

# 環境DNA分析の河川の魚類調査への適用に向けた最適な採水地点の検討

## INVESTGATION OF WATER SAMPLING SITES FOR APPLICATION OF ENVIRONMENTAL DNA TO FISH SURVEYS IN RIVERS

篠原隆佑<sup>1</sup>・村岡敬子<sup>2</sup>・菅野一輝<sup>3</sup>・天羽淳<sup>4</sup>・中村圭吾<sup>5</sup>  
Ryusuke SHINOHARA<sup>1</sup>, Keiko MURAOKA<sup>2</sup>, Kazuki KANNO<sup>3</sup>, Jyun AMOU<sup>4</sup>  
and Keigo NAKAMURA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>非会員 修 (生物資源科学) 国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ  
(〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

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

<sup>3</sup>非会員 博 (農) 国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ  
(〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

<sup>4</sup>非会員 国土交通省 水管理・国土保全局 河川環境課 (〒100-8918 東京都千代田区霞が関2-1-3)  
(現: 国土交通省 北海道開発局 帯広開発建設部)

<sup>5</sup>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) (現: 公益財団法人 リバーフロント研究所)

国土交通省では魚類を対象とした河川水辺の国勢調査への環境DNAメタバーコーディング解析 (以下, MB解析) の導入に向けた検討を進めている. 本報では, 3河川12地区 (区間延長0.4~1.6km/地区) を対象に採捕調査に合わせてMB解析を実施し, 最適な地点数および地点配置を検討した. MB解析の採水地点の配置は, ①河川水辺の国勢調査で設定されている瀬・淵等の環境区分 [2~5地点/地区] および②調査地区の最下流端の左岸および右岸沿い各1地点 [2地点/地区] の2パターンを設定した. 調査地区内で採捕された種がMB解析で検出されるのに最適な地点数は, 4地点/地区程度と示された. また, 少ない地点数で採捕確認種を検出するには, 調査地区の下流端両岸の岸際で採水するのが効率的であることが示された. 一方, 氾濫原性魚類や汽水/海水性のハゼ類は検出しにくい傾向がみられた.

**Key Words:** *environmental DNA, metabarcoding, MiFish primer, National Census on River Environments, water sampling method*

### 1. はじめに

環境中に存在する生物のDNAを調べることで特定の分類群の分布情報を得ようとする環境DNA (environmental DNA: 以下, eDNA) メタバーコーディング解析 (以下, MB解析) が急速に広がっている<sup>1)</sup>. 中でも魚類を対象としたMB解析は, DNAのリファレンスデータが豊富なことに加え, Miya et al. (2015)<sup>2)</sup>によるMiFishプライマーの公表によって, 多くの研究が報告されている<sup>3)</sup>. 従来の魚類調査は対象とする魚種に合わせて, 様々な漁具を用いる採捕が主な手法であるが, 調査に専門的技術を要し, 多大な労力がかかることから, コ

スト削減と将来的な調査の継続が課題であった. 一方, MB解析は現地作業が採水のみと, 専門的な技術が不要で, 低労力・短時間での実施が可能のため, これらの課題解決が望まれるほか, 多地点・高頻度の調査への展開も期待される. MB解析は, 現時点では生物量の把握に課題を残しているものの, 対象分類群の分布情報が得られる点で, 水域管理の推進に必要な生物情報を集積できる技術と考えられる. また, 本手法は種の在・不在の情報に加えて, DNAの配列情報が得られることから, 形態分類が困難な種の判別や地域個体群の把握等, 生物調査の質的な向上が期待される.

