

<特集>環境DNAを用いた環境調査の現状と展望

神奈川県における環境DNA調査の導入経緯とその活用について

長谷部 勇太

(神奈川県環境科学センター)

1. はじめに

神奈川県環境科学センターは公害が社会問題となっていた1968年(昭和43年)に設置された「公害センター」を前身としており、1991年(平成3年)に平塚市四之宮に庁舎を新設移転し、現在の「環境科学センター」としてスタートした。

当センターと生物調査との関係は長く、古くは1968年(昭和43年)から県内の主要な河川を対象に水生生物(底生動物、付着藻類、水草等)の調査を実施しており^{1,2)}、生物相から見た河川環境の評価を行ってきた。

その後も定期的に魚類調査³⁾や底生動物調査⁴⁾を実施しており、現在では県民の水源となっている相模川及び酒匂川において良質な水を安定的に確保するための総合的な取組である水源環境の保全に関する事業(以下「水源事業」という)に基づく、両河川の生物調査(以下「河川モニタリング」という)を実施している。

河川モニタリングは両河川における水質や生物に関する基礎的な情報を収集するとともに、水源事業の実施が河川に与える影響を評価することを目的としており、大きく2種類の調査を実施している。

一つ目は生物調査の専門家に委託し、両河川を広域的に実施する調査(以下「専門家調査」という)、二つ目は生きものに興味がある県民の方々に協力いただき実施する調査(以下「県民調査」という)である。専門家調査は2008年に相模川、2009年に酒匂川で開始し、以降5年に1回実施しており、県民調査は毎年実施している。

本稿では、まず当センターが環境DNA調査を導入することとなった経緯を紹介し、次に過去に実施してきた環境DNAに関する試行的な調査、さらには現在進めている全国環境研協議会Ⅱ型実施共同研究の紹介、最後に、当センターが考える環境DNA調査の展望と課題について述べる。

2. 環境DNA調査導入の経緯

河川モニタリングは主に水質と生物の調査を実施しており、生物調査については捕獲調査を中心に実施している。

調査頻度・地点数については、それぞれの河川に上流から下流まで40の調査地点を設定し、水質調査については月1回、生物調査については年2回(概ね夏季と冬季)の頻度で調査を行っている。

なお、生物調査のうちサンショウウオ類については対象となる種の生息域が源流域に限定されていることから、別途源流域を中心に25の調査地点を設定し、年1回の調査としている。

河川モニタリングにおける生物調査が抱える一つの課題としては、調査頻度の少なさによる事業評価の精度の低さが挙げられる。本来であれば、水質の変化よりも生物相の変化の方がより多くの要因に影響されており、その変化と水源事業の関係を評価するにはより高頻度での調査が必要と考えられるが、生物調査は水質調査に比べ委託費用が高く、当センターでの専門家調査でも予算等の関係から5年に1度、年2回の頻度にとどまっている。

そのような中、2018年度の生態学会大会でのシンポジウム等で新たな生物調査手法である環境DNA調査が紹介され、その特徴の一つである調査の簡易性に着目し、河川モニタリングに導入することで評価精度の向上につながるのではないかと考え、導入に向けた検討を開始することとした。

そこで、導入に向けた最初の取組として、環境DNA調査と捕獲調査を同時に実施することで、従来から実施していた捕獲調査の代替や補完的な調査として活用可能なか検討を行うこととした。

3. 環境DNA調査導入に向けた試行調査

3.1 サンショウウオ類調査

最初にサンショウウオ類調査に関する試行調査について紹介する。水源事業でのサンショウウオ類調査の対象種は、丹沢山地に生息するハコネサンショウウオとヒガシヒダサンショウウオであるが、いずれも源流域に生息しており、深い淵など調査が難しい場所も多く、捕獲調査では確認できていない可能性もあることが課題となっていた。環境DNA調査はこのような河川の構造に影響を受

