

河川水辺の国勢調査（魚類）における環境 DNA メタバーコーディング解析の試行事例分析

ANALYSIS FOR TRIAL CASES OF ENVIRONMENTAL DNA METABARCODING TO FISH SURVEY IN THE NATIONAL CENSUS ON RIVER ENVIRONMENTS

北川哲郎¹・村岡敬子²・山田拓也³・中村圭吾⁴

Tetsuro KITAGAWA¹, Keiko MURAOKA², Takuya YAMADA³ and Keigo NAKAMURA⁴

¹非会員 博（農） 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ（〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6）

²正会員 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ（〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6）

³非会員 修（工） 国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課（〒100-8918 東京都千代田区霞ヶ関 2 丁目 1-3）

⁴正会員 博（工） 国立研究開発法人 土木研究所 水環境研究グループ（〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6）

The applicability of the environmental DNA metabarcoding (MB) assay for fish surveys was investigated using case studies of the National Census on River Environments. The fish lists compiled using MB or traditional sampling (TS) were compared based on 188 fish taxa from 76 sites from 15 case studies. The detection rate by MB was high for migratory swimming fishes (92.9%) and low for benthic marine/brackish fishes (59.2%). The fish taxa were detected at a probability of 76.9 ± 17.1 % (mean \pm SD) by the MB, and 74.2 ± 16.5 % by the TS. The agreement rate between the lists from both methods was 51.1 ± 16.4 %, and a positive correlation was obtained for the 67 of the 76 sites ($p < 0.05$, cor-2 test). The sites with no correlation had one of the following characteristics: (1) less than 10 taxa, (2) major gap in the number of taxa, (3) located in estuarine area, and (4) implementation timing was mismatched. The differences in the taxon lists among multiple sites on the same river correspond to the variation in environmental status.

Key Words: literature survey; fish fauna; qualitative evaluation; class A river; estuarine basin

1. はじめに

近年、我が国においては、「多自然川づくり基本指針」に基づき、河川が本来有している生物の生息・生育・繁殖環境及び多様な河川景観の保全・創出を目指した河川管理が展開されている¹⁾。他方で、多自然川づくりの推進に不可欠な生物情報の調査、とりわけ我が国における最大規模の環境調査事業である河川水辺の国勢調査（以下、水国調査）においては、全ての一級河川の直轄管理区間、ダム等で実施する定期的な直接採捕等に要する経済・労働コストが課題とされてきた²⁾。さらに、生物情報の活用に関する課題として、中村ら³⁾は、これまで水国調査等で集積されてきたデータは生物分布の概略を把握するためには有効である一方で、各河川の調査地点数が少なく河川改修等に応じた細かな検討材料としてはさらなる調査地点の拡充が必要と指摘している。以上のように、水国調査は、コスト縮減とデータの拡充という2つの課題を抱え、より経済性に優れ、かつ効率的な調査技術の導入が待たれる状況にあると言える。

環境 DNA (environmental DNA ; 以下、eDNA) 分析技術は、現地での採水物の分析から生物の在・不在など様々なデータを得ることができる効率的かつ安価な調査手法として注目を集めている⁴⁾。本技術は、水中や土壌中に存在する組織片等の遺伝情報を読み取り生物種の生息を推定するもので、目的生物の DNA を特異的に検出する種特異的解析と特定分類群の DNA 情報を網羅的に検出するメタバーコーディング解析（以下、MB 解析）に大別される⁷⁾。技術的な特性から、生活環を水中のみで完結させる魚類については検出範囲や分析精度の検証といった知見集積の進展が著しく⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、学術団体や行政機関から魚類調査を主眼に置いた調査マニュアル等が公表されるなど¹²⁾¹³⁾、生物調査の手法として実用段階に近づいてきている。eDNA 分析とりわけ MB 解析の技術を直接採捕と組み合わせて水国調査に活用することができれば、調査精度の向上や経済的・努力的な面における直接採捕のみを主体とした従来法からの効率化が見込まれるばかりか¹⁴⁾、近年発達する測量技術や地理情報技術との組み合わせによる、緊密で精度高い環境評価へのさらなる展開が期待できる¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。

