

# 港湾空港技術研究所 資料

TECHNICAL NOTE  
OF  
THE PORT AND AIRPORT RESEARCH INSTITUTE

**No.1373**      June 2020

環境 DNA による沿岸域魚類の網羅的な推定と多様性評価

細川 真也, 百田 恭輔, 大倉 翔太, 小室 隆

国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所

National Institute of Maritime,  
Port and Aviation Technology, Japan

## 目 次

要 旨	3
1. まえがき	4
2. 沿岸域における魚類の推定精度と注意点	4
2.1 はじめに	4
2.2 魚類の推定精度の検証	5
2.3 検出力と同定精度—分析者間の比較—	10
2.4 過剰な推定の傾向	12
2.5 結論	15
3. 抽出された注意点の多様性評価への影響と回避方法	15
3.1 はじめに	15
3.2 検出力の違いに着目した比較解析への影響の考察	15
3.3 分析者の違いの影響の検証	18
3.4 結論	20
4. 多様性評価に必要な空間距離とサンプル数	21
4.1 はじめに	21
4.2 方法	21
4.3 結果	22
4.4 考察	22
4.5 結論	23
5. あとがき	25
5.1 本論文の要約	25
5.2 今後の期待される展開	25
5.3 まとめ	25
謝辞	25
参考文献	25
付録 A Sample coverage の意味, 効果, 及び限界	28
付録 B 目安となる sample coverage とサンプル数	30

## Environmental DNA metabarcoding and diversity analysis for the fish community in coastal areas

Shinya HOSOKAWA\*, Kyosuke MOMOTA\*\*, Shota OKURA\*\*\*, Takashi KOMURO\*\*\*\*

### Synopsis

The analysis of environmental DNA (eDNA) enables us to estimate the presence of organisms without direct their collection. eDNA metabarcoding for fish communities is a technique expected to be applied for biomonitoring and ecosystem health assessment. However, in coastal areas, because eDNA originated from other coastal areas and terrestrial areas via rivers may distribute, it is not well known whether environmental DNA metabarcoding is suitable or not. MiFish, which is a set of primers for metabarcoding eDNA from fish, has been assessed to have specificity, discriminatory power, and reproducibility. This study examined the estimation accuracy of eDNA metabarcoding using MiFish in coastal areas and its applicability for coastal biomonitoring and assessment.

The estimation accuracy of eDNA metabarcoding for coastal fish communities was tested by comparing its estimations and direct collections. These tests resulted that the estimation accuracy of eDNA metabarcoding was high. However, other analyses pointed out that detection power and identification accuracy were dependent on the analyst, and that the eDNA of fish transported from rivers and originated by anthropogenic activities were detected if detection power was high. Although these cautionary notes affect the analyses for species richness and composition, this study showed how we can avoid them. Also, this study examined how distance and how many samples were sufficient for the analyses for comparing species richness and compositions. The knowledge summarized in this study would assist engineers to plan field surveys and to select analytical methods for biomonitoring and ecosystem assessment using eDNA metabarcoding in coastal areas.

**Key words:** Environmental DNA, MiFish primers, Estimation accuracy, Species richness, Species composition

---

\* Senior Researcher, Marine Environmental Information Group

\*\* Ex-postdoctoral Researcher, Marine Environmental Information Group (Researcher, Marine Ecology Research Institute)

\*\*\* Researcher, Marine Environmental Information Group

\*\*\*\* Postdoctoral Researcher, Marine Environmental Information Group

3-1-1, Nagase, Yokosuka, Kanagawa 239-0826, Japan Port and Airport Research Institute  
Phone : +81-46-844-5107, Fax : +81-46-844-1274 E-mail: hosokawa@p.mpat.go.jp

# 環境 DNA による沿岸域魚類の網羅的な推定と多様性評価

細川 真也<sup>\*</sup>, 百田 恭輔<sup>\*\*</sup>, 大倉 翔太<sup>\*\*\*</sup>, 小室 隆<sup>\*\*\*\*</sup>

## 要 旨

環境中に漂う DNA の検出によって生物の生息域を推定する技術（以下、環境 DNA 分析）の開発が進んでいる。魚類を網羅的に推定する環境 DNA 分析は、実務への応用が期待されるが、他の海域との相互作用があり、かつ、河川や人間活動の影響を強く受ける沿岸域では、環境 DNA 分析によりどこまで生物の生息域の推定に有効なのか未知な点が多い。本研究では、種の識別能力と再現性が高く、魚類を網羅的に推定できる MiFish プライマーセットに着目し、沿岸域における推定精度の把握と港湾分野における魚類調査への応用の可能性の検証を行った。

