

環境 DNA 分析を用いた河川調査における 地点間隔設定の最適化に向けた検討

A STUDY OF THE APPROPRIATE SAMPLING INTERVAL FOR
RIVER SURVEYS USING ENVIRONMENTAL DNA ASSAY

北川哲郎¹・村岡敬子²・天羽 淳³・堀江隆生⁴・岡本祐司⁵・中村圭吾⁶

Tetsuro KITAGAWA¹, Keiko MURAOKA², Jun AMOU³, Takao HORIE⁴,
Yuji OKAMOTO⁵ and Keigo NAKAMURA⁶

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)
(現:株式会社建設環境研究所 環境 1 部・環境 DNA 室)

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 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 2-1-3)

⁴非会員 国土交通省 中部地方整備局 三重河川国道事務所 調査課 (〒514-8502 三重県津市広明町 297)

⁵非会員 国土交通省 中部地方整備局 三重河川国道事務所 調査課 (〒514-8502 三重県津市広明町 297)
(現:国土交通省 中部地方整備局 河川環境課)

⁶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)

三重県雲出川の中・下流域における魚類のメタバーコーディング解析 (MB解析) ならびに同時期に同一区間で実施された河川水辺の国勢調査による直接採捕記録との比較により, 河道における環境DNA (eDNA) の適切なサンプリング間隔について検討した. 本研究では, 河口0.0-16.2 km区間から0.2 km間隔で採水した82サンプルのうち, 解析不調を除く79サンプルから, 延べ149 taxa (属・種といった分類学上有意な単位) の魚類が特定された. 純淡水区間にあたる3.4-16.2 kmの区間で得られた魚類リストの無作為抽出試験から, 検出taxa数の期待値の増加曲線を求めたところ, 地点間隔を1地点 / 1.2 kmとすることで, 効率的かつ安定的な種類数の検出が期待できると判断された. また, 直接採捕とMB解析とで得られた魚類リストの相関行列において, 直接採捕が実施された4地区とそれぞれ最も高い正の相関を示すMB解析結果は, -0.3-2.8 km下流から得られた. 両者の距離は当該区間の勾配に対する正の相関を示し, eDNA分析では目的区間の下流で採水する必要がある, その至適距離は勾配から強い影響を受けると示唆された. 以上の結果は, eDNA分析における地点間隔の最適化に向けた実証的な指標となり得る.

Key Words: metabarcoding, traditional sampling, correlation matrix, lower reaches, class A river

1. はじめに

環境DNA (environmental DNA ; 以下, eDNA) 分析技術は, 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, 特定分類群の網羅的検出による生物相の把握や対象生物の資源量の推定等を行う生物調査の手法である¹⁾. 本技術は, 現地から収集された少量のサンプルの分析から多様な生物情報を取得し得る効率的で非侵襲的な調査手法として注目を集め, とりわけ大型水生動物である魚類を対象とした知見集積が著しく^{2,3)}, 実用的な調査技術へと発展しつつある.

eDNA 分析と直接採捕を主体とした従来の調査法とを組み合わせることで河川事業へ活用することができれば, 調査の

効率化や精度の向上が見込まれるばかりか, 地理情報技術等との組み合わせによる生息適地モデル構築といった, 稠密で精度高い環境評価への展開が期待できる^{4,5,6)}. しかし, eDNA 分析技術に関する研究分野はいまだ発展途上で, 調査手法として河川事業へ実装するまでには, 環境条件や対象生物の生態に応じた検出特性, eDNA を含有する懸濁物質 (以下, eDNA 含有物質) の動態等, 乗り越えるべき課題が残されている⁷⁾. 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て, 河川水辺の国勢調査の一環と位置付け, 「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」 (以下, 水国テーマ調査) を令和元年度より開始し, 魚類のメタバーコーディング解析 (以下, MB 解析) を中心と

