

2. 環境 DNA を用いた感染症研究への期待

源 利 文

神戸大学大学院人間発達環境学研究所

環境中の DNA 情報から微生物だけでなくマクロ生物の生態を読み解こうとする「環境 DNA 分析」と呼ばれる技術が急速に発展している。環境 DNA とは水や土などの環境媒体に含まれる DNA の総称であり、生物体そのものに含まれる DNA や、糞や体表粘液などを介して放出されたマクロ生物の生体外 DNA を含む。環境 DNA の分析には大きく分けて、種特異的検出とメタバーコーディングの2種類の手法があり、目的によって使い分けられる。適用可能な対象は微生物から脊椎動物まで、遺伝子として DNA をもつあらゆる生物（ここではウイルスを含む）であり、川や池などの陸水域だけでなく海域への適用も報告されている。本稿ではマクロ生物の環境 DNA 分析の現状を紹介するとともに、ウイルス学をはじめとする感染症の研究分野への応用可能性、およびそのために解決すべき課題について述べる。

環境 DNA 分析とは

この15年ほどの間に、環境中の DNA 情報を用いて生物の生息域や生息数を推定しようとする「環境 DNA 分析」と呼ばれる技術が急速に発展している^{1,2)}。環境 DNA とは環境媒体（水や土など）に含まれる DNA の総称であり、微生物（本稿ではウイルスを含む）の場合のように生物体そのものに含まれる DNA や、大型の動物の場合のように、糞や体表粘液などを介して放出された生体外の DNA を含む。環境 DNA 分析は微生物を対象とした研究が先行して進んでいたが、ここ数年でマクロ生物への適用例が多数報告されるようになってきた。著者はマクロ生物の環境 DNA 分析を専門としており、本稿ではマクロ生物の環境 DNA 分析の現状を紹介するとともに、ウイルス学を初めとする感染症の研究分野への応用可能性について議論したい。

マクロ生物の環境 DNA 分析が初めて報告されたのは、2008年のフランスの研究チームによるものである³⁾。この

研究では、ウシガエル (*Rana catesbeiana*) のオタマジャクシが生息する池としない池でそれぞれ水を汲み、水中から得た DNA サンプルから、ウシガエルの DNA が PCR 法によって検出されるかどうかを調べた。その結果、ウシガエルの生息する池からは DNA が検出され、生息しない池からは検出されず、生物の在／不在と DNA の検出／非検出が一致した。つまり、池にいて水を汲めば、マクロ生物（ここではウシガエルのオタマジャクシ）の生息を知ることができるということである。この報告がきっかけとなり、マクロ生物の環境 DNA 分析に関する研究がはじまった。これまでに、ヨーロッパ、アメリカのチームに加え、日本の研究チームも多数の論文を発表しており、マクロ生物の環境 DNA 分析は国際的にみても日本のチームに強みのある分野である¹⁾。

このような手法によって、両生類や魚類といった比較的大型の脊椎動物だけでなく³⁻⁹⁾、貝などの軟体動物¹⁰⁾、ザリガニなどの甲殻類¹¹⁾、あるいは沈水植物^{12,13)}でも環境 DNA 分析に成功した例が報告されている。また、適用可能なのは湖や川といった淡水域から海域まであらゆる水域であることがすでに報告されている²⁾。

連絡先

〒657-8501

兵庫県神戸市灘区鶴甲3-11

神戸大学大学院人間発達環境学研究所

TEL/FAX: 078-803-7743

E-mail: minamoto@people.kobe-u.ac.jp

環境 DNA 分析の流れ

マクロ生物の環境 DNA 分析の流れを図1に示した。現場での作業は基本的に採水のみである。15mL から数L 程度の水をプラスチックボトル等に汲む。大切なのは器具類のデコンタミネーションで、採水用のボトルを含めサン

