

環境DNAを用いた沖合漁場における魚類相の把握

国立研究開発法人 土木研究所 寒地土木研究所 水産土木チーム ○須藤 賢哉
// 稲葉 信晴
// 森 健二

水産資源増殖を目指した沖合漁場整備の効果を評価する上で、漁場における魚類相を把握することは不可欠である。しかし、従来の漁獲による調査には大きな労力を要し、特に小型船舶での調査の場合、漁場整備に必要となる魚類相等の漁場環境データの取得と蓄積は困難である。本稿では、沖合漁場においてより簡易的に魚類相を把握するための環境DNAによる手法を紹介するとともに、本手法を用いた調査結果について報告する。

キーワード：沖合漁場整備、漁場環境、環境DNA

1. まえがき

日本の漁業生産量はピーク時の1980年代から減少傾向にあり¹⁾、特に国内の漁獲量の約5割を占める沖合漁業のための水産資源増殖は喫緊の課題である²⁾。水産庁では漁業生産量の回復を目指して、概ね水深200mまでの陸棚域に相当する排他的経済水域(Exclusive Economic Zone:EEZ)³⁾において国の直轄事業により漁場整備を行う施策(フロンティア漁場整備事業)を推進している⁴⁾。このような背景から水産土木チームでは、北海道の沖合域に設置された人工魚礁の周辺において、漁場整備に資する漁場環境の評価手法⁵⁾やモニタリング手法⁶⁾の研究を進めている。しかし、陸域から離れた水深の深い沖合域での調査は費用的、労力的な負担が大きく、小型船舶での調査の場合では天候や波浪等による制約が大きく、適切な時期や場所での調査が難しいことが多い。特に、漁場における魚類相の把握は漁場整備を進めていくうえで必要不可欠であり、限られた調査の機会で、より効率的な手法が求められている。

近年、自然環境中の生物に由来するDNA(deoxyribonucleic acid:生物の遺伝子情報が塩基配列で記録された核酸分子)である環境DNAが、その環境中に存在したであろう生物の痕跡や履歴あるいは現存量までもを反映する指標として利用可能であることが明らかになってきている⁷⁾。環境DNAとは、生物由来の組織や排泄物を含む土壌、水、空気等に存在するDNAの断片を指し、広義には「対象分類群やDNAの状態(細胞内外)によらず、環境媒体から得られるDNAの総体」⁷⁾と定義される。よってDNAの塩基配列が解析できる状態で試料を採取できれば、環境中に存在する生物種を推定または特定することが可能となる。

魚類相の把握において、従来の漁獲調査と比較した環境DNAの手法的な利点としては、漁場環境中に存在するDNA断片を十分量採取することができれば、魚類の痕跡を高い分類解像度で検出できるため、現地作業が海水や

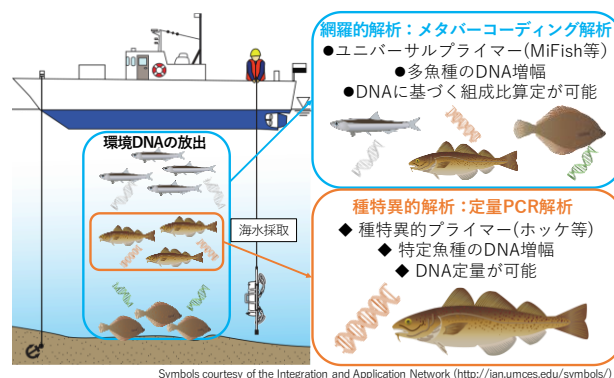


図-1 環境DNAを用いた漁場における魚類相の把握の概念

堆積物等の試料を採取するのみで省力化が可能なこと、また、魚体の捕獲を伴わないため希少種の損失や環境負荷を低減可能なこと等が挙げられる⁷⁾。実際、海洋においては、多種の魚類相を1回の解析で網羅的に把握できるメタバーコーディング解析(図-1)⁸⁾の技術の確立により、漁場における魚類相調査への環境DNAの適用事例も増えてきている⁹⁾¹⁰⁾。さらに、試料中の特定の魚種のDNAだけを特異的に検出し定量化する定量PCR解析(図-1)¹¹⁾も普及してきている。こうした環境DNAの手法と漁獲や魚群探知機等の従来の手法を併用することで、漁場における魚類の現存量を推定する試みも行われている¹¹⁾¹²⁾。しかし、沖合域の人工魚礁漁場における魚類相調査への環境DNAの適用については未だ研究事例が少なく¹³⁾、知見が乏しいのが現状である。本稿では、北海道利尻島沖の人工魚礁漁場における環境DNAを用いた魚類相把握の手法および調査結果について報告する。

