

建設現場への環境 DNA を活用した生物モニタリング技術の適用について

大成建設(株) 正会員 ○赤塚真依子
大成建設(株) 正会員 高山百合子
大成建設(株) フェロー会員 伊藤 一教

1. はじめに

建設工事では、建設地とその周辺の自然環境に影響を与える懸念があるため、希少野生動植物や生態系の保全に向けた取り組みが必要となる。保全対象となる生物種は、地域や工種によって多種多様である。例えば、河川付近の道路や造成、ダム工事では、魚類や両生類、鳥類、昆虫などが保全対象になることがあり、海洋工事では、サンゴや海草、貝類、大型哺乳類などが保全対象になることがある。建設工事では、盛土・切土や河川切回しなどにより地形が変わることが多く、保全対象種の生息する環境（河床・海底地形、流れ、水質等）が変化することが想定される。建設地周辺に生息する動植物の保全対策では、対策の有効性を確認するため、工事前後、施工中の生物調査により保全対象となる動植物の生物量や分布の変化を把握することが重要となる。

従来の生物調査は、踏査、捕獲、潜水など専門調査員による目視観察が主であり、労力が多大で、広域調査には日数が必要になるため、頻度や範囲が限られた調査となることが多い。近年、新しい水域の生物調査方法として環境 DNA 分析が注目されている。環境 DNA 分析は、水域に存在する生物の組織片や排泄物などから生物由来の DNA を調べることで、その水域に生息する生物の情報（生物の種類、存否、生物量）を得る技術である。水中に存在する環境 DNA は、水中の微生物や紫外線等により分解され、大きい細胞片は沈降して堆積するため、生物種や環境にもよるが数日～1週間程度の直近の生物情報を反映していると考えられている¹⁾。

環境 DNA 分析は、河川や海から 1L 程度の水を採取し、ろ過した試料残渣物から DNA を抽出する。抽出した DNA には水域に生息する様々な生物種の DNA が含まれているが、分析対象とする生物に対応する DNA を分析することで、多種多様な生物の調査に対応できる。環境 DNA 分析の試料採取は採水であるため作業負担が少なく、捕獲などに比べ生息環境を荒らさない調査が可能になる。高頻度で採水することにより経時的な変化を把握できる可能性がある。そのため、建設工事においては、環境アセスメントへの対応や、施工中の保全対象とする動植物の生物量や分布の変化を把握するモニタリングとして幅広く展開が期待できる。

著者らは、建設現場への環境 DNA を活用した生物モニタリング技術の適用を目指し、これまでに、河川における回遊魚、湿地における両生類、実海域における海草の調査に取り組んできた。いずれの調査でも分析対象とした生物種の DNA を確認でき、環境 DNA を活用した生物モニタリングの可能性を得た。各調査で得られた結果と課題について報告する。

2. 環境 DNA と生物調査

環境 DNA 分析は、分析対象とする生物群（例えば魚類、動物など）または種にのみ存在する特異的な DNA 配列を選び、その DNA のみが増幅するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で DNA を増幅させることにより、特定の生物群または種の DNA の有無や量を得る方法である。DNA の配列は 4 種類の塩基の組み合わせであり、国立遺伝学研究所がデータベースとして公開している DDBJ（DNA Data Bank of Japan）では、国内外の様々な生物種の DNA 配列を確認することができる²⁾。環境 DNA 分析が可能な生物群や種は、魚類、鳥類、昆虫、哺乳類、植物など増加傾向にあり、淡水魚については分析可能な生物種のリストが環境省から公開されている³⁾。環境 DNA 分析の特徴としては、DNA の配列から生物種を調べるため、外観が類似している外来種と在来種やその交配種など、目視での判別が難しい生物種について、DNA の配列が異なれば区別して調査が可能となる。一方、ヤマメとサクラマスのように、川で孵化した稚魚の時点では個体差がなく、生息環境が河川残留

キーワード 環境 DNA, 環境保全, 建設工事, 生物調査, モニタリング

連絡先 〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設株式会社 技術センター TEL045-814-7221

