

Amph16S 法に係る誤同定チェックシートの
使い方に関する解説書

2025 年 3 月
環境省自然環境局生物多様性センター

(1) 本資料について

環境省では、二次的自然環境に生息する淡水魚類・両生類の分布情報の拡充や希少種の保全推進、外来種の対策強化、環境影響評価における生物調査の効率化などに環境 DNA 分析技術を有効に活用するため、「環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き（淡水魚類・両生類）」を作成し、公開しています。

手引きでは、両生類相を調べるための環境 DNA 分析手法として、両生類特異的ユニバーサルプライマーを用いた網羅的解析（以降、Amph16S 解析とします）を推奨しています。Amph16S 解析では、種を同定する際に、形態分類学的手法により種が同定された標本から得られた DNA 配列（以降、リファレンスとします）が登録された国際塩基配列データベースの情報に対し、サンプルから取得した DNA 配列と最も相同性が高い配列を専用ソフトウェアにより検索し、その登録情報に付けられた学名を同定結果として採用するという方法がとられます。この操作は、一般的に、相同性検索や BLAST 検索などと呼ばれます。

BLAST 検索では、検索の最上位に来た登録配列に付与されている学名をそのまま採用した場合、その種同定結果は、以下に示す主に 3つの要因により、間違ったものになってしまうことがあります。この誤同定の有無を確認し、正しい学名に修正する操作のことを、手引きでは「精査」と呼んでいます。

Amph16S 解析で誤同定が生じる主な要因

- ① 国際塩基配列データベースの登録情報が間違っている（分類学の進展により、登録された種の学名が変更され、登録時と現時点で学名に相違があるもの等を含む）。
- ② Amph16S 解析で用いる配列情報では、種レベルの識別が難しい分類群がある。
- ③ 雑種個体が生息している可能性があり、ミトコンドリア DNA を対象とした分析（Amph16S 解析を含む）では、正確な種同定ができない。

環境 DNA 分析技術を用いた両生類調査において、調査結果の正確性を担保するためには、この「精査」がされていることが重要です。特に、要因①と②による誤同定は、環境 DNA 分析技術を標準化する際の大きな課題であることが分かってきました。この課題を解決するためには、国際塩基配列データベースの登録情報の間違いを修正し、さらに可能な限り最新の学名を反映した新しいデータベースを構築し、かつ、Amph16S 解析では種レベルの識別が難しい分類群に関する情報が整理されていることが望ましいと考えられます。

そこで、環境省では、Amph16S 解析で用いる 16S リボゾーム RNA 遺伝子の一部領域（以降、Amph16S 配列とします）を対象に、国際塩基配列データベースに登録されている配列情報を取得した上で再整理し、学名以外の付帯情報を参考に「データベース上の学名」を修正し、環境省版の Amph16S リファレンスデータベースを整備しました。

また、整備したデータベースの Amph16S 配列を基に、科レベルもしくは属レベルで分子系統樹を作成し、「Amph16S 法における種の識別性を確認するための分子系統樹」としてまとめました。この分子系統樹の情報を参考に、Amph16S 配列では種レベルの識別が難しい分類群を抽出した上で、さらに両生類の専門家に対して、種の識別性や学名等に関する確認や助言（エキスパートチェック）を依頼し、その結果を前述の Amph16S リファレンスデータベースに反映させました。

こうした作業をふまえて完成した環境省版 Amph16S リファレンスデータベースの情報を利用し、手引きで推奨する「精査」を誰でも簡単に行えるものを目指して作成されたツールが、「Amph16S 法に係る誤同定チェックシート」です。このチェックシートでは、アクセッション番号を基に精査を行います。アクセッション番号とは、国際塩基配列データベースに登録されたすべての配列に付けられている配列固有の識別番号です。環境 DNA 分析を民間の分析受託会社や大学等に委託すると、分析結果表（環境省の手引きでは「一致率が高い生物種リスト」と呼んでいます）が提供されます。この分析結果表には、「サンプルから検出されたこの環境 DNA 配列は、このアクセッション番号の登録情報と一致したので、この種に同定しました」という情報が一般的には記載されています。Amph16S 法に係る誤同定チェックシートでは、この分析結果表に記載されたアクセッション番号をチェックシートに入力することで、誤同定の有無を精査することができます。