2. 材料と方法

(1) 試料採取

対象海域の人工魚礁漁場の位置、平面配置、調査地点を図-2に示す。調査は、北海道利尻島の南西約10kmの沖

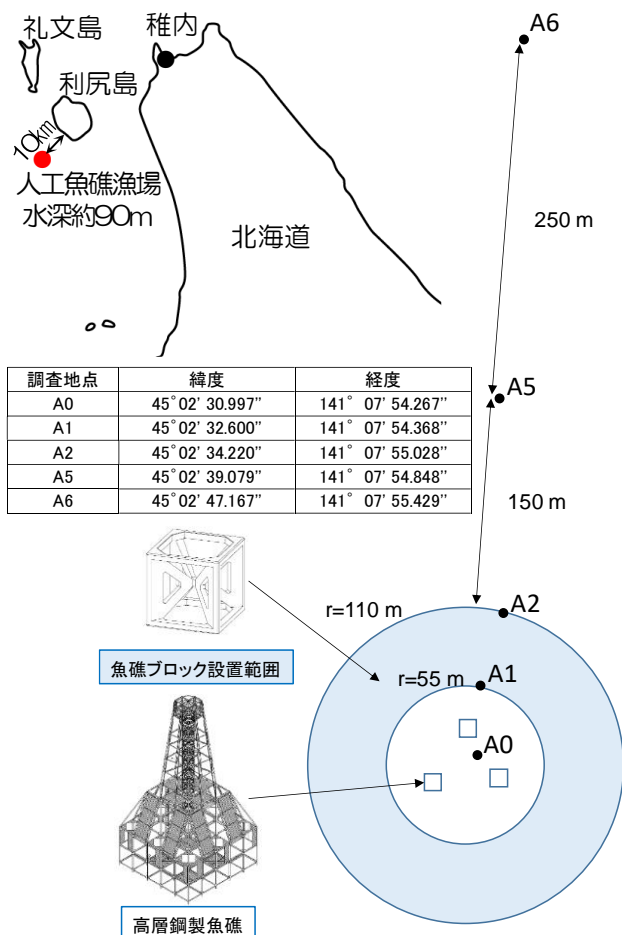


図2 対象海域と人工魚礁漁場の位置、平面配置、調査地点

合に位置する人工魚礁漁場(2014~2015年整備)において行った。当該海域の海底(水深約90m)には、3基の高層鋼製魚礁(高さ20m)を取り囲むように156基のコンクリート製魚礁ブロック(1辺3m)が幅55mの範囲に設置されている。調査地点は、人工魚礁群体の中心からA0、A1、A2、A5、A6とした。

漁場環境中から環境DNAを得るための試料採取は、2018年7月25~29日および2019年10月20日に実施した。2018年は、A0、A1、A2、A5において行い、A0、A5ではバンドーン採水器により表層(海面下1m)と底層(海底上1m)から、A1、A2ではホースを取り付けたROV(遠隔操作型無人探査機)により魚礁ブロックの上面(海底上3m)からポンプにより採水した。2019年は、A1、A2、A5、A6において行い、全点においてバンドーン採水器により表層(海面下1m)と底層(海底上1m)から採水した。採取した海水はそれぞれ3Lポリエチレン製遮光容器に収容し、DNA分解防止剤として10%塩化ベンザルコニウム溶液を終濃度0.01%¹⁴⁾となるように添加後、冷温条件下(10℃以下)で分析施設に輸送した。なお、試料以外のDNAの混入を防ぐため、試料採取に用いた容器は新品または次亜塩素酸ナトリウム溶液により除染したものをを用いた¹⁴⁾。