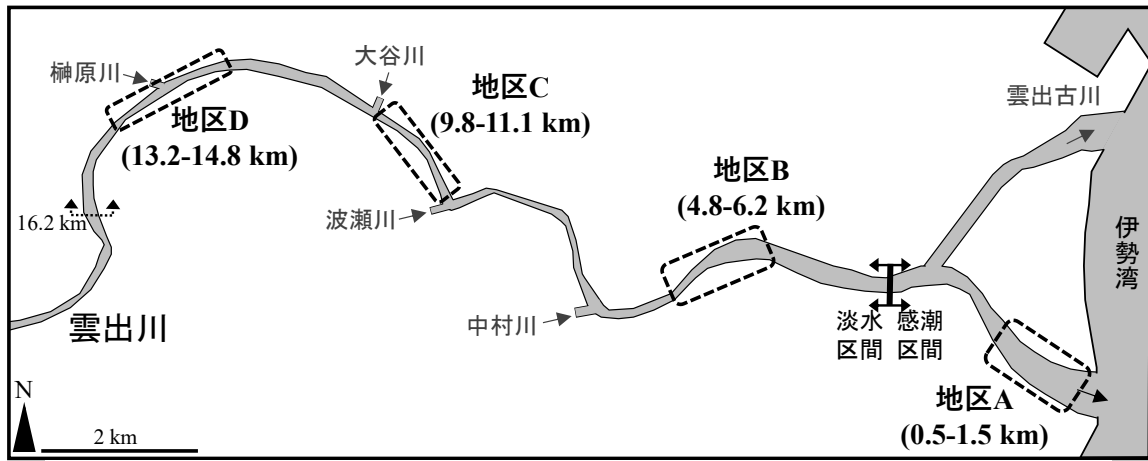


図-1 雲出川下流域の流況および水国調査地区 (A-D) の範囲

した活用事例の集積ならびに課題解決のための調査・検討を展開している⁸⁾。

水国テーマ調査における主要課題のひとつに、適当な調査地点の設定に関する検討が挙げられる。eDNA 分析技術は、流下してくる物質から生物の存在を検出するという技術的特性から、個体を直接採捕する従来法とは異なり、対象生物の生息範囲を特定することが困難である。また、eDNA 含有物質の動態については、調査地点の流況や河床材料といった環境条件によって大きく変化すると指摘されている一方で、大規模河川を対象とした野外実験に基づく実証的知見は不足している現状にある⁷⁾⁹⁾。しかし、個別の河川事業の効果・影響評価への活用の際には、目的とする河川あるいは区間における生物情報を過不足なく検出することが求められる。すなわち、対象範囲の生物情報を最も精度高く反映する調査地点の設定に向けた、調査地点の設定根拠となり得る知見の集積ならびに検出範囲の推定式の構築に向けた取り組みが不可欠と言える。

本報では、令和2年度に実施した水国テーマ調査の一環として実施された、三重県を流れる一級河川雲出川での定間隔採水サンプルを用いたMB解析結果に基づき、調査地点の設定条件に関する検討を行った。さらに、MB解析試料の採水と同時期である11月上旬に実施された、国土交通省中部地方整備局三重河川国道事務所による鈴鹿川・雲出川での水辺現地調査業務(以下、水国調査)の秋季調査で得られた魚類の採捕記録との照合を行い¹⁰⁾、流況変化に伴うeDNA含有物質の検出範囲の変動について検証した。なお、本報に示すデータのうち、環境情報(項:2(1),3(1))ならびにMB解析(項:2(2),3(2))の一部については既報に示されているが¹¹⁾、議論を展開するうえでの重要情報として再掲している。

2. 材料・方法

(1) 採水作業・環境情報の記録

調査区間は、雲出川の河口0.0kmから上流16.2kmまでの範囲とした(図-1)。現地作業は、2020年11月2-6日の

期間中に、いずれも9:00-17:00までの日中の時間帯に実施した。本研究では、対象区間を0.2km間隔で82のブロックに分割し、各ブロックの右岸側下流端の岸際から表層水各1ℓを採水してMB解析に用いる検体とした。採水区間は、eDNA含有物質の流下区間を1-2km程度と推定した山口ほか(2018)を参考として¹²⁾、検出の空白区間が生じない間隔として設定した。なお、採水作業中のコンタミネーションが生じていないことを確認するため、採水時には毎作業日に対して1検体ずつイオン交換水を用いた陰性対照を作成した。採水後の検体は、DNAの劣化を予防するため塩化ベンザルコニウム溶液を終濃度0.01%となるよう添加した後、冷暗環境を保った状態で実験室へと移送した。採水に際しては、環境情報として採水地点の水温(°C)、pH、濁度(NTU)、流速(cm/s)を記録した。水温とpHは携行測定器WM-32EP(東亜DKK社)を、濁度は携行測定器TB-31(東亜DKK社)を、流速はプロペラ式流速計CR-11(コスモ理研社)を、それぞれ用いて測定した。また、物理環境に関わる付帯情報として、雲出川の河川維持管理計画から諸元情報を参照した¹³⁾。

