として、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、1,000 倍に蒸留水で希釈し、それぞれで PCR の増幅がみられるか実験を行った。いずれの希釈倍率でも一律に 200mL を 47mm の GF/F フィルター (Whatman) で濾過した。濾過したフィルターは一連の PCR 作業に供するまで冷凍保存した。

2.4.2 実験 2 サンプル濾過済みフィルターの洗浄による阻害物質影響の低減実験

サンプルを希釈する方法では、PCR 阻害物質の濃度を下げてその影響の軽減するため、実質的には現場から得た採水サンプルの一部のみ濾過することになる。そのため先に述べたように、実際に濾過される DNA 量は希釈率が高い程減少してしまい、その後の DNA 検出率に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、試験水ならびに腐植酸添加液をそれぞれ濾過し、その後フィルターに残存していると考えられる水溶性の PCR 阻害物質を洗い流す方法を試みた。実験では、洗浄量の違いで DNA 検出率がどの程度異なるのかを検討した。試験水ならびに腐植酸添加液 200mL をそれぞれ 47mm の GF/F フィルター (Whatman) で濾過した後、濾過量の 0.1 倍 (20mL)、1 倍 (200mL)、10 倍 (2L)、25 倍 (5L) のそれぞれの水量の水道水を再度濾過 (洗浄) した。濾過したフィルターは一連の PCR 作業に供するまで冷凍保存した。

2.4.3 実験 3 活性炭による阻害物質除去実験

活性炭は脱臭をはじめ、各種の吸着材として利用されてきている。熱帯魚などを飼育する際においても、水質改善・維持を目的として各種販売されている。これら活性炭は用途に応じて使い分けられるが、中でも水槽内に沈木を入れた際生じるタンニンなどの茶褐色の物質を濾過・吸着させる活性炭が販売されている。本試験では、活性炭「超高性能活性炭ブラックホール」(キョーリン社製) を用いて、活性炭吸着による PCR 阻害物質の除去が可能かどうかの実験を行った。

実験では容量 5L の水槽に MEGA POWER 2045 (ジェックス株式会社) の外部濾過器を接続し、その濾過槽内に濾材として超高性能活性炭ブラックホールを使用し循環を行った。

水槽に腐植酸希釈液を入れ、濾過器を介して 6 日間循環を行った。水槽内の腐植酸希釈液は実験開始時と実験終了時 (実験開始から 6 日後) に 47mm の GF/F フィルター (Whatman) でそれぞれ 200mL 濾過を行った。濾過を行う際、DNA 抽出液 (100 μ L) をそれぞれの腐植酸希釈液に添加し濾過を行った。濾過したフィルターは一連の PCR 作業に供するまで冷凍保存した。

2.5 フィルターからのDNA抽出方法

DNA抽出はDNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen)を用い、Yamamoto *et al.* (2016)の手法に従った。DNA抽出作業はゴム手袋、マスクを着用し行った。また、検体ごとに使用器具（ピンセット）をガスバーナーであぶり蒸留水で入念に洗浄した。

コレクションチューブにカラムを除去したミニスピカラムをつけ、ピンセットを用いて濾過したGF/Fフィルターをミニスピカラムの中に入れた。その後、8,000回転で1分間遠心操作し、GF/Fフィルターに残った水分を取り除いた。未使用のコレクションチューブに先ほど遠心操作したミニスピカラムを挿し直し、蒸留水を200 μ L、Buffer ALを100 μ L、Proteinase Kを10 μ L添加し、56 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。8,000回転で1分間遠心操作後、ミニスピカラムにTE Bufferを150 μ L添加した。その後、室温で1分間インキュベートし、8,000回転で1分間遠心操作した。遠心操作後、コレクションチューブにBuffer ALを100 μ L、99.5%エタノールを300 μ L添加した。新しいミニスピカラムにろ液を入れ、8,000回転で1分間遠心操作した。以降はDNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen)の標準プロトコルに従い作業しDNA抽出を行った。