けずに調査が可能のため、捕獲調査と同等以上の結果が得られるのであれば、従来の捕獲調査を代替できる可能性がある。

試行調査内容としては捕獲調査との同時調査による結果の比較、DNAの流下距離検討及び時刻・季節によるDNA濃度の変動に関する検討を実施した。

この内容の詳細は既報に譲り^{5,6)}、ここでは結果の概要のみの紹介に留めることとする。

結果としては、表1、表2のとおり8月に実施した捕獲調査の際に同時に実施した環境DNA調査では結果が一致する地点が多いものの、捕獲調査では確認されたが、環境DNAは検出できなかった地点も存在した。DNAの流下距離検討において、ハコネサンショウウオの幼体15匹をかごに入れ、河川内に設置し、直下で採水した場合でもDNAが不検出であったことと併せて考えると、不検出となったのは捕獲調査を実施した8月に河川にいるサンショウウオは幼体であり、体の大きさが小さく、代謝等に伴い外部に放出するDNAの量が非常に少ないことが原因と考えられた。

一方で、時刻・季節によるDNA濃度の変動に関する検討を実施した結果からは時刻による濃度変化は少なく、季節による変動は非常に大きいことが明らかとなった。この調査では6月というハコネサンショウウオの繁殖期にあたる時期に調査を実施したことで、8月の調査時に比べ、10倍以上の高濃度のDNAが検出された。繁殖期には河川に成体が戻ってきており、繁殖等に伴い活動が活発化していると想定されることから、放出されるDNAの量が多くなったものと考えられた。これらの試行調査の結果から適切な調査時期を設定し、西丹沢地域におけるサンショウ

ウオ類の分布把握調査を実施した⁷⁾。

3.2 魚類調査

3.2.1 捕獲調査確認種に対する検出率

次に魚類調査に関する試行調査について紹介する。魚類については2015年に千葉博物館の宮氏が魚類のユニバーサルプライマーであるMiFishプライマーを開発しており⁸⁾、この試行調査においてもMiFishプライマーを使用している。

MiFishプライマーは非常に検出率が高く、美ら海水族館の水槽での実験では水槽に生息する種の90%~100%が検出されており⁸⁾、環境DNA学会発行の環境DNA調査・分析マニュアル⁹⁾や環境省発行の「DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き」¹⁰⁾においても代表的な魚類の網羅解析手法として紹介されている。

2018年度に相模川で39地点、2019年度に酒匂川で39地点の専門家調査を実施しており、その捕獲調査の際に採水も実施し、環境DNAサンプルを作成し、MiFishプライマーによる魚類網羅解析を実施した。

結果については両河川とも同様の傾向がみられたため、両河川のデータを図1のとおりまとめた。捕獲調査で確認された個体数が多いほど、環境DNAで検出できる確率は高まり、6個体以上捕獲された場合は、ほぼ100%の確率で環境DNAが検出でき、捕獲個体数が1だった場合でも90%に近い検出率となった。捕獲調査で確認されたものの不検出となった種の中にはアユやスナヤツメ類といったMiFishプライマー配列との一致率が低い種も確認された。プライマーとのミスマッチが種の検出に悪影響を与えることは上述の「DNA分析技術を用いた淡

表1 相模川水系の捕獲調査と環境DNA調査の結果比較

調査地点	種名	ヒガシヒダサンショウウオ			ハコネサンショウウオ					
		捕獲調査(調査年)	環境DNA		捕獲調査(調査年)	環境DNA				
	水系名	2008	2013	2018	(copies/ml)	2008	2013	2018	(copies/ml)	
地点番号	St.1	沢井川	-	-	-	-	-	-	-	
	St.2	底沢	-	-	-	-	-	-	-	
	St.3	神ノ川A沢	-	-	2	-	7	5	2	0.05
	St.4	神ノ川B沢	2	-	-	-	8	5	1	0.38
	St.5	神ノ川C沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.6	神ノ川D沢	-	-	-	-	6	8	-	0.26
	St.7	神ノ川E沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.8	道志川A沢	-	-	-	-	-	1	-	検出
	St.9	道志川B沢	-	-	-	-	2	1	1	1.51
	St.10	早戸川A沢	1	-	-	-	6	34	5	0.16
	St.11	早戸川B沢	-	7	-	-	6	32	34	検出
	St.12	早戸川C沢	1	-	-	-	-	-	-	-
	St.13	早戸川D沢	-	-	-	-	9	3	2	検出
	St.14	早戸川E沢	-	-	-	-	-	3	1	検出
	St.15	早戸川F沢	-	-	-	-	2	-	-	0.09
	St.16	早戸川G沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.17	早戸川H沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.18	布川A沢	-	-	-	-	-	-	4	-
	St.19	布川B沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.20	布川C沢	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.21	布川D沢	-	-	-	-	3	5	3	0.08
	St.22	布川E沢	1	-	-	-	5	1	5	-
	St.23	布川F沢	-	-	-	-	5	4	1	0.09
	St.24	布川G沢	-	-	-	-	1	-	-	-
	St.25	谷太郎川	-	-	-	-	-	4	1	検出
	確認地点数	4地点	1地点	1地点	0地点	13地点	13地点	12地点	13地点	