これらの背景を踏まえ, 国土交通省では河川・ダム管理におけるeDNA調査の活用の可能性を検討することを

目的としたテーマ調査を令和元年度より実施しており<sup>4)</sup>、河川水辺の国勢調査（以下、水国調査）の魚類調査へのMB解析の導入に向けた検討が進められている。水国調査における魚類調査は、河川環境の整備と保全を適切に推進するため、河川の自然環境に関する基礎情報の定期的、継続的、統一的な収集整備を図るための基本調査として位置づけられている<sup>5)</sup>。このため、新手法のMB解析を魚類調査に適用する場合には、従来法の採捕で得られるデータとの継続性を保った調査方法の設定が課題となる。既往の研究において、水国調査の魚類採捕と同時にMB解析が行われた研究<sup>6),7),8),9)</sup>が複数報告されており、採捕結果とMB解析結果の種数に正の相関が得られること<sup>6)</sup>や環境区分スケールより調査地区・河川スケールでの採捕結果との整合がよいこと<sup>7)</sup>が報告されており、知見が集積しつつある。今後、水国調査へのMB解析の導入について議論を進めていくためには、具体的な調査方法の設定が必要だが、採水の地点数や地点配置の検討はまだ不十分である。

以上のことから本報では、複数河川を対象に魚類の水国調査に合わせてMB解析を実施し、採捕と同程度の魚種を検出するために効率的な地点数および採水地点の配置を検討した。

## 2. 材料と方法

### (1) 対象河川・地区の概要と採水地点配置のパターン

調査を実施した河川および調査地区の概要を図-1、表-1に示す。調査対象は、2020年に魚類の水国調査が実施された雲出川（三重県）、神通川（岐阜県・富山県）、矢作川（長野県・愛知県・岐阜県）の水国調査地区のうち、本川の12地区とした。各地区における採水地点配置は、①水国調査で設定されている瀬・淵等の環境区分〔2～5地点/地区〕（以下、①環境区分）および②調査地区の最下流端の左岸および右岸沿い各1地点〔2地点/地区〕（以下、②下流端両岸）の2パターンを設定した（図-2）。

### (2) 採水・ろ過作業

現地での採水作業実施日は、採捕調査実施日の近日とするため2020年秋季（10～11月）の水国調査の採捕実施日の前後1週間以内に設定し、潮汐の影響を受ける感潮域区間（神通A、雲出A、矢作A）の採水のタイミングは順流時に統一した。各地点における採水は表層水を1Lとし、採水試料には終濃度0.01%の塩化ベンザルコニウムを添加後に保冷運搬して分析室に搬入した。搬入した試料は、混合エステル製メンブレンフィルター（ADVANTEC社、孔径：0.45 μm）を用いて全量ろ過し、ろ過残渣物は-80℃以下で冷凍保管した。

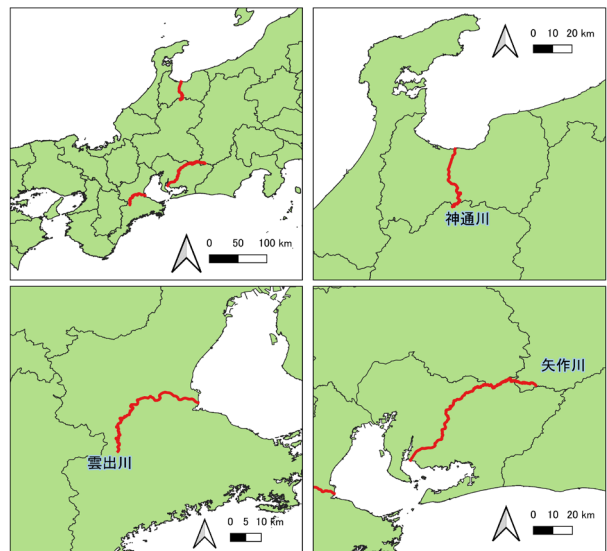


図-1 調査実施河川の位置図

表-1 調査実施地区の概要

河川名	地区名	距離標 (K)	区間延長 (km)	汽水域の有無	採水地点数	
					① 環境区分	② 下流端両岸
雲出川	雲出A	0.5-1.5	1.0	有	3	2
	雲出B	4.8-6.2	1.4	無	4 (2)	2
	雲出C	9.8-11.1	1.3	無	6	2
	雲出D	13.2-14.8	1.6	無	5	2
神通川	神通A	0.9-1.8	0.9	有	5	2
	神通B	7.4-7.9	0.5	無	3	2
	神通C	22.4-22.8	0.4	無	3	2
矢作川	矢作A	2.0-3.0	1.0	有	2	2
	矢作B	9.8-10.5	0.7	無	4 (1)	2
	矢作C	20.4-21.3	0.9	無	4	2
	矢作D	31.4-32.1	0.7	無	3	2
	矢作E	39.8-41.6	0.8	無	5	2

