



絶滅危惧種カゼトゲタナゴの環境 DNA 分析を用いた検出法の確立

百富修平¹・柞磨佑紀¹・梅村啓太郎¹・栗田喜久¹・鬼倉徳雄¹

Author & Article Info

¹九州大学大学院生物資源環境科学府（福津市）
 SM: momodomi.shuhei.687@s.kyushu-u.ac.jp (corresponding author)
 YK: kurita.yoshihisa.070@m.kyushu-u.ac.jp
 NO: onikura@agr.kyushu-u.ac.jp

Received 16 December 2022
 Revised 25 December 2022
 Accepted 28 December 2022
 Published 01 January 2023
 DOI 10.34583/ichthy.28.0_1

Shuhei Momodomi, Yuuki Taruma, Keitaro Umemura, Yoshihisa Kurita and Norio Onikura. 2023. Development of environmental DNA analysis for an endangered bitterling fish, *Rhodeus smithii atremius*. Ichthy, Natural History of Fishes of Japan, 28: 1–5.

Abstract

Rhodeus smithii atremius is an endangered bitterling fish, native to Kyushu Island and the Iki Islands, Japan. In this study, we developed a monitoring method of *R. s. atremius* using environmental DNA (eDNA). For quantitative real-time PCR, we designed primers and probe specific to the mitochondrial cytochrome *b* gene of *R. s. atremius*. We confirmed the usability of this method in aquarium experiments. Then, we sampled water for eDNA analysis and captured the fish at 14 points in the Onga River basin inhabited by *R. s. atremius*, and examined the relationship between the occurrence of the fish and eDNA detection. The detection coincided with fish occurrence. In addition, the particularly high concentration of eDNA corresponded to high catch per unit effort. These results demonstrate the reliability and usefulness of this method for conservation of the species.

カゼトゲタナゴ *Rhodeus smithii atremius* (Jordan and Thompson, 1914) は、コイ科タナゴ亜科に属するバラタナゴ属の一種で、九州北部と壱岐島にのみ生息する日本固有の淡水魚である（阿部ほか，2015）。本亜種の主要な生息環境である河川の中下流域や付随する農業用水路などは、急速に減少しつつあり（阿部ほか，2015），産卵母貝として利用する二枚貝も減少している。本種は環境省レッドリスト（環境省，2020）で絶滅危惧 IB 類に指定されるだけでなく、福岡県、佐賀県、長崎県、大分県、熊本県のいずれのレッドリストにも掲載されており（佐賀県，2003；福岡県，2014；熊本県，2019；長崎県，2022；大分県，2022），

その生息地の把握と保全は急務であると言える。

近年、採捕調査に代わる新しい生息地把握手法として環境 DNA 分析技術が急速に広まっている。環境 DNA とは、環境中に放出された DNA のことで、水中には生物の排泄物、粘液、および配偶子などに由来する DNA が含まれていると考えられている（Ficetora et al., 2008）。この環境 DNA を分析することで、生息する生物種や生物量の推定・把握が可能となる（高原ほか，2016）。この手法では現地での調査が採水のみであるという簡便さから、従来の手法と比べ大幅にコストを削減できる可能性も指摘されている（Takahara et al., 2012）。本研究は、種特異的な検出系を設け、飼育水と自然水域から環境 DNA 検出を行うことで、カゼトゲタナゴの環境 DNA 検出系の確立を目的とした。

材料と方法

カゼトゲタナゴに特異的なプライマー・プローブセットの設計 環境 DNA を用いてカゼトゲタナゴの在・不在を調査するためには、他種の環境 DNA を誤って検出しないように、種特異的な検出系を設ける必要がある。本研究では PCR 産物の検出に標的配列に特異的に結合するプローブを用いることで、通常の PCR 法よりも検出の特異性を高めることができる（高原ほか，2016）、Taqman プローブ法を用いたりリアルタイム PCR による検出系の確立を試みた。

