

<報文>

## 水生生物の保全に係る水質環境基準の指標となる魚種の生息状況調査における環境DNA分析の可能性\*

平川周作\*\*・中島 淳\*\*・松木昌也\*\*・古賀敬興\*\*・秦 弘一郎\*\*・柏原 学\*\*・古閑豊和\*\*・石間妙子\*\*  
・金子洋平\*\*・宮脇 崇\*\*\*・志水信弘\*\*・松本源生\*\*・石橋融子\*\*

キーワード ①環境DNA分析 ②環境基準 ③類型指定 ④指標魚種

### 要 旨

水生生物の保全に係る環境基準は水温を因子とした水生生物の適応性に応じて類型が指定される。本研究では、環境DNA分析を用いた魚類相調査により、類型指定の指標となる魚種をどの程度把握できるのか調査するため、筑後川水系7河川で実施した採捕調査と環境DNA分析による検出状況を比較した。その結果、冷水性及び温水性の指標魚種は、採捕調査で確認された全ての河川において環境DNA分析でも検出され、類型指定の生息状況調査における重要地点のスクリーニングに環境DNA分析を活用できる可能性が示唆された。

### 1. はじめに

公共用水域の水質については、人の健康を保護し、生活環境を保全するうえで維持されることが望ましい基準として、環境基本法に基づき水質汚濁に係る環境基準が定められている<sup>1)</sup>。このうち生活環境の保全に関する環境基準は、水域ごとに基準値が設定され、その類型は政府又は都道府県知事が指定することとなっている。この生活環境の保全に関する環境基準について、水生生物及びその生息又は生育環境を保全する観点から、平成15年11月に全亜鉛について水生生物の保全に係る水質環境基準（水生生物保全環境基準）が設けられ、平成24年8月にノニルフェノール、平成25年3月に直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（LAS）が追加された。水生生物保全環境基準は生息する生物の適応性によって類型が分類される。福岡県では、平成26年から県内河川において採捕による生物の生息状況調査を実施し、類型指定を行ってきた<sup>2)</sup>。採捕調査は、現場で生物を捕獲して同定することから生息状況調査として確実性が高いものの、採捕した生物の同定に係る専門知識が必要であるため常に専門家が同行しなければならず、また、採捕には複数の人員が必要とされるため、一度に調査可能な地点数が限られるといった課題がある。

近年、環境中に放出された生物に由来するDNA（環境DNA）を用いた解析技術の発展により、1L程度の採水とその水を分析することでそこに生息している生物の調査ができるようになってきた<sup>3-5)</sup>。この分野の進展は極めて速く、学術的な研究のみならず行政的な施策においても国土交通省が実施する河川水辺の国勢調査への利用の検討<sup>6-8)</sup>や環境省において希少種や外来種の検出に向けた手引きが作成されるなど<sup>9)</sup>、その利用用途が広がり始めている。環境DNA分析の特徴として、現場作業が採水のみであるため、少ない労力で多くの地点を調査することや回数を増やして調査することが可能であること、DNA配列で同定するため生物の形態に関する専門知識が不要なことが挙げられる。我々がこれまでに河川の魚類を対象に実施した環境DNA分析の検討において、環境DNAでは検出が困難な種が存在するものの採捕調査に比べて検出される魚種の数が多いことが確認され<sup>10)</sup>、また、複数年に渡る採捕調査で確認された魚種を一度の環境DNA分析で網羅して検出することができた<sup>11)</sup>。

本研究では環境DNA分析と採捕調査の結果に基づいて、水生生物保全環境基準の類型指定における環境DNA分析の有用性について検討を行ったのでここに報告する。

\*Feasibility of environmental DNA analysis in habitat surveys of fish species as indicators of the environmental quality standards for the preservation of aquatic life

\*\*Shusaku HIRAKAWA, Jun NAKAJIMA, Masaya MATSUKI, Takaoki KOGA, Koichiro HATA, Manabu KASHIWABARA, Toyokazu KOGA, Taeko ISHIMA, Yohei KANEKO, Nobuhiro SHIMIZU, Gensei MATSUMOTO, Yuko ISHIBASHI (福岡県保健環境研究所) Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