また、採水と併せてCTD(水質計)による水理環境(水温、塩分)の鉛直分布の把握を行った。

(2) 環境DNAの解析

2018年に採取した海水試料については、以下の手法にてメタバーコーディング解析を実施した。海水試料は分析施設に輸送後、直ちにステリベクスフィルターユニット(メルクミリポア、フィルター孔径0.22μm、図-3(a))を通してポンプにより吸引濾過し(図-3(b))、DNAを捕集した。DNA抽出(図-3(c))はMiya et al.¹⁵⁾の手法に従い、MPure Bacterial DNA Extraction Kit(MP Bio、図-3(d))により精製した。精製後のDNAをMiFishプライマー⁸⁾によりtwo-step tailed PCR法を用いてライブラリーを作製後、MiSeqシーケンサー(Illumina、図-4(左))を用いて2×300bpの条件でシーケンシングを行った。MiFishは多種の魚類に対応したユニバーサルプライマーであり、我が国でも現在に至るまで河川や海洋の魚類相の把握のために広く用いられている¹⁶⁾¹⁷⁾。得られた塩基配列は、まず、Fastx toolkitのFASTX Barcode Splitter¹⁸⁾を用いて配列の読み始めがMiFishプライマーと完全一致する配列のみを抽出し、抽出後の塩基配列は解析ツールQiime2¹⁹⁾を用いてノイズ除去後、配列長180塩基を基準としてOTU(Operational Taxonomic Unit)を作製した。得られたOTUは、魚類ミトコンドリアゲノムデータベースMitoFish²⁰⁾のMiFish用リファレンスの塩基配列を参照し、同データベースのBLAST(配列相同性検索プログラム)を用いて魚種の系統推定を行い、魚種毎にリード数(MiSeqの読み取り配列数)として一覧表で出力した。OTU一覧表から漁獲統計資料(北海道庁)²¹⁾および魚類の参考図書²²⁾²³⁾により




図-3 環境DNAの濾過、抽出、精製の手順 (a)ステリベクスフィルターユニット (b)ポンプによる環境DNAの濾過、捕集 (c)DNA抽出 (d)MPureによるDNA精製



図-4 (左)MiSeqシーケンサー (右)リアルタイムPCRシステムStepOnePlus

利尻島周辺海域または北海道周辺海域で生息する魚種を確認し、配列相同性97%以上を基準として科～種レベルで魚種を選定、分類した。

2019年に採取した海水試料については、メタバーコーディング解析に加えて、定量PCR解析を行った。対象魚種は利尻島周辺海域で最大漁獲量を誇るホッケ²¹⁾とした。ホッケの種特異的プライマーの設計については、ホッケとその近縁種の塩基配列情報を核酸配列データベースNCBI²⁴⁾より収集し、種特異的な変異箇所を探し設計した。対象種(ホッケ)の種特異性はPrimer-BLAST²⁵⁾により確認した。精製後のDNAをProbe qPCR Mix (TaKaRa)により調製した後で、設計したホッケ種特異的プライマーとリアルタイムPCRシステムStep One Plus (Thermo Fisher Scientific、)により初期変性95°C30秒1サイクルに続き95°C5秒と60°C30秒を計55サイクルでPCR反応させてDNA増幅を蛍光強度で確認し、PCR反応は4回反復した。ホッケDNA量の基礎となるコピー数の算出は、ホッケ塩基配列に基づく既知コピー数の人工遺伝子によりサイクル数とコピー数の検量線を作成し、PCR反応で増幅が確認された蛍光強度のサイクル数を検量線に当てはめることで算出した。

3. 結果と考察

(1) 沖合域の人工魚礁漁場における魚類相 (2018年)

表-1に2018年7月25～27日の測点A0、A1、A2、A5におけるメタバーコーディング解析によるリード数に基づ

く魚類の組成比を示す。検出された魚種は科～種レベルの分類群では全測点で計26種であった。このうち、当漁場周辺で生息している可能性のある魚種については、左記の資料²¹⁾²²⁾²³⁾に加え、北海道庁による利尻島鬼脇沖の刺し網調査(2018年7月11～12日、未公表)の情報に基づいて判断すると、利尻島、礼文島、宗谷の周辺海域で限定した場合は18種(69.2%)、北海道周辺海域では22種(84.6%)が該当した。また、2018年の利尻島(利尻富士町、利尻町)で漁獲された魚種²¹⁾の中でも特に漁獲量の多かったホッケ、サケ、ヒラメ、マガレイ、ニシン、マダラ、