※ ( ) 内の数字は解析不調となった地点数

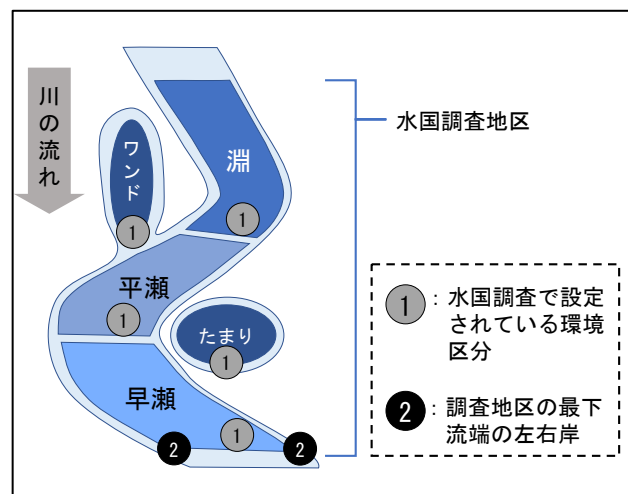


図-2 地区内の採水地点配置イメージ

### (3) メタバーコーディング解析

ろ過残渣物からDNeasy Blood Tissue Kit (QIAGEN社) を用いてDNAを抽出し、One Step PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEACH社) を用いて精製した。精製後のDNAは、MiFish-U/MiFish-U2/MiFish-E/MiFish-Lを4:2:2:1の比率で混合したプライマーセットによる1stPCR法(反復数:8回)で対象領域を増幅し、MiSeq (illumina社) による超並列シーケンシングへ供した。解析によって得られたDNA配列群は、Fastx toolkit (ver. 0.0.14) ならびにQiime 2.0 (ver. 2020.8) のdada2プラグインを用いた代表配列(以下、OTU)の抽出を行った後、データベースMitoFishと照合し、配列の相同性97%以上となるtaxon(分類学上有意な集まりを示す単位、複数形: taxa)を特定した。さらにDNA Data Bank of Japan<sup>10)</sup>の登録配列と照合して該当taxonを精査した上で、水国調査の生物リスト<sup>11)</sup>に従って種名を決定した。なお、データの整理に当たっては、少ないリード数の配列の削除は行わず、DNA配列が多種類に該当する配列は属止めとした。

### (4) 河川水辺の国勢調査: 採捕データの整理

各河川の採捕データは、2020年秋季の水国調査において、カゴ網、サデ網、セル瓶、タモ網、どう、はえ縄、刺網、潜水観察、潜水捕獲、地曳網、定置網、投網で捕獲された種を地区ごとに集計した。なお、重要種保護の観点から、詳細な生物リストの揭示は控える。

### (5) 採捕結果とMB解析の整合率の算出

#### a) 水国設定地区内の地点数と整合率の関係

MB解析で得られた各地点の検出種数、地区内全地点を集計した検出種数、およびランダムに2・4・6地点を抽出して集計した検出種数それぞれに対し、採捕調査と共通して検出された種を共通確認種として整理した。ランダム抽出には、各地点数の全組合せに対しExcel (Microsoft社) のRand関数により乱数を付与し、上位10組を選出した。共通確認種数を採捕確認種数で除した値を整合率と定義し、採捕種数に対してMB解析がどれだけ網羅できているかの指標とした。なお、MB解析で検出された配列のうち複数種が該当した属止めの配列は、採捕確認種を含む場合は共通確認種(多数該当)とし、整合率を算出する際には共通確認種に含めて整理した(表-2)。地点数毎の整合率を最小二乗法による非線形曲線にGraph Pad Prizm ver.9 (Graph Pad software Inc社) を用いてあてはめた。得られた近似曲線の地点あたりの整合率の増加量の傾向を把握するため、各プロット間の接線の傾きを一階微分により算出し、近似曲線の傾きの変化を確認した。