注1) 捕獲調査の数字は個体数
 注2) 環境DNAの分析は地点毎に4反復で行い、4回の平均値を記載。
 注3) 定量下限値は0.05copies/ml(1copy/2μL)。4回のうち1回でもDNAが検出されたものうち、平均値が定量下限値未満の場合は「検出」とした。
 注4) 環境DNAの確認地点数については、「検出」も含めた。
 注5) 表中の「-」は未検出及び未確認を示す。
 注6) 表中の網掛け部分は調査未実施を示す。

表2 酒匂川の捕獲調査と環境DNA調査の結果比較

調査地点	種名	ヒガシヒダサンショウウオ			ハコネサンショウウオ						
		捕獲調査(調査年)	環境DNA		捕獲調査(調査年)	環境DNA					
	水系名	2009	2014	2019	(copies/mL)	2009	2014	2019	(copies/mL)		
地点番号	St.1	白石沢A沢	-	-	-	-	31	21	43	検出	
	St.2	用木沢	-	-	-	-	-	1	20	0.82	
	St.3	東沢A沢	3	5	12	-	-	3	2	0.30	
	St.4	東沢B沢	2	6	2	-	-	-	2	-	
	St.5	東沢C沢	-	-	-	-	-	30	30	23	検出
	St.6	西沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.7	大滝沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.8	玄倉川A沢	-	-	-	-	-	20	23	-	
	St.9	玄倉川B沢	-	-	-	-	-	34	48	-	
	St.10	玄倉川C沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.11	玄倉川D沢	-	-	-	-	-	5	2	-	
	St.12	玄倉川E沢	-	-	-	-	-	17	26	-	
	St.13	玄倉川F沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.14	大瀬沢A沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.15	大瀬沢B沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.16	金山沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.17	水の木沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.18	大又沢A沢	-	-	-	-	-	12	13	2	0.06
	St.19	大又沢B沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.20	大又沢C沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.21	へいソ沢	-	-	-	-	-	-	-	-	
	St.22	香沢	-	-	-	-	-	-	-	1	検出
	St.23	鵜沢	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.24	櫛沢	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	St.25	樗ヶ沢	-	-	-	-	-	-	-	-	検出
	確認地点数	2地点	2地点	2地点	0地点	7地点	9地点	7地点	7地点		

注1) 捕獲調査の数字は個体数
 注2) 環境DNAの分析は地点毎に4反復で行い、4回の平均値を記載。
 注3) 定量下限値は0.05copies/ml(1copy/2μL)。4回のうち1回でもDNAが検出されたものうち、平均値が定量下限値未満の場合は「検出」とした。
 注4) 環境DNAの確認地点数については、「検出」も含めた。
 注5) 表中の「-」は未検出及び未確認を示す。
 注6) 表中の網掛け部分は調査未実施を示す。

水魚類調査手法の手引き」でも言及されており、スナヤツメ類用のプライマーを混合することで当該種の検出率が改善することが示されている¹⁰⁾。

当センターでも、酒匂川における調査の際にはスナヤツメ類用のプライマーを混合して用いており、相模川では検出できなかったスナヤツメ類北方種の環境DNAを検出することができている。

アユについては、両河川において放流も実施されており、商業的にも重要な魚種であることから、今回の試行調査では実施していないがアユ用のプライマーを混合することで検出率向上が期待できる。

3.2.2 環境DNA検出種のリード数比率の比較

環境DNA調査結果を以下の4つのグループに分け、それぞれのグループに属する種が、調査地点においてどのようなリード数比率となるか検討を行った。なお、ここで地点*i*における種*a*のリード数比率*a_i*(%)は、以下の式であらわされる。