\*\*\*Takashi MIYAWAKI (北九州市立大学) The University of Kitakyushu

## 2. 調査方法

### 2.1 調査地点と調査時期

本研究では、福岡県内の筑後川水系桂川(50300555)、筑後川水系山ノ井川(49306468)、筑後川水系花宗川(49306445)、筑後川水系隈上川(49307617)、筑後川水系高良川(49307446)、筑後川水系小石原川(50301543)、筑後川水系金丸川(49307461)を調査地点とした(地点名の後のカッコ内は3次メッシュコード)。

これらの地点において、夏季(平成30年6月から7月)と冬季(平成30年12月から平成31年1月)に環境DNA調査、採捕調査及び水質分析を実施した。なお、金丸川については、冬季の調査のみ実施した。

### 2.2 環境DNA分析

各調査地点において、瀬及び淵の水をそれぞれ1L採水し、冷蔵保存して実験室に持ち帰り、48時間以内にDNAを抽出し、環境DNA解析に用いた。また、冬季の調査では、DNAの分解をより抑制するため、採水時に試料1Lに対して10w/v%ベンザルコニウム塩化物液(日本製薬株式会社)を1mL添加する工程を追加した<sup>12)</sup>。0.22µm Sterivex(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)で試料をろ過、Miya et al.(2016)の方法<sup>13)</sup>に準拠してSterivexに細胞溶解液を添加後、50°Cで60分間溶解処理し、溶解液を回収した。溶解液に10%ポリビニルピロリドン溶液を最終濃度2.8%になるように添加してPCR阻害物質を除去し、MPure Bacterial DNA Extraction Kit(MP Biomedicals, Santa Ana, CA)を用いてDNAを精製した。また、AMPure XP(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)により再精製した。

抽出・精製した環境DNA溶液を用いて、魚類の12S rRNAを標的領域とする環境DNAメタバーコーディング法による網羅的な魚類検出を実施した。DNAライブラリーは、2回のPCR反応により作製し、PCR酵素は、TaKaRa Ex Taq(タカラバイオ株式会社)を用いた。なお、1st PCRは、Miya et al.(2015)が開発した魚類のユニバーサルプライマーMiFish UとMiFish Eを混合したプライマーセット<sup>14)</sup>を用いて4連で実施した後、アンプリコンを混合したものを2nd PCRに適用した。作製したライブラリーは、MiSeq system(Illumina, San Diego, CA)を用いて、2×300 bpの条件でシーケンシング解析を行った。なお、取得したDNA配列データは、DDBJ Sequence Read Archiveデータベース(<https://www.ddbj.nig.ac.jp/dra/index.html>)に登録した(桂川・山ノ井川・花宗川: DRA010376, 隈上川・高良川・小石原川・金丸川: DRA013303)。

次に、取得したDNAリード配列について、MiFish Pipelineを用いて魚種の同定を行った<sup>15)</sup>。本研究では調査地点近辺における近年の魚類相調査データを参考に種名を整理し、MiFish Pipelineの結果について表1のよう

に読み替えを行った。また、国際塩基配列データベースにモツゴ *Pseudorasbora parva* の学名で登録されているものの一部に、誤ってコイ *Cyprinus carpio* の塩基配列が含まれていることが分かっており、DNA配列の一致率で識別した場合に誤同定する可能性が指摘されている<sup>9)</sup>。本研究では、MiFish Pipelineでモツゴとされた代表配列について、NCBIのBLAST検索機能を用いて国際塩基配列データベースのDNA配列と相同性を確認し、モツゴとコイの識別を整理した。なお、MiFish Pipelineの解析結果ではフナ属及びヨシノボリ属が複数種示されたが、本研究で使用した12S rRNA領域では各属における種の識別が困難であることから、フナ属とヨシノボリ属としてまとめて表記した。

### 2.3 採捕調査

採捕調査は、サデ網(口径70cm, 目合5mm)、タモ網(口径40cm, 目合2mm)、電気式漁具LB-20B Electrofisher(Smith-Root, Vancouver, WA)を用いて行った。調査区間は、50~100mの約2蛇行区間を任意に設定し、調査人員は4名(漁具背負い1名, 網捕獲3名)で実施した。本採捕調査は、福岡県の特別採捕許可を取得して実施し、中坊<sup>16)</sup>及び細谷<sup>17)</sup>を基本に種を同定した。