本資料は、環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査を行う際に、精度の高い調査結果を取得するために必要な「精査」を簡易的に行うツールである Amph16S 法に係る誤同定チェックシートの使い方と、その基盤となる環境省版 Amph16S リファレンスデータベースに関して解説するものです。

(2) Amph16S リファレンスデータベースの整備対象種

国際塩基配列データベースから登録情報を取得する際に検索対象とした種は、表 1 の各リストに掲載されている種から重複を除いた 183 種を基本としました。さらに、Amph16S 解析による種の識別性をより明確にするため、表 1 のリストには未掲載の情報のうち、日本国内に生息する両生類の同属近縁他種（主に海外産の種）も、必要に応じて整備の対象種に追加しました。

表 1 Amph16S リファレンスデータベースの整備対象種

リスト名	対象種数	備考
① 国内に生息する両生類のリスト	116 種	
② 環境省レッドリスト 2020(両生類)	67 種	
③ 国内希少野生動植物種一覧	47 種	指定後に新種として報告された 4 種を含む
④ 生態系被害防止外来種リスト（平成 27（2015）年 3 月版）	35 種	国内由来の外来種 2 種を含む(※シノニムも 1 種として集計した)
⑤ 特定外来生物（未判定外来生物も含む）の指定種	30 種	令和 6 年 7 月 1 日時点、交雑種 1 種を含む(※シノニムも 1 種として集計した)
⑥ 日本産爬虫両生類標準和名リスト（2024 年 3 月 11 日版）	113 種	
⑦ 河川水辺の国勢調査のための生物リスト(令和 6 年度版)	111 種	両生類版の掲載種全種
⑧ 国際塩基配列データベース上で使用されている固有の学名など必要性に応じて任意に追加されたもの	30 種	①～⑦の同属他種(外国産を含む)の一部、①～⑦のシノニム等
整備対象種	183 種	和名と学名の組み合わせが重複しているものを除いた種の合計数

(3) Amph16S リファレンスデータベースの整備内容

環境省版 Amph16S リファレンスデータベースの整備に用いたリファレンスは、2024 年 12 月 6 日時点に国際塩基配列データベースからダウンロードした情報を元としています。ダウンロードの際は、前述の 183 種を対象に「学名」と「16S」というキーワードで検索を行い、国際塩基配列データベースから 16S リボゾーム RNA 遺伝子配列が含まれるデータを取得しました。そこからさらに、Amph16S ユニバーサルプライマーの配列の一部を検索キーとして、Amph16S 配列を完全に含む登録情報のみを抽出し、アクセッション番号ごとに整理しました。

さらに、アクセッション番号ごとに整理した登録情報の中から、複数の付帯情報（特に note や ecotype、strain 欄に記載された情報）を参考に、データベースに登録された学名の妥当性を確認した上で、作成した Amph16S リファレンスデータベースの登録学名を修正しました。

続いて、作成した Amph16S リファレンスデータベースに対して、個々の登録情報の信頼性を簡易的に把握できるように、専門家からの助言をふまえて定めた基準に従って、信頼度のランク分けを行いました（表 2）。

表 2 信頼度のランク分け基準

ランク分けの基準項目				信頼度 ランク
標本の採集地		標本管理施設 と標本番号	分子系統樹による チェック	
(国名)	(県名)			
○	○	○	問題なし	AA
○	×	○	問題なし	A
○	○ or ×	×	問題なし	B_Loc
×	×	○	問題なし	B_Spe
×	×	×	問題なし	C
○ or ×	○ or ×	○ or ×	誤同定の疑いあり	D
エキスパートチェックにより修正された情報				Ex