$$a_i(\%) = \frac{a_i}{A_i}$$

a_i = 地点*i*における種*a*のリード数

A_i = 地点*i*における総リード数

a) グループ1

当該地点の同時期の捕獲調査において確認された種

b) グループ2

グループ1に該当しない種のうち、過去に当該地点で実施した調査で確認されている種

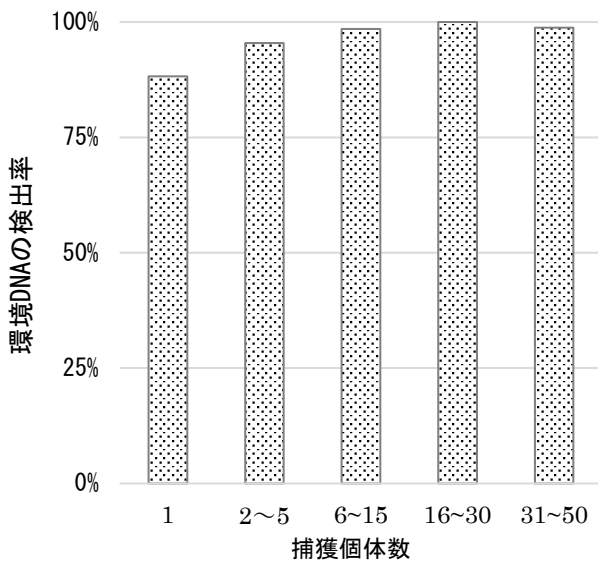


図1 両河川における捕獲個体数と環境DNA検出率

c) グループ3

グループ1, 2に該当しない種のうち、当該地点の環境と生息環境が異なるため、コンタミネーションと考えられる種

d) グループ4

グループ1から3までに該当しない種

グループ毎のリード数比率を箱ヒゲ図にまとめたのが図2である。グループ1はリード数比率が高くなる傾向があり、Tukey-Kramer法による検定の結果でもグループ1のリード数比率の平均はグループ2, グループ3及びグループ4よりも有意 ($p < 0.01$) に高かった。

種網羅解析においては、グループ3に属するようなコンタミネーション由来や排水由来と思われるデータが一定程度入ってきてしまうことがあり、それらを取り除き、グループ1に属するデータを最大化することが調査地点における生物相の評価精度向上につながる。

そういった点からはグループ1のリード数比率が他のグループに比べて有意に高い点を活用し、リード数比率が一定程度低いデータについては一律に有効データとして扱わないという処理手法は、作業が簡単でありつつ、精度の高い調査データを得られるという点で有効な手法であると考えられ、過去の報告でも同様のデータ処理が行われている事例がある¹¹⁾。

一方で、プライマーとの mismatches が認められる種 (アユ等)、緩流部に生息する種 (ナマズ、カムルチー等) はリード数比率が低くなる傾向があるため、一部の