(2) メタバーコーディング解析

各ブロックで採水した検体をメンブレンフィルター(ADVANTEC社、孔径:0.45μm)で全量濾過し、DNeasy Blood Tissue Kit(QIAGEN社)を用いてフィルタリングされた残渣物からDNAを抽出した後、抽出物をOneStep PCR Inhibitor Removal kit(ZYMO RESEARCH社)で精製した。精製後のDNAは、MiFish-U/U2/E/L(Mifish-L:Mifish-Uの配列を一部改変しヤツメウナギ科に至適化したプライマー)を4:2:2:1の比率で混合したプライマーセットを用いたTwo-step tailed PCR法によって対象領域を増幅し³⁾、Fragment Analyzer/dsDNA 915 Reagent Kit(Advanced Analytical Technologies社)で解析試料としての品質を確認した後にMiSeq/MiSeq reagent Kit v3(2×300 bp, illumina社)による超並列シーケンシングへ供した。対象領域の増幅に際しては、1st PCR時に8回の反復区を設け、得られたPCR産物を混合して2nd PCRへと供した。

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¹⁴⁾, データベース MitoFish との照合により配列の相同性 97% 以上となる taxon (分類学上有意な集まりであることを示す単位, 複数: taxa) を特定し, さらに DNA Data Bank of Japan の登録配列と照合して該当 taxon を精査したうえでリスト化した^{15),16)}. なお, 希少種保護の観点から, 本報では各地点における詳細なリストの内訳は掲載しない。

(3) 調査地点の設定に関する検討

a) 地点設定の頻度と検出 taxa 数の変化

MB 解析で得られた魚類リストの在・不在情報を用いて, 調査地点の設定頻度と検出される taxon 数の増加率について検討した. 本分析では, 既往知見において偶然性の高さが指摘される感潮区間および⁸⁾, 解析不調により欠測となった 4.8 km 地点の値を除く 64 地点 (3.4–16.2 km) から得られた MB 解析結果を集計対象とした. 特定の地点を起点とすることで生じるバイアスの影響を避けるため, 疑似乱数によって MB 解析地点から 1–64 地点ぶんの魚類リストを無作為抽出し, 採水頻度に応じた taxon 数の増加率を推定した. 無作為抽出の試行回数は 100 反復とし, その平均を代表値とした. 疑似乱数の生成には, 表計算ソフト Excel 2019 (Microsoft 社) に内装される rand 関数を用いた.

b) 流況に応じた調査地点の設定条件

MB 解析で得られた魚類リストと水国調査で得られた魚類リストの在・不在情報を用いて, ピアソンの積率相関係数に基づく相関行列を作成した. その後, 直接採捕を実施した水国調査地区の末端と最も高い正の相関を示す MB 解析地点との距離を調査区間の環境変化と照合することで, 流況に応じた eDNA 含有物質の検出範囲の変化について検討した. 本分析では, 解析不調により欠測となった 0.0, 1.2, 4.8 km 地点の値を除く 79 地点 (0.2–16.2 km) から得られた MB 解析結果ならびに, 水国調査が実施された 4 地区 (A: 0.5–1.5 km, B: 4.8–6.2 km, C: 9.8–11.1 km, D: 13.2–14.8 km; 図-1) から得られた採捕記録を集計対象とした. 相関行列の作成には, 統計ソフト R (Windows, ver. 4.0.3) を用いた.