型(ヤマメ)と海に下って遡上する降海型(サクラマス)のように異なることで外観に差が出る種については、DNAの配列が同じため区別することができない。

DNA分析方法は主に2つに分類される。1つは、特定の生物群を対象とする網羅的解析である。動物、植物、魚類など対象とする生物群に特徴のあるDNA配列に着目し、特定の生物群のDNAのみをPCRで増幅させる。増幅したDNAの配列をNGS解析(次世代シーケンサー)することで、生物種名を判別する方法である。例えば、海水には、生息している魚類や藻類、哺乳類など幅広い生物のDNAが含まれる。魚類のみが保有する共通したDNAの配列に着目し、その配列部についてPCRさせると、魚類のDNAのみが増幅する。増幅したDNAの配列をそれぞれNGS解析し、得られたDNAの配列のうち魚種ごとに異なる特徴がある配列部分をデータベースと照合することで、試料に含まれる魚類の種名が得られる⁴⁾。もう1つは、特定の生物種のDNAのみを増幅させる種特異的解析である。対象とする生物種のDNA配列のPCRでの増幅速度をqPCR(定量PCR法)で計測し、既知濃度の人工遺伝子から求めた検量線を用いてDNA量を算出する。水槽を用いた室内試験では、魚類や海草の生物量が多いとDNA量が多くなる傾向^{5,6)}や、アユの産卵期に生殖細胞由来のDNAが増加する傾向などが報告されている⁷⁾。

環境DNA分析を活用した生物調査としては、ため池や河川での希少種や外来種の生息分布の調査^{8,9)}や湖沼や海での生息魚種の調査⁴⁾などがある。建設工事における環境DNA分析の活用方法としては、例えば、建設現場内やその周辺で保全対象種の保全対策やモニタリングを実施する際に、保全対象種の在・不在の情報から重点的に対策を講じる候補地の選定などに役立てることが考えられる。また、施工中に必要となる保全対象種の情報としては、工事期間中の保全対象種の生物量変化に関する情報である。定期的に環境DNAを分析することで、経時的な変化から保全対象種の急激な減少の兆候を得ることができ、早期の工事計画や保全対策の変更が可能になる。そのためには、現地で採水した試料のDNA量から水域中の生物量を推定することが期待される。環境DNA分析は、2010年頃から広がり始めた新しい分析方法であり、生物種とDNA量との関係など不明確な点も多い。対象とする生物種に関する目視などによる調査と環境DNA分析の結果を蓄積し、生物量との関係を把握していく必要がある。水域での環境DNA量は、生物量の他に流れや降雨との関りも大きいと考えられ、河川や実海域を対象とした数値解析と環境DNA分析を組み合わせた取り組みがある^{11,12)}。

3. 調査概要と試験方法

(1) 調査概要

表-1は調査対象とした生物種と採水地点の情報である。対象とした生物種は国や都道府県の絶滅危惧種を含むため、生息地保護の観点から一部情報を伏せて記載する。(1)ダム建設地では、ダム上流に回遊魚の産卵場がある。回遊魚の遡上をモニタリングする方法として、環境DNA分析を適用できるか可能性を検討した。

表-1 調査概要

	(1)	(2)	(3)
調査対象種	魚類 回遊魚(サケ科) (都道府県指定保護種)	両生類 サンショウウオ科 (絶滅危惧種)	種子植物 海草(アマモ科) (絶滅危惧種)
調査地	ダム建設地	造成地(山間部)	海域
採水地	河川	湿地	入り江
調査目的	回遊魚の遡上確認	卵塊移植地の調査	藻場分布変化の把握
採水地点	1地点	2地点	11地点(A~K) 1地点(3試料×6回)
採水期間	6ヶ月・全12回	1回(産卵期)	1回(2019年6月)
採水量	1L	500mL, 1L	1L, 10L
分析方法	qPCR	NGS	qPCR

