

環境DNA手法を用いた河川流程における 魚類相再現性の検証 ～中国地方1級河川における 河川水辺の国勢調査との比較～

EVALUATION OF LONGITUDINAL DISTRIBUTION OF FISH COMMUNITY
USING ENVIRONMENTAL DNA: COMPARISON WITH THE NATIONAL
CENSUS ON RIVER ENVIRONMENT OF CLASS A RIVERS IN CHUGOKU
DISTRICT

中尾遼平¹・赤松良久²・乾 隆帝³・内藤太輔⁴・都築隆禎⁵

Ryohei NAKAO, Yoshihisa AKAMATSU, Ryutei INUI, Daisuke NAITO and Takayoshi TSUZUKI

- 1 正会員 農博 山口大学大学院助教 (特命) 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)
- 2 正会員 工博 山口大学大学院 教授 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)
- 3 正会員 農博 福岡工業大学 准教授 社会環境学部 (〒811-0295 福岡県福岡市東区和白東3丁目30-1)
- 4 正会員 理修 公益財団法人リバーフロント研究所 研究員 (〒104-0033 東京都中央区新川1丁目17-24)
- 5 正会員 公益財団法人リバーフロント研究所 次長 (〒104-0033 東京都中央区新川1丁目17-24)

Knowledge of species abundance, diversity and distribution are most important information for ecosystem conservation and management. In this study, we revealed fish communities of three A class rivers in Chugoku district using environmental DNA (eDNA) method. Furthermore, we compared fish community between eDNA and conventional National census. We also evaluated the reproducibility of eDNA method against National census. From the results, the reproducibility of eDNA was higher in freshwater area but lower in blackish area. In freshwater area, reproducibility of eDNA was increased by sampling at multiple river environment than at single site. Environmental DNA method enables to detect the fish community efficiently, however, it is more important to set sampling site in consideration of environmental compartment for uncovering fish community in blackish and complicate river environment.

Key Words : eDNA, metabarcoding, MiFish, conservation, National census on river environment

1. はじめに

近年, 人為的な影響を含む生息環境の劣化や喪失により, 河川生態系における魚類の多様性は減少傾向にある。また, それに伴って絶滅危惧種の種数も増加しており, 保全対策は急務となっている。河川生態系を構成する魚類の分布情報や種多様性は, 河川環境における生物多様性の指標となるだけでなく, 外来種の侵入把握や希少種の保全など, 河川環境の管理をおこなううえで非常に重要な情報となる。我が国では, 水生生物の生息情報の収集において, 全国の1級河川を対象として5年に1度の間隔で河川水辺の国勢調査(水国調査)が実施されており,

各河川における詳細な種の分布情報が記載されている。その一方で, 水国調査は多大な人的・時間的コスト, 分類学的な知識など, 非常に高度な技術を要する。

近年, 水などの環境に存在する生物由来のDNAを検出する環境DNA手法は, 魚類, 両生類, 水生昆虫など幅広い水生生物を対象としたモニタリング手法として活用されている²⁾⁴⁾。また, 手法の1つであるメタバーコーディングは, 環境中の対象分類群を網羅的に検出できることから, 生物分布を把握するうえで有用な手法である⁵⁾⁷⁾。環境DNA手法は調査地で環境試料を採集するだけでよいことから, 従来の採捕調査等に比べて人的・時間的なコストが効率的であることが知られている。