eDNA 分析技術の活用を目指した取り組みとして、赤松ら¹⁸⁾は、北海道の鶴川と奈良県・三重県・京都府に跨る木津川の 2 河川において MB 解析と水国マニュアルに基づく直接採捕との比較調査を実施し、技術の有効性を検討している。しかし、既往研究で集積された知見は断片的で、河川調査への活用へ向けは、全国の水域から多様な魚類を含む事例を集積し、検討を進めていく必要がある。そこで国土交通省は、河川・ダム管理における eDNA 分析技術の活用へ向けた検討を目的とした、水国調査における活用事例の集積や現地調査に併せた MB 解析の試行に関するテーマ調査を令和元年度より開始している¹⁹⁾。本報では、当該テーマ調査の一環として、これまでの水国調査における試行事例の収集・整理に基づき、魚類 eDNA 分析技術と併せて MB 解析の利用性および課題について検討した。

2. 材料・方法

(1) 情報収集

2016 年 4 月から 2019 年 9 月までの期間中に、国土交通省が管理する一級河川で実施された水国調査から、魚類を対象とした eDNA 分析の試行事例を収集した。情報の収集は、国土交通省の北海道開発局ならびに各地方整備局に属する担当部署を対象とし、聞き取りならびに文献貸与によって実施した。なお、本調査では、基本的に業務成果の一部として作成された資料を集計対象とした。

(2) 魚類リストの作成

収集された事例のうち、MB 解析結果から検出 taxon (種・属・科など分類上有意な集まりであることを示す単位 [複数: taxa]) を整理し、採水時期の至近に実施された直接採捕の結果と併せて魚類リストを作成した。集計対象は、MB 解析と直接採捕について同等の魚類相を反映した結果と判断できる事例とし、1 回の MB 解析と複数季・年の直接採捕とを比較するなど努力量が乖離していた事例、MB 解析が不調であったと明記されていた事例は除いた。

魚類リストの作成に際し、魚類名等は原資料の記載に従った。ただし、プライマー情報の記載があったすべての MB 解析事例で採用され、未記載の事例においても採用された可能性が高いと想定される MiFish-U/E プライマーの検出特性および解析時の技術水準を考慮し²⁰⁾、同領域での種判別が難しい分類群については、集計対象から除外あるいは特定可能な taxon までの集計に留めた^{11),13),18)}。また、希少種保護の観点から、リスト化に際しては魚類の生息地特定につながる情報を除いた。

(3) 利用性検証

作成した魚類リストに基づき、MB 解析ならびに直接採捕における検出・確認 taxon 数について、生活型 (海洋/汽水、回遊、淡水)・遊泳型 (遊泳、底生) 別に集計した。さらに、両手法で得られたリスト間における差異を確認する

ため、検出 taxon の在・不在を変数としてピアソンの積率相関係数を求め、無相関検定によって有意性を確認した。また、同一河川内における環境評価手法としての MB 解析の有効性を確認するため、環境の異なる多数の地区を含む 4 事例 (天塩川、淀川、遠賀川、大淀川) の本川区間を代表とし、各地区における taxon 組成の特性を非計量多次元尺度法 (Non-Metric Multidimensional Scaling; 以下、NMDS) を用いて序列化し、調査手法間における taxon の変化傾向に見られる類似性を検証した。さらに、NMDS で示された 2 次元的变化を 3 平方の定理に基づき 1 次元化し (図-4,5 参照)、地区間の物理的距離および河道上の環境イベント (支川の流入、横断工作物、河川区分の変化²¹⁾) の状況と照合した。なお、データの照合に際しては、taxon リストの相対変化と物理的距離とを比較するため、最上流地区から最下流地区までの変化幅ないし距離を 0~1 として標準化した。統計処理には解析ソフト R (windows, ver. 3.6.1) を用いた。

3. 結果・考察

(1) 収集事例

対象期間中に実施された魚類調査 110 件から 21 件の eDNA 活用事例が収集された。また、魚類以外を対象とした水国調査での事例が 2 件あった。内訳を見ると、MB 解析が 21 件、種特異的解析が 2 件、それぞれ実施されていた (表-1)。本調査では、収集事例のうち MB 解析と直接採捕がほぼ同等の魚類相を反映していると判断された 76 地区を含む 16 事例 (15 水系) を対象として分析を行なった (表-2)。各事例には同一地区で複数の eDNA サンプルを採水したケースや MB 解析と直接採捕とをそれぞれ複数回実施し合算したデータを比較したケースが含まれたが、比較方法の違いに伴う相関係数の顕著な変化は認められなかったため ($p > 0.05$, Steel-Dwass test)、本調査では全てのパターンを等価として扱った。