#### b) 採水パターンと整合率の関係

①環境区分および②下流端両岸の2つの採水地点配置ごとに集計した検出種数をもとに採捕調査との整合率を算出し、地点配置パターンの整合率を比較した。

表-2 採捕調査およびMB解析による確認種数の一覧

河川名	地区名	種数			整合率
		採捕のみ 確認種	採捕とMB解析 の共通確認種	MB解析の み検出種	
雲出川	雲出A	5	14(3)	54	0.77
	雲出B	1	16(3)	34	0.95
	雲出C	0	16(7)	24	1.00
	雲出D	1	12(3)	22	0.94
神通川	神通A	1	10(3)	42	0.93
	神通B	1	10(4)	21	0.93
	神通C	1	9(3)	18	0.92
矢作川	矢作A	5	14(2)	36	0.76
	矢作B	6	13(1)	29	0.70
	矢作C	3	11(1)	28	0.80
	矢作D	3	18(2)	20	0.87
	矢作E	2	21(0)	16	0.91

※ ( ) は共通確認種(多種該当)の種数

## 3. 結果・考察

### (1) 魚類の確認状況

#### a) MB解析による検出状況

解析対象とした71検体のうち68検体から正常濃度のDNA抽出物ならびに解析用Libraryが得られ、魚類の配列情報として3,275-27,720リードが読み取られた(最小-最大)。読み取られた配列からは1,227 OTUが抽出され、168 taxaに特定した。なお、DNA配列の増幅が確認できない解析不調となった試料は雲出川で2検体、矢作川で1検体の計3検体で、いずれもワンド・たまり環境で採水した検体であった。

#### b) 採捕による魚類確認状況とMB解析との共通確認種

各河川の地区別の採捕調査で確認された魚類の種数、MB解析で検出された種数および整合率を表-2に示す。各河川において採捕調査で確認された種数は、雲出川では16~23種/地区、神通川では13~15種/地区、矢作川では15~23種/地区であり、神通川がやや少なかった。このうち、採捕調査とMB解析の双方で確認された共通確認種数は、雲出川で15~23種/地区、神通川で12~14種/地区、矢作川で12~21種/地区であり、雲出川の雲出Cを除き、採捕調査でのみ確認される種が1~6種存在した。MB解析でのみ検出された種は、河川外由来の種を除くと、雲出川では22~54種/地区、神通川では18~42種/地区、矢作川では16~36種/地区であり、下流側の地区ほど多い傾向がみられた。

### (2) 採水地点数と整合率の関係

地区内における各地点のMB解析結果をランダムに組み合わせた場合の整合率と地点数の関係を図-3に示す。3河川いずれの地区においても、組み合わせた地点数が増えるにしたがって整合率が上昇し、地区内の全地点を