ダム建設地を縦断する河川において、回遊魚の遡上期間を含む6ヶ月間（全12回）に採水し、回遊魚のDNA量を分析した。同時刻に採水した試料の差の確認として、1回の採水当たり4試料を分析した。分析結果と採水地点の近傍で計測された回遊魚の遡上数を比較した。（2）造成地では、建設予定地がサンショウウオ科（1種）の生息地として知られており、建設工事で土地を改変する前にサンショウウオの卵塊を移植する計画があった。サンショウウオは、夜行性で成体の体長が10cm程であるため、湿地帯での成体の目視確認が難しい種である。移植後のサンショウウオの生息を確認する経過観察への環境DNA分析の適用可能性を検討するため、卵塊を目視で確認した湿地（卵塊確認地点）と卵塊移植前の移植予定地の湿地で採水し、環境DNAの検出傾向を確認した。（3）海域では、環境DNAを放出する起源が移動しない固着生物である海草に着目した。アマモ、コアマモ等の海草群落（アマモ場）は、日本全国の閉鎖性海域沿岸に広く分布し、水産生物の産卵や生育の場として重要な役割を果たしている。高度経済成長期の沿岸開発等の影響から植生面積は減少したことから、沿岸域の持続可能な開発にむけてアマモ場の保全や分布の把握が重要となる。近年、広範囲に分布するアマモ場を効率的に把握する新しいモニタリング方法が求められている。流れのある実海域で、移動しない海草から放出される環境DNAを、定点で採水・分析することで、海草の枯死や繁茂の変化を把握し、海草の分布変化や急激な枯死の監視に適用を目指している。海草場モニタリングに環境DNAを活用できるか可能性を検討するため、実海域調査と併せて、水槽規模での生物量と環境DNA量の関係の把握、海草の環境DNAの分解特性や分析方法の確認、数値解析による流動場での定点観測の成立性評価をすすめている^{6,12)}。本報告では、実海域調査として、海草の生育する実海域で採水し、海草の生育状況と環境DNAの関係から実海域での定点観測の実現可能性を検討した。また、実海域では環境DNAが希薄であることが懸念されるため、海草が生育する水槽の海水を用いてろ過量を変えた分析を実施し、ろ過量によるDNAの検出傾向を確認した。

（2）試験方法

分析手順を図-1に示す。また、作業状況および分析装置を写真-1に示す。環境DNA分析は、採水試料のろ過からDNAの抽出までは共通した作業となり、環境DNA学会の方法に準拠した¹³⁾。現地で採水した試料は、微生物によるDNA分解を抑制するために試料1Lに対して塩化ベンザルコニウム10%溶液1mLを添加し、実験室まで冷蔵で輸送した。採水日の翌日または翌々日に、採水試料をろ過した。ろ紙上に捕捉した残渣物を分析対象とするため、ろ紙の残渣物が内側になるようにろ紙を折り畳んで冷凍保存した。環境DNA分析の前日に、冷凍したろ紙から市販のDNA抽出キットを用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを用いて、DNA量を分析する場合はqPCR分析、生物種の有無を確認する場合はPCRで目的の生物群のDNAを増幅し、NGS解析で生物種を同定した。

4. 調査結果

（1）河川における魚類の調査

ダム建設地を縦断する河川において、環境DNA分析が回遊魚の遡上をモニタリングする手法として適用できる可能性を検討するため、回遊魚の遡上期間を含む6ヶ月間（全12回）に1試料あたり1Lを採水して分析した。試料差の確認として、1回の採水当たり4試料を分析したことから、各採水日に4つの環境DNA分析結果を図示した（図-2）。環境DNA量の変化は、6月、7月における値に対して、8月～10月上旬に高い値