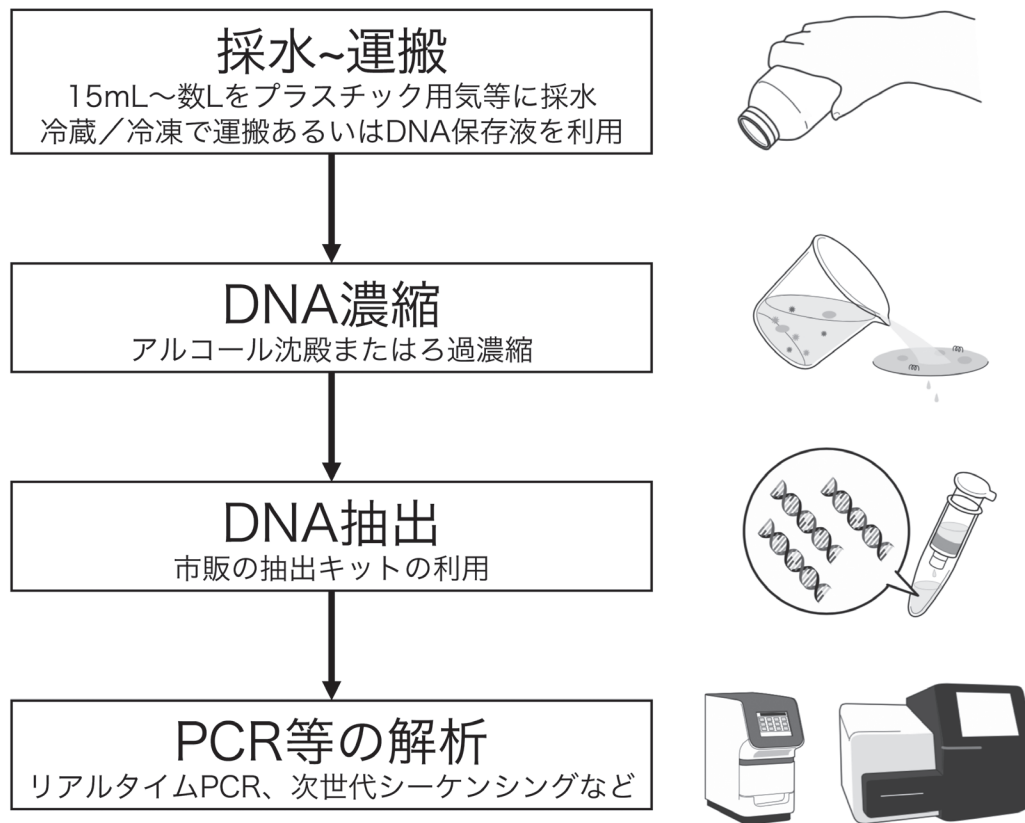


図1 環境DNA分析の流れ

ルと接する全ての容器、器具類を次亜塩素酸ナトリウム溶液（塩素系漂白剤）でデコンタミネーションするか、使い捨てのものを用いる。環境中のDNAは速やかに分解することが知られており、サンプルを冷蔵または冷凍して運搬する^{14,15)}、採水現場で濾過して濾紙を冷凍で運搬する¹⁶⁾、DNAの分解を阻害する保護溶液を用いて運搬する¹⁷⁻¹⁹⁾などの分解防止策がとられる。サンプル水の中には様々な生物種のDNAが含まれているが、分析対象のDNAは一般に希薄であり、何らかの形でDNAを濃縮する必要がある。サンプル容量が小さい場合にはエタノール沈殿が用いられ、大きい場合には濾紙を用いた濾過が用いられるのが一般的である。環境中のマクロ生物のDNAは1-10 μ m程度のサイズ分画に最も多いとされており²⁰⁾、0.45~3.0 μ m程度の孔径の濾紙を用いた濾過が効率的とされる¹⁷⁾。濃縮したDNAからのDNA抽出は様々な手法が用いられるが、これまでの文献でもっともよく用いられているのはQIAGEN社のDNeasyカラムを用いた方法である。著者らも基本的にこの方法でDNA抽出を行っている^{8,21)}。サンプルによってはこの手法ではPCR阻害物質が混入することがあるが、そのような場合には市販されている阻害物質の除去カラムなどを用いることもある。このような形でDNAを濃縮、精製した後は通常のPCR、リアルタイム

PCR、デジタルPCRといった一般に用いられる分子生物学的なテクニックが利用可能である。著者らは1Lのサンプル水から100 μ Lの濃縮サンプルを得て、そのうち1-5 μ L程度をPCRの鋳型として用いるので、一つのサンプルから幾つかの解析を行うことも可能である。以下では精製したDNAの解析について述べる。

環境DNAからの種特異的DNA検出と定量

マクロ生物の環境DNA分析手法には大きく分けて2種類のアプローチがある。第一のアプローチがここで述べる種特異的な検出法である。これは、特定の対象種のDNAだけを選択的に増幅・検出することで行われる。ただし、環境中の雑多なDNAの中から対象種のDNAだけを選択的に増幅するようなPCRプライマーを開発することは困難であり、検出の特異性向上のために、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法が用いられることが多い。

環境DNAの種特異的検出の典型的な適用例としては外来種の分布域把握がある。例えば、広島県の70箇所のため池で目視によるブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の生息確認と環境DNA検出を試みた研究では⁶⁾、目視で生息が確認された8箇所の池全てからブルーギルのDNAが検出されたうえ、目視では確認できなかった11の池から