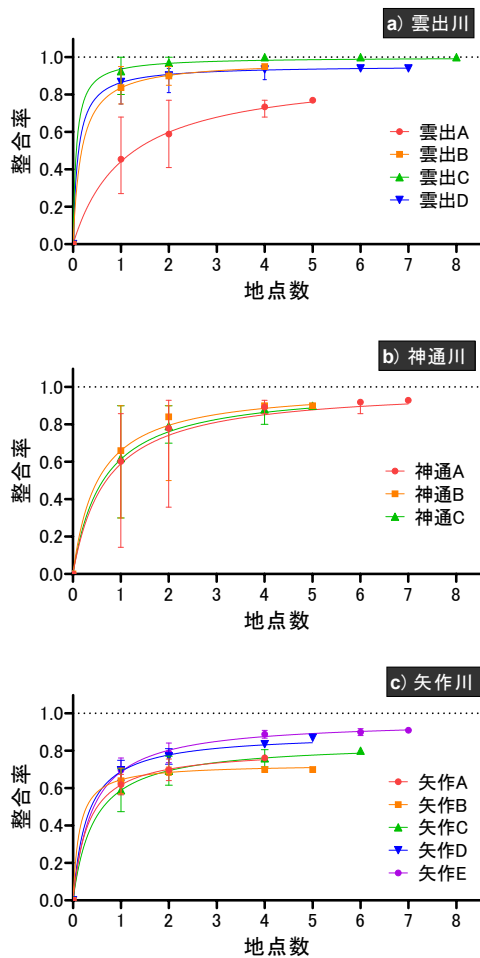


図-3 地点数と整合率（各点は平均値，エラーバーは範囲）

集計した整合率は、雲出川が0.77～1.0，神通川が0.92～0.93，矢作川が0.70～0.91であった。整合率0.9を目標値とした場合に必要な地点数は、雲出川の雲出B～Dでは1～2地点，神通川の全地区では4～5地点，矢作川の矢作Eでは7地点であったが、雲出川の雲出Aと矢作川の矢作A～Dは今回調査の地点配置では0.9に達しなかった。近似曲線の各プロット間における接線の傾きの変化をみると（図-4），地点数が増加するにしたがって接線の傾きは漸減し，4地点以上はほぼ横ばいで推移した。地点数に対する整合率の伸び率を指標として採水の効率を考えた場合，1地区あたり4地点程度が望ましいと考えられる。整合率が0.9に達しなかった雲出Aおよび矢作Aは汽水域に位置するが，採水は潮汐の条件を考慮せず淡水の影響が大きい順流時に設定した。汽水/海水魚が生息する両地区のMB解析結果は，高塩分となる満潮時と低塩分となる干潮時に検出種が異なると予想され，採水のタイミングと整合率関係の把握が今後の課題である。また，河川下流域の感潮域においてMB解析を行った事例<sup>12)</sup>では，同じ地点であってもサンプル間の検出種数の差が大きいことや流速が小さいことによるeDNA含有物の沈降が指摘されている。以上のように汽水域および感潮域におい