3. 結果と考察

(1) 環境条件

現地調査を実施した 5 日間のうち, 河口 0.0–1.6 km と 5.0–6.4 km 地点での採水ならびに直接採捕調査を実施した 11 月 2 日にのみわずかな降水が見られた. 水質項目においては, 水温では最下流域で最も高く上流方向に対して漸減していく傾向が, 濁度では最下流の 0.0–1.0 km 区間および 6.0–8.0 km 区間で部分的な上昇傾向が, それぞれ確認された一方で, pH には全区間を通じた特定の変化傾向は生じなかった (図-2). MB 解析における解析精度ならびに

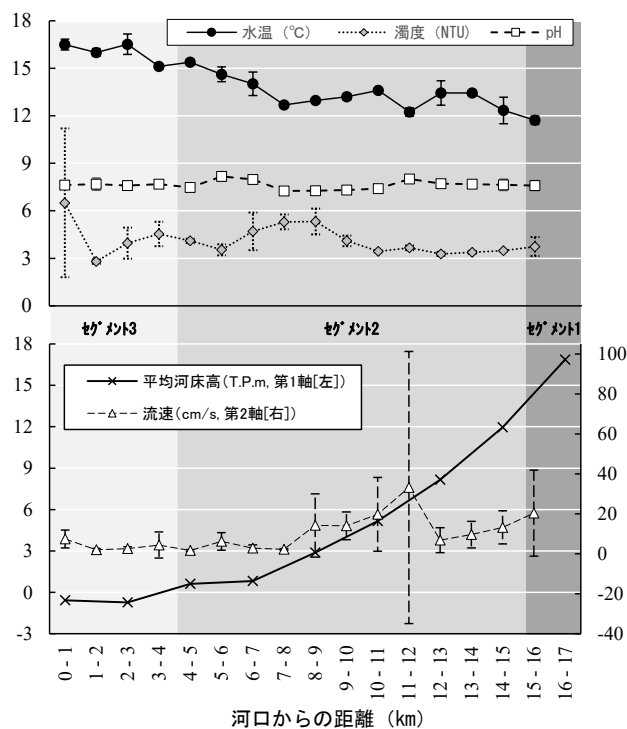


図-2 採水地点の環境情報. 水温・濁度・pH・流速は 1 km 区間中の平均値 ± 標準偏差で, 平均河床高は 2 km 区間中の平均値で, それぞれ示した.

読み取りリード数と降水ないし水質項目に見られた傾向との直接的な関連性は検出されなかった.

各採水地点における流速の全区間平均値は 9.8 ± 19.1 cm/s であった. 調査地区全体の平均勾配は約 1/900 で, 河口から約 4 km までのセグメント 3 区間 (勾配: 1/5,000 以下), 約 4–15 km までのセグメント 2 区間 (勾配: 1/400–1/5,000), 約 15 km 以上のセグメント 1 区間 (勾配: 1/60–1/400) に大別された. また, 一般測として流速と勾配は正の相関性を示すが, 本研究では, 勾配が 1/1,000 よりも急になる河口約 7.0 km 以上の区間において流速の上昇が認められた一方で, より上流域で勾配が急な 12.0 km 以上の区間では再び低下していた. この傾向は, 本研究では流心部から離れた岸際の採水地点で流速を測定したため, 水際環境や流路形状といった, 勾配以外の要因から強い影響を受けた結果を反映したものと考えられた.

(2) 魚類の検出・確認状況

解析対象とした 82 検体のうち 79 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 12,388–24,424 リードが読み取られた (最小–最大; 図-3). 読み取られた配列からは 364 OTU が抽出され, 149 taxa (属・種といった分類上の有意な集まりであることを示す単位 [単数: taxon]) に特定された. 各地点における検出数は 23–59 taxa (図-3) で, とりわけ感潮区間下流区間で多くの種類が検出された. 解析不調となった 3 検体は, それぞれ河口から 0.0, 1.2, 4.8 km 地点からの採水物であった. 解析不調が生じた要因は不明であるが, 同様の手法