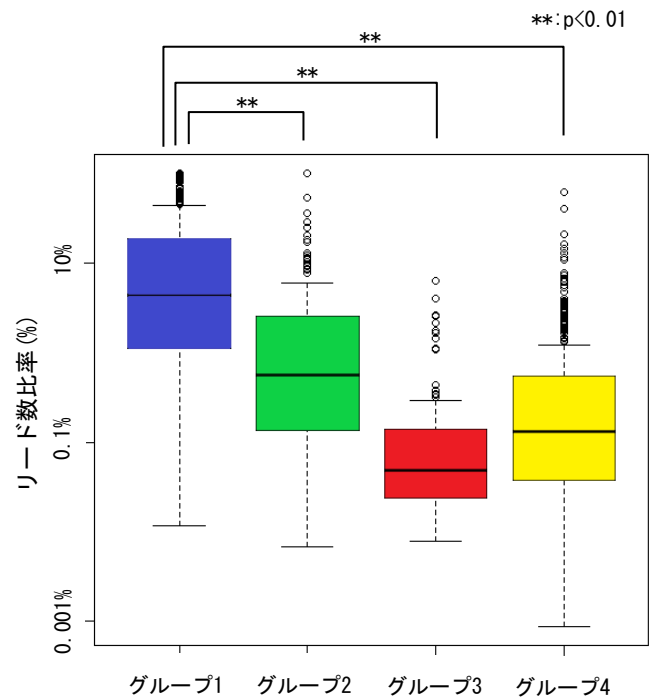


図2 グループ毎のリード数比率の比較

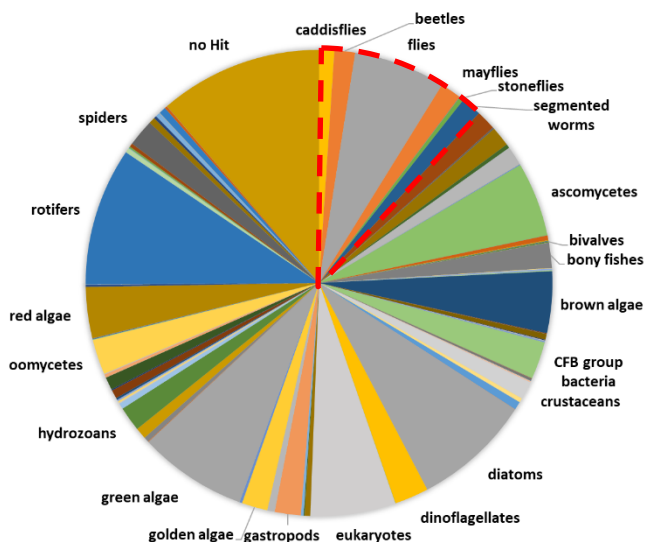


図3 C01後半領域プライマーの分類群別リード数

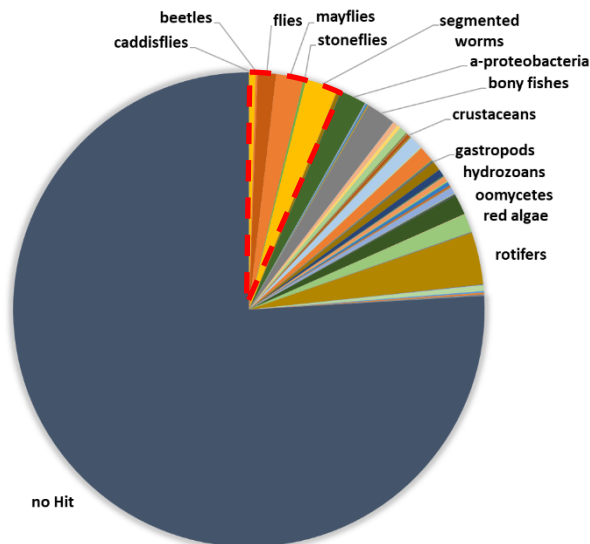


図4 C01前半領域プライマーの分類群別リード数

種については上記の点を考慮して、リード数比率の基準値を設定する必要がある。

3.3 底生動物調査

最後に底生動物に関する試行調査について紹介する。底生動物については魚類と異なり、少なくとも試行調査を実施した時点では国内において標準とされるようなユニバーサルプライマーは開発されておらず、種の同定の際に使用するDNAデータベースについても十分に整備されているとは言えない状況であった。

そこで2019年度は酒匂川10地点で採水したサンプルを用いて、対象とする領域が異なる複数のプライマーの性能試験を実施した。使用したプライマーはそれぞれ①ミトコンドリアDNAC01の658塩基対の後半領域¹²⁾、②前半領域¹³⁾、③ミトコンドリアDNAの16SrRNA領域¹⁴⁾及び④核DNA

の18SrRNA領域¹⁵⁾を対象としたものとした。

それぞれのプライマーの分析結果を分類群別のリード数割合で整理した結果を次に示す。

①C01後半領域のプライマーの結果は図3のとおり、非常に多くの種の環境DNAを増幅し、珪藻類や緑藻類の配列等の割合が多く、赤い点線で囲った底生動物の配列は全体の約1割強であった。

C01前半領域のプライマーの結果は図4のとおり、データベースにヒットしない配列が全体の4分の3を占め、底生動物の配列は全体の1割に満たなかった。

16SrRNA領域のプライマーの結果は図5のとおり、カゲロウ目の配列が全体の9割近くになるなど、底生動物の配列割合は高かったものの、総じて増幅が悪く、解析の過程で多くの配列が除去され、他のプライマーに比べ得ら