メタバーコーディングで得られる魚類の種数は, 従来

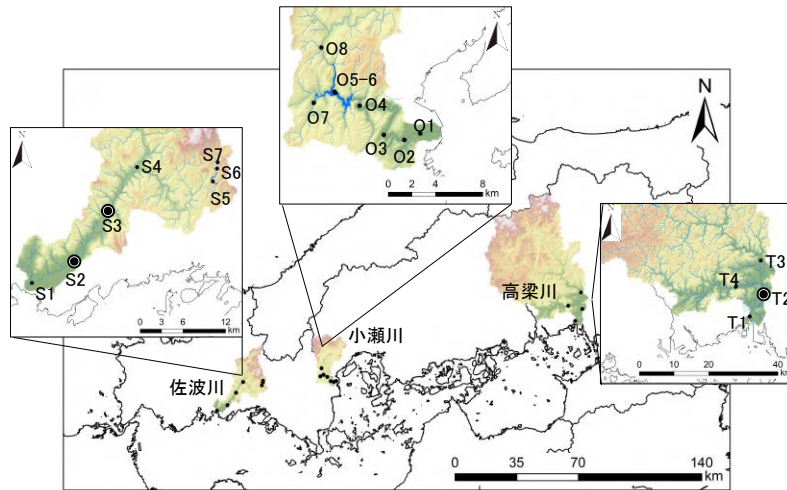


図-1 本研究における調査対象河川および調査地点

白で囲まれた地点S2, S3, T2はワンド等の環境区分で追加の採水を行った地点を示す。

の採捕調査で得られた種数よりも多くなるまたは補完的である場合が多い⁷⁾。しかし、河川における大規模な生物調査と比較した事例はNakagawa et al.⁸⁾と赤松ら⁹⁾を除いてほとんどなく、狭い河川内での評価にとどまっている¹⁰⁾。また、環境試料から種を検出する環境DNA手法の特性上、種を効率的に検出しやすい環境、またはしづらい環境があると考えられ、そのような環境においては、従来の環境DNAのサンプリング手法に改良を加えなければならない可能性がある。そこで本研究では、中国地方の一級河川である小瀬川・高梁川・佐波川において魚類環境DNAメタバーコーディング手法を適用し、それぞれの河川の魚類相を特定した。また、河川水辺の国勢調査（水国調査）の結果と比較することで、ダム湖から河口域の河川流程における環境DNAの魚類の検出精度について検証し、環境DNA手法河川での有用性と課題について議論した。

2. 方法

(1) 野外採水調査

2017年7月23日、8月22日、2018年10月24日、28日に小瀬川、高梁川、佐波川水系の河川およびダム湖において、表層水1 Lを採水した（図-1）。また、河川の一部ではワンドやたまり、河川内の分岐流などの環境区分を考慮した採水を実施した。これらの採水は、水国調査と採捕調査の実施前（直前から1週間前）におこない、採水地点については水国調査で設定されている定点に設定した。

採水したサンプルは、現地地で10 w/v% 塩化ベンザルコニウム水溶液を1 mL添加した後、1 Lの脱イオン水を加えたボトル（クーラーブランク）とともに冷蔵状態で大学に持ち帰り、グラスファイバーフィルター（粒子保持能0.7 μ m, GF/F, GEヘルスケア）を用いてろ過し、DNA抽

出までアルミホイルで密封し、-20℃で凍結保存した。また、クーラーブランクと同様のボトルをろ過時に1本追加し、ろ過作業中のDNA混入確認用とした。

(2) 環境DNA分析

ろ紙からのDNA抽出は、環境DNA学会発行の調査・分析マニュアル¹¹⁾に従って、サリベットチューブ（SARSTEDT）とDNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用いて最終100 μ LのBuffer AEでDNA溶液を抽出し、後のライブラリ調整に用いた。

ライブラリ調整では、魚類環境DNA用のユニバーサルプライマーMiFish⁵⁾を用いて、各サンプルについてPCR増幅による魚類DNAの増幅をおこなった。ライブラリ調整における1st PCRからライブラリ精製までの一連の行程については、環境DNA学会発行の調査・分析マニュアル¹¹⁾に従って実施した。調整したライブラリをiSeq100（Illumina）にかけて塩基配列を決定した。

iSeq100から出力された塩基配列データを回収し、MiFish パイプラインによって各サンプルに含まれるDNA配列から種の特異性と塩基配列の本数（リード数）の決定をおこなった。パイプラインの解析においては、Komai et al.¹²⁾およびTakeuchi et al.¹³⁾と同様にUsearch¹⁴⁾によってシーケンスエラー等を排除したのち、データベースを参照することで99%の塩基配列一致率の基準で種の特異性を決定した。また、塩基配列から種を決定できなかったヨシノボリ属やフナ属等の分類群については、分布域による種同定が可能なものを除き、属レベルでの同定にとどめた。また、10リード以下の種や淡水域で検出された汽水・海産魚については、潜在的なコンタミや人間活動による影響であると判断し、リストから除外した。