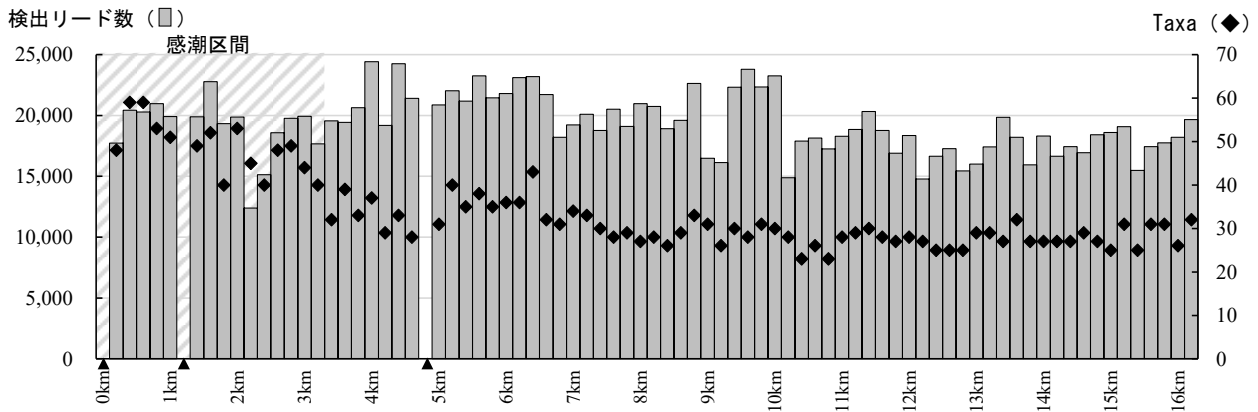


図-3 雲出川の河口から0.0-16.2 kmで実施した魚類MB解析において検出されたリード数と検出 OTU 数の分布。
▲：解析不調による欠測ブロック。

で同時に解析したサンプルでは不調が生じていないこと、不調サンプルがそれぞれ離れた地点からの採水物であることから、偶発的に多量の PCR 阻害物質を混入させてしまったことによる可能性がある。

なお、今回の解析では、生理的適性から雲出川には生息し得ない魚類、外洋性海産魚類、および純淡水域において検出された海産魚類に特定された 24 taxa を、河川外に由来する可能性が高いと判断し集計対象から除外した。また、11月3、4日に作成された陰性対照から8 OTU (4-798 リード) の擬陽性が確認されたため、当該 OTU についてはコンタミネーションが生じた可能性が高いと判断して集計対象から除外した。

(3) 抽出地点数に応じた想定検出 taxon 数の変化

MB 解析における検出 taxa の増加率は、採水頻度の上昇に対して対数的に増加した ($y = 7.6725 \ln(x) + 32.885$, $R^2 = 0.9923$, y : 想定検出 Taxa, x : 抽出地点数; 図-4)。100回の無作為抽出によって得られた平均検出 taxa の増加曲線は、採水頻度が8-11/64地点の範囲で大きく変曲した。また、データのばらつきを示す変動係数 (CV 値) は、1/64地点を想定した場合の0.14から漸減し、11/64地点以上の頻度を想定したケースにおいて0.05を下回ると同時に減少率が鈍化した (図-5)。

以上の結果から、河川の中・下流域での eDNA 分析においては、採水地点間の間隔を1.2 km未満 (11/64地点からの採水に相当) に設定することで、効率的かつ安定的な taxa 数の検出が期待できると示唆された。本成果に関連する知見として、北川ほか (2021) は、本研究と同一区間における海産魚類等の検出状況を調査し、eDNA 含有物質の有効検出範囲を約1.6 kmと推定している¹¹⁾。本研究において好適間隔と推定された1地点/1.2 kmは、有効検出範囲の75%に相当し、調査区間の eDNA 含有物質を連続的かつ大きく重複せずに検出できる間隔と考えられ、既往知見と相矛盾しない傾向が得られた。

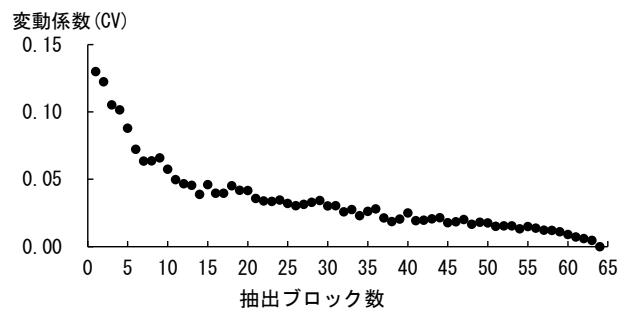


図-4 純淡水区間における魚類リストの抽出数に応じた、検出 taxa 数の期待値の増加曲線 (反復: 各100回)。◇: 平均値, ■: 標準偏差, I: 最少-最多。

