報告(Note)

市民参加型環境 DNA 調査の成果と課題，そして今後の展望

長谷部　勇太
（調査研究部）

Achievements, challenges and future prospects of Citizen Participation Environmental DNA Survey

Yuta HASEBE
(Research Division)

キーワード： 環境 DNA, MiFish, 市民科学, 魚類調査, 生物多様性

１　はじめに

近年,開発や外来種の侵入,気候変動等の要因により世界的に生物多様性の劣化が懸念されており，「生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学-政策プラットフォーム(IPBES)」の 2020 年 3 月の報告では 800 万の動植物種のうち 100 万種が絶滅の可能性があるなど,生物多様性の危機的な状況が明らかとされた[1)]。

本県においても, 2024 年 3 月に「かながわ生物多様性計画」を「かながわ生物多様性計画 2024-2030」として改訂し[2)],前計画から引き続き多様な自然を有する本県の特性に応じた様々な生物多様性保全活動を継続するとともに，自然共生サイト*といった新たな補完的な仕組みも取り入れながら，県内の生物多様性保全を推進している。

ただし，河川等の水圏における生物モニタリングについては，既報[3)]でも言及したとおり調査の難しさや人手の不足といった様々な制限要因から，県内の河川での生物相の把握は十分とは言えない状況にある。

このような状況の中，近年では生物の調査に新たな手法が提案されている。それが環境中を漂う細胞片等に由来する DNA, いわゆる「環境 DNA」を用いた生物調査である。河川や湖沼等に生息する生物からは糞や粘液等に由来すると考えられる DNA が環境中に放出されていることが明らかとなり[4)]，その中には当該生物における細胞由来の DNA が含まれている。環境 DNA 調査は，河川・湖沼等の水を採取し，その中に含まれる DNA を適切な手法で分析することにより，間接的に当該生物の存在を把握する手法であり，特定の生物[5-8)]や魚類を始めとした様々な生物群集[9-14)]を調査可能な非常に強力な生物調査ツールとなりつつある。また，従来の捕獲による調査に比べても，現場での作業時間やコストの軽減，生息環境の撹乱の防止,人が立ち入ることが困難な場所での調査が可能となる等の点で多くのメリットがあると報告されている[15)]。

環境 DNA 調査は上記のメリットにも挙げられている現場調査の簡便さと調査精度の高さから市民参加による調査ツールとしても注目されている[16)]。

海外での事例でも希少種の保全[17)]，外来種の侵入の検知[18)]，特定の地域の生物群集調査[19)]といった事例の他，市民が環境 DNA の分析を実施するような事例まで報告されている[20)]。また，日本においても市民参加による環境 DNA 調査の事例がいくつも報告されている[21-23)]。更に市民参加による環境 DNA 調査は，研究者の作業量の低減という面だけでなく，参加者への環境教育の面での効果も確認されており[24)]，地域の生物多様性の保全にとって重要な価値を持った活動と言える。県が実施した県民ニーズ調査第 2 回課題調査においても，回答者の 3 割は身近な自然環境が劣化したと考えているとの回答があり[25)]，県民参加により河川の生物多様性を知り，結果や課題を共有することは県にとっても重要な活動であると考えられる。

そこで本調査では，県民参加により神奈川県の全県河川を対象に魚類の環境DNA調査を実施し，河川ごとの魚類の生息状況に関する基礎的なデータを収集するとともに，過去の捕獲調査の結果

＊: 「民間の取組等によって生物多様性の保全が図られている区域」であって国が認定した区域

と比較等をすることで，県民参加で十分な精度の調査が可能となるか検証するとともに調査結果を共有し，参加者に生物多様性について関心を持ってもらうことを目的に実施した。

なお，本調査は共創の場形成支援プログラム「ネイチャーポジティブ成長社会実現拠点」の取組として実施しており，当センターも上記プログラムに参画している。

２　方法

２．１　調査地点と調査時期

調査にあたっては県内の高校と水源環境保全事業に基づく河川モニタリング調査[26]において県民調査員登録をしている個人及び団体に募集を行い，合計で 16 の高校と 17 の調査員が参加して実施した。調査実施前にはオンラインでの説明会を開催してマニュアルの説明を行った。調査場所については参加者が神奈川県内の全河川の任意の地点を設定することとし，各参加者 1 地点で，県内 9 河川 33 地点で調査が実施された(図１，表 1 のとおり)。調査日は 2023 年 7 月 29 日を基準日としておおむね前後 1 週間以内で実施した。

２．２　採水・ろ過

現地での採水作業とろ過作業については，調査員が県で作成した環境 DNA 調査マニュアルに従い，図 2 の調査票を用いて調査フローに従い，実施した。具体的な作業内容は次のとおり。

各調査員は調査地点に到着後，調査票に調査地点の情報，緯度経度，時刻等を記入した。その後，調査キット(図 3)に入っているゴム手袋を装着し，おもり・ロープ付きのカップを用いて採水を実施した(図 4)。採水作業は安全を優先し，橋の上からの採水を原則とした。なお，親水設備等水際まで安全に近づける場合については川岸に接近して