も DNA が検出され、通常の生態調査の手法よりも迅速かつ高感度に検出が可能であることが示された。この他にも、北米の五大湖におけるアジア由来のコイ科魚類の環境 DNA 検出⁹⁾、バラスト水によって運ばれた巻貝の DNA 検出など¹⁰⁾、環境 DNA を用いて、外来種の侵入状況を把握する取り組みが各地で行われている。また、外来種の駆除活動を行った後に駆除に成功したかどうかの指標として環境 DNA を用いることも可能であろう。

種特異的な環境 DNA 検出の応用例として、外来種の分布把握の次によく報告されるのが、希少種の生息地把握である。国内の研究例では、環境省レッドリストで絶滅危惧 IB 類に指定されているコイ科のカワバタモロコ (*Hemigrammocypris rasborella*) の新規生息地を発見した事例が報告されている²²⁾。これによると、兵庫県の 81 箇所の池で採水をした結果、6 箇所の池でカワバタモロコの DNA が検出され、引き続き個体の捕獲調査を実施したところ、6 箇所のうち 5 箇所で実際にカワバタモロコが生息していることが確認された。つまり、野外調査としては 5 日ほどかけて水を汲むだけでカワバタモロコの新規生息地を 5 箇所も発見できたということになる。これは、これまで相当の努力によって兵庫県下の生息地が 30 箇所ほど知られていただけであることを考えると、効率的に新たな生息地を見つけられることを示している。この他にも、特別天然記念物であるオオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) の分布域を調査した例や⁴⁾、ニホンザリガニ (*Cambaroides japonicus*) の検出例¹¹⁾が報告されており、希少種の生息地探索に環境 DNA 分析が有効であることが次々と示されている。

あるところに多数の個体が生息していれば、つまり生息密度が高ければ、水中の環境 DNA 濃度も高まることが期待される。逆に言えば、環境 DNA 濃度が高いところにはより多くの個体（あるいはより大きな個体）が生息している可能性がある。このような発想に基づき、環境 DNA 量から特定の種の個体数やバイオマスを推定しようという試みも行われている。Takahara et al. (2012)⁷⁾はこのような取り組みの先駆的な例であるが、水槽実験と野外実験池を用いた実験により、水槽や池に生息するコイ (*Cyprinus carpio*) のバイオマスと環境 DNA 量の間には正の相関関係があることを初めて明らかにした。このような例はその後両生類でも成り立つことなどが報告されてきた²³⁾。最近では河川におけるアユのバイオマスとその DNA 量の間にも正の相関があることが示され²⁴⁾、また海洋においても魚群探知機によって推定したマアジの生息数と環境 DNA 量の間にも正の関係があること⁸⁾、つまりバイオマスの推定が可能であることが報告されており、環境 DNA の定量によるバイオマス推定は池や湖などの閉鎖系だけでなく川や海のような開放系でも可能であるといえる。

DNA の量を測る上では主にリアルタイム PCR 法が用い

られて来たが、最近ではデジタル PCR を用いたより高精度な DNA 定量手法も環境 DNA 分析に応用されている^{25,26)}。デジタル PCR とは nL サイズの小さなボリュームのドロップレットや PCR ウェルを多数用いて PCR を行うことで、対象となる遺伝子の数を絶対定量するものである。相対定量を基本とするリアルタイム PCR と比べ、定量精度が高いことや PCR 阻害に強いことなどの利点があり、近年注目されている。さらに、SNP 解析によるハプロタイプ類度の分析など、比較的新しい手法も環境 DNA 分析に適用されるようになってきた²¹⁾。これは、雑多な夾雑物を含む環境 DNA といっても、しっかりと精製してしまえば通常の DNA 実験に用いることができるレベルのサンプルが得られるため、これまでに蓄積された手法を用いることが可能であるがゆえである。現在は水サンプルを用いた分析が主流の環境 DNA 分析であるが、湖底堆積物からの DNA 検出も報告されており²⁷⁾、このようなサンプルからの DNA 精製手法が確立すれば、より多くの情報が得られるようになることだろう。