### 2.4 類型の指標魚種

環境基準の水域類型の指標となる魚介類のうち<sup>18)</sup>、本研究の採捕調査で確認された指標魚種(冷水性魚類: ヤマメ(サクラマス) *Oncorhynchus masou masou*, カジカ *Cottus pollux*, 温水性魚類: ウグイ *Pseudaspius hakonensis*, オイカワ *Zacco platypus*, コイ, ナマズ *Silurus asotus*, フナ類 *Carassius* sp., 回遊性ヨシノボリ類 *Rhinogobius* sp.)を対象とした。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 環境DNA分析による瀬と淵の調査結果

筑後川水系7河川の夏季と冬季に実施した環境DNA分析において、同一河川の瀬と淵で採水した試料から検出された魚類の種数を表2に示す。計13回の調査において、瀬と淵の検出魚種が完全に一致することはなく、検出された種類や種数に共通した特徴や傾向は認められなかった。瀬又は淵のみで採水した場合は、環境DNA分析で検出される魚種を取りこぼす可能性がある。一方、これまでに我々が実施した別の調査では、採水時に瀬と淵を混合した試料を用いて環境DNA分析を行った結果、平成26年から令和2年までに計7回実施した採捕調査で確認された全ての魚種を検出することができている<sup>11)</sup>。環境DNA分析の特徴の一つとして、現場作業は1L程度の採水のみという点が挙げられるものの、瀬と淵を考慮して1地点あたりの

表1 BLAST検索及び調査地点の生息情報に基づくMiFish Pipeline出力結果の読み替え

MiFish Pipeline 出力結果		読み替え結果	
学名	和名	学名	和名
<i>Carassius gibelio</i>	フナ	→ <i>Carassius</i> sp.	フナ属
<i>Carassius</i> sp.	アカブナと同じ属名の種	→ <i>Carassius</i> sp.	フナ属
<i>Carassius auratus</i>	アカブナ	→ <i>Carassius</i> sp.	フナ属
<i>Cyprinus megalophthalmus</i>	コイと同じ属名の種	→ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ
<i>Pseudorasbora parva</i>	モンゴ*	→ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ
<i>Acheilognathus intermedia</i>	オオタナゴと同じ属名の種	→ <i>Tanakia lanceolata</i>	ヤリタナゴ
<i>Rhodeus ocellatus</i>	タイリクバラタナゴ	→ <i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>	ニッポンバラタナゴ
<i>Acheilognathus tabira</i>	アカヒレタビラ	→ <i>Acheilognathus tabira nakamurae</i>	セボシタビラ
<i>Tribolodon sachalinensis</i>	エゾウグイ	→ <i>Pseudaspius hakonensis</i>	ウグイ
<i>Phoxinus oxycephalus</i>	スジハゼ	→ <i>Rhynchocypris oxycephala</i>	タカハヤ
<i>Hemibarbus labeo</i>	コウライニゴイ	→ <i>Hemibarbus barbuis</i>	ニゴイ
<i>Squalidus</i> sp.	スゴモロコと同じ属名の種	→ <i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>	コウライモロコ
<i>Squalidus japonicus</i>	デメモロコ	→ <i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>	コウライモロコ
<i>Pseudobagrus medianalis</i>	アリアケギバチと同じ属名の種	→ <i>Tachysurus aurantiacus</i>	アリアケギバチ
<i>Silurus soldatovi</i>	ナマズと同じ属名の種	→ <i>Silurus asotus</i>	ナマズ
<i>Oryzias latipes</i>	メダカ	→ <i>Oryzias latipes</i>	ミナミメダカ
<i>Rhinogobius</i> sp.	アヤヨシノボリと同じ属名の種	→ <i>Rhinogobius</i> sp.	ヨシノボリ属
<i>Rhinogobius burunneus</i>	アヤヨシノボリ	→ <i>Rhinogobius</i> sp.	ヨシノボリ属
<i>Rhinogobius</i> sp.	カワヨシノボリ	→ <i>Rhinogobius</i> sp.	ヨシノボリ属
<i>Tridentiger obscurus</i>	チチブ	→ <i>Tridentiger brevispinis</i>	ヌマチチブ