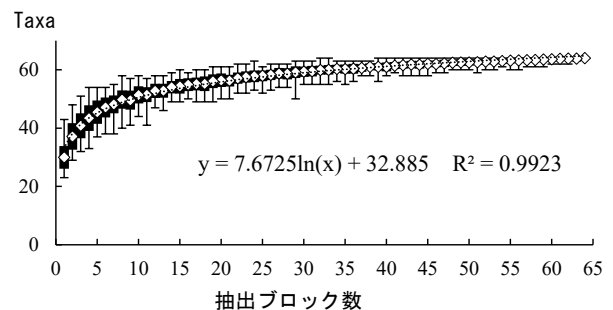


図-5 純淡水区間における魚類リストの抽出数に応じた変動係数 (CV 値) の変化。

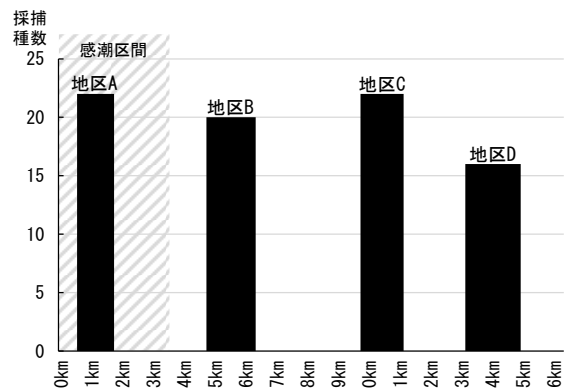


図-6 2021年11月に実施された直接採捕 (水国勢調査) における各地区の確認種数。

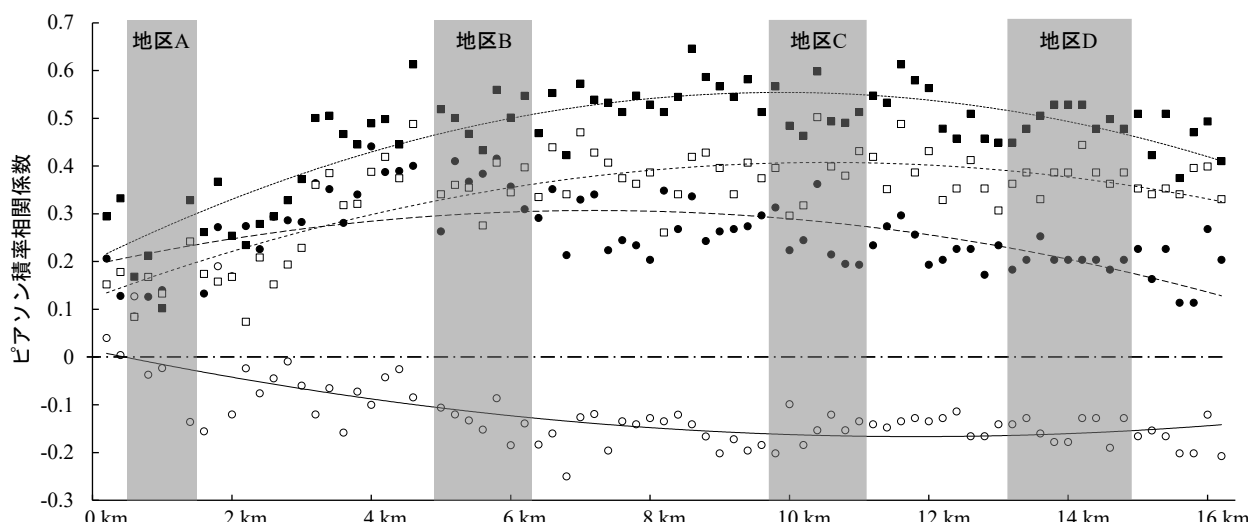


図-7 雲出川の河口から0.0-16.2 km で実施した魚類 MB 解析で得られた魚類リストと、直接採捕が実施された4地区の魚類リストとの相関行列に基づく散布図。○：地区A ($y=0.0013x^2-0.0305x+0.0138$, $R^2=0.5013$), ●：地区B ($y=-0.0022x^2+0.0317x+0.1929$, $R^2=0.3753$), ■：地区C ($y=-0.0036x^2+0.0712x+0.2023$, $R^2=0.7027$), □：地区D ($y=-0.0026x^2+0.0539x+0.1236$, $R^2=0.6192$)。