環境 DNA メタバーコーディング

環境 DNA 分析のもう一つのアプローチが環境中の DNA から特定の分類群の遺伝子をまとめて増幅して、次世代シーケンシングなどの技術を用いて分析する環境 DNA メタバーコーディングである。微生物の分野では 16S rRNA に代表される優れたメタバーコーディングマーカーがすでに開発されており、このような分析がルーティーンに行われているが、マクロ生物を対象としたメタバーコーディング手法は今まさに開発が進んでいるところである。マクロ生物のメタバーコーディングは著者を含むチームが河川の魚類に適用したのが最初の報告例である²⁸⁾。この研究では、水槽実験によって、環境 DNA 分析が水槽内の魚種を過不足無く検出することや、京都府の由良川で採取した 2L の水サンプルから数種の魚の DNA を検出することに成功した。これは、水を採取するだけで、その水域の生物相を把握できる可能性を示した画期的な成果である。ただし、このときに用いられたプライマーには増幅バイアスがあることが明らかであり、魚類相全体を解明するには、増幅バイアスの少ない新たなプライマーが必要であった。この増幅バイアスはバーコード領域をミトコンドリアのチトクローム B (CytB) 遺伝子に設定したことに由来する。魚類では CytB やチトクロームオキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子が通常のバーコーディング目的でよく解析され、データが蓄積されている。しかし、これらのタンパク質をコードする遺伝子はアミノ酸レベルでは保存的であるものの、塩基レベルでは配列の保存性が低く、真にユニバーサルなプライマーの設計が困難である。同時期に発表された別のチームの論文でも同様の問題があり、魚類相の把握に用いるには困難が多かった^{29,30)}。

このような困難を打開したのはミトコンドリアの12S rRNAに代表されるリボソーム遺伝子におけるメタバーコーディングプライマーの開発である。リボソーム遺伝子は一般にステム・ループ構造と呼ばれる構造を持ち、二本鎖を形成するステム部分は進化速度が非常に遅く、つまり生物種間での相同性が高く、ループ部分は進化速度が速い、つまり種間の変異が多いという特徴がある。このことを利用することで、ステム部分のような進化速度の遅い領域にプライマーを設計し、ループ部分のような進化速度の速い領域を挟んでPCR増幅することで、種の同定に用いることができる。Kelly et al. (2014)³¹⁾は12s rRNA遺伝子に設計したメタバーコーディングプライマーで多くの魚類のDNAの同時検出に成功したが、バーコーディング領域の解像度が低く、検出されたDNA配列からでは属レベルの同定にとどまった。同様に、Valentini et al. (2016)³²⁾も種レベルまで同定することが困難であることを報告している。一方、Miya et al. (2015)³³⁾によって開発されたMiFishプライマーは、魚類の環境DNAメタバーコーディング用のプライマーとしては現時点で世界最高水準のものである。このプライマーを用いることで、例えば沖縄県の美ら海水族館の水槽水から、飼育魚種の93%の種が検出されるなど、MiFishプライマーは幅広い魚種に適用可能であり、種レベルの判別を行うことが可能である。MiFishの唯一の弱点は12S rRNAの遺伝子情報がデータベース上に十分には無いということであったが、徐々に改善され、現在では約7000種の判別が可能になっているということである。

最近では、例えば真核生物をすべてまとめて検出しようという大胆な試みも報告されているが、多くがCOIをバーコード領域として利用している。COIには上述したように増幅バイアスの欠点があり、例えばDeiner et al. (2016)³⁴⁾は河川の水サンプルから19門に渡る296科のDNAを検出したが、魚類のDNAがほとんど検出されないなど、明らかにバイアスがあることが報告されている。このような手法は全体を大づかみにするためには有効と考えられるが、著者のこれまでの経験からは、魚類や哺乳類といったある程度の分類群ごとにメタバーコーディング検出系を作成して、丁寧に解析を積み重ねることが取りこぼしの少ないデータを得るためには有効であると考えられる。

環境DNA手法のウイルス感染症研究への応用

ここまで見てきたように、マクロ生物の分布推定に有用な環境DNA分析であるが、国内でこのような分析がはじまったのはウイルス感染症に関連する研究がきっかけであった。著者の当時所属したグループでは、人間活動が感染症の発生や拡大に与える影響について、コイヘルペスウイルス感染症をモデルとした研究を行っていた³⁵⁾。その中で、DNAウイルスであるコイヘルペスウイルス

(*Cyprinid herpesvirus 3*: 以下CyHV-3と略す)の環境中での動態を調べるために、DNAの定量を行っていた。そのような技術の発展形として、現在のマクロ生物の環境DNA分析がある。ここでは、CyHV-3の動態を水中DNAの定量から明らかにした例について簡単に紹介したい。