沿岸域における推定精度の把握では、直接的な方法との比較による推定能力を評価し、さらに、注意点の抽出を行った。この結果、環境 DNA 分析は高い精度で魚類の分布を推定できるものの、分析者による検出力及び同定精度に差があることと河川や人間活動に由来した環境 DNA を検出してしまう等の過剰な推定があることが注意点として挙げられた。魚類調査への応用に関して、環境 DNA 分析によって推定された結果から種数と種組成の比較が可能かどうか検証した結果、抽出された注意点がこれらの比較に影響するものの、その影響は回避できることが示された。また、種数と種組成の比較に必要な空間距離とサンプル数についても検証した。本研究で整理された知見は、環境 DNA 分析技術を用いた港湾分野の魚類調査計画の立案や解析手法の選択に貢献するものと考えられる。

キーワード：環境 DNA, MiFish プライマー, 推定精度, 種の豊富さ, 種組成

---

\* 海洋情報・津波研究領域海洋環境情報研究グループ 主任研究官  
\*\* 元海洋情報・津波研究領域海洋環境情報研究グループ 専任研究員（現（公財）海洋生物環境研究所 研究員）  
\*\*\* 海洋情報・津波研究領域海洋環境情報研究グループ 研究官  
\*\*\*\* 海洋情報・津波研究領域海洋環境情報研究グループ 専任研究員  
〒239-0826 神奈川県横須賀市長瀬 3-1-1 港湾空港技術研究所  
電話：046-844-5107, Fax：046-844-1274 E-mail: hosokawa@p.mpat.go.jp

## 1. まえがき

生物から放出されて環境中に漂う DNA は環境 DNA と呼ばれ、これを分析する技術（以下、環境 DNA 分析）により、生物を採取しなくても生息域を把握できる可能性がある<sup>1)</sup>。環境 DNA 分析は、生物を採取しないことから非破壊的であり、場合によっては安価であることから、現地調査への応用が注目されている。

大型動物の環境 DNA 分析については、2008 年にウシガエルを対象とした論文が発表されたのを初めとし<sup>2)</sup>、その後、研究対象が様々な生物に広がっている<sup>3)</sup>。近年は、生物に共通する DNA 領域を分析することで生物を網羅的に解析する技術が開発されている<sup>4)~9)</sup>。この技術により、個々の生物種の分布だけでなく多様性の分布の把握も可能となることが期待される。

水中の環境 DNA は水の流れに伴って空間的に広がるため、開放的な場所になるほど、環境 DNA 分析の障壁が多くなることが予想される。このことから、環境 DNA 分析の検証の多くは、水槽、池、湖のような流れの条件を単純化しやすい閉鎖的な環境で試みられている<sup>3),4),6)~8)</sup>。一方で、環境 DNA 分析を沿岸域で使った事例もある。日本海側に面する舞鶴湾では、流動が穏やかあり、環境中に放出された魚の DNA が数時間で検出されない濃度に薄まることから、環境 DNA 分析を用いて、マアジの分布のスナップショットを捉えることに成功した<sup>10),11)</sup>。

しかし、同じ沿岸域であっても、場所によって流動特性は大きく異なり、環境 DNA 分析だけでは生物の生息域の把握が難しくなることもある。太平洋沿岸の英虞湾では、環境 DNA 分析を応用したアマモ分布の推定が試みられているが、潮汐に伴う流れの影響が強く、流動モデルを併用しなければその応用が困難であることが報告されている<sup>12)~14)</sup>。我が国の沿岸域の多くでは、潮汐に伴う流れがあり、河口の影響を受ける場所も多いことから、環境 DNA 分析の応用は容易ではないことが想像できる。さらに、網羅的な推定では、対象

とする環境 DNA も多様となることから、その応用にはより高度な知識や技術が必要になる可能性がある。多くが沿岸域に立地する我が国の港湾<sup>15)</sup>では、環境 DNA 分析による魚類の網羅的な推定が、どこまで新しい調査手法として応用できるか疑問が残る。

著者らは、この疑問を検証するため、およそ2年間で環境 DNA 分析に基づいた沿岸域の魚類分布の把握に関するデータを積み重ね、様々な角度から分析した（表—1.1）。本論文は、環境 DNA 分析による網羅的な推定の港湾分野における応用の可能性を探ることを目的として、この成果を整理したものである。既にまとめられている環境 DNA 分析に関する基本的な知見<sup>1),16)</sup>に対して、沿岸域特有の視点から補間する位置付けとしてまとめた。

本論文は、主に、第 2 章から第 4 章までの3つの章で構成されており、第 2 章では、まず、環境 DNA 分析による沿岸域を対象とした魚類推定の精度を検証し、さらに、実務で取り扱う上での注意点の抽出を行った。網羅的な推定を使った明確な目的がある場合、第 2 章でまとめた知見が参考になる。