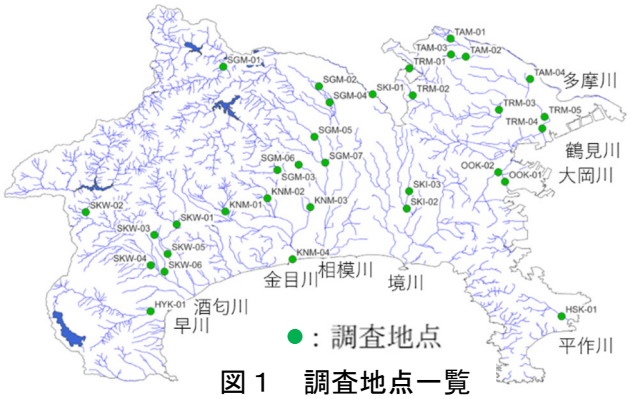


図１　調査地点一覧

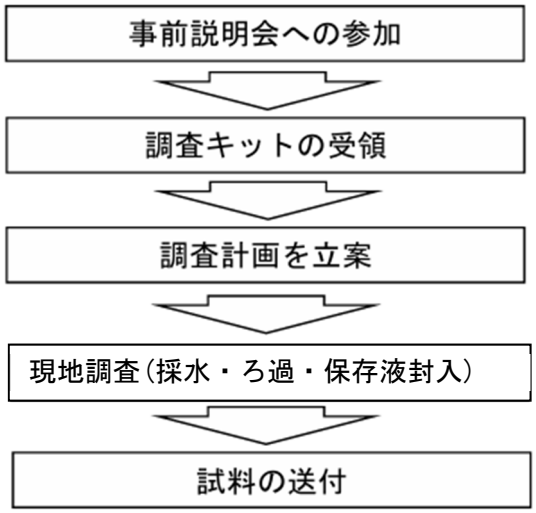
表１　調査地点一覧

調査ID	水系	調査河川	水系別調査地点数
TAM-01	多摩川	二ヶ領本川	4
TAM-02	多摩川	平瀬川	
TAM-03	多摩川	平瀬川	
TAM-04	多摩川	二ヶ領本川	
TRM-01	鶴見川	鶴見川	5
TRM-02	鶴見川	奈良川	
TRM-03	鶴見川	鶴見川	
TRM-04	鶴見川	鶴見川	
TRM-05	鶴見川	鶴見川	
OOK-01	大岡川	掘割川	2
OOK-02	大岡川	大岡川	
HSK-01	平作川	平作川	1
SKI-01	境川	境川	3
SKI-02	境川	境川	
SKI-03	境川	和泉川	
SGM-01	相模川	道志川	7
SGM-02	相模川	姥川	
SGM-03	相模川	玉川	
SGM-04	相模川	鳩川	
SGM-05	相模川	中津川	
SGM-06	相模川	恩曽川	
SGM-07	相模川	相模川	
KNM-01	金目川	金目川	4
KNM-02	金目川	鈴川	
KNM-03	金目川	渋田川	
KNM-04	金目川	三沢川	
SKW-01	酒匂川	四十八瀬川	6
SKW-02	酒匂川	河内川	
SKW-03	酒匂川	酒匂川	
SKW-04	酒匂川	狩川	
SKW-05	酒匂川	酒匂川	
SKW-06	酒匂川	仙了川	
HYK-01	早川	早川	1

注:各水系で標高の高い順に番号を振っている

の採水も可能とした。

ろ過作業には 50ml ロックタイプシリンジ（SS-50LZ，テルモ社）とカートリッジ型のステリベクスフィルター(Merck & Co., Inc.，孔径 0.45 μ m)を使用した。ひも付きカップで採水した河川水をシリンジで 50mL 採取し，フィルターでろ過を行う作業を 2 回実施した後，残った水は下流側に捨てた。この作業を計 5 回実施し，合計で 500mL の河川水をろ過した。この際，フィルターの目詰まりにより 500mL のろ過ができなかった場合は，調査票にろ過水量を記入の上，ろ過作業を中断し，次の作業に移った。ろ過作業後はステリベクスフィルターの排出口にキャップをはめ，内部に RNAlater(Thermo Fisher Scientific, Inc.)を約 2mL 充填し，注入口にもキャップをしたうえで，ステリベクスフィルター側面に調査日・調査場所を記入



環境DNA観測野帳

1．採水・ろ過

採水者　：

調査日時：　年　月　日　時　分　　天候：

河川名		支川名	
地点情報			
緯度経度	,		

採水地点概況

ゴミ	無・有 種類　（　） 場所　（右・中・左・全体）	植物片	無・有 種類　（　） 場所　（右・中・左・全体）
油膜	無・有 場所　（右・中・左・全体）	工事	無・有　（護岸・浚渫・その他） 場所　（　）
濁り	無・有 場所　（右・中・左・全体） 原因　（　）	流入	無・有 場所　（　）

濾過量

ステリベクス　　mL　基本500mL

ーシリンジの容量は50mLなので、最大10回までろ過をお願いします。途中で目詰まりした場合は、50×シリンジのろ過回数をご記入ください。

その他現場での特記事項

ここから下は記載不要

2．DNA抽出

作業者　：

抽出方法：新手法・学会マニュアル準拠

抽出液量：75μL×2・100μL×1・200μL×1・その他（　）

（抽出日：　年　月　日）

その他DNA抽出時の特記事項

図２　環境 DNA 調査フロー及び調査票

した。その後，ビニールパックに封入し，保冷剤入りの保冷袋に入れた。これらのサンプルは各調査員が冷凍便で神奈川県環境科学センター(以下「センター」)に送付した。当日冷凍便で発送できない場合は自宅に持ち帰り冷凍庫に保存の上，調査員の都合のつく日にセンターに冷凍便で送付した。センターに送付されたステリベクスフィルターは DNA 抽出作業を行うまで-20℃以下で保存した。

なお，コンタミネーション防止のために河川水

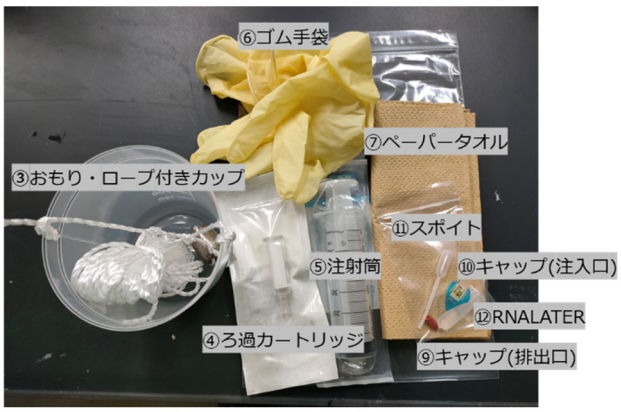


図３　調査キット

に直接触れる部分はすべて使い捨てタイプの器具を使用した。

２．３　DNA 抽出

DNA の抽出は，一般社団法人環境 DNA 学会の方法に準拠し，一部の工程は変更して実施した[27)]。

具体的には冷凍していたステリベクスフィルターを解凍し，50mL ロックタイプシリンジを注入口に接続し，空気を押し出して，排出口から RNAlater を排出した。

次に，ステリベクスフィルターの注入口側から 440μL の溶解バッファミックス(PBS 220μL, Buffer AL 200μL, Proteinase K 20μL))を注入し，56℃30 分で回転させながら，インキュベートした。

インキュベート後，ステリベクスフィルターの注入口の蓋を外し，5mL スクリュー式チューブ(65-8749-11, エッペンドルフ)に注入口を下にして接続し，遠心分離機(Model4200+St-2504MS，KUBOTA)で，4800rpm で 1 分間遠心し，チューブに溶解バッファミックスを回収した。その後，溶解バッファミックスに 200μL の分子グレードエ

図４　調査実施風景

タノール(99.5%, 富士フィルム)を添加した。溶解バッファミックスとエタノールの混合物を真空マニホールドに取り付けられた DNeasy Blood and Tissue Kit(QIAGEN)のシリカメンブレンカラムにロードし，DNA を吸着した。その後，500 μL の AW1 バッファーと 500 μL の AW2 バッファーでカラムを順次洗浄した後，DNeasy カラムを 20,000g で 2 分間遠心分離して乾燥させた。カラムに 200 μL の AE バッファーを入れ，1 分間室温でインキュベートした後, 6000g で遠心し, DNA を溶出し，DNA 抽出液を得た。

環境 DNA 学会の方法との違いは，RNAlater の除去工程と溶解バッファミックスの回収工程であり, DNA 抽出工程全体への影響は少ないと考えられる。

また, DNA 抽出時に新品のステリベクスフィルターに RNAlater2mL を注入したものを用意し, 上記の DNA 抽出作業を行うことで，この後の分析のネガティブコントロールとした。