コイヘルペスウイルス病は1990年代後半に初めて報告された比較的新しい感染症である³⁶⁾。その病原体であるCyHV-3は*Alloherpesviridae*に分類され、そのゲノムサイズは295kbpと比較的大型のウイルスである³⁷⁾。発見当初はニシキゴイ(*Cyprinus carpio koi*)にのみ感染する病気と考えられたが、後にコイ(*C. carpio*)全般に感染することが明らかになるとともに、世界中に感染が広がった^{36,38)}。日本国内にも2003年に初めて侵入が確認された後、2005年までには全ての都道府県での発症が確認された³⁹⁾。感染したコイは80%以上が死ぬとされ⁴⁰⁾、2004年に琵琶湖で起きたアウトブレイクでは10万匹以上のコイが死んだと推定されている⁴¹⁾。著者を含むグループでは、この病気の発生や拡大に人間活動が影響しているとする仮説を実証するべく研究を行っており、感染の指標として水中のウイルス定量を試みた。

水中のウイルスを選択的に回収、濃縮する技術は幾つかの方法が提唱されており、例えば水中のノロウイルスの遺伝子型が同時期にその集水域で流行した遺伝子型と一致することなどを明らかにした優れた論文が多数出版されている^{42,43)}。中でも、陰電荷膜法と呼ばれるテクニックがCyHV-3の回収にも使えることが示され⁴⁴⁾、著者らもその技術を採用してCyHV-3の季節動態や空間分布を明らかにすることとした。例えば、京都府の由良川でアウトブレイクが発生した直後から継続的に採水して調査を行った結果、アウトブレイクの収束から3ヶ月たっても高濃度のCyHV-3が水中に存在することが明らかになった⁴⁵⁾。また、琵琶湖における調査の結果からは夏場にCyHV-3の濃度が高まり、冬には検出限界以下まで濃度が下がることや、堆積物中に高濃度のウイルスがたまっていることが明らかになり^{46,47)}、また、全国の一級河川のほとんどがコイヘルペスウイルスによって汚染されていることなどがわかった⁴⁸⁾。これらの研究と並行して、湖岸の形状変化が湖内の水温環境を変化させること⁴⁹⁾、水温環境の変化がコイのストレス応答や感染症への感受性を変化させること⁵⁰⁻⁵²⁾、野外におけるCyHV-3の伝播ダイナミクスなどが明らかになった^{53,54)}。

これらの成果から、人間活動による環境変化がCyHV-3のダイナミクスに影響し、感染症の発症や拡大に影響することはある程度ははっきりしたが³⁵⁾、一つ欠落した情報がある。それは、コイの環境中での動態である。実は、コイがどこにどれだけ生息しているのかは、あまりわかっていない。春に湖岸の抽水植物帯で産卵することは良く知られているが、それ以外の時期にはどこにいるのか、例えば琵琶

琵琶湖のような大きな湖ではほぼ何もわからないといって良い。ちょうどその頃水槽で飼育しているコイが相当量のDNAを水槽中に放出していることがわかり、これを利用することで環境中におけるコイの動態を明らかにできるのではないかという発想から、マクロ生物の環境DNAの研究が国内で進むこととなった。

その後、水槽実験や野外の池を用いた実験により、水中の環境DNA量からコイのバイオマスを推定できることが明らかになった⁷⁾。現時点では、ようやく道具立てが揃い、コイの動態とCyHV-3の動態の関係を明らかにする準備が出来たという段階であり、パイロット的な実験の結果も報告されつつある⁵⁵⁾。今後、マクロ生物であるコイとウイルスであるCyHV-3の環境動態がより詳細に明らかになっていくであろう。

環境DNAを用いたタイ肝吸虫の生態解明への取り組み

環境DNA分析の感染症研究への応用は、寄生虫の感染症に関する研究ではじまっている。著者らのグループでは、タイ肝吸虫の生態を明らかにする取り組みを行っている。タイ肝吸虫は扁形動物の一種であり、貝と魚を中間宿主として、ヒトを含む哺乳類が終宿主である寄生虫である。感染者は長期間寄生された結果、肝硬変や胆管癌などを引き起こし、最悪の場合は死に至る⁵⁶⁾。その名前の通り、タイやラオス、カンボジアなどの東南アジア各国に約2000万人の感染者がいると見積もられている。このような複雑な生活史を持つ寄生虫の生態を解明し感染を低減させるためには、第一段階として効果的なホットスポットのスクリーニング手法の開発が求められる。そこで、著者らのチームでは、環境DNA分析を用いて寄生虫および宿主の分布状況の解明に取り組んでいる⁵⁷⁾。