(2) 魚類の検出状況

収集された文献中に記載された魚類は 206 taxa で、MB 解析でのみ検出された魚類は 49 taxa、直接採捕でのみ確認された魚類は 42 taxa であった。MB 解析のみで検出された taxon のうち、汽水域よりも上流に出現する可能性が低い外洋性ないし深海性魚類、河川中流部で検出された海洋性魚類、番匠川の⑤地区のみで検出された国外外来魚類に含まれる計 18 taxa については、食品や飼育展示に由来する可能性が強いと判断し集計対象から除外した (表-3)。集計対象とした 188 taxa の検出・確認状況に基づき総 taxon 数に対するそれぞれの検出・確認率を地区別に求めたところ、MB 解析では 76.9±17.1% (平均±標準偏差)、直接採捕では 74.2±16.5% で、MB 解析のほうがやや検出率が高くなった (表-4)。両手法の検出率に生じた差については、Nakagawa et al.⁹⁾が MB 解析と直接採捕との比較に基づき

表-1 環境DNA 技術活用一覧 (H28～R1 Sept.)

水系名	年	水国地区との整合	採捕	採水	採水 タイミング	採水量 (L)	検体数 (/地点)	プライマー 情報	備考
天塩川	H28	全地区	9月	9月	採捕時	-	1	-	表層水
石狩川	H30	代表地区	-	-	-	計1L	3~4	MiFish-U/E	別の採捕調査と比較, 0.5L×2と1Lの区がある
後志利別川	H30	全地区	-	6,10月	-	1	1	-	鳥類調査のためeDNAのみ
	H31	全地区	春季(不明)	6月	-	1	1	-	
湧別川	H30	全地区	6,10月	6,10月	-	-	-	-	
北上川	H28	別途設定	10月	10月	採捕時	-	1	-	
	H29	別途設定	6月	6月	採捕時	-	1	-	別項目の水国調査で追加実施
高瀬川	H30	全地区	6,8,10月	6,8,10月	採捕時	2	1	-	各地点のサンプルを合算して比較
岩木川	H29	代表地区	9月	9月	採捕日付近	-	1	-	地区ごとに1-3地点で採水
馬淵川	H30	全地区	7-8月	5月	別途設定	1	1	-	
最上川	H29	全地区	6月	6月	採捕時	1	複数	-	各3~4地点で採水, 各1L
庄川	H29	代表地区	6月	6月	採捕時	2	10	-	トゲウオ類がいそうな環境などで複数採水
姫川	H30	全地区	-	-	-	-	1	-	
黒部川	H29	代表地区	8-9月+11月	8-9月+11月	-	1	1	MiFish-U/E	二次水域で補助的に採水
木曾川	H30	代表地区	-	-	-	1	3~4	MiFish-U/E	採水のみで別途実施の水国データと比較
淀川	H29	全地区	5月	5月	採捕日付近	1	1	-	表層水
肱川	H29	代表地区	10月	11月	別途設定	-	1	-	
遠賀川	H30	全地区	5-6,8月	5-6,8月	採捕時	1	複数	MiFish-?	複数個所で採水したものを混合(計1L)
筑後川	H29	代表地区	-	8月	採捕日付近	0.05	3	定量用	ニッポンバラタナゴなど重要種の定量のみ
山国川	H29	代表地区	9月	9月	採捕時	1	1~9	定量用	スナヤツメなど重要種の定量のみ
番匠川	H30	全地区	10月	10月	採捕時	1	2	MiFish-U/E	「干潮と満潮」あるいは「本川とワンド」で各1L
緑川	H30	代表地区	-	11月	-	1	1~2	-	
大淀川	H29	全地区	8,10月	8,10月	採捕時	1	1	-	