カゼトゲタナゴと近縁な種の塩基配列を比べるため、アメリカ国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information: NCBI）のデータベースから九州北部に生息するコイ科タナゴ亜科魚類のミトコンドリア DNA の cytochrome *b* 領域の遺伝子配列情報を以下の通り得た。カゼトゲタナゴ：AB109007, AB366484, AB366485, KF410759；ヤリタナゴ *Tanakia lanceolata* (Temminck and Schlegel, 1846)：AB108870；セボシタビラ *Acheilognathus tabira nakamurae* Arai et al., 2007：AB366471；アブラボテ *Tanakia limbata* (Temminck and Schlegel, 1846)：AB108935；カネヒラ *Acheilognathus rhombeus* (Temminck and Schlegel,

A Forward		5´	-----	3´
<i>R. s. atremius</i>	T T C A G T G A A T C T G A G G C G G G T T C			
<i>R. o. kurumeus</i>	T T C A A T G G A T T T G A G G C G G A T T T			
<i>R. o. ocellatus</i>	T T C A A T G G A T T T G A G G C G G A T T T			
<i>T. limbata</i>	T T C A A T G A A T C T G A G G G G G A T T T			
<i>T. lanceolata</i>	T C C A A T G A A T T T G G G G A G G C T T T			
<i>A. t. nakamurae</i>	T T C A A T G A A T C T G A G G C G G A T T C			
<i>A. rhombeus</i>	T A C A A T G A A T T T G A G G G G G A T T T			
<i>A. cyanostigma</i>	T T C A A T G A A T T T G A G G C G G A T T T			
B Reverse		5´	-----	3´
<i>R. s. atremius</i>	C T A A A C T C C G A C G C G G A T A A G A			
<i>R. o. kurumeus</i>	C T A A A C T C T G A C G C C G A C A A A A			
<i>R. o. ocellatus</i>	C T A A A C T C C G A C G C C G A C A A A A			
<i>T. limbata</i>	C T A A A T T C T G A C G C G G A C A A A A			
<i>T. lanceolata</i>	C T A A A C T C T G A C G C G G A C A A A A			
<i>A. t. nakamurae</i>	C T A A A C T C C G A C G C G G A C A A A A			
<i>A. rhombeus</i>	T T A A A C T C C G A C G C A G A C A A A A			
<i>A. cyanostigma</i>	T T A A A T T C C G A C G C A G A C A A A A			
C Probe		5´	-----	3´
<i>R. s. atremius</i>	C T T C T C C C C T T T G C A G T C G C A			
<i>R. o. kurumeus</i>	C T A T T C C C A T T T G T A A T C G C C			
<i>R. o. ocellatus</i>	C T A T T T C C A T T T G T A A T C G C C			
<i>T. limbata</i>	C T C C T C C C A T T T G T C G T C G C C			
<i>T. lanceolata</i>	C T C C T C C C A T T T A T T G T T G C T			
<i>A. t. nakamurae</i>	C T C C T C C C A T T C A T C G T T G C C			
<i>A. rhombeus</i>	C T C C T C C C A T T T A T C G T T G C C			
<i>A. cyanostigma</i>	C T T C T T C C A T T C A T C G T C G C C			

Fig. 1. DNA sequence of each bitterling fish of the part corresponding to primers and probe developed in the present study. Shading indicates sequence differences. A: forward primer; B: reverse primer; C: probe. The actual reverse primer sequence is complementary to this sequence.

1846) : AB109002 ; ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* Jordan and Thompson, 1914 : AB366506 ; タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* (Kner, 1866) : LC647043 ; イチモンジタナゴ *Acheilognathus cyanostigma* Jordan and Fowler, 1903 (国内外来種) : AB109008. 各種の配列情報について MEGA7 (Kumar et al., 2016) を用いてアラインメントし、カゼトゲタナゴに特異的となるようプライマーおよびプローブを設計した。得られたプライマー・プローブセットは、増幅領域長 125bp のプライマーセットおよびその増幅領域を認識するプローブで、その配列情報は以下の通りである。フォワード : Raa-CytB-F (5'-TTCAGTGAATCTGAGGCGGGTTC-3'), リバース : Raa-CytB-R (5'-TCTTATCCGCGTCGGAGTTAGA-3'), プローブ : Raa-CytB-P (5'-FAM-CTTCTCCCCTTTGCAGTCGCA-TAMRA-3'). 他種を誤検出する可能性をできるだけ低くするため、プライマー・プローブの 3' 末端側にカゼトゲタ