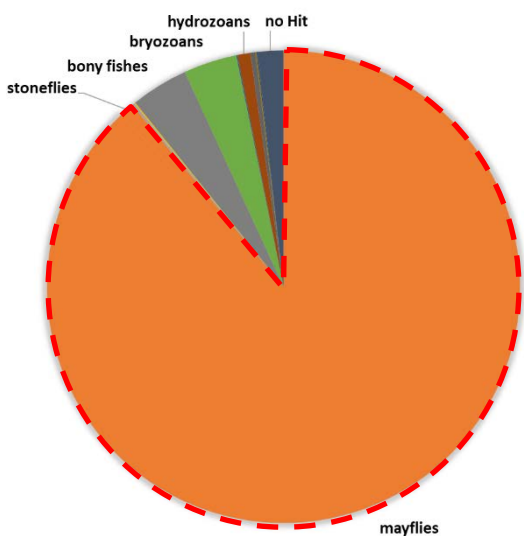


図5 16SrRNA領域プライマーの分類群別リード数

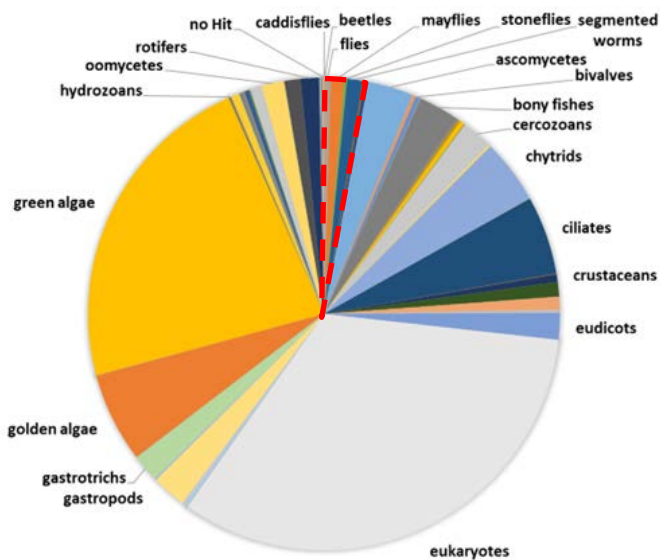


図6 18SrRNA領域プライマーの分類群別リード数

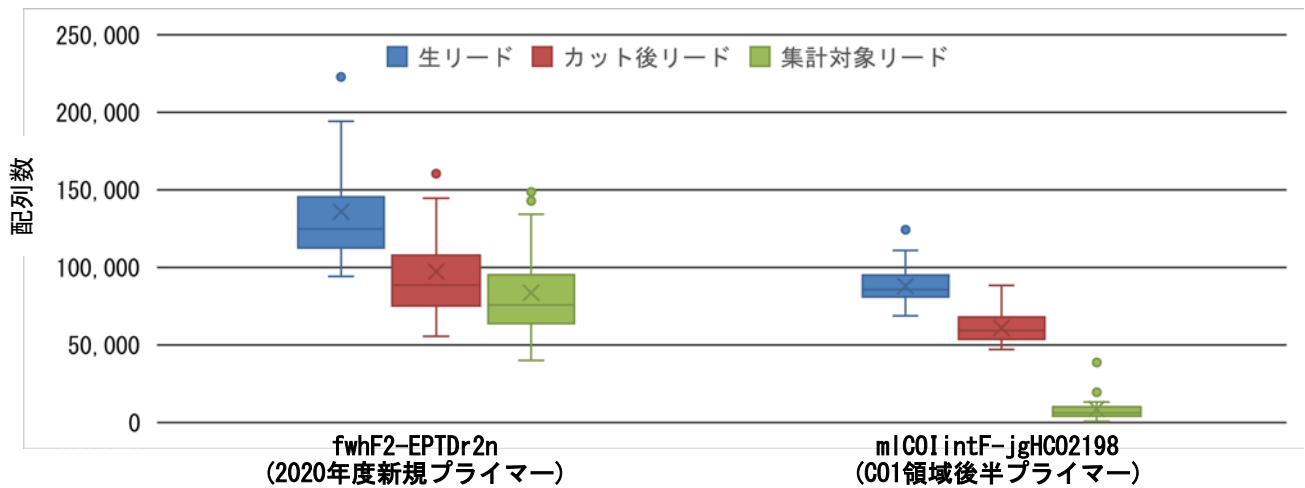


図7 2019年度試行プライマーと2020年度試行プライマーの配列数比較

れた配列が5%にも満たない結果となった。

18SrDNA領域のプライマーの結果は図6のとおり、様々な分類群の環境DNAが検出され、底生動物の配列が非常に少なく、全体の配列の5%に満たない結果となった。

サンプルには様々な生物から放出された環境DNAあるいは微生物などの場合は生物自身が含まれており、特異性の低いプライマーを用いると対象とする生物種以外の環境DNAにより分析結果が水増しされてしまうことが報告されている¹⁶⁾。