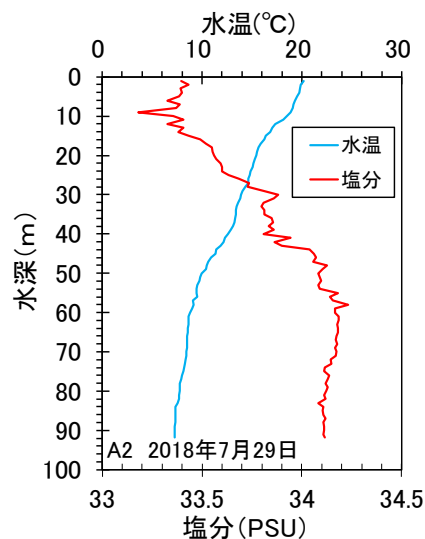


図-5 水温と塩分の鉛直分布(A2、2018年7月29日)

表-1 メタバーコーディング解析による魚類の組成比(2018年7月25日～29日)

分類群名			A0		A1	A2	A5	
			表層	底層	魚礁ブロック上面	表層	底層	
フグ目	フグ科	マフグ	100	—	5.2	—	8.4	6.1
ボラ目	ボラ科	ボラ	—	—	—	0.005	—	—
コイ目	ドジョウ科	不明種	—	—	—	1.4	—	—
ニシン目	ニシン科	ニシン	—	3.2	16.2	8.1	91.4	15.8
		マイワシ	—	1.8	—	2.8	—	11.1
タラ目	タラ科	スケトウダラ	—	—	0.07	0.03	—	0.02
		マダラ	—	—	16.2	7.9	—	2.8
サケ目	サケ科	サクラマス	—	—	—	0.66	—	—
		サケ	—	17.2	—	—	—	—
カサゴ目	アイナメ科	ホッケ	—	19.3	48.1	32.4	—	26.6
	トクビレ科	トクビレ	—	—	1.0	6.1	—	—
	ヒラメ科	ヒラメ	—	—	—	—	—	0.71
カレイ目	カレイ科	アサバガレイ	—	—	—	0.31	—	—
		ソウハチ	—	0.15	—	0.20	—	0.004
		マガレイ	—	—	—	6.9	—	8.6
		ヒレグロ	—	58.4	—	13.9	—	1.2
—	サバ科	マサバ	—	—	0.001	—	0.16	—
—	アジ科	マアジ	—	—	—	—	0.07	—
—	ハダカオオカミウオ科	ハダカオオカミウオ	—	—	—	—	—	0.004
スズキ目	メバル科	アカガヤ	—	—	2.3	—	—	5.6
		不明種	—	—	2.6	—	—	6.0
	タウエガジ科	ニセマダマギンボ	—	—	—	—	—	6.9
		不明種	—	—	—	4.9	—	—
		ツマグロカジカ	—	—	—	1.3	—	—
カジカ科	カラフトカジカ	—	—	8.3	1.7	—	8.6	
	カジカ属不明種	—	—	—	11.4	—	—	

マサバ、ソウハチ、ヒレグロの環境 DNA が検出された。

水深帯に着目すると、表層(海面下 1m)と底層(海底上 1m、魚礁ブロック上面は海底上 3m)では種数の傾向が異なり、表層 4 種に対して底層は 24 種と多かった。表層の魚種は浮魚(ニシン、マサバ、マアジ)と温帯性のマフグであり、底層の魚種は底魚(ホッケ、トクビレ、タラ科、カレイ科、カジカ科、メバル科等)や冷水性のサケ科が殆どを占めた。観測時の水塊構造(図-5)としては弱い成層化が見られ、水温分布は表層が高水温で底層が低水温であった。成層化した海域での環境 DNA の鉛直分布が魚類の生態に基づく生息実態を反映するという調査事例²⁹⁾もあり、成層化により環境 DNA の鉛直移動が少ないと仮定すれば、観測時に検出された魚種は水深帯毎の生息実態を反映している可能性があり、浮魚と底魚という生態や適水温が関係していることが推察された。