ナゴに特異的な配列が多くなるよう設計した (Fig. 1). 先述のタナゴ亜科魚類 8 種の抽出 DNA と、プライマー・プローブセットに加え PCR キット (Robust HotStart PCR Kit, Kapa Biosystems) を用いて PCR を行った。PCR はサーマルサイクラー (T100™ Thermal Cycler, BIO-RAD) を使用し、95°C で 30 秒の後、95°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 15 秒からなるサイクルを 30 サイクル行った。得られた PCR 産物は、電気泳動装置 (Mupid®-exU, タカラバイオ) で 100 V、20 分の電気泳動を行った。また、塩基配列相同性検索 (BLAST®, NCBI) で、増幅領域の配列のホモロジー検索を行い、カゼトゲタナゴの登録配列のみが一致率 100% となることを確認した。

飼育水槽からの採水 水槽内のカゼトゲタナゴ重量と検出される環境 DNA 濃度の関係を調べるため、水槽実験を行なった。水量 1L, 5L, 10L, 25L, 50L の水槽を用意し、各水槽に福岡県の遠賀川流域で採捕したカゼトゲタナゴを 3 個体ずつ投入した。投入から 12 時間後に各水槽から 1L 採水し、投入個体の重量を計測した。コンタミネーションの有無を調べるため、カゼトゲタナゴを投入しない水槽を用意して同様に採水し、ネガティブコントロールとした。各水槽は水面近くでエアレーションを行い、蓋を設置した。水槽やその他の器具は、採水ボトルと同様に使用前に次亜塩素酸ナトリウムで漂白し、脱イオン水で洗浄した。得られた結果から、Microsoft Excel® (Microsoft) を用いてピアソンの積率相関係数検定を行った。

自然水域での採水 遠賀川流域において、九州大学水産実験所が保有する魚類相データ (非公開) をもとに、過去にカゼトゲタナゴの採集記録がある 3 地点を含む 14 地点を選出した。カゼトゲタナゴの産卵期である 2019 年 6 月 4 日に、各地点において右岸・流心・左岸の 3 か所で 500 ml ずつ採水した。採水ボトルは、使用前に次亜塩素酸ナトリウム (市販品の 10% 濃度) で漂白して脱イオン水で洗浄し、調査地で 3 度共洗いしてから採水を行った。また輸送時の DNA 混入による汚染の有無を確認するため、同様のボトルに脱イオン水を入れてネガティブコントロールとした。すべてのサンプルに塩化ベンザルコニウムを最終濃度 0.01% になるように加えて、氷冷して同一のクーラーボックスに入れて持ち帰った。

濾過および DNA 抽出 採水したサンプルは、その日のうちに GF/F ガラスフィルター (pore size c. 0.7 μm, Cytiva) で濾過した。フィルターからの抽出は唾液採取用チューブ (Salivette®, Sarstedt) および DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) を用いて DNA 溶液を抽出した。詳細な手順は環境 DNA 調査・実験マニュアル (環境 DNA 学会, 2020) に準拠した。抽出した DNA 溶液は -20°C で保管した。

リアルタイム PCR による環境 DNA の検出 環境

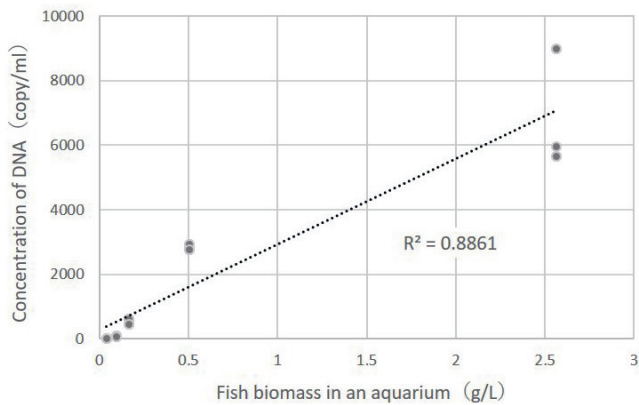


Fig. 2. Relationship of concentration of DNA (vertical axis) and fish biomass in an aquarium (horizontal axis).