2.6 リアルタイムPCR

環境DNAの検出にはThermal Cycler Dice Real Time System III (TaKaRa bio)を用いて実施した。1検体当たりのPCR反応液は25 μ Lであり、組成は12.5 μ LのProbe qPCR mix (TaKaRa bio)、各0.5 μ Lの10 μ Mプライマー (Thermo Fisher Scientific)、1.0 μ Lの10 μ Mプローブ (Thermo Fisher Scientific)、8.5 μ Lの滅菌蒸留水、2.0 μ Lの抽出DNAとした。PCRの条件は95 $^{\circ}$ Cで10秒間変性、続いて95 $^{\circ}$ Cで5秒間、60 $^{\circ}$ Cで30秒間の55サイクルをした。使用したプライマーおよびプローブは池田 (2019)の開発した以下のものを用いた。

CamjCOI_F

(5'-GGGATAGTTGGAACCTTCATTAAGAATAA-3')

CamjCOI_R

(5'-CAAAAGCATGTGCAGTAACAAC-3')

CamjCOI_probe

(5'-FAM-CGGGTAGAATTAGGTCAAC-TAMRA-3')(プローブは蛍光色素の違いで最後がTAMRAとなっている)

2.7 その他

各種実験で使用する器具に関しては、山中ら (2016)に准じ、10%濃度の次亜塩素酸ナトリウムで洗浄した後、水道水と蒸留水で洗浄したものを使用した。この洗浄処理は、それぞれのサンプルの濾過を行う前に毎回行った。

3. 結果

本実験で行った分析の結果をまとめたものを表1に示す。

3.1 実験1 サンプル希釈による阻害物影響の低減実験

試験水で行った1倍、2倍、10倍、100倍、1,000倍希釈実験において、1倍希釈では8反復中8回陽性反応が検出され、その際のCt値は最大で34.07、最小で30.85であり、平均値は32.23であった。2倍希釈では8反復中8回陽性反応が検出され、Ct値は最大で31.84、最小で30.42であり、平均値は31.15であった。10倍以上希釈した試験水では、DNAの検出は確認されなかった。

一方、腐植酸添加液で実験を行った結果、1倍から1,000倍希釈のいずれでも8反復中に陽性反応が確認された(1倍希釈:7回、2倍希釈:8回、10倍希釈:3回、100倍希釈:5回、1,000倍希釈:2回)。

Ct値に関して、1倍希釈では最大で40.25、最小で36.81であり、平均値は38.49であった。2倍希釈では最大で38.97、最小で35.02、平均値は36.02であった。10倍希釈では最大で36.07、最小で35.27、平均値は35.74であった。100倍希釈では最大で37.21、最小で35.89、平均値は36.35であった。1,000倍希釈では最大で39.31、最小で37.13、平均値は38.22であった。

1倍希釈でのCt値は、最大値、最小値および平均値のいずれでも他の希釈率における同項目のCt値に比べて大きい値を示したが、2倍希釈または10倍希釈で減少し、その後100倍希釈から1,000倍希釈にかけて増加する傾向がみられた(図1)。

3.2 サンプル濾過済みフィルターの洗浄による阻害物質影響の低減実験

濾過量の0.1倍(20mL)、1倍(200mL)、10倍

表1 各実験における陽性反応回数と Ct 値の結果

実験方法	希釈段階	洗浄	その他	陽性回数 (8反復中)	Ct値			
					最大値	最小値	平均値	
実験1	試験水 (腐植酸無添加)	1倍希釈	-	-	8	34.07	30.85	32.23
		2倍希釈	-	-	8	31.84	30.42	31.15
		10倍希釈	-	-	0	N	N	N
		100倍希釈	-	-	0	N	N	N
		1,000倍希釈	-	-	0	N	N	N
	腐植酸添加液	1倍希釈	-	-	7	40.25	36.81	38.49
		2倍希釈	-	-	8	38.97	35.02	36.02
		10倍希釈	-	-	3	36.07	35.27	35.74
		100倍希釈	-	-	5	37.21	35.89	36.35
		1,000倍希釈	-	-	2	39.31	37.13	38.22
実験2	試験水 (腐植酸無添加)	0.1倍(20ml洗浄)	-	-	6	33.57	31.64	32.58
		1倍(200ml洗浄)	-	-	8	36.86	33.73	35.06
		10倍(2L洗浄)	-	-	5	38.39	36.51	37.48
		25倍(5L洗浄)	-	-	4	39.92	38.14	39.12
	腐植酸添加液	0.1倍(20ml洗浄)	-	-	5	40.50	38.16	39.09
		1倍(200ml洗浄)	-	-	7	39.97	36.41	38.43
		10倍(2L洗浄)	-	-	6	40.99	38.52	39.64
		25倍(1250ml洗浄)*	-	-	4	40.26	37.56	39.14
実験3	腐植酸希釈液	-	-	1日目(実験開始時)	7	41.56	36.24	39.04
		-	-	6日目(実験終了時)	8	34.28	30.37	32.21