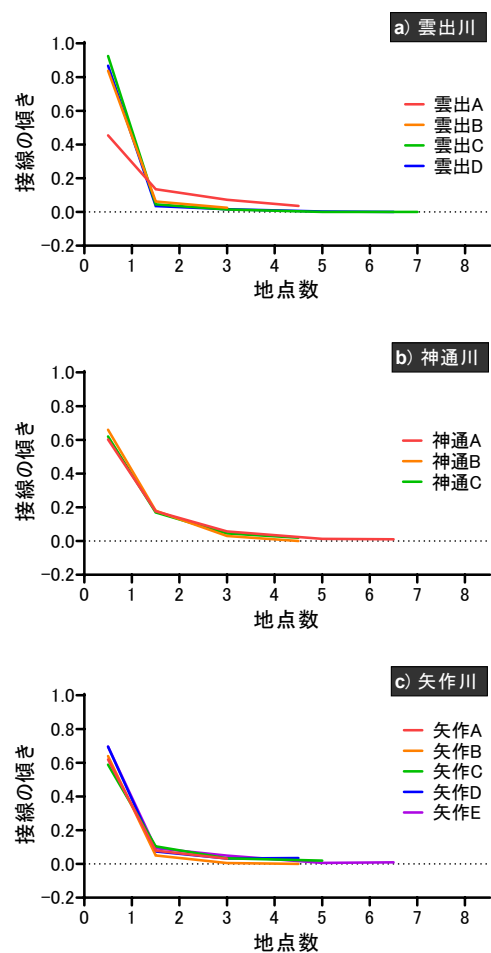


図-4 近似曲線の接線の傾きの変化

ては，潮の干満と採水のタイミング，採水回数や採水量，さらには採水水深など，引き続き幅広い検討が必要と考えられる。

### (3) 採水パターンによる整合率の比較

①環境区分と②下流端両岸の2パターンを地区別に集計し算出した整合率を図-5に示す。雲出川における各地区の整合率は①が0.50～1.00，②は0.77～1.00，神通川が①が0.79～0.93，②は0.79～0.86，矢作川が①が0.65～0.91，②は0.65～0.78であり，いずれの河川も採水パターン間に明瞭な差はなかった。そこで，①環境区分を2検体ずつ組み合わせて集計した場合の整合率を算出し，②下流端両岸の整合率と比較した（図-6）。①と②で整合率の平均値に明瞭な差は見られなかったが，整合率の範囲は，いずれの河川においても②下流端両岸が小さかった。②下流端両岸は，水国調査地区の確認種を少ない地点数で安定して検出できる地点配置であると考えられる。なお，辻ら（2021）<sup>9)</sup>によると，本研究対象河川と同じ神通川の水国調査地区において，地区下流端の左岸・右岸・流心で採水した場合，地区内の魚類相を網羅的に検出できることを報告している。本研究と違い地区

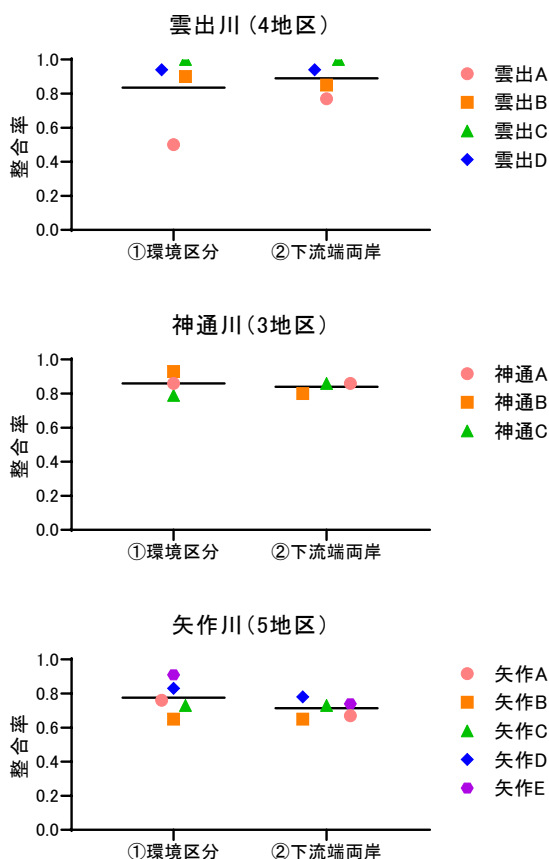


図-5 採水パターン別の整合率（プロットは地区の採水パターン毎に集計し算出した整合率、バーは平均値）

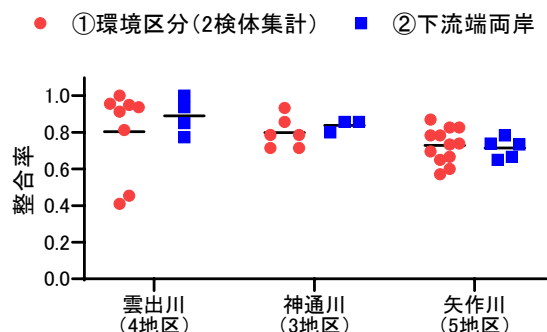


図-6 採水パターン別の整合率（プロットは各採水パターンから2検体ずつ集計し算出した整合率、バーは平均値）

下流側の流心でも採水を実施しているため、単純比較は難しいが、水国調査地区の下流側での採水で整合率が高い点において、類似の傾向が確認できた。②下流端両岸で効率的に検出できる要因として、eDNAの流下距離と横断方向へのeDNAの不均一性が挙げられる。既往の研究により、河川外由来のDNAは数km程度流下すること<sup>13)</sup>、横断方向への拡散は限定的であること<sup>14)</sup>が報告されている。水国調査の地区の範囲はおおむね1kmで設定されていることを踏まえると、②下流端両岸は地区全体の魚類相を概ね反映でき、かつ横断方向の不均一性に対応した配置であることが効率的に検出できた要因と推察される。