また、Amph16S 解析による種の識別性を確認するため、Amph16S 配列が得られた種について、科レベルもしくは属レベルで暫定的にグループ化し、分子系統樹を作成しました。分子系統樹から、同じ枝の同じ位置に 2 種以上の配列が入れ子状に並んだ場合（すなわち種間で Amph16S 配列に違いがないことが示された場合）、そこに該当する種は、Amph16S 解析では種レベルでの識別が困難であるとみなしました。

さらに、作成した Amph16S リファレンスデータベース及び分子系統樹は、両生類の

専門家から、種の識別性や学名等に関する確認や助言（エキスパートチェック）を受けています。エキスパートチェックにより、誤同定の疑いがある（もしくは登録情報の信頼性に疑問が残る）と判断された登録情報については、信頼度ランクを「**D**」としました。また、エキスパートチェックにより、分類学の最新知見や分子系統樹から登録上の学名を変更することが望ましい等の指摘がされた登録情報については、信頼度ランクを「**Ex**」とし、学名とそれに付与される和名を修正しました。

Amph16S 法に係る誤同定チェックシートを使った精査の結果、信頼度ランクに「AA、A、B_Loc、B_Spe、C、Ex」のいずれかが表示された登録情報については、「Amph16S 解析の結果として採用を推奨する学名・和名」の欄に表示された情報を分析結果表に採用します。しかし、信頼度ランクが「**D**」と表示された登録情報については、「Amph16S 解析の結果として採用を推奨する学名・和名」の欄に表示された情報に対する信頼度が低いため、分析結果として採用せず、別途、サンプルから検出された環境 DNA 配列を用いて個別に分子系統樹を作成し、再精査を行うことが推奨されます。

なお、環境省版 Amph16S リファレンスデータベース及び Amph16S 法に係る誤同定チェックシートは、作成時点における種の識別性を示したものであり、この識別性は確定したものではありません。今後、国際塩基配列データベース上に登録されるリファレンスが増えることで、種の識別性に対する判断が変更される可能性があります。

(4) Amph16S 法に係る誤同定チェックシートの使い方

環境 DNA 分析は、多くの場合、民間の分析受託会社や大学等に委託することが想定されます。分析完了後は、委託先から分析結果表（環境省の手引きでは「一致率が高い生物種リスト」と呼んでいます）を入手することになります。

下の図は、環境 DNA 分析結果表の例です。一般的に、分析結果表には、依頼したサンプルから得られた環境 DNA 配列と最も相同性（一致率）が高かった配列の「アクセッション番号」が記載されています。なお、分析受託会社によっては、アクセッション番号（バージョン番号付き）の出力が標準仕様になっていない場合があるので、分析を依頼する際に確認してください。

表 3 環境 DNA 分析結果表の一例

No.	アクセッション番号	一致率	科名	和名	学名	採水日	2024/5/30		
						調査地	st.1	st.2	st.3
					確認種類数	6	3	2	5
					総リード数	119,436	30,174	41,186	48,076
1	LC500183.1	99.624	アマガエル科	ニホンアマガエル	<i>Dryophytes japonicus</i>	84,990	27,678	40,788	16,524
2	KX269220.1	100	アカガエル科	ニホンアカガエル	<i>Rana japonica</i>	12,257	0	0	12,257
3	AB430340.1	100	アカガエル科	ムカシツチガエル	<i>Glandirana reliquia</i>	10,304	2,350	0	7,954
4	LC744032.1	100	アカガエル科	トウキョウダルマガエル	<i>Pelophylax porosus porosus</i>	7,251	146	0	7,105
5	LC386544.1	100	アオガエル科	シュレーゲルアオガエル	<i>Zhangixalus schlegelii</i>	4,236	0	0	4,236
6	LC742242.1	100	アオガエル科	カジカガエル	<i>Buergeria buergeri</i>	398	0	398	0