DNA 抽出液は次の工程に使用するまで-20℃以下で保存した。

２．４　ライブラリー調整

得られた DNA 抽出液に対してミトコンドリア DNA の 12SrRNA 領域を対象にした MiFish プライマー[9]を用いて魚類網羅解析用のライブラリー調整を行った。

ライブラリー調整は環境 DNA 学会の分析マニュアルを参考に 2 段階の Tailed PCR で実施した[27]。1stPCR でプライマーによるターゲットアンプリコンの増幅と 2ndPCR 用のアダプター領域の付与を行い，2ndPCR で個別のサンプルを識別するための 8 塩基からなる固有のインデックス配列と次世代シーケンサーのフローセルに結合するための配列の付与を行った。この際, 1st PCR のプライマーは，MiFish-U，キュウリウオ科用改変プライマー(以下,「Mifish-O」という)，及びスナヤツメ用改変プライマー（以下,「Mifish-L」という）をそれぞれ 4 : 1 : 1 のモル比率で混合したものを用いた。それぞれのプライマーの配列は表 2 のとおりであり, 改変プライマーの下線太字は MiFish-U プライマーからの改変部分を示している。なお, Mifish-O-R については MiFish-U-R と同配列を使用した。

また, MiFish-U プライマー及び Mifish-O プライマーについては次世代シーケンサーによる分析の際の塩基多様度を高め，シーケンス精度を向上させることを目的に，プライマー配列と次世代シーケンサー分析用のアダプター配列の間に N を 0~5 個挿入した 6 種類のプライマーを等モル混合したものを用いていた。スナヤツメ類については河川において優占種となるほどの生息密度となることが想定されないことから，N は挿入しなかった。

ライブラリー調整の具体的な手順は以下の通り。1stPCR は，10 μM プライマーミックス 0.45 μL，DNA テンプレート DNA 2 μL 及び 7.5 μL の KOD One PCR Master Mix(TOYOBO, Osaka ,Japan) で構成される最終容量 15 μL で実行した。PCR 時の取りこぼしを最小限にするため，サンプルごとに 8 つの複製を作成し，PCR を実施した。PCR による増幅は，SimpliAmp サーマルサイクラー(Thermo Fisher Scientific, Inc.)を使用して，サンプル間のコンタミネーション防止のため個別に蓋の可能な 8 連チューブを使い，98℃10 秒，65℃5 秒，68℃5 秒の 35 サイクルで実施した。8 複製の PCR 産物をプールし, それらのうちから 40 μL を SPRI セレクトにより 0.7×-0.7×の Right side size selection を行い，精製と非対象の増幅の除去を行った。精製したサンプルは，4150 TapeStation system(Agilent)で対象領域の DNA 濃度を確認し，それぞれ 100pg/μL となるように希釈し, 2ndPCR に用いた。ネガティブコントロールについては各サンプルの平均希釈率で希釈を行った。

2ndPCR は 5 μM プライマー1.8 μL, 精製希釈済み 1stPCR 産物 2 μL 及び 15 μL の KOD One PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka ,Japan)で構成される最終容量 30 μL で実行した。PCR による増

表２　プライマー配列

プライマー名	配列
MiFish-U-F	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT(N0~5)GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC-3'
MiFish-U-R	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT(N0~5)CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'
MiFish-O-F	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT(N0~5)GTCGGT**T**AA**T**CTCGTGCCAGC-3'
MiFish-L-F	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG**CT**GGTAAA**C**CTCGTGCCAGC-3'
MiFish-L-R	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATAG**C**GGGGTATCTAATCCC**G**GTTTG -3'

幅はサーマルサイクラーを使用して，サンプル間のコンタミネーション防止のため個別に蓋の可能な 8 連チューブを使い，98℃10 秒，60℃5 秒，68℃5 秒の 10 サイクルで実施した。この際フォワードプライマーとリバースプライマーに使用したインデックス配列については環境 DNA 学会マニュアルとは異なり，インデックスホッピングの影響を除外するため，ユニークデュアルインデックスとした [28]。2ndPCR 産物は各サンプル 10μL ずつプール・混合した後，それらのうちから 40μL を SPRI セレクトにより 0.75×-0.75×の Right side size selection を行い，精製と非対象の増幅の除去を行った。

精製したライブラリーの濃度を 4150 TapeStation system で測定し，50pM に希釈し，PhiX Control v3 を 20%混合し，iSeq 100 Reagent(Illumina, CA, USA)を用いて，iseq100 プラットフォームでシーケンスを行った。この時，OOK-02 と TAM-02 の 2 サンプルについては，他のサンプルの分析の都合上，300bp のシングルエンドでのシーケンスとし，それ以外のネガティブコントロールを含めたサンプルは 150bp×2 のペアエンドでのシーケンスとした。

すべての配列データは，日本 DNA データバンク（DDBJ）の Sequence Read Archive（DRA，アクセッション番号：PRJDB19173）に登録した。

２．５ データ処理及び種の割り当て

iseq100 プラットフォームから出力された生のシーケンスリードは，bcl2fastq v2.20 (Illumina, CA, USA)を用いて各サンプルにデマルチプレックスされた。150bp×2 のペアエンドリードは，USEARCH v11.0.667[29,30] を用いてマージした。Phred Quality Score が 2 の塩基以降の配列と，アライメント領域にミスマッチが多すぎるペアリード（> 5 bp または同一性 90%未満）は，デフォルト設定で破棄した。300bp のシングルエンドリードについては trimmomatic v0.39[31]を用いて Trueseq のアダプタートリミングを実施し，以降の処理については全てのサンプルとも同じ処理を行った。次に，USEARCH の "fastq_filter "コマンドを用いて，塩基の長さが 140bp 未満のリードを除去し，残ったリードについて，全塩基での予測エラー率の合計の閾値を<1.0 として，各リードの品質フィルタリングを行った。その後，cutPrimers.py v2.0[32] を用いてプライマー配列を除去し，Usearch の "fastx_uniques "コマンドを用いて各ユニーク塩基配列について合計リード数を算出した。その後，Usearch の "unoise3 "コマンドを用いて PCR エラーとキメラリードをデフォルト設定でチェックし，エラー補正を行った。また，最小リード数については 7 以下の配列を削除した。その結果，ZOTU（zero-radius operational taxonomic units）と呼ばれる予測された生物学的配列セットが得られた。最後に，USEARCH を使用して，各サンプルのクオリティフィルターされたリードを，生成された ZOTUs データセットに 97%以上の類似度でマッピングし，保持されるリード数を最大化した。