\* BLAST 検索により, MiFish Pipeline で分類されたモンゴの一部はコイに読み替えた。

採水箇所を増やすなど、採水時にひと工夫することで検出可能な魚種の取りこぼしの低減につながると考えられる。

同じ調査地点の夏季と冬季の検出魚種の数と比較すると桂川（夏季：18種、冬季：29種）と小石原川（夏季：3種、冬季：18種）は他の調査地点に比べて夏季の検出種数が少なかった。その要因として、採水した試料へのPCR阻害物質の混入による影響が考えられた。この両地点は同じ日に調査を実施しており、現地調査時の天候は晴れていたものの河川水は懸濁した状態であり、気象庁の観測データ<sup>19)</sup>によると近傍の朝倉の観測地点で3日前に一日あたり24.0mm、19日前には一日あたり295.5mmの降水量が観測されていた。特に、小石原川の調査地点の上流では河川工事が実施されていたことから、降水による懸濁も起こりやすく、フミン酸などのPCR阻害物質<sup>20, 21)</sup>の混入による影響を受けやすい状態にあったと考えられる。

本研究のように指標魚種の生息状況の確認や魚類相把握を目的とする調査において、降水後や濁水時など定常状態にない河川水を試料とした場合には、調査地点の状

況を反映していない結果につながる可能性がある。河川の状態をみて調査目的にあった採水の実施を判断するためには、定常時の調査地点がどのような状態であるかを事前に把握しておくことが重要と考えられる。

表2 瀬及び淵で実施した環境DNA分析による魚類の各検出種数と総検出種数

調査地点	夏季			冬季		
	瀬	淵	総数	瀬	淵	総数
桂川	8	16	18	24	20	29
山ノ井川	19	19	21	15	14	17
花宗川	20	21	23	15	15	18
隈上川	6	6	7	10	7	10
高良川	8	7	8	12	10	12
小石原川	3	2	3	12	18	18
金丸川	—	—	—	8	7	9

### 3.2 環境 DNA 分析と採捕調査の検出魚種比較

次に、採捕調査で確認された魚種を環境DNA分析でどの程度検出されているか調査した。なお、環境DNA分析については瀬と淵を統合した結果を比較対象とした。筑後川水系7河川の夏季と冬季で実施した採捕調査と環境DNA分析で検出された魚種の一覧を表3に示す。3.1で示した小石原川の夏季調査を除き、その他の調査においては夏季・冬季共に採捕調査よりも環境DNA分析で検出された魚種が多かった。しかし、スナヤツメ *Lethenteron reissneri* とアリアケスジシマドジョウ *Cobitis kaibarai* は採捕

調査でのみ確認された。スナヤツメについては、本研究で使用したユニバーサルプライマーの配列とのミスマッチが報告されており<sup>9)</sup>、環境DNAとして捕集されていたとしてもPCRで増幅ができずに偽陰性となったと考えられる。一方、アリアケスジシマドジョウにおけるユニバーサルプライマーの領域は、プライマー配列と完全に一致しないものの、本研究で検出された他の純淡水魚でも同じ配列であり、プライマーのミスマッチによる影響は低いと考えられた。赤松ら<sup>22)</sup>による環境DNAメタバーコーディングと採捕調査の比較においても、底生魚や底生潜掘