DNA の検出は、リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems® StepOnePlus™, Thermo Fisher Scientific) を用いて定量 PCR を行った。先述したプライマー・プローブセットに加え、qPCR マスターミックス (Probe qPCR Mix, with UNG, タカラバイオ) を使用し、定量化のための検量線は、PCR 毎にプラスミドによってクローニングされたカゼトゲタナゴの人工 DNA の 15000, 1500, 150, 15 copies / μ L の希釈系列から作成した。希釈系列および超純水を用いたネガティブコントロールは各 3 反復、採水サンプルは各 4 反復 PCR を行った。反応条件は、25°C で 10 分、95°C で 15 秒の後、95°C で 5 秒、55°C で 15 秒、72°C で 15 秒からなるサイクルを 55 サイクル行った。なお、1 サンプルにつき 4 反復の分析を行ったため、地点ごとのコピー数は 12 反復 (流心, 右岸, 左岸) の平均値とした。ただし、水槽実験のサンプルは 3 回 PCR を行い、それぞれの平均値を記録した。在・不在の判断は、12 反復中 1 反復でも増幅が確認された場合を在とした。また増幅が確認された野外サンプルの PCR 産物の一部は、ダイレクトシーケンス (株式会社ファスマック) を行い、産物の配列決定を行った。

カゼトゲタナゴの捕獲調査 天然水域については、採水と同地点において、2019 年 6 月 12 日、14 日、18 日の 3 日間で採捕による魚類相調査を行い、カゼトゲタナゴの在・不在を確認した。採捕は投網とたも網を用いて、3 人で各地点 30 分から 1 時間程度行い、捕れた魚種とその個体数を記録した。

結 果

カゼトゲタナゴに特異的なプライマー・プローブセットの設計 得られたプライマー・プローブセットを用いて、カゼトゲタナゴおよび前述した九州北部産の近縁種 (材料と方法を参照) の抽出 DNA を鋳型とした、PCR および PCR 産物の電気泳動を行った。その結果、増幅された DNA のバンドはカゼトゲタナゴからのみ確認され、他種およびネガティブコントロールでは増幅が認められなかつ

た。

採水サンプルからの環境 DNA 検出 飼育水槽から採水したサンプルについて、ネガティブコントロールを除くすべてからカゼトゲタナゴの環境 DNA が検出された。水槽実験におけるカゼトゲタナゴの密度とリアルタイム PCR で検出された環境 DNA 濃度は正の相関 ($r^2 = 0.886$, $p < 0.01$) を示した (Fig. 2)。

遠賀川水系内で採水したサンプルについては、14 地点中 3 地点で環境 DNA の増幅が確認された (Table 1)。3 地点のうち 2 地点は過去に採集記録がある地点で、1 地点は記録の無い地点であった。PCR 産物のダイレクトシーケンスによって得られた配列について、塩基配列相同性検索を用いてホモロジー検索を行った結果、PCR 産物はカゼトゲタナゴのものであることが確認された。

カゼトゲタナゴの捕獲調査 採捕調査では、環境 DNA の増幅が確認された 3 地点でカゼトゲタナゴを採捕することができ、他の地点では採捕されなかった (Table 1)。ただし、降雨による増水のため、1 地点で採捕調査を実施できなかった。採捕調査の結果をもとに、単位漁獲努力量あたりの採捕個体数 (CPUE: 採捕数/時間/人) を算出して、検出された環境 DNA 量の関係を比較したところ、CPUE が 1 を下回った 2 地点に比べて、CPUE が高かった 1 地点 (CPUE 4.22) の環境 DNA 量が著しく高い値となった (Table 1)。

考 察

本研究で設計したプライマーを用いて、カゼトゲタナゴおよび九州北部に生息するタナゴ亜科 7 種の DNA を鋳型とする PCR を実施した結果、カゼトゲタナゴのみ増幅が確認された。また、今回設計したプライマーの特異性をプライマーデザインツール (Primer-BLAST, NCBI) で確

Table 1. Results of the present field survey at 14 sites in the Onga River basin (capturing records of *R. s. atremius*, concentration of DNA, and CPUE).