上記の解析結果から得られた ZOTU についてオンラインでの megablast[33]により，DNA データベースとの相同性解析を実施した。得られた結果から最も相同性の高く，配列一致率 98.5%以上，配列カバー率 99%以上の ZOTU のみを有効データとし，アクセッション番号をリスト化した。それぞれの ZOTU についてアクセッション番号から生物種の紐づけ作業を実施したが，この際，別種であるが，MiFish プライマーの領域では区別できない種が存在するため，結果の精査を行った。精査には環境省が公開している「MiFish に係る誤同定チェックシート ver1.1」を利用した [34]。このシートによるチェックの結果，複数の種に該当した場合は種名を併記したが，県内に生息の記録がない種については必要に応じて表記を修正した(例：チェックシートの表記→ナマズ / イワトコナマズ / タニガワナマズ / ナマズ属の一種[海外]，本報告での表記→ナマズ)。この時，魚類以外の種については無効データとして扱い，この後の解析には使用しなかった。上記作業によりそれぞれの ZOTU について魚種の情報の紐づけを行った後，魚種ごとにリード数を合算した。ここで得られた魚種リストには人為的な排水等に由来する DNA を検出した可能性があるため，さらに結果を手動で精査した。人為的な排水等に由来する DNA を一律に削除することは難しいが，調査地点の標高と生息範囲を考慮し，人為的な影響により DNA が検出されたと考えられる種についてはその後の解析からは除外した。

上記の作業により得られた調査地点ごとの魚種リストと河川ごとにまとめられた魚種リストを，この後の解析に使用した。

２．６ 調査地点ごとの生物群集解析

得られた調査地点ごとの魚類リストを用いて，群集解析を実施した。各地点の Horn 指数による非類似度を R ソフトウエアの Vegan パッケージ v2.6-2[35]により計算し，Cluster パッケージ v2.1.6[36]の k-medoid 法により複数のグループにクラスタリングを行った。クラスタリングの適切なグループ数については pam 関数により計算した平均シルエット値が最大となるグループ数を採用した。シルエット値はクラスタリングの品質を示す値であり，より高い方が適切なクラスタリングが実施されていると判断される。ここでは最も適切なグループ数を設定するため地点間の類似度からシルエット値を算出している。

次に分類されたグループの指標種を特定するため，labdsv パッケージ v2.1-0[37]を用いて IndVal 法[38]による指標種分析($p<0.05$)を実施した。

更に上記で計算した Horn 指数による非類似度から Vegan パッケージを用いて nMDS(非計量多次元尺度構成法)により 2 次元平面上に配置し，グループごとの類似度を可視化した。

上記の解析には R ver.4.4.1[39]を使用した。

２．７ 過去の捕獲調査結果との比較

河川ごとにまとめられた魚種リストを基に過去の捕獲調査で確認された魚種と比較を行った。その際，調査方法の特性から種まで同定できない場合もあったことから比較の際にはその点を考慮した。

比較にあたっては，多摩川，平作川，金目川及び早川については神奈川県内河川の魚類（平成 26 年 3 月）[40]，鶴見川，大岡川及び境川については

表３　各調査地点のクラスタリング結果と指標種

調査地点	標高	種数	グループ 1	2	3	4	5	6	7	8	9
SKW-01	387.8	9				■					
HYK-01	254	13					■				
SGM-01	198.5	13								■	
SKW-02	178	11					■				
KNM-01	124.1	15					■				
SKI-01	95.3	14	■								
SGM-02	91.2	4			■						
TAM-01	78.1	18	■								
SGM-03	77.9	14			■						
SGM-04	75.9	12			■						
TAM-02	69.9	15	■								
SKW-03	53.6	19	■								
TRM-01	51.9	17	■								
TRM-02	43.4	15	■								
KNM-02	41.2	14					■				
SKI-02	41	18	■								
TAM-03	35.6	8	■								
SGM-05	35.5	22				■					
SGM-06	34.8	21	■								
SKW-04	34.1	25				■					
SKW-05	32.7	19							■		
SKI-03	24.3	11	■								
TRM-03	22.7	33								■	
SGM-07	19.1	30							■		
SKW-06	18.4	16							■		
KNM-03	8.6	22	■								
OOK-01	6.9	16						■			
TAM-04	6.3	14		■							
KNM-04	4.2	12									■
HSK-01	3.3	30						■			
TRM-04	3.1	20						■			
OOK-02	3	29						■			
TRM-05	1.9	12						■			
グループ指標種			オイカワ	ミナミメダカ タモロコ /ホンモロコ ドジョウ (大陸系統) コイ	カワヨシノボリ	ウグイ	ー	コノシロ クロダイ	アユ	ホトケドジョウ	ドジョウ (在来系統)

注：緑の塗りつぶしは各グループに属する調査地点を示している。

横浜の川と海の生物（第 15 報・河川編）[41]，相模川については相模川水系の魚類相 [42]，酒匂川については酒匂川水系の魚類相 [43]の調査結果を用いた。

３　結果

ベースコールファイルから出力された生のリードはネガティブコントロールを除き 79,222-148,946 リード/サンプルとなった。データ処理を行った結果，得られた ZOTU 数は 18-131 個/サンプルであり，魚類の種数とリード数はそれぞれ 4-33 種/サンプル, 17,526-130,000 リード/サンプルとなった。全地点合計で 85 種(属あるいは系統含む。以降同じ)の魚類を検出し，その他の生物群(哺乳類，鳥類，爬虫類)を 9 種検出した。

ネガティブコントロールからは 7 つの ZOTU が検出された。これらのうち，サンプルからも検出されたのはウシの DNA のみであり，それらは PCR 試薬の中に意図せず含まれていたことがメーカーから示されている。今回は魚類を対象に解析を実施したため，ネガティブコントロールの結果はサンプルの解析には影響しないことを確認した。

３．１　調査地点ごとの生物群集解析

pam 関数により計算した結果は図 5 のとおりであり，最もシルエット値の高かったのはグループ数が 9 の時であった。そのためグループ数 9 でクラスタリングを実施し，それぞれのグループの指標種を特定した結果を表 3 のとおりまとめた。こ