(3) 2手法間の魚類相の比較と統計解析

環境DNAメタバーコーディング（以下、環境DNA手

表-1 環境DNAメタバーコーディングおよび河川水辺の国勢調査に基づく魚類リスト

No.	科	種名	小瀬川		高梁川		佐波川		No.	科	種名	小瀬川		高梁川		佐波川	
			CO	MB	CO	MB	CO	MB				CO	MB	CO	MB	CO	MB
1	ウナギ科	ニホンウナギ	●	●	●	●		●	1	アカエイ科	アカエイ			●			
2	コイ科	コイ	●	●	●	●	●	●	2	ゴンズイ科	ゴンズイ				●		
3		フナ属sp.	●	●	●	●	●	●	3	ニシン科	サッパ			●	●		
4		ゲンゴロウブナ			●	●			4	シラウオ科	シラウオ					●	
5		ヤリタナゴ						●	5	ヨウジウオ科	ガンテンイシヨウジ			●			
6		アブラボテ			●	●			6	ボラ科	ボラ	●	●	●	●	●	●
7		カネヒラ			●				7		セスジボラ			●			
8		シロヒレタビラ				●			8		メナダ	●		●		●	
9		イチモンジタナゴ					●		9	トウゴロウイワシ科	トウゴロウイワシ			●	●		
10		ニッポンバラタナゴ				●			10	サヨリ科	サヨリ			●			
11		タイリクバラタナゴ			●	●			11		クルマメサヨリ				●		
12		スイゲンゼニタナゴ							12	ダツ科	ダツ	●			●		
13		オイカワ	●	●	●	●	●	●	13		マゴチ			●		●	
14		ハス	●	●	●	●			14	スズキ科	スズキ	●	●	●	●		
15		カワムツ	●	●	●	●	●	●	15		アジ属sp.				●		
16		ヌマムツ			●	●			16		アイゴ						●
17		ソウギョ							17		ヒイラギ			●	●	●	
18		ワタカ	●	●					18	タイ科	クロダイ	●	●	●	●	●	●
19		ウグイ	●	●	●	●	●	●	19		キチヌ			●		●	
20		タカハヤ	●	●			●	●	20		マダイ				●		
21		モツゴ			●	●			21		ネズミゴチ			●			
22		ムギツク	●	●	●	●	●	●	22	イソギンボ科	トサカギンボ	●		●	●	●	
23		ヒガイ属	●	●	●	●			23		イダテンギンボ	●		●	●		
24		タモロコ			●	●	●	●	24	ハゼ科	トビハゼ			●		●	
25		ニゴイ属sp.			●	●			25		タビラクチ			●		●	
26		ズナガニゴイ					●	●	26		チワラスボ			●		●	
27		スゴモロコ属sp.	●	●	●	●			27		アカウオ（wakae型）			●		●	
28		イトモロコ			●	●	●	●	28		ヒモハゼ			●		●	
29		カマツカ	●	●	●	●	●	●	29		ミミズハゼ属sp.	●	●				
30		ツチフキ			●				30		チクゼンハゼ					●	
31		ゼゼラ			●	●			31		エドハゼ			●		●	
32	ドジョウ科	ドジョウ	●	●	●	●	●	●	32		クボハゼ		●			●	
33		オオシマドジョウ	●	●					33		キセルハゼ					●	
34		ヤマトシマドジョウ					●	●	34		ニクハゼ					●	
35		シマドジョウ属sp.			●	●			35		マハゼ	●		●	●	●	
36	ギギ科	ギギ	●	●			●	●	36		アシシロハゼ	●	●	●	●	●	
37	アカザ科	アカザ	●		●	●	●	●	37		ヒナハゼ	●	●				
38	ナマズ科	ナマズ	●	●	●	●			38		アベハゼ	●				●	
39	キュウリウオ科	ワカサギ					●	●	39		マサゴハゼ			●			
40	アユ科	アユ	●	●	●	●	●	●	40		ウロハゼ			●		●	
41	サケ科	サケ属sp.		●			●	●	41		ヒメハゼ	●	●	●		●	
42		ニジマス							42		ツマグロスジハゼ			●		●	
43	メダカ科	ミナミメダカ	●	●	●	●	●	●	43	フグ科	クサフグ	●	●			●	●
44	サンフィッシュ科	ブルーギル	●	●	●	●		●									
45		オオクチバス	●	●	●	●											
46	ケツギョ科	オヤニラミ	●	●	●	●	●	●									
47	カジカ科	カジカ（大卵型）	●		●	●											
48	ドンコ科	イシドンコ		●													
49		ドンコ	●	●	●	●	●	●									
50	ハゼ科	ウキゴリ	●	●	●	●											
51		ビリンゴ	●	●			●										
52		ゴクラクハゼ	●	●	●	●		●									
53		ヨシノボリ属sp.	●	●	●	●	●	●									
54		カワヨシノボリ	●	●	●	●	●	●									
55		チチブ属sp.	●	●	●	●	●	●									
56	タイワンドジョウ科	カムルチー			●	●											
出現種数			31	31	41	44	26	32	出現種数			14	9	28	16	26	4
共通種数			29		39		24		共通種数			8		11		3	
淡水魚類：水国調査 48種、環境DNA 55種										汽水・海産魚類：水国調査 37種、環境DNA 22種							