表3 夏季及び冬季に実施した環境DNA分析と採捕調査で検出された魚種一覧

種名	桂川		山ノ井川		花宗川		隈上川		高良川		小石原川		金丸川	
	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕	環境DNA	採捕
スナヤツメ					●	■					●			
ニホンウナギ			○								□			
ゲンゴロウブナ*	○		○	□	○	□			□	□	□		□	
フナ属(ギンブナ)*	○	□	○	□	○	□	●	■	□	○	□	□	□	■
コイ*	○	□	○	□	○	□	●	■		□	□		□	
アブラボテ	○	□			○		●							
ヤリタナゴ	○	□												
ニッポンバラタナゴ		□												
カゼトゲタナゴ		□			○									
セボシタビラ	○	□												
カネヒラ	○													
オイカワ*	○	□	○	□	○	□	●	■	□	○	□	□	□	■
カワムツ		□	○	□	○	□	●	■	○	□	●	■	○	□
ヌマムツ					□									
ハス		□			○									
ウグイ*		□	○	□	○	□	●	■				□		
タカハヤ		□	○	□			○	□	●	■	○	□	●	■
カマツカ		□	○	□	○	□	●	■		□	□	●	■	■
ツチフキ	○	□												■
ゼゼラ		□												■
ニゴイ		□												
イトモロコ	○	□	○	□	○	□	■		□	○	□	○	□	■
コウライモロコ		□												
カワヒガイ	○	□			○									
ムギツク		□	○	□	○	□	●				○	□	●	■
モツゴ	○													
タモロコ	○	□												
ドジョウ*			○		○	□								
アリアケスジシマドジョウ		■												
ヤマトシマドジョウ			○	●	○	●	■					●		
アリアケギバチ			○	□	○	□	●					□	●	
ギギ		□												
アカザ			○											
ナマズ*	○	□	○	□	○	□	■		□			□		
アユ		●	○	□	○	□						●		
ヤマメ(サクラマス)**		□						○	□	■		□		
ミナミメダカ	○	□			○	□	■	○						
カジカ**			○	□	○				○	□	●	□	■	
オヤニラミ			○	□	○	□				□	●	■		
カムルチー	○	□								□	●	■		
ドンコ	○	□	○	□	○	□	●	■	○	□	●	■	□	
ヨシノボリ属(トウヨシノボリ)*	○	□	○	□	○	□	●		○	□	●	■	□	■
ヨシノボリ属(カワヨシノボリ)		●		●		●		●	■		●	■		
スマチチブ		□												

○ 環境DNA調査(夏季)  
 □ 環境DNA調査(冬季)  
 ● 採捕調査(夏季)  
 ■ 採捕調査(冬季)  
 \* 温水性指標魚種  
 \*\* 冷水性指標魚種

魚の確認率は低いことが報告されていることから、ユニバーサルプライマーとのミスマッチ以外に生息環境の違いが検出率に影響する可能性がある。

類型指定の指標魚種に着目すると、冷水性及び温水性の指標魚種は、採捕調査で確認された全ての地点において環境DNA分析でも検出された。また、温水性の指標魚種であるゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* とドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* は採捕確認された地点はなかったが、環境DNA分析でのみ検出された。採捕確認できなくとも環境DNAが捕集でき、解析対象となるDNA領域の配列が他種と区別できる種であれば、環境DNA分析で検出される。また、本研究で確認されたゲンゴロウブナは、本来琵琶湖・淀川水系に分布する固有種であるが、人為移入によって分布が拡大している種である<sup>23)</sup>。環境DNA分析では、このような国内由来の外来種のDNAも検出することが可能であり、その分布調査の用途にも活用できると考えられる。一方、その他のフナ属やヨシノボリ属は、本研究で使用したユニバーサルプライマーで増幅する領域の類似度が属内で高く、種の分類が困難であった。特に、ヨシノボリについては、類型指定の指標魚種を回遊性ヨシノボリ類としており、環境DNA分析では回遊性と非回遊性のヨシノボリを区別することが困難であることから、類型指定の指標としては環境DNA分析の結果の取り扱いに注意が必要である。

冷水性の指標魚種であるヤマメ（サクラマス）やカジカについて、本研究では採捕確認されておらず環境DNA分析でのみ検出され、調査地点の源流や上流では確認されているものの調査地点に実際生息しているか疑わしいものもあった。環境DNAが生物分布を反映する距離は数百mと見積もられているが<sup>24)</sup>、河川において約10km上流に生息する生物のDNAを検出した事例<sup>25)</sup>や我々の研究でも調査地点では確認されず約3.3km上流で生息を確認した事例がある<sup>11)</sup>。このように、河川の環境DNA分析ではDNAの流下による影響を考慮する必要があり、調査地点に実際に生息しているかを判断するには、文献情報を含め、生態学の専門家による環境DNA分析結果の精査が重要と考えられる。

#### 4. まとめ

筑後川水系7河川の採捕調査と環境DNA分析の結果を比較したところ、環境基準の類型指定の指標となる冷水性・温水性の魚種は、採捕確認された全ての地点で環境DNA分析でも検出された。このように、環境DNA分析により類型指定の指標魚種を高感度に検出できることが確認され、類型指定の生息状況調査における重要地点のスクリーニングに環境DNA分析を活用できる可能性が示唆された。

一方、採捕確認されていない地点においても環境DNA

分析では指標魚種が検出されたこと、また、懸濁などのような採水試料の状態によって環境DNA分析による検出力が変わる可能性があることも示された。今後、環境DNA分析における偽陽性や偽陰性の評価と対処方法については検討を進める予定である。