表-2 メタバーコーディング解析ならびに採捕調査で検出された taxon 数の一覧

水系名	天塩川								後志利別川								湧別川								北上川								高瀬川								岩木川								馬淵川							
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
地区No. ^{※1}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Taxa	10	8	8	15	7	4	23	16	10	9	18	15	12	12	15	6	22	24	24	24	24	19	24	24	23	23	22	20	26	24																										
eDNAのみ	1	2	0	1	0	1	10	8	2	2	5	2	3	5	3	1	2	2	6	8	8	12	10	13	14	6	10	11	4																											
採捕のみ	5	3	3	9	1	0	2	0	0	0	2	1	1	2	4	3	11	1	1	4	7	3	6	1	1	7	6	12	11																											
共通	4	3	5	5	6	3	11	8	8	7	11	12	8	5	8	2	9	21	17	12	4	9	8	9	8	9	4	3	9																											
相関係数 ^{※2}	0.58	0.53	0.78†	0.53*	0.92†	0.86	0.64†	0.69†	0.89†	0.88†	0.74†	0.88†	0.79†	0.58*	0.68†	0.51	0.58†	0.92†	0.84†	0.64†	0.31	0.53†	0.46*	0.58†	0.54†	0.54†	0.29	0.14	0.52†																											

※1: ①: 感潮域, ①: 純淡水域 ※2: *, p<0.05, †: p<0.01.

※3: 地区直上の水族館からの排水による影響が強く懸念されたため, 地区⑤は集計から除外.

表-3 集計対象外とした taxon

除外理由	Taxon
河道内で検出される可能性が低い(外洋性・深海性)	サンマ, ムツ, ホッケ, カツオ, キハダマグロ
河川中流域以上で検出される可能性が低い ^{※1} (海洋性)	タイワンアイノコイワシ, ニシン, プリ, マダイ, イトヨリダイ, サワラ, ヤマトカマス, マアジ, マアジ属, イサキ, マサバ, サバ属, ソウハチガレイ
飼育展示個体の可能性が高い	ピラニア類, コロソマ

※1: 中流域以上での確認例のみ除外した.

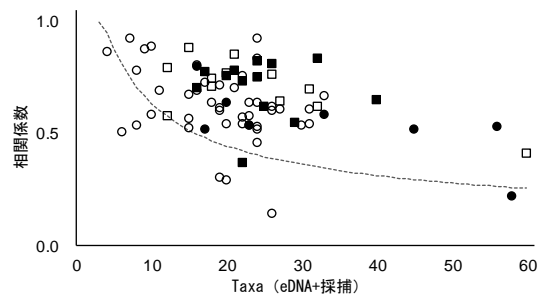


図-1 メタバーコーディング解析と直接採捕の結果に見られた相関. 点線以上には有意な正の相関関係(○:1 検体/1 季, ●: 複数検体/1 季, □:1 検体/2 季合算, ■:複数検体/2 季合算. 破線: p<0.05, cor 2 test).

eDNA の検出範囲を約 6 km 上流と, 山口ら¹⁰⁾が一次元河川水・物質動態モデルに基づき eDNA 含有物の流下範囲を 1~2 km と, それぞれ推定しているのに対し, 水国調査の調査地区が約 1 km の区間であることから, MB 解析の検出範囲が水国調査の調査範囲よりも広範であったことに

起因している可能性がある. なお, 両手法で得られた魚類リストの一致率は 51.1±16.4 %で, 完全な一致が見られた地区はなかったが, 全 76 地区のうち 67 地区で有意な正の相関関係が確かめられた (図-1; p<0.05, cor 2 test).

調査手法間での相関が有意水準に達しなかった 9 地区については、①両手法による検出・確認数がいずれも 10 taxa 以下と少ない (図-2 : No.1~4), ②MB 解析での検出 taxa が直接採捕による確認数の半分以下 (図-2 : No. 5), ③採水時期と採捕時期に約 2 ヶ月のずれがある (図-2 : No. 6, 7), ④感潮域に設けられた調査地区 (図-2 : No. 7~9), といった傾向が見られた。感潮域では 3/12 地区と高い割合で相関関係が認められず、魚類リストの一致率についても純淡水域の地区と比較して有意に低くなったことから ($p < 0.05$, Wilcoxon rank sum test), とりわけ感潮域を対象とした MB 解析に際しては、淡水魚類を目的とした調査であれば採水タイミングを順流時に設定するなど、潮汐の影響を考慮した計画策定が不可欠と考えられた。