注) COとMBはそれぞれ河川水辺の国勢調査と環境DNAメタバーコーディングの種リストを示す。

法) によって得られた魚種リストを地点ごとに整理し、リード数を存在データへと変換した。河川環境データベース¹⁾に記録されている水国調査の結果を参照し、各河川および各地点の魚類相と環境DNA手法によって得られた魚類相を比較した。水国調査の分布情報については、採水と同季節におこなわれたものを使用し、環境DNA手法との比較材料とした。また、予備情報として別季節および過去の調査記録についても収集し、環境DNA手法でのみ検出された種の比較に使用した。

各地点における環境DNA手法および水国調査の出現種数と2手法間の共通種数を計数し、そこからそれぞれの手法における各地点の種のカバー率を算出した。種の

カバー率の算出は、水国調査と環境DNA手法の両方で出たすべての種が生息していると見なし、“一方の出現種数÷2手法での総出現種数”とした。

得られた種のカバー率の増減に影響を与えている環境要因を検証するために、本研究では一般化線形混合モデル (GLMM) を用いた。水国調査および採水調査時に取得した環境データから、2手法の種のカバー率を応答変数に、塩分の有無 (淡水・汽水)、水環境 (河川・ダム湖)、河川水系、水温、水深を説明変数に、地点IDをランダム項とし、確率分布には二項分布を用いた。統計解析には、R ver. 3.6.2のglmmMLパッケージを使用した。得られた結果は、それぞれ表-2および表-3に示した。