この問題を解決するためには底生動物に特異的なプライマーを用いることが必要となる。そのため2019年度の結果を受け、2020年度の試行調査では酒匂川20地点で採水したサンプルを用いて、真菌、藻類及びバクテリア等の非標的分類群のDNA増幅を抑えるプライマー¹⁷⁾ (以下「2020年度新規プライマー」)を用いて、検証を行った。

その結果を図7に示す。ここで、「生リード」とは次世代シーケンサーから出力された配列数、「カット後リード」は精度の低い配列などを除去した後の配列数及び「集計対象リード」は底生動物に分類される種の配列数数を

示している。左側のグラフが2020年度新規プライマーの結果で、右側のグラフが2019年度に試したプライマーのうち、最も底生動物の配列割合が多かった①C01領域後半のプライマーの結果である。

2020年度新規プライマーは底生動物の配列数の割合が非常に多くなっており、非対象分類群のDNAの増幅を抑えていることが確認できた。

次に同時に実施した捕獲調査結果と比較した結果を図8に示す。ここでは底生動物の中で、多くの割合を占める水生昆虫類のうち代表的な分類群であるカゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目、トンボ目及びハエ目の結果を示している。最も検出率が良かったのはハエ目であり、特にユスリカ科の仲間が非常に多く検出された。一方で、その他の4つの分類群では捕獲調査で確認された種の環境DNA調査での検出率が悪く、より検出率の高いプライマーを探索することが、この試行調査終了時点での課題となった。

4. 底生動物調査手法の標準化を目指して

上記の試行調査を経て、課題の残った底生動物については、2022年度現在においても手法開発に取り組んでいる。その目標は誰が調査しても精度の高い結果を得られるような標準化された手法の開発である。

底生動物には水生昆虫類、貝類及び甲殻類等様々な生物群が含まれるが、その多くを占めるのは昆虫類に属する種であることから、現在のところ水生昆虫類を対象にして標準化を進めている。

標準化のためには大きく2つの取組が重要と考えている。一つ目が調査・分析工程の標準化、二つ目がDNAデータベースの充実である。

調査・分析工程の標準化については、現場での採水方法、採水量及び複製の数、ろ過・抽出工程におけるフィルターの選択、磁気ビーズ式又はカラム式の選択及び抽

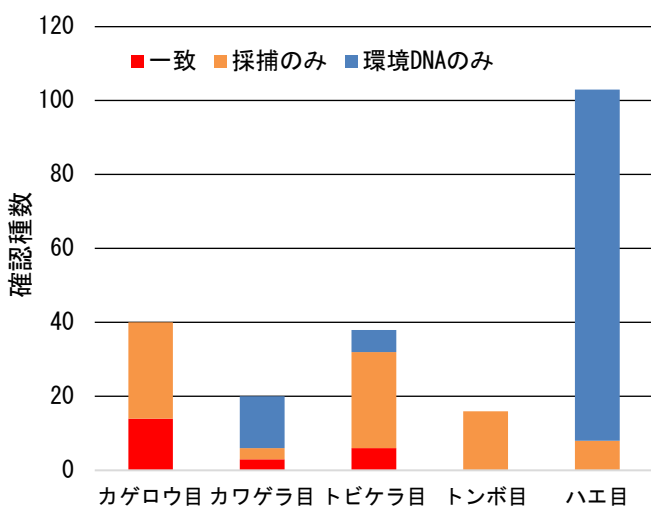


図8 分類群別の捕獲調査結果との比較

出時のバッファの量、分析工程における1stPCRの複製数、サイクル数及びプライマーの選択等、検討すべき事項は多岐にわたっている。試行調査の結果からはプライマーとしては16SrRNA領域に設計された昆虫用のユニバーサルプライマーであるMtInsects-16S¹⁸⁾を中心にいくつかのプライマーを組み合わせたことが適切と考えている。また、検討を進める中でMiFishプライマーのように2段階PCRのプロトコルでは増幅バイアスの影響を強く受けること等、新たな問題も明らかとなってきている。

DNAデータベースは、次世代シーケンサーで得られた配列と照合することにより種の同定を行うために必ず必要となるものである。現在のところMtInsects-16Sが対象としている領域についてはDDBJ等のDNAデータベースへの登録種数が少なく、手法標準化のためにはDNAデータベース整備についても同時に進めなければならない。そこで山梨大学と協力し、CO1領域658塩基対の後半部分とMtInsects-16Sの対象領域についてDNAデータベースの整備を進めている。