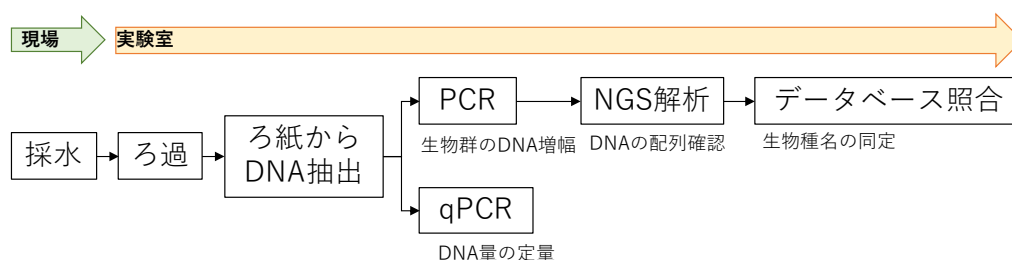


図-1 環境DNA分析の流れ

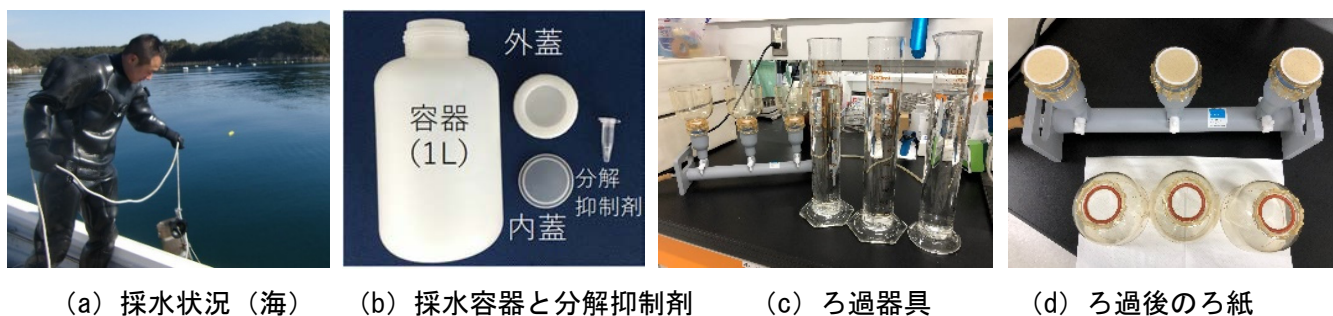
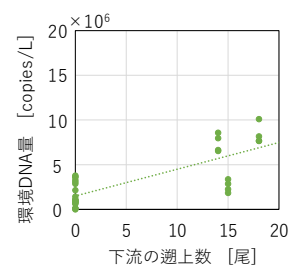
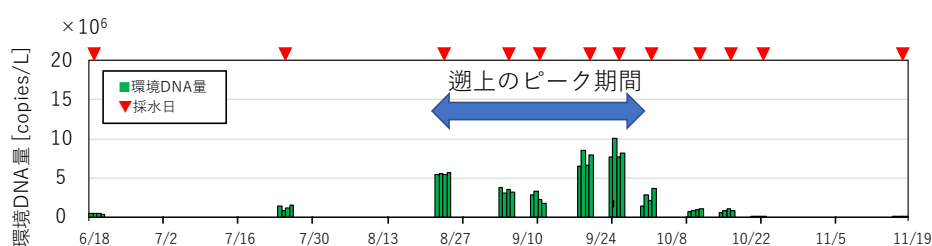


写真-1 採水・ろ過・DNA 抽出状況および分析装置



を示し、10月上旬以降は6月と同程度の値まで下がった。各採水日における4試料の差異は4試料の平均値から最大10%となり、遡上前と遡上後の値の差に比べて差が小さいため、本調査では、採水期間中の環境DNA量の変化を捉えることができたと考えられる。

採水したダム建設地の近くでは、遡上期間中に通過した回遊魚の遡上数が公開されている。生息地保護の観点から観測データの記載は省くが、調査した年は、7月中旬に小規模な遡上と8月中旬～9月末に大規模な遡上が確認された。図-2より、小規模な遡上を確認した後の採水となった7/23の環境DNA量は、遡上前の6/18に比べて増加した。大規模な回遊魚の遡上が始まった8月中旬以降の採水となった8/21以降の試料の環境DNA量は、7/23に比べて増加した。遡上が終了したと考えられる10/9以降は、遡上前の6/18と同程度まで環境DNA量が低下した。このことから、回遊魚の遡上による生物量の変化が環境DNA量に反映されたと考えられる。遡上の開始や終了を環境DNA量から確認できる可能性が示唆された。