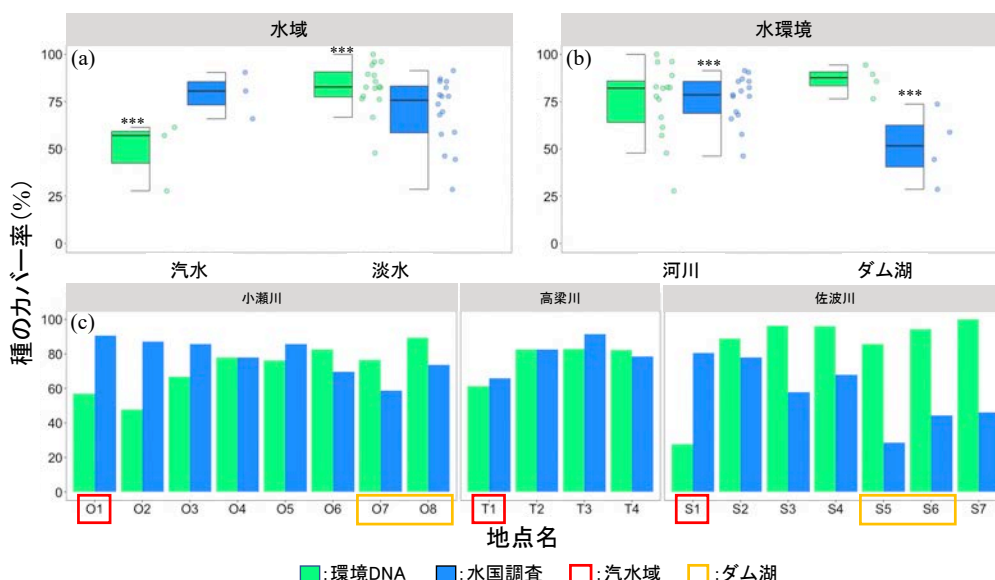


図-2 環境DNA手法および水国調査間の種のカバー率の比較

(a) 水域間の比較, (b) 水環境間の比較, (c) 地点間の比較をそれぞれ示す。また、箱ひげ図に表示されている点は、箱ひげに含まれているそれぞれの数値を示し、***同士は有意差のみられた箇所を表している。

GLMMにおける結果の解釈について、縦にリストされている内容は、GLMMによって定式化した際の切片 (Intercept) と説明変数となったそれぞれの環境要因を示している。また、横側にリストされている値は、coefficientがそれぞれの変数に対する回帰係数を、sc(coef)は回帰係数に対する標準誤差を示し、そこから算出されるz valueを用いてp値であるPr ($>|z|$)を求めている。説明変数の内容が少なくなっているものについては、計算をする際に片側またはどちらか1種類の変数を比較の基準として用いているためである。また、coefficientの項が基準とした側と比べて正であればプラスに、負であればマイナスに影響を与え、それが統計的に有意かどうかをPr ($>|z|$)で判断している。

3. 結果と考察

(1) 3河川における環境DNA分析と水国調査の比較

各河川における環境DNA手法と水国調査の結果を記載した魚種リストを表-1に示している。本研究の結果、2手法の合計で汽水・海産魚43種、淡水魚類56種が確認された。このうち環境DNA手法では汽水・海産魚22種、淡水魚類55種が、水国調査では汽水・海産魚37種、淡水魚48種がそれぞれ確認された。環境DNA手法でのみ確認された種は汽水・海産魚ではゴンズイ、クルマサヨリ等の4種、淡水魚類でヤリタナゴ、シロヒレタビラ等の5種であった。環境DNA手法でのみニッポンバラタナゴが検出されているが、これは交雑由来のタイリクバラタナゴである可能性が高い。水国調査のみで確認された種は、汽水・海産魚ではアカエイ、シラウオ、キセルハゼ等21種、淡水魚でイチモンジタナゴの1種であった。