今回検出された底魚のうち利尻島周辺海域で最大漁獲量を誇るホッケの環境 DNA は、底層のみから検出され、組成比に占める割合も A0 を除いた全ての測点で最も高かった。メタバーコーディング解析から推定された魚類の相対存在量がトロール漁獲による現存量と有意に相関する調査事例²⁹⁾に照らせば、A0 以外の測点において観測時の底層付近でホッケが高い現存量であった可能性が考えられる。

ニシンは利尻島周辺での漁獲量が多く²⁴⁾当該人工魚礁漁場での刺し網漁でもホッケに次いで多く漁獲されている(利尻漁協漁獲記録、未公表)。本調査においても、A0 の表層を除いてニシンの環境 DNA が検出され、A5 表層では 91.4%を占めた。入江ら²⁸⁾によれば、オホーツク海やベーリング海の夏季から秋期にかけてはニシンが日周鉛直移動を行う傾向があることが指摘されている。こうしたニシンの生態がホッケとは異なり表層と底層の両方でニシンが検出された一因であると推察された。

(2) 魚類相とホッケ環境 DNA の定量評価(2019 年)

表-2 に 2019 年 10 月 20 日の測点 A1、A6 におけるメタバーコーディング解析によるリード数に基づく魚類の組成比を示す。検出された魚種は 2 測点で計 9 種であり、検出された全魚種が利尻島または北海道の周辺海域に生息する魚種に該当した²¹⁾²²⁾²³⁾。

水深毎の優占魚種の組成比については、表層(海面下 1m)は浮魚であるカタクチイワシが A1 で 43.0%、A6 で

100%と最も優占し、底層(海底上 1m)は底魚であるホッケが A1 で 50.5%、A6 で 75.6%と最も優占した。ホッケについては、春から初夏に表層近くで柱状の群れ(通称ホッケ柱)を形成することがあるが²⁹⁾、夏季から冬季には水深 100m 前後の陸棚域に生息するとされる²⁸⁾。北海道奥尻島の 10 月における調査事例³⁰⁾でもホッケが水温躍層より下層の水温 8°C前後の海底直上で多く釣獲されている。ホッケの環境 DNA が底層のみから検出され、観測時の水塊構造(図-6)としては成層化しているかつ水深 50m 付近の躍層より上層ではホッケの適水温(3~13°C)³¹⁾より高水温であったことから、観測時にホッケは主に底層に分布していたことが示唆された。

底魚のうち利尻島周辺でも多く漁獲されるソウハチ²⁴⁾はカレイ科の一種であるが、A1 表層のみで組成比 18.3%で検出され、底層では未検出であった。北部日本海域における調査事例³²⁾によれば、ソウハチは成魚が 7~8 月に水深 20m 程度の水深帯に浮上して産卵し、9 月頃に仔魚がふ化して水温 15~20°Cに分布することが報告されている。2019 年の観測時期は 10 月であったことや観測時の表層水温は 16.6°Cであったことから A1 の表層付近でソウハチの仔魚が回遊していた可能性があり、その環境 DNA が検出されたことが推察された。

図-7 に 2019 年 10 月 20 日の測点 A1、A2、A5、A6 における定量 PCR 解析によるコピー数に基づくホッケの環境

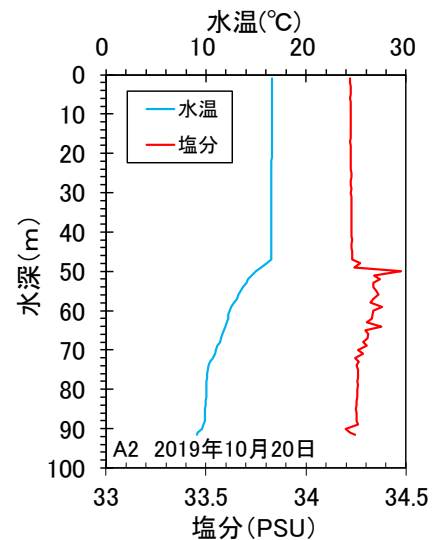


図-6 水温と塩分の鉛直分布(A2,2019年10月20日)