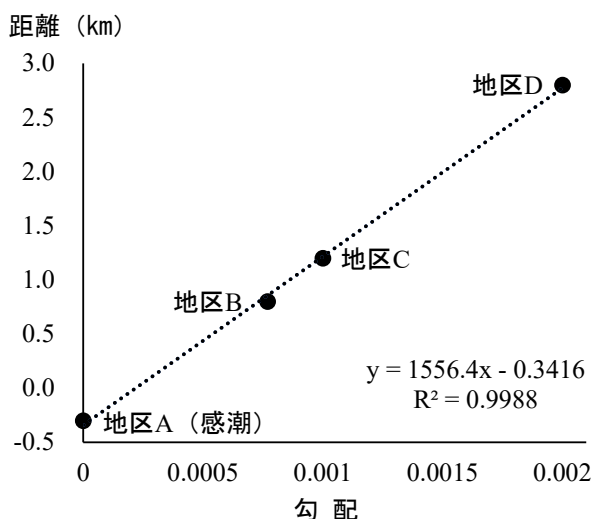


図-8 水国調査地区の勾配と各地区で得られた魚類リストに対して最も高い相関係数を示すリストが得られた MB 解析 (採水) 地点までの距離。

(4) 相関行列に基づく好適調査地点の推定

雲出川で実施された水国調査における総確認魚類数は50種/属で、各水国調査地区(A-D地区; 図-1)における確認数はそれぞれ16-22種/属であった(属レベルまでの同定に止まる個体を含む, 図-6)。なお, MB解析の結果と同様, 希少種保護の観点から詳細な内訳は掲載しない。

各水国調査地区の魚類リストと MB 解析で得られた79地点ぶんの検出魚類リストとの相関行列は, いずれも二次関数式による近似式で表される単峰型の分布様式を呈した(図-7)。また, 各水国調査地区の至近側の末端と, 各地区の魚類リストに対してそれぞれ最も高い相関係数を示す検出魚類リストが得られた eDNA 採水地点は, それぞれ A 地区で0.3 km (vs. 上流端), B 地区で0.8 km (vs. 下流端), C 地区で1.2 km (vs. 下流端), D 地区で2.8 km (vs.

下流端)であった。各末端と採水地点との距離は, 各地区の勾配に対して高い正の相関を示した ($y=1556.4x-0.3416$, y : 直接採捕区間の末端と相関値が最高となる eDNA 採水地点までの距離, x : 勾配; 図-8)。

水国調査における確認リストと eDNA の検出リストとの相関行列に見られた単峰型の分布様式は, MB 解析によって, 雲出川における淡水魚類相の縦断的な変化に応じた魚類リストが検出されたことを示唆している。また, 各地区の勾配と魚類リスト間の相関係数との対応関係から, eDNA 分析を用いた魚類調査では, 目的とする区間よりも下流側に離れた地点で採水することが望ましく, その至適距離は, 当該区間の勾配から強い影響を受けると推察された。本研究で検出された eDNA 含有物質の流下範囲と勾配との関連性については, 採水地点の流心部における流速の影響を間接的に検出している可能性がある。流況と検出範囲との因果関係の解明には更なる精査が求められる一方で, 勾配の値は実測が不可欠な流速とは異なり地形情報からの算出が可能である。すなわち, 勾配を指標として用いることで, eDNA 分析を用いた生物調査における効率的な計画立案や対象生物の生息範囲の推定に活用し得ると期待できる。ただし, 北川ほか (2021) は, 中規模河川の下流域における eDNA 含有物質の横断方向への拡散は限定的と指摘している¹⁷⁾。本研究では右岸側のみで採水を実施したことから, 水国調査地区の直下では対岸側から流下する eDNA 含有物質を捉えられず, 当該地区の生物情報を十分に検出できなかった可能性は残される。

4. 結論

本研究で得られた結果から, 河川の中・下流域での MB 解析を用いた魚類調査における, 好適な地点間隔の設定に関する諸条件が明らかとなった。すなわち, ①採水地点間