Site No.	record	concentration (/ml)	CPUE
1	present	96.353	0.33
2	absent	0	0
3	present	5153.437	4.22
4	present	64.447	0.33
5	absent	0	0
6	absent	0	0
7	absent	0	0
8	absent	0	0
9	absent	0	0
10	absent	0	0
11	absent	0	0
12	absent	0	0
13	absent	0	0
14	absent	0	— ¹

¹Sampling could not be conducted due to high water.

認したところ、両プライマー配列に対して1塩基も変異をもたないのはカゼトゲタナゴのみであった。タナゴ亜科以外のコイ科魚類の本プライマーに相当する部分の配列においては、少なくとも計4塩基以上の変異があり、かつ、どちらか一方もしくは両方のプライマーの3'末端側から5塩基以内に変異が存在することが確認された。さらに、定量PCR産物のダイレクトシーケンスの結果、増幅された環境DNAの塩基配列がカゼトゲタナゴの塩基配列と一致したことから、本プライマーを用いて、カゼトゲタナゴの環境DNAを特異的に増幅できると考えられる。本研究で行った飼育水槽と自然水域における採水サンプルからの解析では、カゼトゲタナゴ環境DNAが検出され、かつ検出された全ての地点で本種の生息が確認された。以上の結果から、本研究で開発したプライマー・プローブセットを用いて、カゼトゲタナゴの環境DNAを検出することが可能であると判断された。

カゼトゲタナゴはハプロタイプ分析の結果3つのクレード（筑後-矢部系統、壱岐系統、遠賀系統）に分かれることが知られている（Miyake et al., 2010）。本研究で設計したプライマーは、遠賀川水系産に加え、筑後川水系産のカゼトゲタナゴとも配列が一致するよう、変異を含まない領域で設計された。また、採水地点の遠賀川水系に生息する30種以上のコイ科魚類（国土交通省, 2020）の全てを対象とした増幅確認は行っていないが、上述したようにプライマーデザインツールの確認などにより、本プライマーのカゼトゲタナゴにおける特異性が担保されている。したがって、本研究で開発したプライマー・プローブセットは、現在の九州本土の北部におけるカゼトゲタナゴ検出について十分に機能すると言える。一方で、壱岐産の系統についてはリバースプライマーに1塩基の相違が確認されており、本検出系の機能について新たに検証が必要である。また、今後、すでに日本に持ち込まれているユーラシア大陸原産のバラタナゴ属魚類などの近縁種が九州北部に移入されるなど同場所の魚類相が変化した場合、本検出系の機能について再検討が必要になることが予想される。

飼育水槽の水1Lあたりのカゼトゲタナゴ重量(g/L)と、採水1Lあたりの検出された環境DNA量(copy/L)には、強い正の相関関係が認められ(Fig. 2)、自然水域においても生息密度に依存すると考えられるCPUEが最も高かった地点において、環境DNA量が著しく高い値を示した(Table 1)。水槽内や閉鎖水域において、環境DNA量と生物量には強い正の相関関係にあることを示した研究結果は多く(Takahara et al., 2012; Thomsen et al., 2012など)、近年では河川においても、生物量を推定できる可能性が指摘されている(Doi et al., 2017)。本研究で扱ったカゼトゲタナゴについても高水温期と低水温期の比較、あるいは繁殖期と非繁殖期の比較など、季節性等を考慮した実験や、流水

環境下での実験などを行うことで、本種の生息密度など量的評価系に発展する可能性が考えられる。

緒言で言及したように、環境DNAを用いた調査の大きな利点は、従来の直接捕獲や目視確認と比較して現地調査のコストが大幅に低いことである。実際に、直接採捕と環境DNA分析の検出感度やコストを比較する研究も行われており、前者と比べ後者では検出感度が高く、必要なコストも低い報告がなされている(Jerde et al., 2011; Sigsgaard et al., 2015)。また、環境DNAを用いた、特定種の存否確認を目的とした研究についても数多く報告されている(Koizumi et al., 2015; 福岡ほか, 2016など)。これらの研究の多くではリアルタイムPCRが用いられており、検出感度および精度の高さが指摘されている(高原ほか, 2016)。本研究でも同手法により採捕調査と同精度の結果を得ることができた。一方で、その分析においては、高額な機器や試薬が必要となり、広範への普及に課題が残る。これに対して、安価で汎用的な試薬や機器を用いて、通常のPCRと電気泳動を組み合わせた環境DNA分析も報告されており(Jerde et al., 2011; 山崎ほか, 2019など)、高等学校でも利用されている(米田ほか, 2015)。この手法では、環境DNAの検出・非検出のみで、濃度のデータは得られないが、カゼトゲタナゴにおいても同様の手法が開発できれば、目的に応じての使い分けが可能となることが考えられる。