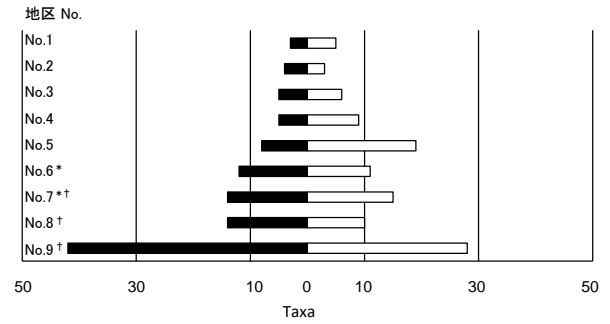


図-2 eDNA と直接採捕との相関が低かった地区の検出・確認傾向 (■:eDNA, □:採捕. *:実施時期に約 2 ヶ月の差, †:河口・感潮域)。

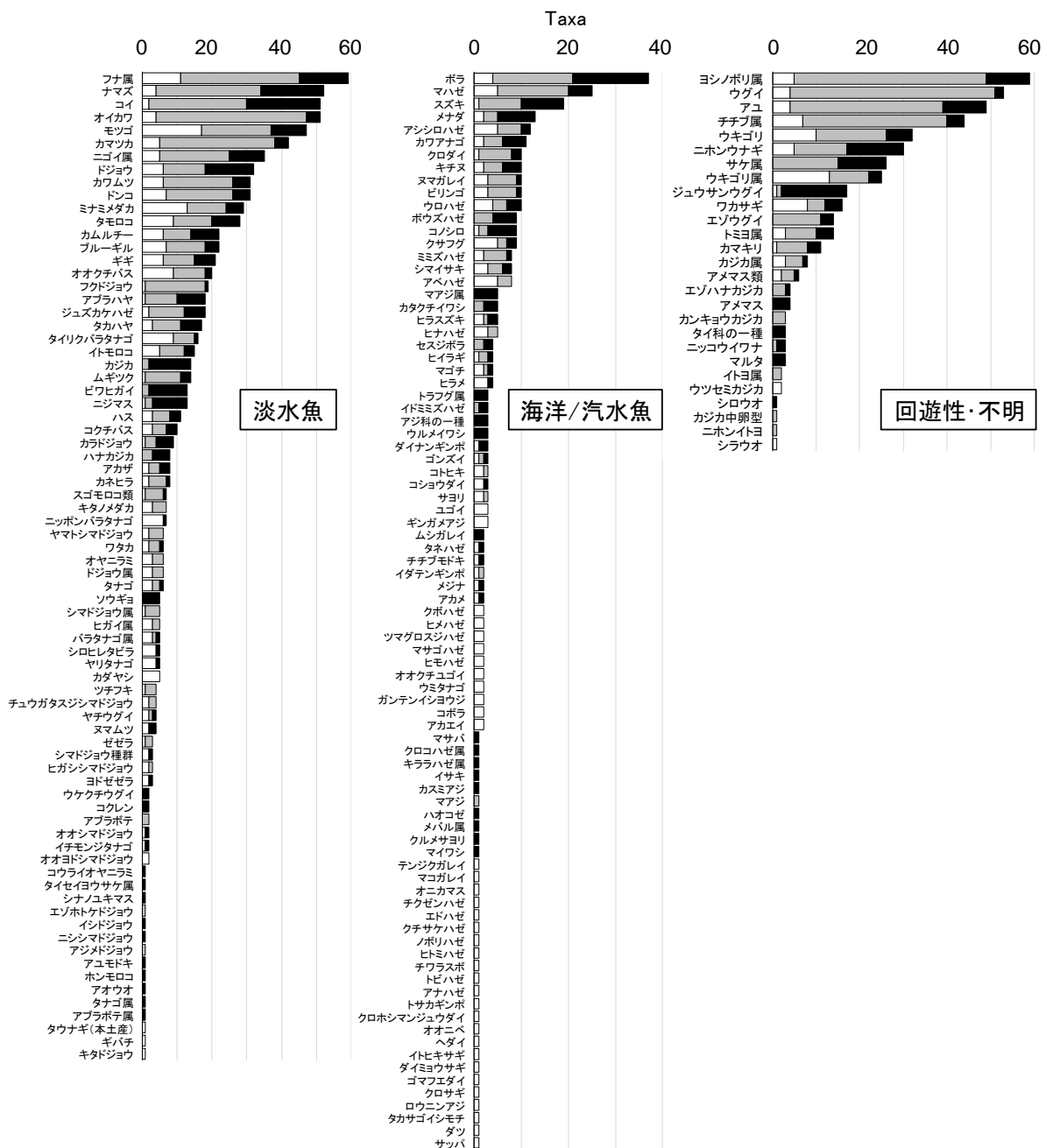


図-3 魚類の taxon 別検出・確認状況 (□:採捕のみ, ■:両方確認, ■:eDNA のみ)。

表-4 生活・遊泳型別に見た魚類の検出・確認状況

遊泳・生活型	総数	eDNA (%) ^{※1}	採捕 (%) ^{※2}
淡水	656	496 (75.6%)	482 (73.5%)
遊海/汽水	195	138 (70.8%)	115 (59.0%)
泳回遊	85	79 (92.9%)	54 (63.5%)
その他	127	110 (86.6%)	96 (75.6%)
淡水	269	214 (79.6%)	191 (71.0%)
底海/汽水	157	93 (59.2%)	120 (76.4%)
生回遊	84	66 (78.6%)	60 (71.4%)
その他	136	108 (79.4%)	118 (86.8%)

※1: eDNA 検出数 / 総検出・確認数 (eDNA+採捕).

※2: 採捕確認数 / 総検出・確認数 (eDNA+採捕).

(3) 生活・遊泳型に応じた検出傾向

全 76 地区における魚類の総検出・確認数として得られた延べ 1709 例について、生活型ならびに遊泳型別に集計した結果を図-3 ならびに表-4 に示す。今回の調査で最も MB 解析による検出率が高かったのは回遊性の遊泳魚で (92.9%)、最も低かったのは海洋汽水性の底生魚類であった (59.2%)。魚類の検出率を生活型別に見ると海洋汽水性魚類が、遊泳型別に見ると底生魚類が、それぞれ低い値を示した。ただし、最も検出例数が多かった淡水魚類では底生魚類の検出率が遊泳魚類の値を上回るなど、遊泳型については明瞭な検出傾向は認められなかった。