表-2 メタバーコーディング解析による魚類の組成比(2019年10月20日)

分類群名			A1		A6	
			表層	底層	表層	底層
ニシン目	カタクチイワシ科	カタクチイワシ	43.0	10.7	100	—
カレイ目	カレイ科	ソウハチ	18.3	—	—	—
トビエイ目	アカエイ科	不明種	1.7	—	—	—
タラ目	タラ科	スケトウダラ	—	38.2	—	—
		マダラ	—	0.6	—	—
カサゴ目	アイナメ科	ホッケ	—	50.5	—	75.6
	トクビレ科	トクビレ	—	—	—	11.5
スズキ目	ケムシカジカ科	ケムシカジカ	—	—	—	12.9
	メバル科	クロソイ	37.0	—	—	—

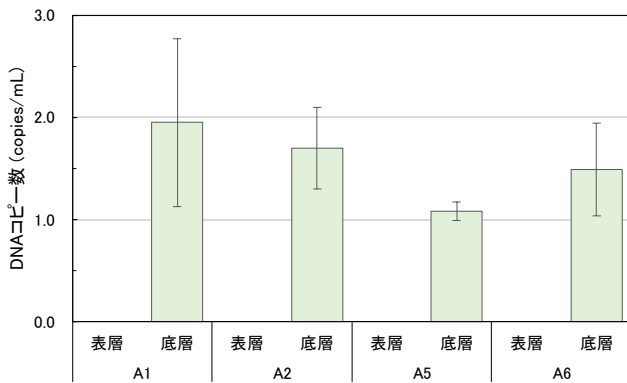


図-7 定量PCR解析によるホッケ環境DNA量(2019年10月20日)
誤差棒はPCR反復4回における標準偏差を表す

DNA量を示す。メタバーコーディング解析の結果(表-2)と同様に、ホッケは底層のみから検出され、表層は定量下限値未満であった。各測点の底層の海水1mL当たりのホッケ環境DNA量は、PCR反復4回におけるコピー数の平均値±標準偏差(copies/mL)として表すと、A1で1.95±0.82、A2で1.70±0.40、A5で1.08±0.09、A6で1.49±0.45であり、人工魚礁の群体内の測点(A1、A2)で群体外の測点(A5、A6)よりも高い傾向が見られた。

定量PCR解析による環境DNA量と魚類の現存量の関連性については、舞鶴湾のマアジについて魚群探知機の超音波反射強度により比較検証した事例¹²⁾やバルト海の各種魚類についてトロール漁獲により比較検証した事例¹¹⁾があり、環境DNA量が魚類の現存量や分布を反映している可能性を示唆する結果が報告されている。これらに照らせば、今回の定量PCR解析の結果は当漁場周辺のホッケの分布を反映している可能性があり、人工魚礁へのホッケの増集が推察された。ただし、人工魚礁における環境DNA量については、魚礁ブロックによる流速低減域の粒子状物質集積効果³³⁾により周辺から移流した環境DNAが構造物近傍に集積した可能性も考えられる。

4. 結論と展望

(1) 環境DNAの調査結果からの結論

今回の沖合漁場における魚類の環境DNAの調査結果から、主な結論を以下に示す。

- ① メタバーコーディング解析により検出された魚種と組成比は測点、水深帯(表層、底層)、観測時期により異なる傾向が見られたが、観測時に当漁場周辺に分布していたと思われる魚種を概ね検出していたと推察された。魚種と組成比の違いの要因としては、魚種毎の生態や水塊構造(水温、成層化)の影響が示唆された。
- ② 利尻島周辺で最大漁獲量を誇るホッケは2018年7月と2019年10月のメタバーコーディング解析で全測点の底層のみで検出され、殆どの測点で組成比が最大であった。これはホッケが当該海域の底層付近で回遊し、かつ高い