寄生虫症のリスクエリアとなるのは、寄生虫と第一中間宿主である巻き貝、第二中間宿主であるコイ科の魚類が出会う場所である。つまり、それぞれの分布域をマッピングし、その分布が重なる地点にリスクがあるということになる。一杯の水から水域のあらゆる生物の生息状況を把握できる可能性のある環境DNA分析によって、このようなマッピングが可能となる。これまでに分析ツールの開発はおおよそ済みであり、ラオスのサバナケット県で行ったパイロット調査では、水サンプルからタイ肝吸虫のDNAを特異的に検出すること、第一中間宿主である*Bithynia*属の巻き貝のDNAを特異的に検出すること、MiFishプライマーを用いた環境DNAメタバーコーディングによって第二中間宿主となりうるコイ科魚類の分布を網羅的に明らかにすることが可能であることが示された。環境DNA分析の結果推定されたリスクエリアで採れた魚が高頻度でタイ肝吸虫に感染していることもその後の調査で明らかになった。将来的には大規模なリスクマッピングも可能であろう。このように、一杯の水から微生物やウイルスを含むあらゆる

生物の分布を明らかにできる可能性のある環境DNA分析は、感染症の生態学的研究と非常に親和性の高い技術であるといえる。

感染症研究への期待と解決すべき課題

前述のように、環境DNA分析を用いることで、一杯の水サンプルからウイルスを含む微生物から、大型の脊椎動物まであらゆる生物の分布を把握することができる。つまり、病原体とその宿主の分布をひとまとめに解析することが可能である。このような技術を用いることで、一般に複雑な生活史を持つ病原生物の分布や動態、それらを媒介するベクター生物の分布や動態を明らかにすることが可能である。特に、それらの生物の分布域や環境中動態が不明な場合に、広い範囲をスクリーニングする手法として有効であると考えられる。具体的には、デング熱を媒介する蚊の分布を把握する、水を採取してトリインフルエンザウイルスの侵入を把握するなどへの応用が考えられる。

一方で環境DNA分析にはまだ解決すべき課題がいくつか残されている。第一にDNAの由来やその環境中でのダイナミクスが理解されていないことがある。マクロ生物の環境DNAは糞や体表粘液などに含まれていることがわかっているが、どちらがより効いているのかはよくわからない。また上述のように、1-10 μ m程度のサイズであることはわかっているが細胞片のような状態なのか、細胞小器官の状態で水中にあるのか、それともDNAが何らかの粒子に絡みついたような状態で存在しているのかなどがわからず、それゆえ環境中における挙動の理解も進んでいない。

第二の課題は、環境DNAが反映する時空間的な範囲がわからない点である。あるところでDNAが検出されたとして、そのDNAを持っていた生き物は、いつその付近にいたのか、採水地からどれくらいの距離にいたのかなどを正確に理解することは困難である。空間的な面では、環境DNAは河川において数百mから十km超にわたって検出されうるという報告がある^{34,58)}。また、海域においては半径150~250m以内のバイオマスをよく反映するというデータもある⁸⁾。時間的には、生物を取り除いてから数時間から数ヶ月程度検出可能な程度の量が残存するという報告例がある。環境DNAの分解過程は指数関数的であるとされており、放出地点から時間とともに、距離とともに分解や希釈の効果によって減衰する。そのため、時間と空間を分離することは困難であり、様々な仮定をおいた上で時間や空間的な情報を推定していくといったアプローチが必要になる。

さらに、DNAなどの遺伝物質を検出することと、そこに生きている生物（あるいは活性のあるウイルス）がいるということは同義ではないという点には十分に注意を払う必要がある。環境DNA中のラナウイルスのDNA定量に

よってオタマジャクシの感染価を評価できる可能性が報告されるなど⁵⁹⁾、指標としての有効性が議論されているところである。

このように、現段階では様々な課題が残されているマクロ生物の環境DNA分析であるが、初めての報告が2008年であることを考えれば、8年間でかなり研究が進んだと評価していいのではないだろうか。課題となっている部分についても各地で研究が進められており、一つ一つ解決されていくと思われる。環境DNA分析はこれまでに行われてきた釣りや網などを用いた捕獲手法とは特性の違う調査法である。その特性の違いはまだ我々には理解できていない部分もあるが、大きなポテンシャルを持っていることは確かである。このポテンシャルを最大限に活かすことで感染症の研究、とりわけ病原体と宿主の環境動態の解明に役立つ日が来ることを期待したい。