MB 解析による検出率が低かった魚類には、直接採捕による確認例数が少ないものが多く、特に直接採捕のみで確認されている taxon の半数以上は、全体を通じての確認例が 1 例のみに止まるものであった。また、MB 解析による検出率が 50% 以下となった taxa には、本川環境よりも止水一半止水域を好む小型淡水魚類、あるいは汽水性の小型ハゼ類が多く含まれた。eDNA の検出濃度は対象の個体数ならびに密度に相関するとされることから²²⁾、この傾向は、採水地点 (本川) との連続性が低い孤立水域やワンド等に生息する、あるいは生息個体数が僅少な魚類の検出率が低下した結果と考えられた。さらに、偶来性の高い海洋汽水性魚類の検出率が低下した要因としては、小型定置網などの漁具類を一晩程度設置する直接採捕と採水時の瞬間的な状況を捉える MB 解析との、両調査手法が有する時間的スケールの違いを反映した結果と推察された。

(4) 河川内での検出魚類の組成変化

河川全体での検出・確認魚類が 50 taxa 以上となった淀川、遠賀川、大淀川では、直接採捕と MB 解析に基づく NMDS の分布パターンにある程度の類似傾向が示された (図-4)。対して、2/5 地区で検出・確認 taxa の相関性が認められなかった天塩川では、調査手法間で異なる分布パターンが生じた。この傾向は、天塩川では全体の検出・確認魚類数が 18 と少なく、各地区の環境を表徴できるほどのリストが得られなかったためと考えられたが、その要因が調査手法の技術的制限に基づくものか、採水条件などに関する計画ないし作業上の問題にあるかは特定できなかった。また、物理環境の変化に応じた taxon リストの変化について、とりわけ遠賀川の地点 2~4 ならびに大淀川の