謝 辞

匿名の査読者とIchthy編集委員の藤原恭司氏には原稿に対して有益な助言をいただいた。以上の方々に謹んで感謝の意を表す。本研究は、河川基金助成事業(課題番号2019-5211-057)の助成を受けて行われた。

引用文献

- 阿部 司・鬼倉徳雄・中島 淳. 2015. カゼトゲタナゴとスイゲンゼニタナゴ: 種の保存法指定種・未指定種における保全の現状と課題. 魚類学雑誌, 62: 65-69. [URL](#)
- Doi, H., R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara and T. Minamoto. 2017. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 62: 30-39.
- Ficetola, G. F., C. Miaud, F. Pompanon and P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4: 423-425.
- 福岡有紗・高原輝彦・松本宗弘・兵庫県立農業高校生物部・丑丸敦史・源 利文. 2016. 在来希少種カワバタモロコ環境DNAによる検出系の確立. *日本生態学会誌*, 66: 613-620. [URL](#)
- 福岡県. 2014. 福岡県レッドデータブック2014. [URL](#) (10 Dec. 2022)
- Jerde, C. L., A. R. Mahon, W. L. Chadderton and D. M. Lodge. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4: 150-157. [URL](#)
- 環境DNA学会. 2020. 環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.2. [URL](#) (20 May 2019)
- 環境省. 2020. 環境省レッドリスト2020. [URL](#) (10 Dec. 2022)
- Koizumi, N., T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi, A. Mori, K. Watabe and T. Takemura. 2015. Preliminary experiment for detection method of fish

- inhabiting agricultural drainage canals using environmental DNA. *IDRE Journal*, 297: 7–8. [URL](#)
- 国土交通省. 2020. 平成 30 年度河川水辺の国勢調査結果の概要〔河川版〕(生物調査編). [URL](#) (23 Dec. 2022)
- 熊本県. 2019. レッドデータブックくまもと 2019—熊本県の絶滅のおそれのある野生動植物 —. [URL](#) (10 Dec. 2022)
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33: 1870–1874. [URL](#)
- Miyake, T., J. Nakajima, N. Onikura, S. Ikemoto, K. Iguchi, A. Komaru and K. Kawamura. 2010. The genetic status of two subspecies of *Rhodeus atremius*, an endangered bitterling in Japan. *Conservation Genetics*, doi: 10.1007/s10592-010-0146-0 (Oct. 2010), 12: 383–400 (Apr. 2011).
- 長崎県. 2022. 長崎県レッドリスト 2022. [URL](#) (10 Dec. 2022)
- 大分県. 2022. レッドデータブックおおいと 2022. [URL](#) (10 Dec. 2022)
- 佐賀県. 2003. 佐賀県レッドリスト. [URL](#) (10 Dec. 2022)
- Sigsgaard, E. E., H. Carl, P. R. Møller and P. F. Thomsen. 2015. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, 183: 46–52. [URL](#)
- Takahara, T., T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi and Z. Kawabata. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*, 7: e35868. [URL](#)
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土井秀幸・内井 喜美子. 2016. 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. *日本生態学会誌*, 66: 583–599. [URL](#)
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M. T. Gilbert, L. Orlando and E. Willerslev. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 2565–2573.
- 山崎裕治・西尾正輝. 2019. 簡易的な環境 DNA 分析方法を用いた絶滅危惧種イタセンパラの検出. *魚類学雑誌*, doi: 10.11369/jji.19-005 (July 2019), 66: 171–179 (Nov. 2019). [URL](#)
- 米田創樹・木澤祥士・松本 涼・久次米 響・生月秀幸・本城将真・岸田周士・喜多山友輔・柳瀬 太・松本宗弘・森垣 岳. 2015. 環境 DNA 手法を用いた希少種調査方法の確立. *共生のひろば*, 10: 18–21. [URL](#)