利益相反の開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

引用論文

- 1) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 環境DNA分析の現状と手法確立に向けた展望. 日本生態学会誌 66, 2016.
- 2) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸: 環境DNA分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌 66, 2016.
- 3) Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423-425, 2008.
- 4) Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T: A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology* 52: 358-365, 2015.
- 5) Minamoto T, Uchii K, Takahara T, Kitayoshi T, Tsuji S, Yamanaka H, Doi H: Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Ecology Resources*, in press.
- 6) Takahara T, Minamoto T, Doi H: Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *Plos One* 8: e56584, 2013.
- 7) Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z: Estimation of fish biomass using environmental DNA. *Plos One* 7: e35868, 2012.
- 8) 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 KW, Miya M, Araki H, Yamanaka H, Maruyama A, Miyashita K, Masuda R, Minamoto T, Kondoh M: Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *Plos One* 11: e0149786, 2016.
- 9) Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM: "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4: 150-157, 2011.
- 10) Ardura A, Zaiko A, Martinez JL, Samuiloviene A, Borrell Y, Garcia-Vazquez E: Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water. *Journal of Molluscan Studies* 81: 495-501, 2015.
- 11) Ikeda K, Doi H, Tanaka K, Kawai T, Negishi JN: Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Conservation Genetics Resources* 8: 231-234, 2016.
- 12) Fujiwara A, Matsuhashi S, Doi H, Yamamoto S, Minamoto T: Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. *Freshwater Science*, 35: 748-754, 2016.
- 13) Matsuhashi S, Doi H, Fujiwara A, Watanabe S, Minamoto T: Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants. *Plos One* 11: e0156217, 2016.
- 14) Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS: Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* 183: 85-92, 2015.
- 15) Takahara T, Minamoto T, Doi H: Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biological Conservation* 183: 64-69, 2015.
- 16) Yamanaka H, Motozawa, H., Tsuji, S., Miyazawa, R. C., Takahara, T., Minamoto, T.: On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research* 31: 963-967, 2016.
- 17) Minamoto T, Naka T, Moji K, Maruyama A: Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology* 17: 23-32, 2016.
- 18) Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, McVeigh MM, Lodge DM: The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources* 15: 168-176, 2015.
- 19) Yamanaka H, Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsui, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., Kondo, A. : A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, in press.
- 20) Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM: Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676-684, 2014.
- 21) Uchii K, Doi H, Minamoto T: A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16: 415-422, 2016.

- 22) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文: 在来希少種カワバタモロコの環境 DNA による検出系の確立. 日本生態学会誌 66, 2016.
- 23) Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP: Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 70: 1123-1130, 2013.
- 24) Doi H, Inui R, Akamatsu Y, Kanno K, Yamanaka H, Takahara T, Minamoto T: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, in press.
- 25) Doi H, Takahara T, Minamoto T, Matsushashi S, Uchii K, Yamanaka H: Droplet digital PCR outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environmental Science & Technology* 49: 5601-5608, 2015.
- 26) Doi H, Uchii K, Takahara T, Matsushashi S, Yamanaka H, Minamoto T: Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys. *Plos One* 10: e0122763, 2015.
- 27) Turner CR, Uy KL, Everhart RC: Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93-102, 2015.
- 28) Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z: Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13: 193-197, 2012.
- 29) Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Moller PR, Rasmussen M, Willerslev E: Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *Plos One* 7: e41732, 2012.
- 30) Thomsen PF, Kielgast JOS, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, Orlando L, Willerslev E: Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565-2573, 2012.
- 31) Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB: Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *Plos One* 9: e86175, 2014.
- 32) Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, Gaboriaud C, Jean P, Poulet N, Roset N, Copp GH, Geniez P, Pont D, Argillier C, Baudoin JM, Peroux T, Crivelli AJ, Olivier A, Acqueberge M, Le Brun M, Moller PR, Willerslev E, Dejean T: Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25: 929-942, 2016.
- 33) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of >230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2: 150088, 2015.
- 34) Deiner K, Fronhofer EA, Mächer E, Walsler J-C, Altermatt F: Environmental DNA reveals that rivers are conveyer belts of biodiversity information. *Nature Communications* 7: 12544, 2016.
- 35) Kawabata Z, Minamoto T, Honjo MN, Uchii K, Yamanaka H, Suzuki AA, Kohmatsu Y, Asano K, Itayama T, Ichijo T, Omori K, Okuda N, Takehashi M, Nasu M, Matsui K, Matsuoka M, Kong H, Takahara T, Wu D, Yonekura R: Environment-KHV-carp-human linkage as a model for environmental diseases. *Ecological Research* 26: 1011-1016, 2011.
- 36) Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A: A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 44-57, 2000.
- 37) Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, Davison AJ, Waltzek TB, Bercovier H, Hedrick RP: Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *Journal of Virology* 81: 5058-5065, 2007.
- 38) Garver KA, Al-Hussiney L, Hawley LM, Schroeder T, Edes S, LePage V, Contador E, Russell S, Lord S, Stevenson RMW, Souter B, Wright E, Lumsden JS: Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 46: 1242-1251, 2010.
- 39) Sano M, Ito T, Kurita J, Yanai T, Watanabe N, Miwa S, Iida T: First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathology* 39: 165-167, 2004.
- 40) Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M: Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 21: 4677-4684, 2003.
- 41) Matsui K, Honjo M, Kohmatsu Y, Uchii K, Yonekura R, Kawabata Z: Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshwater Biology* 53: 1262-1272, 2008.
- 42) Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T: Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Research* 39: 4271-4280, 2005.
- 43) Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S: Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1033-1039, 2002.
- 44) Haramoto E, Kitajima M, Katayama H, Ohgaki S: Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *Journal of Fish Diseases* 30: 59-61, 2007.
- 45) Minamoto T, Honjo MN, Uchii K, Yamanaka H, Suzuki AA, Kohmatsu Y, Iida T, Kawabata Z: Detection of cyprinid herpesvirus 3 DNA in river water during and after an outbreak. *Veterinary Microbiology* 135: 261-266, 2009.
- 46) Honjo MN, Minamoto T, Kawabata Z: Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Veterinary Microbiology* 155:

- 183-190, 2012.
- 47) Minamoto T, Honjo MN, Kawabata Z: Seasonal distribution of cyprinid herpesvirus 3 in Lake Biwa. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6900-6904, 2009.
- 48) Minamoto T, Honjo MN, Yamanaka H, Uchii K, Kawabata Z: Nationwide Cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan. *Research in Veterinary Science* 93: 508-514, 2012.
- 49) Yamanaka H, Minamoto T, Wu D, Kong H, Wei Z-H, Liu B, Kawabata Z: Spatial-temporal analysis of water temperatures during spring in Lake Erhai, China: implications for fisheries. *Inland Waters* 2: 129-136, 2012.
- 50) Takahara T, Honjo MN, Uchii K, Minamoto T, Doi H, Ito T, Kawabata Z: Effects of daily temperature fluctuation on the survival of carp infected with Cyprinid herpesvirus 3. *Aquaculture* 433: 208-213, 2014.
- 51) Takahara T, Minamoto T, Doi H, Ito T, Kawabata Z: Differences between domesticated Eurasian and Japanese indigenous strains of the common carp (*Cyprinus carpio*) in cortisol release following acute stress. *Ichthyological Research* 61: 165-168, 2014.
- 52) Takahara T, Yamanaka H, Suzuki AA, Honjo MN, Minamoto T, Yonekura R, Itayama T, Kohmatsu Y, Ito T, Kawabata Z: Stress response to daily temperature fluctuations in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Hydrobiologia* 675: 65-73, 2011.
- 53) Uchii K, Matsui K, Iida T, Kawabata Z: Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus 3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 32: 857-864, 2009.
- 54) Uchii K, Telschow A, Minamoto T, Yamanaka H, Honjo MN, Matsui K, Kawabata Z: Transmission dynamics of an emerging infectious disease in wildlife through host reproductive cycles. *The ISME Journal* 5: 244-251, 2010.
- 55) Minamoto T, Pu X, Xie J, Dong Y, Wu D, Kong H, Yang X, Takahara T, Honjo MN, Yamanaka H, Kawabata Z: Monitoring fish pathogenic viruses in natural lakes in Yunnan, China. *Limnology* 16: 69-77, 2015.
- 56) サトウ恵, マルセロ・オオタケ・サトウ: 寄生虫学からみたエコヘルス~タイ肝吸虫を例に. *医学のあゆみ* 249: 630-634, 2015.
- 57) 源利文: 環境 DNA: エコヘルス研究の新しいツール. *医学のあゆみ* 249: 1264-1269, 2015.
- 58) Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP: Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources* 14: 109-116, 2014.
- 59) Hall EM, Crespi EJ, Goldberg CS, Brunner JL: Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molecular Ecology Resources* 16: 423-433, 2016.

Expectation for infectious disease studies using environmental DNA

Toshifumi MINAMOTO

Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University, Japan

3-11, Tsurukabuto, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

Tel/ Fax: +81-78-803-7743

E-mail: minamoto@people.kobe-u.ac.jp

Environmental DNA analysis for micro- and macro-organisms is rapidly developing. Environmental DNA means total DNA present in environmental media such as water or soil, and includes DNA contained in the organisms themselves and extra-organism DNA of macro-organisms. Analysis of environmental DNA can be divided into two methods, species-specific detection and metabarcoding, which can be used according to each purpose. Applicable subjects are all organisms (including viruses in this case) with DNA as genes, and application to rivers, ponds, lakes and marines has been reported. In this paper, the present situation of environmental DNA analysis of macro organisms is described, and the possibility of application to infectious disease studies and the problems to be solved are discussed.