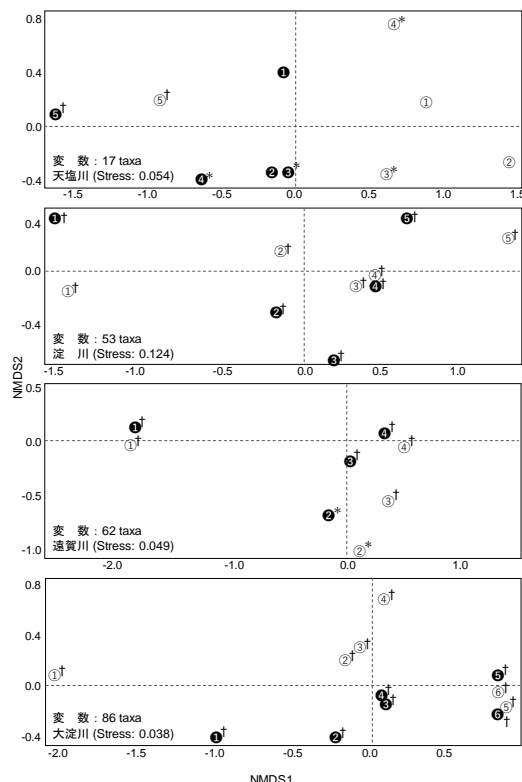


図-4 同一河川内における魚類検出特性の地点間変化. 数字は調査地区番号 (●: MB 解析, ○: 直接採捕. R.3.6.1 Win; Pac. vegan; Jaccard index; perm.: 10,000. cor-2 test; †: $p < 0.01$, * : $p < 0.05$).

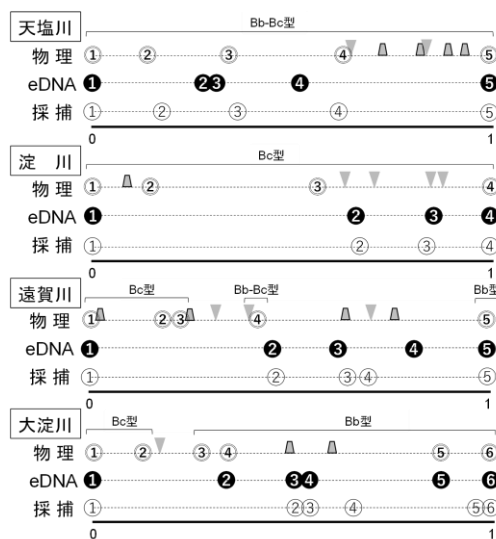


図-5 NMDS から算出した地区間における魚類相の相対変化と環境イベントとの対比. 数字は調査地区番号. 物理: 最下流から最上流までの距離を相対化して図示. ▼: 支川の流入, ▲: 堰・頭首工など横断工作物. eDNA・採捕: 三平方定理により NMDS1, 2 から変化幅 (d) を算出 ($d^2 [2 \text{ 地区間距離}] = [NMDS1 \text{ の差}]^2 + [NMDS2 \text{ の差}]^2$) して相対化して図示.

地点 2~4 では、MB 解析において環境イベント (河川区分の変化, 支川流入) を挟んだ地区間の変化幅が大きく評価され (図-5)、直接採捕に比して環境イベントの影響がより強く反映される傾向にあることが確かめられた。環境変化に応じた検出魚類の変化が確認されたことから、MB 解析は、地区の環境特性を表徴するリストを作成可能で、河川環境の評価に活用し得る手法であると示唆された。