#### 謝辞

本研究は、JSPS科研費JP19K04682の助成を受けたものです。

#### 5. 引用文献

- 1) 環境省：水質汚濁に係る環境基準，<https://www.env.go.jp/kijun/mizu.html>（2021.12.10アクセス）
- 2) 福岡県：水質環境基準類型指定，公共用水域・地下水環境基準値表，<https://www.pref.fukuoka.lg.jp/contents/ruikeisitei.html>（2021.12.10アクセス）
- 3) Miya M., Gotoh R. O., Sado T.: MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science*, **86**, 939-970, 2020
- 4) 高原輝彦，山中裕樹，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～淡水域の研究事例を中心として～. 日本生態学会誌，**66**，583-599，2016
- 5) 山中裕樹，源利文，高原輝彦，内井喜美子，土居秀幸：環境DNA分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌，**66**，601-611，2016
- 6) 中尾遼平，赤松良久，乾隆帝，内藤太輔，都築隆禎：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～. 河川技術論文集，**26**，331-336，2020
- 7) 内藤太輔，赤松良久，都築隆禎，横山良太，畔上雅樹，宮本健也，乾隆帝：環境DNAによる魚類の網羅的解析の河川水辺の国勢調査への導入に関する検討. 河川技術論文集，**26**，337-342，2020
- 8) 北川哲郎，村岡敬子，山田拓也，中村圭吾：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. 河川技術論文集，**26**，319-324，2020
- 9) 環境省：環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第2版，[http://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish\\_tebiki2.pdf](http://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_tebiki2.pdf)（2021.12.10アクセス）
- 10) 平川周作，中島淳，松木昌也，古賀敬興，秦弘一

- 郎, 柏原学, 古閑豊和, 石間妙子, 宮脇崇, 金子洋平, 志水信弘, 松本源生, 石橋融子: 環境DNAメタバーコーディングを用いた河川における魚類調査手法の検討と水質による影響の解析. *環境化学*, **30**, 125-132, 2020
- 11) 平川周作, 中島淳: 河川水を対象とした環境DNA分析による魚類相調査の可能性. *福岡県保健環境研究所年報*, **47**, 62-66, 2020
- 12) Yamanaka H., Minamoto T., Matsuura J., Sakurai S., Tsuji S., Motozawa H., Hongo M., Sogo Y., Kakimi N., Teramura I., Sugita M., Baba M., Kondo A.: A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, **18**, 233-241, 2017
- 13) Miya M., Minamoto T., Yamanaka H., Oka S. I., Sato K., Yamamoto S., Sado T., Doi H.: Use of a Filter Cartridge for Filtration of Water Samples and Extraction of Environmental DNA, *Journal of Visualized Experiments*, **117**, e54741, 2016
- 14) 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. *Royal Society Open Science*, **2**, 150088, 2015
- 15) Sato Y., Miya M., Fukunaga T., Sado T., Iwasaki W.: MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1553-1555, 2018
- 16) 中坊徹次編: 日本産魚類検索 全種の同定 第三版. 東海大学出版会, 秦野, 2013
- 17) 細谷和海編: 増補改訂 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京, 2019
- 18) 環境省: 水生生物の保全に係る環境基準の類型指定について, <https://www.env.go.jp/hourei/05/000142.html> (2021.12.10アクセス)
- 19) 気象庁: 過去の気象データ検索, <https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php> (2021.12.10アクセス)
- 20) 小野孝明, 友成航平, 森名生, 富阪吉登, 西英二: 各種DNA定量キットにおけるPCR阻害耐性の比較. *日本法科学技術学会誌*, **20**, 69-81, 2015
- 21) 板宮裕実, 吉川ひとみ: 植物の法科学的検査に適したPCRキットの比較. *分析化学*, **65**, 757-763, 2016
- 22) 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)*, **74**, I\_415-I\_420, 2018
- 23) 国立研究開発法人国立環境研究所: 侵入生物データベース ゲンゴロウブナ, <https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/detail/50540.html> (2021.12.10アクセス)
- 24) 一般社団法人環境DNA学会: 環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.2, <https://ednasociety.org/#manual> (2022.3.1アクセス)
- 25) Deiner K., Altermatt F.: Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS One*, **9**, e88786, 2014