表-3 調査地区の下流端両岸で検出できなかった種

生活型	雲出川	神通川	矢作川
汽水/海水魚	クロサギ		シマイサキ
	マサゴハゼ	ヒナハゼ	ミミズハゼ
	ヒナハゼ		トビハゼ
	チクゼンハゼ		アベハゼ
	クボハゼ		ヒナハゼ
回遊魚		カジカ中卵型	テングヨウジ
			カワアナゴ
			スマチチブ
			スミウキゴリ
			シマヨシノボリ
		ウツセミカジカ（降海回遊型）	
純淡水魚	ゲンゴロウブナ	スナヤツメ南方種	ゲンゴロウブナ
	ハス	モツゴ	トウカイコガタスジシマドジョウ
	カダヤシ	ギンブナ	カダヤシ
		ニシシマドジョウ	ミナミメダカ
			カムルチー
			ゼゼラ
			スゴモロコ類
			ドジョウ
			ブルーギル
			ドンコ

※ ■ の網掛けは氾濫原性魚種

#### (4) 下流端両岸で検出しにくい種の特徴

地区内で採捕されたが②下流端両岸で検出できなかった種数は、雲出川で8種、神通川で6種、矢作川で21種であった（表-3）。これらの種を生活型別に整理した場合、純淡水種および汽水/海水性種が多かった。また、純淡水魚で検出できなかった種の半数はドジョウ類やフナ類といった止水環境のワンド・たまり等を生息場とする氾濫原性種<sup>15),16),17)</sup>、汽水/海水性種で検出できなかった種の多くは底生魚のハゼ類であった。北川ら（2020）<sup>6)</sup>による21河川でのMB解析事例でも、止水-半止水性の小型魚類および汽水性のハゼ類の検出率が低いことが報告されており、本結果と一致した。氾濫原性魚種が生息するのは主に、ワンド・たまり等の本川との接続が小さい環境であり、②下流端両岸で採水した場合は、ワンド等に生息する種のDNAがとらえにくいと考えられる。このことから、淡水域での採水については、②下流端両岸を基本にワンド・たまり等の止水環境で採水を行うことで採捕との整合率が高くなると推察される。ただし、本研究では、ワンド・たまり環境での採水物においてDNAの増幅が確認できなかった。詳細は不明であるが、おそらくPCR反応の阻害による影響を受けたと推測される。植物の分解過程に形成されるフミン物質<sup>18)</sup>やフルボ酸、タンニン酸などは環境中に存在するよく知られたのPCRの阻害物質とされており<sup>1)</sup>、阻害物質への対策も今後の課題である。

一方、汽水/海水魚のハゼ類が検出しにくかった要因として、前述した潮汐のタイミング以外に、底生生活型の魚類であることが挙げられる。内藤ら（2020）<sup>7)</sup>は淵環境の表層と下層で採水した場合、下層では底生魚の検出率が高いことを報告しており、上下層水の混合が期待されない水域では下層の採水を追加することで整合率をあげることができると推測される。

#### 4. まとめ

魚類を対象とした水国調査へのMB解析の導入に向けて、複数河川を対象にMB解析に必要な地点数および採水地点配置を検討した。その結果、採捕で確認される魚種を効率的に検出できる地点数は4地点程度であり、特に水国調査地区の下流端の両岸で採水すると効率的に魚類相を検出できることが示された。一方で、氾濫原性魚類および汽水/海水性のハゼ類は検出しにくく、採水地点設定に対応が必要と考えられた。河川水辺の国勢調査へのMB解析導入に向けた検討は今後も継続予定であり、他河川の事例を収集しながら採水地点設定の最適化を進める予定である。今後の課題として、本報では議論していないMB解析でのみ検出された種の特徴の把握および調査コスト面の検討も踏まえながら、水国調査への導入につなげたいと考えている。