環境DNA手法における河川全体の総種数は、淡水魚では環境DNA手法が水国調査に比べて種数が増える傾向にあった。特にダム湖およびその流入河川では環境DNA手法での検出力が高く、すべての地点で水国調査の種のカバー率を上回っていた (図-2 (c))。深い場所にいる種については環境DNA分析で検出できない可能性も考えられたが、本研究における水国調査の実施地点はダム湖の中では比較的浅い箇所であるため、種の検出における水深の影響はほとんどみられなかったと考えられる。仮に環境DNA手法で検出された種がすべて生息しているとすれば、水国調査で採捕されていなかった種を環境DNAで検出できていたためであり、これらの種は、同年度の別季節または過去の調査で検出された種が多く含まれていた。例えば、弥栄ダムではサケ属sp.が春のみ採捕されていたが、夏に調査をおこなった環境DNA手法でも検出が確認されていた。佐波川ではニホンウナギを環境DNAで確認しており、過去の調査で記録されていたことから、生息している可能性も高いと考えられる。また、ヤリタナゴやシロヒレタビラ等の個体数の少ない希少種も環境DNA手法でのみ検出されていたことから、遊泳性の魚類であれば密度の低い種であっても検出できる可能性が高いと考えられる。このように、淡水魚については環境DNA手法を用いることで、採捕調査では見落としていた種を検出することができ、季節を通じた複数回の調査と同様の検出力が示された。インドコやソウギョについては生息の可能性はあるが、過去の分布情報がないことから、再調査が必要である。

一方で、環境DNA手法は水国調査に比べて汽水・海産魚の種数が少なくなっていた (図-2(a))。この理由として、汽水域の種組成を環境水ILからでは網羅しきれていないこと、ハゼ科を中心とした底生魚を検出できて

いないことがあげられる。前者について、感潮域は河川に比べて水域面積が広く、干潟などの多様な環境が創出されている。この多様な環境に生息する生物種を網羅するためには、表層水を1L採水するだけでは、不十分である可能性が考えられる。また、淡水と海水の混ざり、水の流れの遅い感潮域は、水平および鉛直方向の水の混合が抑えられている可能性も考えられる。後者については、ハゼ科魚類のなかには、マハゼ等の砂礫底を利用するものから、泥底や泥中、甲殻類等の巣穴など、さまざまな環境を利用する種が含まれている。また、引き潮時に採水したサンプルでは、水位のある時間帯に底生魚のDNAを含む環境水は、すでに海域へと流されてしまっている可能性が高く、得られる魚類の情報も採水地点よりも上流側の情報が多く含まれるものになると考えられる。

これらの理由から、感潮域において種のカバー率を向上させるためには、採水地点や方法の検討をおこなう必要がある。この結果は、GLMMでも支持されており、環境DNA手法における種のカバー率は汽水域よりも淡水域で増加することが示されている（表-2, coefficient (塩分濃度(淡水)) = 1.504, $p < 0.001$)。一方で、水国調査において汽水環境の有無は影響しておらず、淡水域と同様のカバー率を期待できる可能性が高いことが示された（表-3, coefficient (塩分濃度(淡水)) = 0.028, $p = 0.9260$)。また、水国調査における種のカバー率は、ダム湖で有意に減少していた（図-2(b), 表-3, coefficient (流域2(ダム湖)) = -1.439, $p < 0.001$)。水域が広く、水深によって調査範囲が限られるダム湖では、水国調査のような採捕ではダム湖内に生息する魚類を完全には網羅できていない可能性が高い。一方で、環境DNA手法において、ダム湖は種のカバー率を増減させる要因にはなっておらず、河川と同様の検出力が保持されていると考えられる（表-2, coefficient (流域2(ダム湖)) = 1.297, $p = 0.1290$)。例えば、弥栄ダムにおいて水国調査では、ダム湖地点ではハスが採捕されていなかったが、環境DNAではダム湖および流入河川の両方で確認されていた。

(2) 河川環境区分における採水の重要性

本研究において、環境区分ごとの追加採水をおこなった地点では、本川と環境区分で検出される種数が異なっていた。高梁川のT2地点ではワンドでのみ確認された種が28種中7種含まれていた。佐波川でもS2地点で24種のうち3種が、S3地点では25種のうち1種が検出されている。本川のみで採水をおこなっていた場合、環境DNA手法ではこれらの種を見逃していたことになる。一方で、本川でのみ確認されていた種もT2で12種、S2で1種、S3で2種それぞれ確認されていたことから、本川においてもワンドや分岐流と同様に独自の情報をもっていると考えられる。