※1：表中の N は陽性反応が出なかったためデータがない状態を指す。

※2：表中の * 印は同一実験内での他の試験水とは異なる濾過量であったことを示す(50mL 試験水濾過)。

(2L) および 25 倍 (5L) それぞれの水量で試験水の濾過済みのフィルターを洗浄した結果、すべての区分で 8 反復中に陽性反応が検出された (0.1 倍：6 回、1 倍：8 回、10 倍：5 回、25 倍：4 回)。

Ct 値に関して、0.1 倍 (20mL) 洗浄では最大で 33.57、最小で 31.64 であり、平均値は 32.58 であった。1 倍 (200mL) 洗浄では最大で 36.86、最小で 33.73、平均値は 35.06 であった。10 倍 (2L) 洗浄では最大で 38.39、最小で 36.51、平均値は 37.48 であった。25 倍 (5L) 洗浄では最大で 39.92、最小で 38.14、平均値は 39.12 であった。

試験水では、洗浄する水量が多いほど Ct 値の最大値、最小値および平均値のいずれも増加する傾向がみられた (図2)。

腐植酸添加液で同様の実験を行った結果、濾過量の 0.1 倍 (20mL)、1 倍 (200mL)、10 倍 (2L) にあたる水量での洗浄は行うことができたが、濾過量の 25 倍にあたる 5L での洗浄ではフィルターが目詰まりのため途中から洗浄できなかった。洗浄することができた区分では、いずれも 8 反復中に陽性反応が検出された (0.1 倍：5 回、

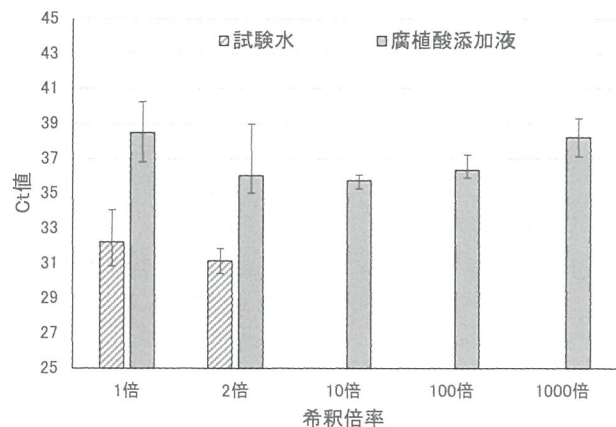


図1 サンプル希釈による阻害物質影響の低減実験結果。棒グラフは平均値を示し、各棒グラフの上下の - は最大値、最小値を示す。

1 倍：7 回、10 倍：6 回)。

Ct 値に関して、0.1 倍 (20mL) 洗浄では最大で 40.50、最小で 38.16、平均値は 39.09 であった。1 倍 (200mL) 洗浄では最大で 39.97、最小で 36.41、平均値は 38.43 であった。10 倍 (2L) 洗浄では最大で 40.99、最小で 38.52、平均値は 39.64 であった。