の間隔を 1.2 km 程度に設定することで効率的かつ安定的な taxa 数の確認が期待できること, ②MB 解析によって検出される魚類リストが生息魚類の縦断分布を反映していること, ③eDNA 分析では目的とする調査区間よりも下流側に離れた地点で採水することが望ましく, ④その至適距離は当該区間の勾配から強い影響を受けること, といった, eDNA 含有物質の流下実態に関する実証的知見が集積された。これらの成果は, eDNA 分析を用いた河川調査での地点設定における数的指標としての活用が見込まれる。他方で, 本研究で得られた知見は単一河川での事例に基づくもので, 水温等の環境条件が大きく異なる高・低緯度地域や高度に都市化された地域といった, 異なる環境を流れる河川への汎用性は検証されていない。そこで今後は, 環境条件の異なる他河川において事例を集積し, 勾配に関連した数的指標の変化に対する eDNA 含有物質の有効検出範囲の応答性および検出範囲に大きな影響をおよぼし得る環境要因を抽出することで, より一般化された指標の策定へと展開していく必要がある。

謝辞: 本研究の遂行にあたり, 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。

参考文献

- 1) Ruppert, K., M., R. J. Kline and M.S. Rahman: Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA, *Global Ecol. Conserv.*, Vol.17, e00547, 2019.
- 2) Minamoto, T., M. Miya, T. Sado, S. Scino, H. Doi, M. Kondoh, K. Nakamura, T. Takahara, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, W. Iwasaki, A. Kasai, R. Masuda and K. Uchii: An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols, *Environ. DNA*, <https://doi.org/10.1002/edn3.121>, 2020.
- 3) Miya, M., R. O. Gotoh and T. Sado: MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples, *Fish. Sci.*, Vol.86, pp.939-970, 2020.
- 4) Feio, M. J., R. M. Hughes, M. Callisto, S. J. Nichols, O. N. Odume, B. R. Quintella, M. Kuemmerlen, F. C. Aguiar, S. F.P. Almeida, P. Alonso-EguíaLis, F. O. Arimoro, F. J. Dyer, J. S. Harding, S. Jang, P. R. Kaufmann, S. Lee, J. Li, D. R. Macedo, A. Mendes, N. Mercado-Silva, W. Monk, K. Nakamura, G. G. Ndiritu, R. Ogden, M. Peat, T. B. Reynolds, B. Rios-Touma, P. Segurado, and A. G. Yates: The Biological Assessment and Rehabilitation of the World's Rivers: An Overview, *Water* 13, no. 3: 371. <https://doi.org/10.3390/w13030371>, 2021.
- 5) 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.
- 6) 中村圭吾: グリーンレーザーを用いた航空レーザー測深(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.
- 7) Pont, D., A. Valentini, M. Rocle, A. Maire, O. Delaigue, P. Jean and T. Dejean: The future of fish-based ecological assessment of European rivers: from traditional EU Water Framework Directive compliant methods to eDNA metabarcoding-based approaches, *J. Fish Biol.*, Vol. 98, pp.354-366, 2019.
- 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の試行事例分析, *河川技術論文集*, Vol.26, pp.319-324, 2020.
- 9) 土居秀幸・近藤倫生 編: 環境DNA 一生態系の真の姿を読み解く一, 共立出版, 2021.
- 10) 三重河川国道事務所: 鈴鹿川・雲出川水辺現地調査業務報告書, 2021.
- 11) 北川哲郎・村岡敬子・天野 聡・岡本祐司・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*, Vol. 27, pp.295-300, 2021.
- 12) 山口皓平・赤松良久・乾 隆帝・後藤滋益・河野善仁・栗田喜久: 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.I_409-I_414, 2018.
- 13) 三重県河川国道事務所: 雲出川河川維持管理計画, URL:<https://www.cbr.mlit.go.jp/mie/river/plan/maintenance.html>, 2021年2月26日取得, 2020.
- 14) Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. P. Holmes: DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nature Methods*, Vol.13, pp.581-583, 2016.
- 15) Sato, Y., M. Miya, T. Fukunaga, T. Sado and W. Iwasaki: MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding, *Mol. Biol. Evol.*, Vol.35, pp.1553-1555, 2018.
- 16) Ogasawara, O., Y. Kodama, J. Mashima, T. Kosuge and T. Fujisawa: DDBJ Database updates and computational infrastructure enhancement, *Nucl. Acids Res.*, Vol.48(D1), pp.D40-D50, 2020.
- 17) 北川哲郎・村岡敬子・中村圭吾: 河川下流域における回遊型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*, Vol. 27, pp.301-304, 2021.

(2022. 3. 25 受付)