精査を行う分析結果表が準備できたら、Amph16S 法に係る誤同定チェックシート（以降、チェックシートとします）の「アクセッション番号」と表記された黄色いセルに、分析結果表のアクセッション番号（バージョン番号付き）を入力します。精査を行う分析結果表が Excel ファイルの場合は、分析結果表のアクセッション番号を、チェックシートの「アクセッション番号」と表記された黄色いセルにコピー＆貼り付けをします。

チェックシートの各セルには、Excel の vlookup 関数が入力されているため、Amph16S リファレンスデータベースから、入力されたアクセッション番号に対する該当情報が自動的に参照出力される仕様となっています。なお、チェックシートでは、最初の状態では非表示になっていますが、1 行目と 2 行目に引用するシート名（デフォルトは Amph16S リファレンスデータベース）と引用する列番号が指定されています。チェックシートに出力される情報をカスタマイズしたい場合は、この行を変更するか、セルに入力されている関数自体を直接書き換えてください。

図-参 8- 1 は、チェックシートの出力結果の一例です。チェックシートでは、以下の 4 種類の学名と和名と信頼度ランクを出力します。

- 出力名① 国際塩基配列データベース上の登録学名とそれに対応する和名
 出力名② 国際塩基配列データベース上の付帯情報を基に修正した学名とそれに対応する和名
 出力名③ 日本産爬虫両生類標準和名リストの学名・和名
 出力名④ Amph16S 解析の結果として採用を推奨する学名・和名

No.	アクセッション番号	出力名①		出力名②		出力名③		出力名④		信頼度 ランク
		D列の学名に対応する和名	国際塩基配列データベース上の登録学名	F列の学名に対応する和名	国際塩基配列データベース上の付帯情報を基に修正した学名	H列の学名に対応する和名	E,F列の情報に対応する日本産爬虫両生類標準和名リストの学名	Amph16S解析の結果として採用を推奨する和名	Amph16S解析の結果として採用を推奨する学名	
1	JQ929922.1	クロサンショウウオ	Hynobius nigrescens	クロサンショウウオ	Hynobius nigrescens	クロサンショウウオ	Hynobius nigrescens	クロサンショウウオ	Hynobius nigrescens	B_Spe
2	MH253629.1	ヒダサンショウウオ	Hynobius kimurae	ヒダサンショウウオ	Hynobius kimurae	ヒダサンショウウオ	Hynobius kimurae	ヒガシヒダサンショウウオ	Hynobius fossigenus	Ex
3	LC727153.1	アカハライモリ	Cynops pyrrhogaster	アカハライモリ	Cynops pyrrhogaster	アカハライモリ	Cynops pyrrhogaster	アカハライモリ	Cynops pyrrhogaster	B_Loc
4	LC500175.1	ニホンヒキガエル	Bufo japonicus	ニホンヒキガエル	Bufo japonicus	ニホンヒキガエル	Bufo japonicus	アズマヒキガエル	Bufo formosus	Ex
5	AB968251.1	タゴガエル	Rana tagoi tagoi	タゴガエル	Rana tagoi tagoi	タゴガエル	Rana tagoi	タゴガエル / ナガレタゴガエル	Rana tagoi / Rana sakuraii	Ex
6	AB761267.1	ウシガエル	Aquarana catesbeiana	ウシガエル	Aquarana catesbeiana	ウシガエル	Lithobates catesbeianus	ウシガエル	Lithobates catesbeianus	B_Loc
7	LC536282.1	ツチガエル	Glandirana rugosa	ツチガエル	Glandirana rugosa	ツチガエル	Glandirana rugosa	ムカシツチガエル	Glandirana reliquia	Ex
8	LC648633.1	トウキョウダルマガエル	Pelophylax porosus porosus	トウキョウダルマガエル	Pelophylax porosus porosus	トウキョウダルマガエル	Pelophylax porosus porosus	トウキョウダルマガエル	Pelophylax porosus porosus	B_Loc
9	LC386559.1	モリアオガエル	Zhangixalus arboreus	モリアオガエル	Zhangixalus arboreus	モリアオガエル	Zhangixalus arboreus	モリアオガエル	Zhangixalus arboreus	AA