濾過量ならびに洗浄水量が異なるため他の洗浄量の結果と同列に扱うことはできないが、濾過液に対する 25 倍

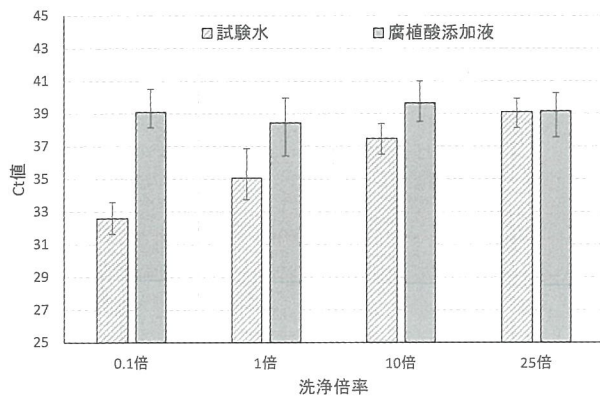


図2 サンプル濾過済みフィルターの洗浄による阻害物質影響の低減実験結果。

棒グラフは平均値を示し、各棒グラフの上下の-は最大値、最小値を示す。

の水量で洗浄を行った結果 (表 1*印: 50mL 濾過後 1,250mL の水道水で洗浄)、8 反復中 4 回陽性反応が確認され、Ct 値は最大で 40.26、最小で 37.56、平均値は 39.14 であった。

いずれの洗浄量でも陽性反応が検出され、Ct 値は最大値、最小値および平均値ともに洗浄量に関わらずほぼ同様の値となった (図2)。

3.3 活性炭による阻害物質除去実験

活性炭を濾材とした外部濾過器を介して水槽内の腐植酸希釈液の循環を行った結果、実験開始後 2 日目あたりから徐々に試験水の水色が薄くなり、概ね 6 日後には腐植酸希釈水の水色が無色になった (図3)。

実験開始時および実験終了時 (実験 6 日目) の腐植酸希釈液に DNA 抽出液を添加したものをそれぞれ濾過し PCR を行ったところ、いずれにおいても陽性反応が検出された。実験開始時では、8 反復中 7 回陽性反応が検出され、Ct 値は最大で 41.56、最小で 36.24、平均値は 39.04 であった。実験終了時では 8 反復中 8 回陽性反応が検出され、Ct 値は最大で 34.28、最小で 30.37、平均値は 32.21 であった。