遡上した回遊魚は、採水時に上流に生存または産卵後に枯死して存在しているため、採水地点を通過したあとは、上流に回遊魚の生物量が蓄積していくと考えられる。しかしながら、10月上旬に遡上が終わると環境DNA量が翌週には低下した。そのため、採水して得られた環境DNA量は、ある期間およびある範囲に存在した生物量を反映していると考えられる。環境DNA量と通過した生物量や経過日数との関係を考察するため、週1回の頻度で採水した期間（9/3～10/22）について、環境DNA量と遡上数の関係を図示した。遡上数の観測点と採水地点が近いので採水日における環境DNA量と遡上数を図示し、正の相関が得られた（図-3）。以上のことから、河川において定点で環境DNAを分析すると、回遊魚の遡上のような生物の移動傾向をモニタリングできる可能性が示唆された。

(2) 山間部におけるサンショウウオ科の調査

サンショウウオの卵塊移植後の経過観察への環境 DNA 分析適用の可能性を検討するため、卵塊を目視で確認した湿地（卵塊確認地点）と卵塊移植前に採取した卵塊を移植予定である湿地（移植予定地）で採水した。ろ過量は 1L と 500mL の 2 条件を検討した。採水地は湿地で水深が浅く、採水時に底泥が巻きあがりやすい環境であった。採水地とろ過したろ紙の写真を示す（写真-2）。移植予定地の試料のろ紙の写真を比べると、ろ過量が増えることで、ろ紙に底泥が回収され、ろ紙の色が濃くなった。卵塊確認地の 500mL をろ過したろ紙は、移植予定地のろ紙 (1L) よりろ紙の色が濃く、底泥を多く回収した。卵塊確認地では、底泥が多く 500mL のろ過に 30 分以上かかったため、1L の試料は、2 枚のろ紙に分けてろ過した。

2 地点で採水した試料を分析した結果を表-2 に示す。分析対象はサンショウウオ科の 1 種であるが、分析する生物群として、有尾目（サンショウウオ科やイモリ科など）とサンショウウオ科の 2 種類を実施した。各試料から得られた DNA の配列は、DDBJ に登録されている全生物種の配列と照合し、登録配列との一致率を確認した。採水試料から得られた DNA の配列は、サンショウウオ科の 1 種と 99～100% の一致率となった。また、サンショウウオ科の他の種やその他の生物種と採水試料から得られた DNA 配列の一致率は上記より低かった。そのため、検出できた DNA は、採水した地域で生育を確認しているサンショウウオと判別できた。

表-2 より、ろ過量を 1L とした分析のうち、有尾目では、卵塊確認地の試料から DNA の増幅を確認できず、NGS 解析が不可となった。移植予定地の試料ではサンショウウオ科の DNA を確認した。サンショウウオ科を対象とした分析では、卵塊確認地、移植予定地ともにサンショウウオ科の DNA の増幅を確認することができたが、卵塊確認地の試料では、移植予定地に比べ 10 分の 1 以下の DNA 量の増幅となった。ろ過量を 500mL とした分析では、2 地点ともに同程度のサンショウウオ科の DNA 増幅を確認した。卵塊確認地の 1L をろ過した試料で DNA の増幅を確認出来なかった要因としては、腐葉土に含まれる腐植物質（フミン酸）など分析

	採水状況	500ml	1L
卵塊確認地点	 卵塊発見箇所		写真なし (500mL × 2 枚を分析)
移植予定地			

写真-2 採水状況とろ過後のろ紙

表-2 環境 DNA 分析（NGS 解析）結果

分析対象 とした生物群	両生綱有尾目	両生綱有尾目サンショウウオ科	
ろ過量	1L	1L	500mL
移植予定地	◎	◎	◎
卵塊確認地点	× (DNA 増幅せず)	△ (1/10 以下の DNA 増幅)	◎