**謝辞：**北陸地方整備局ならびに中部地方整備局の皆様には、採捕データを提供いただいた。また、相島芳江氏、雨貝則子氏をはじめとする土木研究所河川生態チームの諸氏からは解析作業に対する技術的協力を得た。ここに記して謝意を表する。

#### 参考文献

- 1) 土居秀幸, 近藤倫生：環境DNA生態系の真の姿を読み解く, 共立出版, 2021.
- 2) 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 Society Open Science, Volume 2, 2015.
- 3) Miya, M., Gotoh, R. O. and Sado, T. : MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples, Fisheries Science, 86, pp.939-970, 2020.
- 4) 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, [http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/kankyoDNA\\_200110.pdf](http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/kankyoDNA_200110.pdf), (閲覧：2022年3月23日)
- 5) 国土交通省水管理・国土保全局 河川環境課：平成28年度版河川水辺の国勢調査 基本調査マニュアル〔河川版〕(概要編), <http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/manual.htm> (閲覧：2022年3月23日)
- 6) 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, 第26巻, 2020.
- 7) 内藤太輔, 都築隆禎, 蔭山一人, 宮本健也, 赤松良久, 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, リバーフロント研究所報告, 第31号, 2020.
- 8) 赤松良久, 都築隆禎, 横山良太, 舟橋弥生, 太田宗弘, 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, 74(5), 2018.
- 9) 辻冴月, 赤松良久, 中尾遼平, 都築隆禎, 内藤太輔, 横山良太, 畔上正樹, 乾隆帝：河川水辺の国勢調査による魚類調査と環境DNA定量メタバーコーディングの比較検討, 河川技術論文集, 第27巻, 2021.
- 10) DNA Data Bank of Japan : <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index.html> (閲覧：2022年3月23日)
- 11) 河川環境データベース：河川水辺の国勢調査のための生物リスト(令和3年度生物リスト), <http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/mizukokuweb/system/sci-butsuListfile.htm>, (閲覧：2022年3月23日)
- 12) 平田真二, 白尾豪宏, 飯田岳, 赤松良久, 乾隆帝, 中村圭吾, 村岡敬子：汽水域及び河川下流域における環境DNAの空間分布把握とサンプリング方法の検討, 河川技術論文集, 第25巻, 2019.
- 13) 北川哲郎, 村岡敬子, 天野聡, 岡本裕司, 中村圭吾：河道内で検出された海産魚類を指標とした環境DNA含有物質の有効検出範囲の推定, 河川技術論文集, 第27巻, 2021.
- 14) 北川哲郎, 村岡敬子, 中村圭吾：河川下流域における回遊性カジカ属の稚魚に由来する環境DNA含有物質の拡散, 河川技術論文集, 第27巻, 2021.
- 15) 公益財団法人リバーフロント研究所：実践的な河川環境の評価・改善の手引き(案)[H31.3版](02\_代表区間選定シート【様式】参考資料), <http://www.rfc.or.jp/result4.html>, (閲覧：2022年3月23日)
- 16) 藁田孝晴, 鶴田哲也, 井口恵一朗：絶滅のおそれのある日本産淡水魚の生態的特性の解明, 日本水産学会誌, 76(2), pp.169-184, 2010.
- 17) 細谷和海 編：山溪ハンディ図鑑15増補改訂日本の淡水魚, 山と溪谷社, 2019.
- 18) Wetzel, R. G.: Limnology Lake and River Ecosystems, Third Edition, pp. 734-736, Academic Press, 2001.

(2022. 3. 25受付)