現存量であった可能性を示しており、定量PCR解析によるホッケの環境DNA量の結果から、人工魚礁へのホッケの増集の可能性が示唆された。

(2) 沖合漁場での環境DNAの利点と今後の展望

本調査の結果および既往調査事例^{7)~13)17)26)27)}を併せると、沖合漁場において環境DNAを用いることで期待される利点としては、採水のみで魚類相の把握ができるため省力化、多地点、高頻度の観測が可能となること、採捕が不要なため漁場環境への負荷を低減できることが考えられる。これにより、季節や地点間の比較による網羅的かつ系統的な漁場環境データの取得に繋がり、沖合漁場整備効果の評価手法としての活用が期待できる。今後は本稿で紹介した環境DNAの手法や魚体長を解析できる魚群探知機³⁴⁾等を活用し、沖合域における魚種と現存量を空間的かつ時系列的に効率良く把握できるようになれば、沖合漁場整備効果の評価に資するモニタリング手法の構築に繋がると考えられる。

謝辞: 試料採取、環境DNAの解析、および本稿の執筆に当たっては北海道庁、利尻漁業協同組合、(株)アルファ水工コンサルタンツ、(株)生物技研の各位に多大なるご協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 農林水産省(2022):海面漁業生産統計調査
https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/
- 2) 水産庁(2022):水産白書
<https://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/>
- 3) 海上保安庁(2022):管轄海域情報~日本の領海等概念図
https://www1.kaiho.mlit.go.jp/JODC/ryokai/ryokai_setsuzoku.html
- 4) 中村隆、岡貞行、山本竜太郎、柳瀬知之、浅川典敬、中川良文(2008):沖合漁場整備の政策的意義と技術的課題、水産工学、45(1)、pp.67-74.
- 5) 国立研究開発法人土木研究所(2022):食料供給力強化に貢献する寒冷海域の水産基盤の整備・保全に関する研究、令和3年度研究開発プログラム報告書(公表準備中).
- 6) 須藤賢哉、稲葉信晴、渡邊浩二(2021):沖合域での漁場環境モニタリング手法の構築に向けた衛星通信による遠隔観測の試み、北海道開発技術研究発表会論文、推-20、pp.876-881.
- 7) 土居秀幸、近藤倫生(監修)(2021):環境DNA、生態系の真の姿を読み解く、共立出版、281p.
- 8) Masaki Miya, Yukuto Sato, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Jan Y. Poulsen, Keiichi Sato, Toshifumi Minamoto, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Hitoshi Araki, Michio Kondoh, Wataru Iwasaki(2015): 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, pp.1-33.
- 9) Damien Boivin-Delisle, Martin Laporte, Frédéric Burton, René Dion, Eric Normandeau, Louis Bernatchez (2021): Using environmental DNA for biomonitoring of freshwater fish communities: Comparison with established gillnet surveys in a boreal hydroelectric impoundment, *Environmental DNA*, 3(1), pp.105-120.
 - 10) Edward Good, Luke E. Holman, Antonio Pusceddu, Tommaso Russo, Marc Rius, Claudio Lo Iacono (2022): Detection of community-wide impacts of bottom trawl fishing on deep-sea assemblages using environmental DNA metabarcoding, *Marine Pollution Bulletin*, 183, 114062, pp.1-14.
 - 11) Steen Wilhelm Knudsen, Rasmus Bach Eberta, Martin Hesselsoe, Franziska Kuntke, Jakob Hassingboe, Peter Bondgaard Mortensen, Philip Francis Thomsen, Eva Egelving Sigsgaard, Brian Klitgaard Hansen, Einar Eg Nielsen, Peter Rask Møller (2019): Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, pp.31-45.
 - 12) Satoshi Yamamoto, Kenji Minami, Keiichi Fukaya, Kohji Takahashi, Hideki Sawada, Hiroaki Murakami, Satsuki Tsuji, Hiroki Hashizume, Shou Kubonaga, Tomoya Horiuchi, Masamichi Hongo, Jo Nishida, Yuta Okugawa, Ayaka Fujiwara, Miho Fukuda, Shunsuke Hidaka, Keita W. Suzuki, Masaki Miya, Hitoshi Araki, Hiroki Yamanaka, Atsushi Maruyama, Kazushi Miyashita, Reiji Masuda, Toshifumi Minamoto, Michio Kondoh (2016): Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan, *PLoS ONE*, 11(3), e0149786, pp.1-18.