図-参 8- 1 Amph16S 法に係る誤同定チェックシートの出力結果の例（一部のみ抜粋）

出力名①のセル（チェックシートの C,D 列）には、国際塩基配列データベース上の登録学名とそれに対応する和名が出力されます。分析結果表の精査が行われていない場合は、この出力結果が結果表に表示されている可能性があります。

出力名②のセル（チェックシートの E,F 列）には、国際塩基配列データベース上の付帯情報（特に note や ecotype、strain 欄に記載された情報）を基に修正した学名が表示されます。また、一部の種については、種内系統の情報も付与されて出力される場合があります。

出力名③のセル（チェックシートの G,H 列）には、日本産爬虫両生類標準和名リストに対応する学名・和名が出力されます。

出力名④のセル（チェックシートの I,J 列）には、出力名③の情報を基本としつつ、分子系統樹による確認結果やエキスパートチェックの結果を反映した Amph16S 解析の結果として採用を推奨する学名・和名が出力されます。

例えば、先ほどのチェックシートの出力結果例では、「タゴガエル」の学名で登録されている配列（アクセッション番号 AB968251.1）と 97.0%以上の一致率で一致した環境 DNA 配列が検出されていますが、主に関東地域に生息するタゴガエルは、同地域のナガレタゴガエルと種レベルの識別が困難であると判断されるため、「タゴガエル / ナガレタゴガエル」として、入力されたアクセッション番号の Amph16S 配列と一致したときに**該当する可能性のあるすべての種**が出力されています。

引用文献

- 1) 日本爬虫両棲類学会 (2024) 日本産爬虫両生類標準和名リスト (2024 年 3 月 11 日版) .
<https://herpetology.jp/wamei/> (2024 年 10 月 26 日アクセス).

(5) Amph16S リファレンスデータベースのその他の活用方法

Amph16S リファレンスデータベースは、Amph16S 法に係る誤同定チェックシートの参照データベースとしてだけでなく、その他にも活用方法が考えられます。

1 つは、相同性検索 (BLAST 検索) 用のデータベースとして利用する方法です。この Amph16S リファレンスデータベースは、個別の登録情報に対して、専門家のチェックによる信頼度ランクが付与されています。したがって、例えば AA や Ex ランクの配列情報だけを別途抜き出して、独自にデータベース化し、そのデータセットに対して BLAST 検索を行うことで、より簡単に正確な同定結果が得られる可能性があります。ただし、この活用方法は、自身で BLAST 検索を行う技術と知識をお持ちの方に限定されます。

もう 1 つの活用方法としては、Amph16S 解析で使用されているユニバーサルプライマーのミスマッチの有無やミスマッチ数の確認を行うために必要な情報を取得することができます。Amph16S リファレンスデータベースの EC 列には、プライマーのアニーリング領域を含んだ Amph16S 配列を出力しています。この情報を抜き出すことで、個別の種や分類群に対するミスマッチの有無やミスマッチ数の確認を行うことができます。そのため、環境 DNA 調査の際に問題となることがある「プライマーのミスマッチに起因する偽陰性」の検討に活用することが可能となります。なお、EC 列が「0」となっているアクセッション番号は、その登録情報自体にプライマーのアニーリング領域が含まれていないことを示しています。

(6) 免責事項

本資料及び Amph16S リファレンスデータベースの情報は、細心の注意を払い作成したのですが、その正確性や内容等について、環境省が保証するものではありません。環境省は、利用者が本資料の情報をを用いて行う一切の行為（資料の一部を編集・加工等した情報を利用することを含む）について、何ら責任を負うものではありません。

(7) 著作権

本資料の著作権は、下記ホームページの「生物多様性センター ウェブサイト利用規約」に準じます。

環境省自然環境局生物多様性センターホームページ URL :

http://www.biodic.go.jp/copyright/terms_of_service.html