DNAデータベースの基となる生体サンプルの収集については2022年度より開始したII型実施共同研究「複数プライマーを用いた環境DNA底生動物調査手法の開発」により全国の地方環境研究所に協力いただいている。ハエ目等のように非常に数が多く、同定についても専門性が必要な分類群については、上記の研究だけでは十分な種数を確保できないと想定されるため、多くの分類の専門家からの協力を得られるかが鍵になるのではないかと考えている。

最後に、手法の標準化については既にある程度確立されてきており、今後は標準化された手法により得られたデータをいかに活用するかが重要となってくる。底生動物については古くから水環境を評価する指標生物として用いられてきており¹⁹⁾、環境DNA調査についても調査データを積み重ねることで環境指標として活用できるものと期待される。

更に近年では生物多様性保護の重要性が高まってきており、水環境における生物多様性の評価においても昆虫相の把握は重要な要素となりうるものと考えられる。

環境DNA調査は2008年にウシガエルの環境DNAを検出して以来様々な技術開発が進み、現時点においても様々な生物群を簡単に調査することが可能となってきている。今後も更なる技術開発が進み、世界的な課題である生物多様性の保全に資する技術となることを期待して、本稿を締めたいと思う。

5. 引用文献

- 1) 神奈川県：相模川の藻類植生と水質汚濁，1971
- 2) 神奈川県：藻類植生・底生動物と水質汚濁（第7報），

- 1978
- 3) 神奈川県：神奈川県内の魚類，
<https://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/kankyougakank/suiseisiryu.html>（2022.11.11アクセス）
- 4) 神奈川県：神奈川県内河川の底生動物，2005
- 5) 長谷部勇太，白子智康：サンショウウオ類の分布調査における捕獲調査と環境DNA調査の比較. 全国環境研究会誌，**44**，62-68，2019
- 6) 長谷部勇太，白子智康：サンショウウオ類分布調査における環境DNA活用のための基礎的検討. 全国環境研究会誌，**45**，38-44，2020
- 7) 中山駿一，長谷部勇太：環境DNAを用いた丹沢山地におけるサンショウウオの分布調査手法の開発. 神奈川県環境科学センター研究報告 No. 45，2022（現在投稿中）
- 8) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen J. Y., 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 more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci*, **2** : 150088, 2015
- 9) 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, Uchii K : An illustrated manual for environmental DNA research : water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, **3**, 8-13, 2021
- 10) 環境省自然環境局生物多様性センター，
https://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html
（2022.11.11アクセス）
- 11) Ahn H, Kume M, Terashima Y, Feng Y, Kameyama S, Miya M, Yamashita Y, Kasai A : Evaluation of fish biodiversity in estuaries using environmental DNA metabarcoding. *PLoS ONE*, **15**, e0231127, 2020
- 12) Leray M, Yang J. Y., Meyer C. P., Mills S. C., Agudelo N, Ranwez V, Joel T. B, Machida J. R : A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity : application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zool*, **10**, 34, 2013
- 13) Vamos E, Elbrecht V, Leese F : Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, **1**, e14625, 2017
- 14) Kambhampati S, Smith P. T : PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene

- fragments. *Insect Mol. Biol*, **4**, 233–236, 1995
- 15) Fonseca V. G, Carvalho G. R, Sung W, Johnson H. F, Power D. M, Neill S. P, Packer M, Blaxter L. M, Lamshead P. J. D, Thomas K. W, Creer S : Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity. *Nat Commun*, **1**, 98, 2010
- 16) Hajibabaei M, Porter T. M, Robinson C. V, Baird D. J, Shokralla S, Wright M. T. G : Watered-down biodiversity? A comparison of metabarcoding results from DNA extracted from matched water and bulk tissue biomonitoring samples. *PLoS One*, **14**, e0225409, 2019
- 17) Leese F, Sander M, Buchner D, Elbrecht V, Haase P, Zizka V. M. A : Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*, **3**, pp. 261–276, 2021
- 18) Takenaka M, Yano K, Suzuki T, Tojo K : Development of novel PCR primer sets for DNA metabarcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species. *bioRxiv*, 2021
- 19) 津田松苗, 森下郁子 : 生物による水質調査法, 山海堂, 1974