 - 13) Masaaki Sato, Nariaki Inoue, Ryogen Nambu, Naoki Furuichi, Tomohito Imaizumi, Masayuki Ushio (2021): Quantitative assessment of multiple fish species around artificial reefs combining environmental DNA metabarcoding and acoustic survey, *Scientific Reports*, 11, 19477, pp.1-14.
 - 14) 環境 DNA 学会(2020): 環境 DNA 調査・実験マニュアル, ver. 2.2, 105p
 - 15) Masaki Miya, Toshifumi Minamoto, Hiroki Yamanaka, Shin-ichiro Oka, Keiichi Sato, Satoshi Yamamoto, Tetsuya Sado, Hideyuki Doi (2016): Use of a Filter Cartridge for Filtration of Water Samples and Extraction of Environmental DNA, *Journal of Visualized Experiments*, 117, e54741, pp1-8.
 - 16) 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(2018): 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(5)、pp. I_415-I_420.
 - 17) Satoshi Yamamoto, Reiji Masuda, Yukuto Sato, Tetsuya Sado, Hitoshi Araki, Michio Kondoh, Toshifumi Minamoto, Masaki Miya (2017): Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea, *Scientific Reports*, 7, 40368, pp.1-12.
 - 18) The Hannon Lab (2022): FASTX-Toolkit
http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/commandline.html
 - 19) QIIME 2 development team(2022): QIIME 2
<https://qiime2.org/>
 - 20) Atmosphere and Ocean Research Institute, University of Tokyo(2022): MitoFish
<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/>
 - 21) 北海道水産林務部(2019-2021): 北海道水産現勢、平成30年確報、令和元年確報、令和2年確報、pp.27.
 - 22) 落合明、田中克(1986): 新版魚類学(下)、恒星社厚生閣、1123p.
 - 23) 水島敏博、鳥澤雅(監修)(2003): 新北のさかなたち、北海道新聞社、645p.
 - 24) National Library of Medicine (2022): National Center for Biotechnology Information
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 - 25) National Library of Medicine (2022): Primer-BLAST
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
 - 26) Oriol Canals, Iñaki Mendibil, María Santos, Xabier Irigoien, Naiara Rodriguez-Ezpeleta (2021): Vertical stratification of environmental DNA in the open ocean captures ecological patterns and behavior of deep-sea fishes, *Limnology and Oceanography Letters*, 6, pp.339-347.
 - 27) Seyedeh Fatemeh Afzali, Hugo Bourdages, Martin Laporte, Claire Mérot, Eric Normandeau, Céline Audet, Louis Bernatchez (2020): Comparing environmental metabarcoding and trawling survey of demersal fish communities in the Gulf of St. Lawrence, Canada, *Environmental DNA*, 3(1), pp.22-42.
 - 28) 入江隆彦、吉田久春(1982): オホーツク海北部水域のニシンの研究-III 1976年秋季の分布と生態、北水試報告、47、pp.23-38.
 - 29) 北川貴士、中川隆、木村龍治、新野宏、木村伸吾(2012): ホッケ柱(ばしら): 渦形成によるホッケ魚群の摂餌戦略、日本水産学会誌、78(4)、pp.656.
 - 30) 夏目政史(1995): 北海道奥尻島のホッケの移動、北水試研報、47、pp.7-13.
 - 31) 社団法人日本水産資源保護協会(1980): 水産生物適水温図、pp.27.
 - 32) 永澤亨(1990): 北部日本海域におけるソウハチ (*Cleisthenes pinetorum herzensteini*) の浮遊生活期、日本海区水産研究所研究報告、40、pp.15-25.
 - 33) Takuma Matsumoto, Kenya Sudo, Ken-Ichiro Ishii, Ayako Imura, Nobuharu Inaba (2022): Distribution of Diatom Resting Stages in Sediment near Artificial Reefs Deployed in the Dysphotic Zone: Exploration of New Artificial Reef Function, *Applied Sciences*, 12, 9972, pp.1-14.
 - 34) 石澤健志、須藤賢哉、森健二 (2022): 高解像度計量魚群探知機搭載ブイによる沖合人工魚礁における魚群定量化の試み、寒地土木研究所月報、No.839、pp.40-47.