〔凡例〕

◎：サンショウウオ科の DNA を検出

△：サンショウウオ科の DNA を検出したが、◎に比べ、1/10 以下の DNA 増幅

×：DNA 増幅せず

阻害となる物質が分析時に影響した可能性が考えられる。分析阻害の要因となる腐葉土が多い調査地点の場合は、ろ過量を増やすと DNA の増幅が阻害され偽陰性となる課題が明らかとなった。底泥の混入を避けた採水やろ過量を複数検討することが重要である。

本検討では、湿地のような水深が浅く底泥を含む試料から、夜行性で成体の体長が約 10cm の目視確認が難しいサンショウウオ科の DNA を検出できた。分析で検出した DNA は、卵塊または近傍に生育している成体由来の DNA である可能性が考えられる。卵塊確認地だけでなく移植予定地で DNA が検出されたことは、過去にも卵塊を移植したことがあるため、周囲に成体が生息している可能性や目視で卵塊の確認はできていないが、卵塊が産卵されていた可能性が考えられる。ただし、環境 DNA の放出起源としては、サンショウウオを捕食した大型生物の排泄物にサンショウウオの DNA が含まれていた可能性や細胞が長期間保存される底泥中に沈降していた細胞片が採水時に巻き上がり、DNA を供給した可能性もあるため、生存している個体からの DNA ではない可能性を考慮する必要がある。そのため、移植地の選定や移植後の生息の経過観察に環境 DNA を適用していくためには、卵塊が孵化して幼体、成体になる生活史が変化する時期の DNA の検出傾向や目視観察結果との比較のデータを蓄積して行う必要があると考えられる。

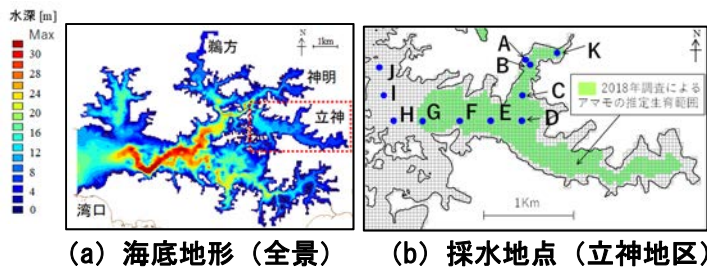
(3) 実海域における海草の調査

三重県英虞湾の海草が生育する立神地区を調査対象地とした (図-4)。本海域では、海草のうちアマモ科のアマモ、コアマモの生育が確認されている。三重県英虞湾に生育するアマモは、一年生が優占種であることから、分布域や密度が調査する季節や年により変化する。コアマモは、都道府県ごとに異なるが、地域によっては絶滅危惧 I B 類に指定されている種である。2018 年 6 月にダイバーによる目視観察を実施し、海草の生育を確認した立神地区の湾奥の K から湾中央に向かう J の 11 地点を調査地点とした (図-4(b))。2018 年の調査では、海草の被度は A~G で 5~40% であった⁶⁾。海草の生育調査結果を表-3 に示す。採水地点の直下を潜水目視で観察した結果では、2019 年 6 月は、A 点と水深 8m 前後の C、D 点で海草の被度 5% 以下の生育を確認したのみで、その他の採水点付近では海草の生育を確認できなかった。広範囲を観察するため、立神地区湾内の 13km の航跡を ROV で調査し、潜水目視の結果を基準に画像から被度を判断した。入り江の西側で被度 10~30%、中央部や採水地点 C、D 付近で被度 5% 以下の海草の生育を確認した (表-3、図-5)。