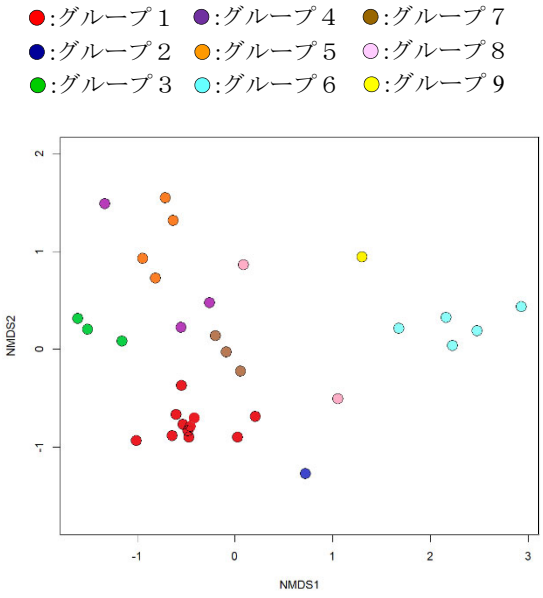


図６　nMDS の結果

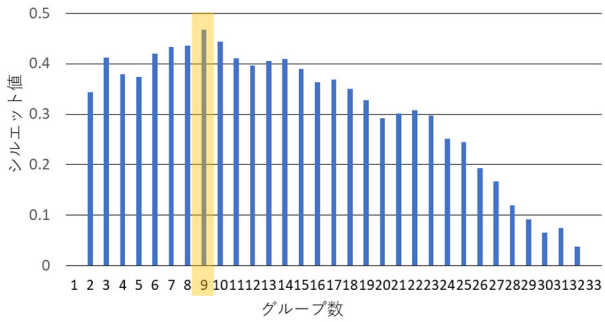


図５　グループ数とシルエット値の関係

ここではすべての調査地点を標高順に並べている。なお，グループ 5 については，指標種は選定されなかった。

また，nMDS の結果は図 6 の通りであった。ここでは k-medoid 法により分けられたグループにより，色分けを行っている。nMDS の結果は各軸の数値には意味をもたず，各地点やグループ間の位置関係からその関係性や類似性を視覚的に把握することが可能である。

３．２　過去の捕獲調査結果との比較

過去の捕獲調査結果との比較を行った結果を表 4 に示す。環境 DNA 調査ではヨシノボリ属等で種の判別できないものがいくつかあり，捕獲調査との間で整合を取った。また，同様に捕獲調査では系統判別できないコイやドジョウについては，環境 DNA 調査との間で整合を取った。

３．３　参加者との調査結果の共有

それぞれの参加者には自ら調査した地点の調査結果を個別に知らせるとともに，全地点の調査結果に関する報告会を 2023 年 12 月 24 日にオンラインで開催し，結果の共有を図った。

その後，参加者へのアンケートを実施し，調査に関する課題や今後の調査に関する希望等の意見をもらった。

４　考察

調査地点のグループ分けについては，指標種等からそれぞれ次のような特徴を持ったグループであることが考えられた。

グループ 1 は最もグループ内の地点数が多く，指標種が県内河川での普通種であるオイカワであったことから，一般的な中流河川の生物相を持った調査地点であることが考えられた。

グループ 2 に属するのは 1 地点のみであり，指

表４　河川別の環境 DNA と捕獲調査結果の比較

目名	科名	種和名	水系	多摩川		鶴見川		大岡川		平作川		境川		相模川		金目川		酒匂川		早川	
			調査地点数	2	4	12	5	7	2	2	1	13	3	40	7	15	4	40	6	7	1
			生態情報	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA	捕獲	eDNA
ヤツメウナ:ヤツメウナギ科	スナヤツメ北方種		G											△				△	○		
ウナギ目	ウナギ科	ニホンウナギ	D	○			○		○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	
ニシン目	カタクチイワシ科	カタクチイワシ	P				○				○										
ニシン目	ニシン科	コノシロ	P				○		○		○										
ニシン目	ニシン科	カタボイワシ	P				○														
ニシン目	ニシン科	サッパ	P				○														
コイ目	コイ科	ヌマムツ	N		○	○		○													
コイ目	コイ科	ゲンゴロウブナ	N	○								○		○	○						
コイ目	コイ科	ギンブナ	U	○	△	○	△	○			△	○	△	○	△	○	△	○	△		
コイ目	コイ科	キンブナ	G													○					
コイ目	コイ科	ソウギョ	A				○														
コイ目	コイ科	コイ（飼育型）	N	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○
コイ目	コイ科	コイ（野生型）	U		○		○		○		○		○		○		○		○		○
コイ目	コイ科	タモロコ	N	○	△	○	△					○	△	○	○	○	○	○	○		
コイ目	コイ科	ホンモロコ	N																		
コイ目	コイ科	ニゴイ	G	○	○		○							○	○	○	○	○			
コイ目	コイ科	カワムツ	N	○		○	○	○				○	○	○	○		○		○		
コイ目	コイ科	オイカワ	N		○	○	○	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
コイ目	コイ科	マルタ	D	○	○	○	○		○												
コイ目	コイ科	ウグイ	G	○			○							○	○	○	○	○	○	○	○
コイ目	コイ科	カマツカ	N	△	○	△	○						○	△	○	△	○	△	○		
コイ目	コイ科	スナゴカマツカ	G		○		○					△			○						
コイ目	コイ科	モツゴ	G		○	○	○					○	○	○	○	○	○	○			
コイ目	コイ科	ビワヒガイ	N											○							
コイ目	コイ科	ムギツク	N		○	○	○							○	○	○					
コイ目	コイ科	アブラハヤ	G	○	○	○	○	○		○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
コイ目	コイ科	タカハヤ	G/N					○	○						○						
コイ目	コイ科	スゴモロコ	N	○	△	△	△											○			
コイ目	コイ科	コウライモロコ	N															○			
コイ目	コイ科	イトモロコ	N			○	○							○	○						
コイ目	ドジョウ科	ヒガシシマドジョウ	G				○	○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○
コイ目	ドジョウ科	ドジョウ（大陸系統）	A	△	○	△	○	△	○		○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○
コイ目	ドジョウ科	ドジョウ（在来系統）	G		○		○								○		○		○		○
コイ目	ドジョウ科	カラドジョウ	A			○															
コイ目	ドジョウ科	ドジョウ属の一種	U		○		○								○		○				
コイ目	ドジョウ科	キタドジョウ	G												○		○		○		
コイ目	フクドジョウ科	ホトケドジョウ	G		○	○	○	○				○			○	○	○	○	○		
ナマズ目	ナマズ科	ナマズ	N	○	○	○	○						○	○	○		○	○	○		
ナマズ目	アカザ科	アカザ	G											○							
サケ目	アユ科	アユ	D	○	○	○	○	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
サケ目	サケ科	サクラマス類	N											○		○	○	○	○	○	○
サケ目	サケ科	アメマス類	N											○		○		○			
サケ目	サケ科	ニジマス	A		○									○	○			○	○		○
ボラ目	ボラ科	ボラ	P			○	○	○	○	○	○	○		○		○	○	○			
トウゴロウ:トウゴロウイワシ科	トウゴロウイワシ		P				○				○										
カダヤシ目	カダヤシ科	カダヤシ	A			○	○					○									
カダヤシ目	カダヤシ科	グッピー	A									○									
ダツ目	サヨリ科	サヨリ	P								○										
ダツ目	メダカ科	ミナミメダカ	U	○	○	○	○	○	○		○	○		○	○	○	○	○	○		
スズキ目	アジ科	マアジ	P						○												
スズキ目	イソギンポ科	トサカギンポ	P				○		○		○										
スズキ目	イソギンポ科	イダテンギンポ	P				○														
スズキ目	カジカ科	カジカ	G											○	○	○	○	○	○		
スズキ目	カジカ科	カマキリ	G											○		○					
スズキ目	カワアナゴ科	カワアナゴ	D				○			○											
スズキ目	ケツギョ科	オヤニラミ	N																○		
スズキ目	コチ科	マゴチ	P						○												
スズキ目	サバ科	カツオ	P						○												
スズキ目	サンフィッシュ科	ブルーギル	A		○	○	○								○						
スズキ目	サンフィッシュ科	コクチバス	A	○	○									○							
スズキ目	サンフィッシュ科	オオクチバス	A			○							○	○					○		
スズキ目	シマイサキ科	シマイサキ	P								○	○									
スズキ目	ユゴイ科	ユゴイ	P													○				○	
スズキ目	スズキ科	スズキ	P			○	○		○		○										
スズキ目	スズキ科	ヒラスズキ	P								○										
スズキ目	タイワンドジョウ科	カムルチー	A										○	○			○				
スズキ目	タイ科	キチヌ	P				○		○		○										
スズキ目	タイ科	クロダイ	P				○	△	○		○	○									
スズキ目	ドンコ科	ドンコ	N				○							○	○						
スズキ目	ニベ科	シログチ	P						○												
スズキ目	ハゼ科	マハゼ	P			○	○	○	○		○	○		○		○	○				
スズキ目	ハゼ科	アシシロハゼ	P							○	○										
スズキ目	ハゼ科	モヨウハゼ / ツマグロスジハゼ	P								○										
スズキ目	ハゼ科	スジハゼ	P						○		○										
スズキ目	ハゼ科	タネハゼ	P						○												
スズキ目	ハゼ科	ウロハゼ	P				○	○	○												
スズキ目	ハゼ科	ビリンゴ	D			○	○	○	○												
スズキ目	ハゼ科	ニクハゼ	P				○		○												
スズキ目	ハゼ科	スミウキゴリ	D	○	○	○		○	○		○	○		○	○	○	○	○	○	○	
スズキ目	ハゼ科	ウキゴリ	D	○		○	○	○	○	○		○		○		○	○	○			
スズキ目	ハゼ科	ドロメ	P					○													
スズキ目	ハゼ科	ミミズハゼ	D									○					○				
スズキ目	ハゼ科	アベハゼ	P			○	○	○	○	○	○										
スズキ目	ハゼ科	サツキハゼ	P								○										
スズキ目	ハゼ科	ヒナハゼ	D			○	○	○	○		○	○									
スズキ目	ハゼ科	カワヨシノボリ	N		○	○	○					○	○	○	○				○		
スズキ目	ハゼ科	シマヨシノボリ	D		○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
スズキ目	ハゼ科	ゴクラクハゼ	D			○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○			
スズキ目	ハゼ科	トウヨシノボリ	D			△		△				△		○				○		○	
スズキ目	ハゼ科	クロヨシノボリ	D																		
スズキ目	ハゼ科	オオヨシノボリ	D		△		△			○		○	△		△	○	△	○	△	○	△
スズキ目	ハゼ科	ルリヨシノボリ	D													○		○		○	
スズキ目	ハゼ科	クロダハゼ	D			○						○									
スズキ目	ハゼ科	ボウズハゼ	D									○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
スズキ目	ハゼ科	シモフリシマハゼ	D			○	○														
スズキ目	ハゼ科	ヌマチチブ	D	○		○		○				○		○		○		○		○	
スズキ目	ハゼ科	チチブ	D		△	○	△	○	△	○	△	○			△		△		△		
スズキ目	ハゼ科	アカオビシマハゼ	P				○		○		○										
スズキ目	ハタ科	アカハタ	P						○												
スズキ目	メジナ科	メジナ	P						○		○										
カレイ目	カレイ科	マコガレイ	P								○										
フグ目	フグ科	クサフグ	P									○									
			確認種数	20	29	38	55	27	36	11	30	33	20	41	37	32	34	33	30	17	13