陽性反応回数に関しては実験開始時と実験終了時でほぼ同じであったが、Ct 値に関しては実験終了時で最大値、最小値および平均値のいずれも低い値を示した (図4)。

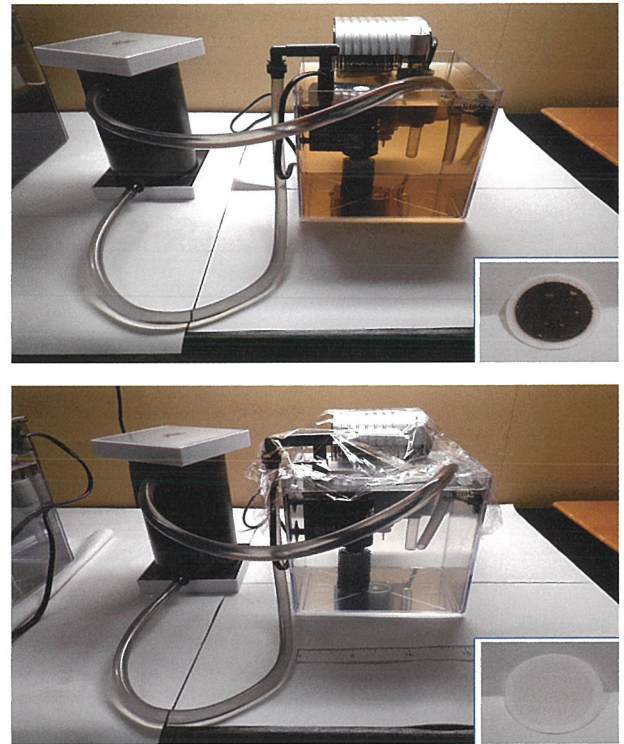


図3 活性炭による阻害物質除去実験装置と濾過フィルター。上: 実験1日目 下: 実験6日目

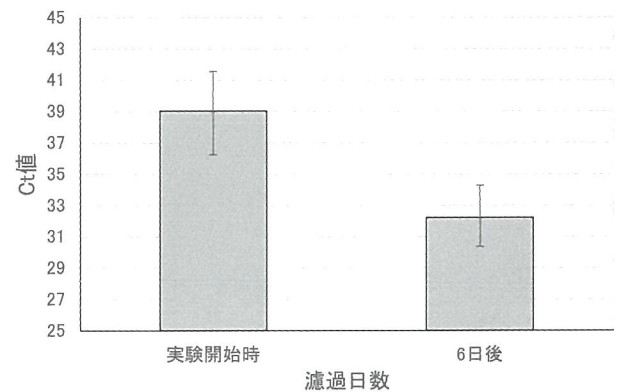


図4 活性炭による阻害物質除去実験結果。

棒グラフは平均値を示し、各棒グラフの上下の-は最大値、最小値を示す。

4. 考察

環境 DNA 分析における Ct (Threshold Cycle) 値は一般に試水中の初期鋳型量 (DNA 量) が多いほど小さく、少ないほど大きな値をとる。

実験 1 の 1 倍希釈において、試験水と腐植酸添加液での陽性反応回数と Ct 値を比較すると、陽性反応回数は両

方ともほぼ差がなかったが、Ct 値は腐植酸添加液の方が高い値を示している。陽性反応回数に差がなかったのは腐植酸添加液の阻害物質の濃度が低かったためと考えられるが、Ct 値における差は、初期 DNA 量が同じ試験水を使用しているため、腐植酸が阻害物質として影響を及ぼした結果と考えられる。

希釈による阻害物質影響の低減実験（実験1）では、試験水において10倍希釈以上での陽性反応が検出されなかった。これは、10倍以上の希釈ではDNA量が陽性反応を示すほど十分ではなかった可能性と、DNA抽出液を用いたことから10倍以上の希釈では洗浄効果が影響し、フィルターからDNAが抜け落ちているという2つの可能性が考えられる。一方、腐植酸添加液では1～1,000倍の希釈率まで陽性反応が検出された。腐植酸添加液でのCt値の平均値をみると、本来希釈率に従いDNA濃度が薄くなるため、それに従いCt値も大きくなることが予測されるが、実験結果では希釈率とは無関係にほぼ横ばいになる結果であった。

以上のことを考慮すると、試験水では10倍以上でもDNA量としては陽性反応を示すことが可能な量のDNAが存在していたものの、フィルターからの脱落が生じていたため、10倍以上の希釈率では陽性反応が検出されなかった可能性が考えられる。また、腐植酸添加液では濾過時に腐植酸の懸濁物質によるフィルターが目詰まりが生じたため、DNAの脱落が防止され、陽性反応が検出された可能性が考えられる。

濾過済みフィルターの洗浄による阻害物質影響の低減実験（実験2）において、試験水では20mL～5Lまでの洗浄水量のすべてで陽性反応が検出され、Ct値は洗浄水量が多くなるほど大きい値を示した。このことから、洗浄水量が多くなるほど、フィルターからのDNAの脱落が多くなっていることが示唆される。一方で、腐植酸添加液では20mL～2Lまでの水量で洗浄を行うことができたが、5Lでは洗浄途中で濾過が停止した。また、20mL～2Lでの水量で洗浄した際のCt値は、最大値、最小値および平均値のいずれもが濾過量に相関せずほぼ一定量を示した。このことから、希釈法での状況と同じく、腐植酸物質によるフィルターが目詰まりが生じ、フィルターからのDNAの脱

落防止され、フィルター上にDNAが残されていた可能性が考えられる。

活性炭によるPCR阻害物質除去の実験（実験3）では、濾過器を介した循環経過日数に従い、水槽内の腐植酸希釈液の色が薄くなり、循環後3～4日で水槽内の腐植酸希釈液の色がほぼ無色へ変化した。また、実験開始時と実験終了時の両方でそれぞれ濾過を行った結果、いずれも陽性反応が検出されたが、Ct値には大きな違いがあり、実験終了時の腐植酸希釈液では実験開始時と比べ最大値、最小値および平均値全てで小さい値を示した。このことは、活性炭を用いて循環を行った際、腐植酸希釈液のPCR阻害物質が物理的に除去された可能性があるためと考えられる。