11 地点における干潮時の環境 DNA 分析結果を図-6(a) に示す。湾奥から湾口に向かう K から J では、K から G の地点で海草のうちアマモの DNA を検出し、H~J では DNA の検出なしとなった。コアマモは、K と E で検出した。海草場から離れることで、環境 DNA 量は検出なしが増える傾向となった。C 点において定点採水した結果を図-6(b) に示す。1 つの試料につき 3 反復分析した値の平均を示している。同じ時刻に採水した試料を比較すると、DNA が増幅しない非検出となる試料と定量下限以下の値となる試料が混在した。C 点における 1 時間の値の変動幅は、干潮時に調査した 11 地点の値の幅と同程度となり、今回の調査、分析方法では、調査地点や時間の差の比較ができないことが明らかとなった。その理由の一つとして、海域における海草の環境 DNA 量が希薄で定量下限値以下であることが挙げられる。この海域で環境 DNA 量の変化を把握するためには、環境 DNA 量が少ない試料を対象とした分析方法の検討が必要となる。

水槽に生育する海草を対象として、ろ過量と分析方法を検討した結果を図-7 に示す。縦軸は分析値から 1 枚のろ紙に回収された DNA 量に換算したろ過量あたりの値である。従来の分析方法 (ろ過量: 1L, 分析量: 2 μ L) で検出なしとなった海水を対象とし、ろ過量を従来法の 10 倍となる 10L として分析した結果、定量下限を超えた値を得た。また、分析量を従来法の 2.5 倍となる 5 μ L とした検討では、1L、10L とともに DNA の増幅を確認でき、10L では分析量 2 μ L の値より DNA 量は低かった。分析阻害対策として行った磁性ビーズによる精製後の分析値は、5 μ L で 1L、10L とともに精製前より高くなった。このことは、分析量を 5 μ L とした分析では分析阻害の影響があり、精製によって影響が低減されたと考えられる。

以上の結果より、実海域では対象とする環境 DNA の濃度が希薄であり、1L のろ過量では検出する環境 DNA の分析結果で検出の有無が混在する結果となった。海草場から離れることで環境 DNA が非検出となる結果が



(a) 海底地形（全景） (b) 採水地点（立神地区）

図-4 調査対象海域（三重県英虞湾）

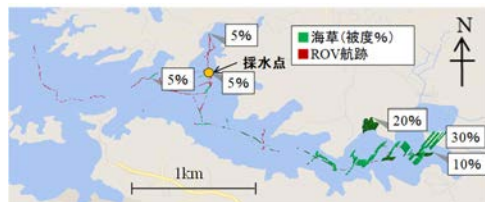
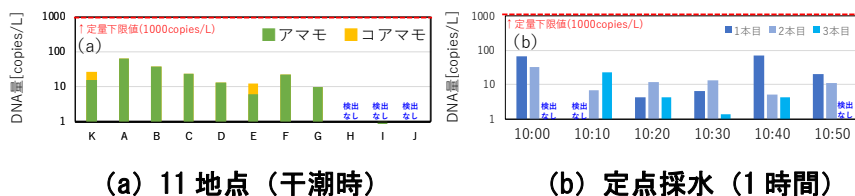


図-5 ROV 調査による海草被度（三重県英虞湾）

表-3 海草の分布調査結果

	採水時間	水深 [m]	海草 [被度%]	海草 (ROV) [被度%]
K	7:40	3.6	0	0
A	7:34	1.2	5%以下	5%以下
B	7:29	3.4	0	0
C	7:24	7.3	5%以下	5%以下
D	7:18	8.1	5%以下	5%以下
E	7:13	8.6	5%以下	未計測
F	7:09	9.2	0	未計測
G	7:03	10.1	0	未計測
H	6:58	10.8	0	0
I	6:42	11.7	0	0
J	6:35	13.5	0	0



(a) 11 地点（干潮時）

(b) 定点採水（1 時間）

図-6 環境 DNA 分析結果（三重県英虞湾）

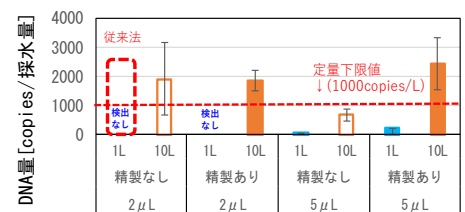


図-7 ろ過量と分析液量の検討（水槽）

増える傾向から、海草の環境 DNA は実海域で生育分布と関係がある可能性は示唆された。ろ過量や分析量を増やすことで定量下限を超えた値の検出が可能となる見込みが得られたことから、実海域での定点モニタリングの実現に向けて、ろ過量を増やし、再度、試料差や 1 時間の変動幅を現地で調査する必要がある。