生態情報G：純淡水魚・在来種，N：純淡水魚・国内外来種，A：純淡水魚・国外外来種，U：純淡水魚・不明種，D：遡し回遊魚，P：周縁魚

注：△については、属止めの場合や2種の区別がつかない場合など、単一の種と同定できなかったことを示している。

標種として比較的田んぼや用水路等に関連する種が多く，そういった環境の影響を大きく受けた調査地点であると考えられた。

グループ 3 は純淡水魚の移入種であるカワヨシノボリが指標種となっており，その他のヨシノボリ属よりも優先している点等から河川の連続性が確保されていない調査地点の可能性が考えられた。

グループ 4 は指標種が在来種のウグイであり，調査結果を見ても在来種が多い点から，比較的人為的な生物相の改変の影響が少ない地点であることが考えられた。

グループ 5 については指標種も選定されず，nMDS の結果からはグループ 4 とも近い関係にあるが，明確な傾向を読み取ることは難しかった。

グループ 6 は指標種がコノシロとクロダイであり，河口域あるいは感潮域で調査した地点と考えられた。nMDS の結果からもこのグループは他の調査地点と比べて距離が離れており，感潮域の生物相を反映した結果であることが確認された。

グループ 7 は指標種がアユであり，グループに属する河川も相模川と酒匂川であることからアユの放流により影響を受けている地点と考えられた。

グループ 8 は指標種がホトケドジョウであり，調査地点は湧水環境からの流れ込み等の影響がある調査地点と考えられた。

グループ 9 に属するのは 1 地点のみであり，金目川の本流ではなく，金目川の河口近くに流れ込む小河川で採取されたものであった。この地点では全県的に非常に少なくなっていると考えられる在来系統のドジョウが指標種となっており，希少な生物相が残されていると考えられた。nMDS の結果からもグループ 6 に近い場所に位置しており，軽微ながら感潮域の影響を受けた生物相となっていることも確認された。

河川ごとにまとめた結果をみると，環境 DNA 調査で最も種数が多かったのは鶴見川の 55 種であり，次いで相模川 37 種，大岡川 36 種と続いた。鶴見川では調査地点数が 5 地点と相模川の調査地点数 7 地点に比べて多くはなかったが，グループ 6 に属する感潮域での調査地点が 2 地点あったことから，河口域や海域に生息する魚の DNA も検出したことで種数の増加につながったものと考えられた。河口域での捕獲調査は河川の構造によっては船での調査が必要となる等比較的費用や手間がかかることが想定されるが，環境 DNA 調査であれば橋の上から採水カップを下ろして採水すればよいという点からこういった水域での調査には非常に有用であることが明らかとなった。