4. 結論

MB 解析によって検出された taxon の数は直接採捕での確認数に劣らず、検出されたリスト間において多くの事例で高い相関性が認められたことから、MB 解析は、魚類相の把握という観点においては直接採捕に劣らない精度を持った調査手法であると考えられた。さらに、検出された taxon リストの地区間変化と河道内の環境イベントとの関係性から、MB 解析の環境評価に対する利便性の高さが示唆された。他方で、本調査においては、感潮域など特定の環境下において検出率の低下が確認されるなど、調査計画を策定するうえで配慮すべき課題が抽出された。また、MB 解析に基づくリストに挙げたほぼ全ての taxon で直接採捕されているながら MB 解析で検出されない例が確認されたほか、現行の MB 解析技術では種・属の特定が困難な分類群の検出例が数多く含まれていた。以上により、MB 解析は、魚類相ならびに環境特性の概要を把握する手法としては有効である一方、検出の精度や安定性には課題を残し、現状としては直接採捕や eDNA 種特異的分析と組み合わせた活用手法を検討していくべきと考えられた。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、国土交通省北海道開発局ならびに各地方整備局から水国調査に関するデータ提供をいただいた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 国土交通省河川局河川環境課:多自然川づくり基本方針, URL: http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha06/05/051013_.html, 2019年12月9日取得, 2006.
- 2) 舟橋弥生・柏木才助・後藤勝洋・池田有希・太田昌志・竹内秀二:河川環境に関する施策の取り組み状況と課題の分析について, リバーフロント研究所報告 第28号, pp.11-18, 2017.
- 3) 藤田朝彦:河川水辺の国勢調査. 魚類額の百科事典, 一般社団法人日本魚類学会 編, 丸善出版, pp.544-545, 2018.
- 4) 河川水辺の国勢調査改善検討委員会:第6回 河川水辺の国勢調査改善検討委員会資料, URL: https://www.mlit.go.jp/river/shinngikai_blog/mizubekokutyou/dai06kai/index.html, 2019年12月9日取得, 2012.
- 5) 中村圭吾・服部 敦・福濱方哉・萱場祐一:河川の環境管理を推進するための課題と方向性, 河川技術論文集 Vol.21, pp.31-36, 2015.
- 6) Minamoto, T., H. Yamanaka, T. Takahara, M.N. Honjo and Z. Kawabata: Surveillance of fish species composition using environmental DNA, *Limnology*, Vol.13, pp.193-197, 2012.
- 7) 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土井秀幸・内井喜美子: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して～. 日本生態学会誌 Vol.66, pp.583-599, 2016.
- 8) 山中裕樹:魚類の環境 DNA メタバーコーディングにおける採水方法と検出種数の関係についての検討, 里山学術研究センター 2017年度年次報告書, pp.194-198, 2017.
- 9) Nakagawa, H., S. Yamamoto, Y. Sato, T. Sado, T. Minamoto and M. Miya: Comparing local -and regional- scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods, *Freshw. Biol.*, Vol.63, pp.569-580, 2018.
- 10) 山口皓平・赤松良久・乾 隆帝・後藤益滋・河野誉仁:河川における環境 DNA 含有物質の動態に関する基礎的研究, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.74, No.5, pp.1_409-1_414, 2018.
- 11) 宮 正樹:環境 DNA 学会の今(第1回) MiFish プライマーを用いた魚類環境 DNA 研究の最新動向-1: 海外の研究グループによって明らかになった MiFish プライマーの高い種検出能力, 環境 DNA 学会ニュースレター No.2, pp.17-22, 2020.
- 12) 環境 DNA 学会:環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver2.1, URL: <http://ednasociety.org/manual>, 2019年5月8日取得, 2019.
- 13) 環境省:「MiFish による種の識別に注意を要する淡水魚類」リストについて, URL: http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html, 2019年12月12日取得, 2019.
- 14) 村岡敏子・中村圭吾:河川における環境 DNA の実用化に向けた土木研究所の取り組み. 土木技術資料 Vol.61, pp.2-5, 2019.
- 15) 岩崎貴也・阪口翔太・横山良太・高見泰興・大澤剛士・池田敏士・陶山佳久:生物地理学とその関連分野における地理情報システム技術の基礎と応用, 日本生態学会誌 Vol.64, pp.183-199, 2014.
- 16) 遠山貴之・鬼倉徳雄・光益慎也・齋藤康宏:一級水系流域における魚類分布予測モデルの構築と多自然川づくり支援システムの開発, 河川技術論文集 Vol.25, pp.363-368, 2019.
- 17) 中村圭吾:グリーンレーザーを用いた航空レーザ測深(ALB)による河川調査の現状と可能性, 水環境学会誌 Vol.42, pp.174-178, 2019.
- 18) 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 Vol.74, No.5, pp.1_415-1_420, 2018.
- 19) 河川環境データベース:環境 DNA を用いた河川生物把握の可能性に関するテーマ調査の実施について, URL: http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/kankyoDNA_200110.pdf, 2020年1月20日取得, 2020.
- 20) Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, *Royal Soc. Open Sci.*, Vol.2, 150088, 2015.
- 21) 可児藤吉:溪流棲昆虫の生態, 日本生物誌「昆虫. 上巻」, 研究社, pp.171-317, 1944.
- 22) Mizumoto, H., H. Urabe, T. Kanbe, M. Fukushima and H. Araki: Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid, *Limnology*, Vol.19, pp.219-227, 2018.

(2020. 4. 2 受付)