5. まとめ

ダム建設地、造成現場、沿岸域において魚類、両生類、海草を対象とした環境 DNA 調査を実施した。その結果、いずれの調査でも対象種の DNA を確認できた。6 ヶ月間の魚類の遡上モニタリングでは、回遊魚の DNA 量が遡上期に増加し、遡上後に低下したことから、遡上期間を把握できる可能性が得られた。一方で、分析上の課題も明らかとなった。対象種を確認した場所において、DNA が検出されない試料があった。実海域では試料に含まれる DNA 量が少なかったことや、湿地では腐葉土等に含まれるフミン酸が多く試料に混在し、分析が阻害されたことが要因と考えられる。ろ過量や泥分による分析阻害の影響が明らかとなり、多様な環境下で環境 DNA 分析を用いるためには、調査地点や対象種に合わせた検討が重要となることが分かった。

参考文献

- 1) 高原輝彦, 山中祐樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子, 環境 DNA 分析の手法開発の現状, 日本生態学会誌, vol.66, pp.583-599, 2016.
- 2) 生命情報・DDBJ センター, <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index.html>
- 3) 環境省生物多様性センター, 環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き, 第 1 版, pp.28-38, 2020.
- 4) Miya, M., Yamamoto, S., 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: detection of more than 230 subtropical marine species, *Royal Society Open Science*, 2, 150088, pp.1-33, 2015.
- 5) Toshifumi Minamoto, Miho Fukuda, Koki R. Katsuhara, Ayaka Fujiwara, Shunsuke Hidaka, Satpshi

Yamamoto, Koji Takahashi, Reiji Masuda, "Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution", *PLOS ONE*, vol.12, No. 2, pp. E0173073, 2017.

- 6) 赤塚真依子, 高山百合子, 伊藤一教, 渡辺謙太, 桑江朝比呂, 大澤亮介, 森本哲平, 源利文: 海草場を対象とした環境 DNA の季節変化・日変化・形態変化に関する基礎研究, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), vol.75, No.2, pp. I_1075-I_1080, 2019.
- 7) 皆川朋子, 秋山 秀樹, 狹間 俊介, 児玉 紗友里: 環境 DNA 分析による瀬淵スケールを対象としたアユの生息場・産卵場評価に関する基礎研究, 土木学会論文集 B1 (水工学), vol.74, No.5, pp. I_427-III_432, 2018.
- 8) 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*, vol.52, 2, pp.358-365, 2015.
- 9) Sakai, Y., Kusakabe, A., Tsuchida, K., Tsuzuku, Y., Okada, S., Kitamura, T., Tomita, S., Mukai, T., Tagami, M., Takagi, M., Yaoi, Y. and Minamoto, T.: Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis, *Environmental DNA*, vol.1, 3, pp.281-289, 2019.
- 10) Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., 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.
- 11) 乾 隆帝, 後藤 益滋, 河野 誉仁, 赤松 良久, 掛波 優作, 一松 晃弘: 江の川における環境 DNA 分析を用いたアユの定量化と生物量に影響を与える環境要因の検討, 土木学会論文集 B1 (水工学), vol.61, No.4, pp. I_1105-I_1110, 2017.
- 12) 高山百合子, 赤塚真依子, 伊藤一教, 源利文: 環境 DNA を活用した固着性水生生物モニタリング手法の成立性について, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), vol.75, No.2, pp. I_1087-I_1092, 2019.
- 13) Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., Nakamura, K., Takahara, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Iwasaki, W., Kasai, A., Masuda, R. and Uchii, K. : An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. Environmental DNA Early View, *Environmental DNA*, <https://doi.org/10.1002/edn3.121>, pp.1-6, 2020.