個別の種について着目すると，スナヤツメ北方種は在来種と考えられているが，別種とされるスナヤツメ南方種と酷似しており，形態からの同定が困難である。神奈川県の希少淡水魚生息状況-Ⅳ(平成 17～26 年度)[44]の報告では琵琶湖水系由来の移入種であるスナヤツメ南方種の侵入とスナヤツメ北方種の生息域の減少が報告されている。今回酒匂川水系でスナヤツメ北方種が検出されたことは希少種保全の観点から非常に重要な発見であり，今後は県のレッドデータへの反映等を進めていく必要がある。また，外来種については，酒匂川でオヤニラミの DNA が検出された点に着目した。オヤニラミは京都府以西の西日本に広く分布するケツギョ科の淡水魚で，在来分布においては生息数が減っており，環境省のレッドリスト絶滅危惧種 IB 類に選定されているが，中部地方や関東地方の一部に導入され，これらの地域では環境省の「生態系被害防止外来種リスト[45]」の総合的に対策が必要な外来種に指定されている。過去にセンターが実施した魚類の捕獲調査[26]では記録のなかった魚種であるが，2021 年 10 月に県の博物館の瀬能氏が酒匂川水系狩川支流の分沢川においてオヤニラミの幼魚を捕獲しており[46]，センターが現在実施している令和 6 年度の酒匂川水系調査でも同様に分沢川の森と水の公園上流でオヤニラミを捕獲している。瀬能氏によれば「生息適地を考慮した導入であることが明白で，一定以上の飼育経験や知識がある者による仕業であることが強く疑われる事例」[46]とされ，生物多様性の問題に対する正しい理解と周知の重要性を示している事例と言える。更に今回オヤニラミの DNA が検出されたのは同じ狩川水系であるが分沢川よりも上流の地点であり，分沢川に生息していたオヤニラミが生息域を拡大したのか，あるいは分沢川以外にも意図的な放流が行われたのかは不明であるが，追加的な調査を行い，生息範囲の把握と拡大防止のための対策を行う必要があると考えられた。

捕獲調査結果との比較については，両手法で検出された種，片方の手法で検出された種等様々であったが，全体的には河川に生息する普通種につ

いてはおおむね両手法とも同じ結果が得られた。これは市民参加型の調査でも環境 DNA 調査であれば非常に精度よく調査地点周辺の生物相を把握できることを示している。今後は捕獲調査だけでなく環境 DNA 調査も補完的に活用していくことで，県内河川の生物相が明らかになり，河川生態系の変化などについても把握することが可能となると期待される。

今回調査してもらったサンプルは微量ながらコンタミネーションが疑われる配列が含まれていたものの，これらは河川での調査では一般的に検出される範囲内のものであった。上記の通り捕獲調査と比較しても精度に関しては非常に高いものであると考えられた。一般的に市民調査については調査精度を担保するうえで標準化やデータの検証が必要であるという指摘[47]にしばしば直面する。センターで実施している県民参加型の生物捕獲調査でも年に何度も講習会を開催し，調査精度の向上に努めている[26]。今回の環境 DNA 調査では調査マニュアルを作成し，オンラインでの調査説明会を開催して調査方法を説明したのみで，それぞれの参加者に現地での講習会までは実施しなかった。これは市民調査として考えた場合，標準化にかけたコストは非常に低いといえる。またデータ検証についても環境省作成のチェックシート[34]を活用することで比較的労力をかけずに検証を行うことができた。それでも今回のように高い精度での調査を実現することができた点は環境 DNA 調査と市民調査の親和性の良さを示していると考えられる。

一方で課題としては陸水環境の生物多様性保全を考えた場合，魚類のみを調査対象とするだけで十分に保全可能なのかという点について懸念がある。実際に，調査後に参加者からどのような生物群に興味があるかアンケートを実施したところ，魚類の他，両生類，哺乳類，水生昆虫類，特定外来生物等様々な生物調査に関心があることが示されていた。この点については今後環境 DNA 技術をさらに発展させることで様々な生物群に対して調査可能な技術が開発されることが期待される。また，今回の調査では共創の場形成支援プログラムの一環として実施したが，環境 DNA 調査については一定の調査費用が必要なため，継続的に調査をするための財源の確保も課題となる。近年では生物多様性も含めた自然資本の劣化が経済的なリスクと認識され始めており[48]，TNFD*を始めとしたネイチャーポジティブのための取組を企業が求められている状況である。このような流れをうまく活用し，県内の企業とも連携して環境 DNA の調査と生物多様性保全の取組みを進めることが今後重要となっていくと考えられる。環境 DNA 技術はまだまだ発展途上の技術であり，得られた結果を解析し，生物多様性保全の現場で活用可能なデータにしていくといった点についてもまだまだ多くの課題が残されている状況である。

ただ，いくつもの課題がありつつも，今後生物多様性の問題はさらに重要性を増していくことは明らかであり，その中で市民参加による環境 DNA 調査は大きな役割を果たしていくことが期待される。今後は今回のような取り組みを継続・発展させていくことで県内の生物多様性を明らかにし，地域の希少な生物多様性の保全につなげていくことが期待される。

＊:Taskforce on Nature-related Financial Disclosures の略であり，企業や金融機関が自然環境や生物多様性に関するリスクや機会を評価・開示するためのフレームワークを提供する国際的な組織

謝辞

本報告の基となった令和 5 年度河川環境 DNA 調査プロジェクトの調査にご参加いただきました皆様にこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

1) IPBES (2019): Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1148 pages.
2) 神奈川県: 「かながわ生物多様性計画 2024-2030」のページ https://www.pref.kanagawa.jp/docs/t4i/cnt/f12655/p1042709.html (2024.9 参照)
3) 長谷部 勇太,濱邉一弥,武田麻由子,中山駿一,菊池宏海,勝呂尚之, 環境 DNA を用いた県内生物多様性調査手法の確立, 神奈川県環境科学センター研究報告第 45 号(2022)
4） Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., and

Taberlet, P. :Species detection using environmental DNA from water samples. Biol. Lett. 4, 423–425. (2008).

5) 長谷部 勇太，白子 智康，指標種に着目した環境 DNA の基礎研究，神奈川県環境科学センター研究報告 No.43 (2020)

6) 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，全国環境研会誌 Vol.44 No.2（2019）

7) Fukumoto, S., Ushimaru, A. and Minamoto, T., A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. J Appl Ecol, 52: 358-365.(2015) https://doi.org/10.1111/1365-2664.12392

8) Katano I, Harada K, Doi H, Souma R, Minamoto T Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. PLoS ONE 12(5): e0176541.(2017) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176541

9) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. and Iwasaki W. ,MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine speciesR. Soc. Open Sci.2150088 (2015) http://doi.org/10.1098/rsos.150088

10) Komai T, Gotoh RO, Sado T, Miya M,Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. Metabarcoding and Metagenomics 3: e33835.(2019) https://doi.org/10.3897/mbmg.3.33835

11) Ushio M, Fukuda H, Inoue T, et al. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. Mol Ecol Resour. 2017; 17: e63–e75. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12690

12) Ushio, M., Murata, K., Sado, T. et al. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. Sci Rep 8, 4493 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-22817-5

13) Takenaka, M., Hasebe, Y., Yano, K., Okamoto, S., Tojo, K., Seki, M., Sekiguchi, S., Jitsumasa, T., Morohashi, N., Handa, Y., & Sakaba, T., Environmental DNA metabarcoding on aquatic insects: Comparing the primer sets of MtInsects-16S based on the mtDNA 16S and general marker based on the mtDNA COI region. Environmental DNA, 6, e588.(2024) https://doi.org/10.1002/edn3.588

14) Sakata MK, Kawata MU, Kurabayashi A, Kurita T, Nakamura M, Shirako T, Kakehashi R, Nishikawa K, Hossman MY, Nishijima T, Kabamoto J, Miya M, Minamoto T, Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. Metabarcoding and Metagenomics 6: e76534. (2022) https://doi.org/10.3897/mbmg.6.76534

15) Darling JA, Mahon AR.:From molecules to management:adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. Environmental Research,111:978-988 (2011).