今回の3種の実験は、できるだけ実際に野外で採集するサンプルを想定し行うことを目的としていたが、試行錯誤を含めた予備実験的な色合いが濃いため、実際のサンプルの再現に関して実験を行う際の課題が浮き彫りになった。例えば、できるだけ各実験に供するDNA濃度を一定にした方が良いのではないかと配慮のもと、DNA抽出液を使用した際に、フィルターの洗浄による実験で顕著に示されるように、GF/FフィルターからのDNAの脱落の可能性が示された。実際に野外で採水した場合、DNAは細胞又は組織などある程度の大きさを持って存在しているものも含まれると考えられるため、洗浄などを含め濾過によるフィルターの抜け落ちは今回ほどの影響はないのかもしれない。また、今回PCR阻害物質として使用した園芸用肥料は液体タイプであったため、フィルターが目詰まりが生じることは予測していなかった。そのため、実験1ならびに実験2でのPCR阻害物質の除去の効果は確認できなかった。しかし、実際に野外で採水したサンプルでは、底泥などの巻き上げや懸濁物質が含まれるため同様の状況になりうるということが容易に予測される。

以上を踏まえると、フィルター上に付着したそれら阻害物質の除去は洗浄では困難であるため、阻害物質の物理的除去はフィルターでの濾過段階の作業で行うよりも、濾過以前の段階で除去できる方法を模索する方がよいと考えられる。

このような中、実験3での活性炭による阻害物質除去

実験で PCR 阻害物質を物理的に除去できそうな結果が得られたことはやや希望が持たれる。何らかの形で活性炭を介してサンプル採水を行うことができれば、問題解決の糸口になるかもしれない。ただし、簡易さという観点は言わずもがな、環境 DNA として水中に懸濁している細胞や組織自体も活性炭に吸着されてしまう可能性も含め、さらなる検証が必要である。

参考文献

- 池田幸資. 2019. 環境 DNA を用いた絶滅危惧種ニホンザリガニの生息要因と外来種ウチダザリガニの侵入状況の解明. 北海道大学. 博士(環境科学) 甲第 13539 号, 1-95.
- 中田和義・松原創. 2011.2.5 ザリガニ類の生態と保全. In: 川井唯史・中田和義(編), エビ・カニ・ザリガニ 淡水甲殻類の保全と生物学. 生物研究社. 176-199.
- 高橋輝彦・山中祐樹・源利文・土居秀幸・内井喜美子. 2016. 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～. 日本生態学会誌, 66: 583-599.
- Uchii, K., Doi, H., Okahashi, T., Katano, I., Yamanaka, H., Sakata, M. K. and Minamoto, T. 2019. Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. *Environmental DNA*, 1 (4) : 359-367.
- 山川央・宮正樹. 2019. 環境 DNA 分析技術の外来種対応への応用 印旗沼カミツキガメを例として. *科学と生物*, 57 (5) : 311-316.
- Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., Tsuji, S., Hashizume, H., Kubonaga, S., Horiuchi, T., Hongo, M., Nishida, J., Okugawa, Y., Fujiwara, A., Fukuda, M., Hidaka, S., Suzuki, W. K., Miya, M., Araki, H., Yamanaka, H., Maruyama, A., Miyashita, K., Masuda, R., Minamoto, T. and Kondoh, M. 2016. Environmental DNA as a 'Snapshot' of Fish Distribution: A Case Study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLOS ONE*, 11(3) : e0149786.
- 山中祐樹・源利文・高橋輝彦・内井喜美子・土居秀幸. 2016. 環境 DNA 分析の野外調査への展開. *日本生態学会誌*, 66 : 601-611.
- 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2. 2(2020年4月3日発行). 2020. 一般財団法人環境 DNA 学会, 1-105.