表-2 環境DNA手法におけるGLMMの結果

	coef	se(coef)	z	Pr(> z)
(Intercept)	5.212	4.508	1.156	0.2480
塩分濃度(淡水)	1.504	0.440	3.416	0.0006 ***
流域2(ダム湖)	1.297	0.854	1.519	0.1290
河川2(高梁川)	1.794	0.983	1.824	0.0681
河川3(佐波川)	-0.933	1.482	-0.630	0.5290
水温	-0.229	0.174	-1.313	0.1890
水深	0.000	0.005	-0.099	0.9210

***: $p < 0.001$

表-3 水国調査におけるGLMMの結果

	coef	se(coef)	z	Pr(> z)
(Intercept)	-0.349	2.447	-0.143	0.8870
塩分濃度(淡水)	0.028	0.304	0.093	0.9260
流域2(ダム湖)	-1.439	0.397	-3.622	0.0003 ***
河川2(高梁川)	-0.419	0.551	-0.761	0.4470
河川3(佐波川)	0.010	0.848	0.012	0.9900
水温	0.091	0.092	0.993	0.3210
水深	-0.006	0.003	-1.838	0.0661

***: $p < 0.001$

また、これら3地点では、追加採水を実施したことで、環境DNA手法で確認された種数に加えて水国調査と共通で確認された種数も増加していた（図-2(c)）。本川のみ環境DNA手法と水国調査の共通種数は、T2で17種、S2およびS3で17種、13種であったのに対し、追加採水分の種数をあわせることで、22種、18種、14種に増加していた。本川とワンドのうち、ワンドのみで確認された種には、シロヒレタビラ、タイリクバラタナゴなどのタナゴ類やモツゴ、ミナミメダカなど、止水域を好適生息地とする種であった。ワンド等の止水域は本流と環境が大きく異なることから、追加の採水によってこれらの環境区分を好む種を、環境DNA手法で検出することができていたと考えられる。したがって、本研究においても既往の報告⁹⁾と同様に、環境DNAメタバーコーディングで種組成の再現性・網羅性を上げるためには、環境区分を考慮した採水が重要となることが示唆された。

(3) 環境DNAメタバーコーディングによる種組成の再現性の向上にむけた課題と提案

本研究で得られた結果から、河川において感潮域で環境DNAメタバーコーディングによる種のカバー率が低くなっていた。この改善策として、採水方法では採水の繰り返しを取る、水層の不均一さを補うために表層と底層の水を混合した後に採水する、といった方法が考えられる。また、環境区分では干潟ではタイドプールや間隙水を汲むなど、満潮時の生物情報や採水地点の生物情報を反映できる可能性のある水サンプルを採水することで改善される可能性がある。さらに、環境として堆積物サンプルの利用も改善策の1つとして当てはまる。堆積物では、生物由来のDNAが長期間保持されることで、水サンプルとは異なる種組成を検出できることが報告されている¹⁹⁾。堆積物を利用することで、本研究で検出の困難であった感潮域における種のカバー率の向上および底生のハゼ科魚類の検出率向上につながると考えられる。これらの改善策を野外環境で検証することで、種の検出力の向上につながり、環境DNAメタバーコーディング

の有用性が向上すると考えられる。

本研究では、採捕調査と環境DNAメタバーコーディングの両方を組み合わせることで地点における検出種数が最大になったことから、種を網羅するという点においては、2種類の手法の組み合わせがもっとも効果的であると考えられる。他方で、環境DNAメタバーコーディングのみでも採捕で個体数の多かった分類群はほぼ網羅できており、他季節でしか採捕されていなかった種を検出できていた。これらのことから、課題はあるものの、河川における魚類調査において環境DNAメタバーコーディング手法は有用であることが示されたと考えられる。