16) 清野聡子，環境 DNA の市民科学で見直す地域の自然-技術的課題と解決の可能性-，水環境学会誌，46(A)，331-335(2023)

17) J. Biggs, N. Ewald, A. Valentini, C. Gaboriaud, T. Dejean, R.A. Griffiths, J. Foster, J.W. Wilkinson, A. Arnell, P. Brotherton, P. Williams, F. Dunn,Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (Triturus cristatus),Biol. Conserv., 183 (2015), pp. 19-28, 10.1016/j.biocon.2014.11.029

18) Larson, E.R., Renshaw, M.A., Gantz, C.A. et al. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive crayfishes Orconectes rusticus and Pacifastacus leniusculus in large lakes of North America. Hydrobiologia 800, 173–185 (2017). https://doi.org/10.1007/s10750-017-3210-7

19)Kvalheim, L., Stensrud, E., Knutsen, H., Hyvärinen, O., & Eiler, A., Integration of citizen science and eDNA reveals novel ecological insights for marine fish conservation. *Environmental DNA*, 6, e584.(2024) https://doi.org/10.1002/edn3.584

20) Tøttrup, A.P., Svenningsen, L., Rytter, M., Lillemark, M.R., Møller, P. and Knudsen, S.W. ,‘Citizens in the Lab: Performance and Validation of eDNA Results’,Citizen Science: Theory and Practice, 6(1), p. 35.(2021) https://doi.org/10.5334/cstp.382.

21) 神奈川県：環境 DNA のページ，https://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/suigen/edna.html (2024.9 参照)
22) Miya M, Sado T, Oka S-i, Fukuchi T, The use of citizen science in fish eDNA metabarcoding for evaluating regional biodiversity in a coastal marine region: A pilot study. Metabarcoding and Metagenomics 6: e80444.(2022) https://doi.org/10.3897/mbmg.6.80444
23) アースウォッチジャパン: 環境 DNA を用いた魚類調査プロジェクト，https://www.earthwatch.jp/?product=edna (2024.9 参照)
24) Suzuki-Ohno, Y., Tanabe, A. S., Kasai, A., Masuda, R., Seino, S., Dazai, A., Suzuki, S., Abe, T., & Kondoh, M.,Evaluation of community science monitoring with environmental DNA for marine fish species: “Fish survey project using environmental DNA”. Environmental DNA, 5, 613–623.(2023) https://doi.org/10.1002/edn3.425
25) 神奈川県: 令和 3 年度県民ニーズ調査結果(第 2 回課題調査) https://www.pref.kanagawa.jp/docs/h3e/cnt/f3489/220210.html (2024.9 参照)
26) 神奈川県: 河川のモニタリング調査 https://www.pref.kanagawa.jp/docs/b4f/suigen/top.html (2024.9 参照)
27) 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) https://doi.org/10.1002/edn3.121
28) Guenay-Greunke, Y., Bohan, D.A., Traugott, M. et al. Handling of targeted amplicon sequencing data focusing on index hopping and demultiplexing using a nested metabarcoding approach in ecology. Sci Rep 11, 19510 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-98018-4
29) Edgar RC:Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics. 2010 Oct 1;26(19):2460-1, (2010).
30) Edgar, R. C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. Preprint at bioRxiv,(2016).
31) Anthony M. Bolger, Marc Lohse, Bjoern Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, Bioinformatics, Volume 30, Issue 15, August 2014, Pages 2114–2120, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170
32) Kechin A, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M. cutPrimers: A New Tool for Accurate Cutting of Primers from Reads of Targeted Next Generation Sequencing. J Comput Biol. 2017 Nov;24(11):1138-1143.
33) National Center for Biotechnology Information: BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome(2024.9 参照)
34) 環境省: 環境 DNA 調査 https://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html (2024.9 参照)
35) Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., … Weedon, J., vegan: Community ecology package. R Package Version 2.6.4. (2022) https://CRAN.R-project.org/package=vegan
36) Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, Hornik K, cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.1.6 — For new features, see the 'NEWS' and the 'Changelog' file in the package source) (2023) https://CRAN.R-project.org/package=cluster.
37) Roberts, D.W. ,Labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology. R Package Version 2.1-0.(2019) https://CRAN.R-project.org/package=labdsv
38) Dufrêne, M. and Legendre, P., SPECIES ASSEMBLAGES AND INDICATOR SPECIES:THE NEED FOR A FLEXIBLE ASYMMETRICAL APPROACH. Ecological Monographs, 67: 345-366. https://doi.org/10.1890/0012-9615(1997)067[0345:SAAIST]2.0.CO;2
39) R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing_. R Foundation for

Statistical Computing, Vienna, Austria. (2024) <https://www.R-project.org/>.
40) 神奈川県: 神奈川県内河川の魚類（平成 26 年 3 月）https://www.pref.kanagawa.jp/documents/72222/kasennogyorui0-16.pdf (2024.9 参照)
41) 横浜市:横浜の川と海の生物（第 15 報・河川編）https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/machizukuri-kankyo/kankyohozen/kansoku/science/shiryo/kawatoumi/kawaumi15kasen.html (2024.9 参照)
42) 齋藤 和久, 金子 裕明, 勝呂 尚之, 相模川水系の魚類相,神奈川自然誌資料(31):59-68(2010)
43) 齋藤 和久, 金子 裕明, 勝呂 尚之, 酒匂川水系の魚類相,神奈川自然誌資料(33):103-112 (2012)
44) 勝呂 尚之, 神奈川県の希少淡水魚生息状況-Ⅳ(平成 17～26 年度),神奈川県水産技術センター研究報告第 10 号(2019)
45) 環境省:生態系被害防止外来種リスト https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/iaslist.html (2024.9 参照)
46) 瀬能 宏, 絶滅危惧種にとどめ!?-最近の足柄平野の外来魚事情-, 自然科学のとびら第 27 巻 4 号(2021)
47) Bonter, D.N. and Cooper, C.B., Data validation in citizen science: a case study from Project FeederWatch. Frontiers in Ecology and the Environment, 10: 305-307.(2012) https://doi.org/10.1890/110273
48) World Economic Forum (WEF) (2020) “Nature Risk Rising: Why the Crisis Engulfing Nature Matters for Business and Economy” https://www3.weforum.org/docs/WEF_New_Nature_Economy_Report_2020.pdf (2024.9 参照)