4. 結論

中国地方の1級河川において魚類環境DNAメタバーコーディング手法を適用し、得られた種リストと同時期に実施された水国調査の採捕で得られた種リストを比較した。水国調査の種リストに比べて環境DNAメタバーコーディングの検出種数のほうが多くなる傾向が見られた。これは、ワンドなど複数の環境区分を設定することで種のカバー率が向上したこと、1季節の採捕調査では見落としていた種を環境DNAでは検出できていたためである。これらのことから、環境DNAメタバーコーディングが河川における魚類調査に有用であることが示された。その一方で、感潮域では環境DNAメタバーコーディングによる種のカバー率が低かった。これは、河口付近における水域の広さや潜窟性の魚類を環境DNAで検出できなかったためであると考えられる。感潮域での種のカバー率の向上には、採水回数や採水箇所を増加や堆積物試料の利用が効果的であると考えられ、今後の検証が必要である。

謝辞：本研究は、国土交通省中国地方整備局山口河川国道事務所受託研究「佐波川における効率的な魚類調査に関する研究」の一環としておこなわれた。

参考文献

- 1) 国土交通省：河川環境データベース
<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/>.
- 2) Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H. and Kawabata Z.: Estimation of fish biomass using environmental DNA, PLoS ONE, 7(4): e35868, 2012.
- 3) Fukumoto S., Ushimaru A. and 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.
- 4) Doi H., Katano I., Sakata Y., Souma R., Kosuge T., Nagano M., Ikeda K., Yano K. and Tojo K.: Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem, Royal Society open Science, 4, 170568, 2017.
- 5) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J.Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. and Iwasaki W.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes, Royal Society open Science, 2, 15088, 2015.
- 6) Yamamoto S., Masuda R., Sato Y., Sado T., Araki H., Kondoh M., Minamoto T. and Miya M.: Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea, Scientific Reports, 7, 40368, 2017.
- 7) Deiner K., Bik H.M., Mächler E., Seymour M, Lacoursière-Roussel A., Altermatt F., Creer S., Bista I., Lodge D.M., Vere N., Pfrender M.E. and Bernatchez L.: Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology, 26(21), 5872-5895, 2017.
- 8) Nakagawa H., Yamamoto S., Sato Y., Sado T., Minamoto T. and Miya M.: Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods, Freshwater Biology, 63 (6), 569-580, 2018.
- 9) 赤松良久, 都築隆禎, 横山良太, 舟橋弥生, 太田宗宏, 畔上雅樹, 内藤太輔, 乾隆帝: 河川水辺の国勢調査による魚類相調査と環境DNAメタバーコーディング解析の比較検討, 土木学会論文集B1(水工学), Vol.74, No.5, I_415-I_420, 2018.
- 10) Olds B. P., Jerde C. L., Renshaw M. A., Li Y., Evans N. T., Turner C. R., Deiner K., Mahon A. R., Bruescke M. A., Shirey P. D., Pfrender M. E., Lodge D. M. and Lamberti G. A.: Estimating species richness using environmental DNA, Ecology and Evolution, 6 (12), 4214-4226, 2016.
- 11) 一般社団法人環境DNA学会: 環境DNA調査・分析マニュアル Ver. 2.1 (2019年4月25日発行).
- 12) Komai T., Goto O. R., Sado T. and Miya M.: Development a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans, Metabarcoding & Metagenomics, 3, 1-19, 2019.
- 13) Takeuchi A., Sado T., Goto O. R., Watanabe S., Tsukamoto K. and Miya M.: New PCR primers for environmental metabarcoding from freshwater eels, genus *Anguilla*, Scientific Reports, 9, 7977, 2019.
- 14) Edgar R. C.: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, Bioinformatics, 26 (19), 2460-2461, 2010.
- 15) Sakata K. M., Yamamoto S., Gotoh O. R., Miya M., Yamanaka H. and Minamoto T.: Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA, Environmental DNA, 2020; 00, 1-14.

(2020. 4. 2受付)