第 3 章と第 4 章では、環境 DNA 分析による網羅的な推定の応用の一つとして考えられる生物多様性の評価<sup>17)</sup>に着目し、その可能性を検証した。第 3 章では、第 2 章で抽出された注意点の多様性解析への影響の把握及びその回避方法の検討、第 4 章では多様性の違いを識別できる空間距離と評価のために必要となるサンプル数を検討した。

## 2. 沿岸域における魚類の推定精度と注意点

### 2.1 はじめに

#### (1) 本論文で着目する MiFish プライマー

環境 DNA 分析による魚類の網羅的な推定手法が 2012 年に発表されて以降<sup>4),5)</sup>、いくつかのプライマーが開発されている<sup>7),8)</sup>。MiFish プライマーセット（以下、MiFish）は、硬骨魚類に共通する MiFish-U と軟骨魚類に最適化した MiFish-E によって構成され、水族館において 93% も

表—1.1 本論文で行った調査の種類とその解析内容。

調査時期		調査場所	タイプ	第 2 章			第 3 章		第 4 章
				2.2	2.3	2.4	3.2	3.3	
2017 年度	2018 年 1 月	東京湾周辺	沿岸域		*	*		*	
2018 年度	2018 年 9 月	広島県尾道	アマモ場	*					
		山口県笠戸湾	アマモ場	*				*	
	2018 年 12 月	東京湾口（フェリー）	沿岸域、湾口						*
	2019 年 1 月	広島県尾道	アマモ場	*					
2019 年度	2019 年 6-7 月	山口県笠戸湾	アマモ場	*				*	
		東京湾	釣り場	*	*				*
	2019 年 7-8 月	神奈川県久里浜湾	アマモ場	*		*	*		
		山口県笠戸湾	沿岸域、アマモ場	*		*	*	*	*

の魚種を適中させる驚異的な実績を有している<sup>7)</sup>。さらに、近年、温帯の沿岸域に生息するアナハゼ類に最適化した MiFish-U2 も開発されており<sup>1)</sup>、推定可能な魚種は充実しつつある。

プライマーには、データベースが充実している DNA 領域 COI を対象としたもの等もあり、それぞれ特徴を有しているが、MiFish は、種の識別能力及び再現性が高く、かつ、魚類に特化していることから推定効率にも優位性がある<sup>18)</sup>。魚類へ特化したプライマーとしては、他にも teleo<sup>8)</sup> 等があるが、MiFish であれば我が国の多くの分析専門業者が取り扱える。本論文では、我が国の港湾での応用方法を探ることを目的としていることから、MiFish に着目している。

## (2) 本章の目的

本章では、MiFish を用いた環境 DNA 分析による沿岸域の魚類の推定精度の把握に主眼を置き、まず、釣り場とアマモ場において、直接的な方法によって把握した魚種と環境 DNA 分析による推定結果を比べ、その推定精度を検証した。推定精度の評価においては、気象予報の分野で用いられる「適中」、「見逃し」、「空振り」の3つのカテゴリ<sup>19)</sup>を用いた(図—2.1)。閉鎖性空間における評価では、空振りに対応する評価方法として偽陽性が用いられるが<sup>7)</sup>、開放的な空間ではこの用語が適切なものとは言えない。このことから、本論文ではこれらの評価方法を採用した。

本章の構成は、推定精度の評価を通じて環境 DNA 分析の概観をつかんだ後、見逃しと空振りに影響する要因を整理し、環境 DNA 分析によって得られた結果を取り扱う上での注意点を抽出した。

## 2.2 魚類の推定精度の検証

### (1) 本節の目的

環境 DNA 分析による魚類の網羅的な解析では、直接的な方法と同等もしくはそれ以上の種を推定できることが知られている<sup>5),8),18),20),21)</sup>。しかし、沿岸域での応用を確かなものとするには、推定精度に関する知見は未だに十分とは言えない。

本節では、釣り場とアマモ場において環境 DNA 分析で魚種を推定し、直接的な方法で得た魚種と比較し、適中、見逃し、空振りの3つのカテゴリにより推定精度を評価した。推定精度の評価を行った後、見逃しと空振りの特徴を整理し、環境 DNA 分析による魚類の網羅的解析と直接的な方法との間で不一致が生じる要因を抽出した。

### (2) 方法

#### a) 直接的な方法による魚類把握

環境 DNA 分析による推定精度は、東京湾内の3つの釣り場(図—2.2)と全国の3つのアマモ場(図—2.3)を対象として検証した。

		直接的な方法 (釣果情報・そりネット)	
		検出	未検出
環境 DNA による方法	出魚	適中	空振り
	未出魚	見逃し	適中

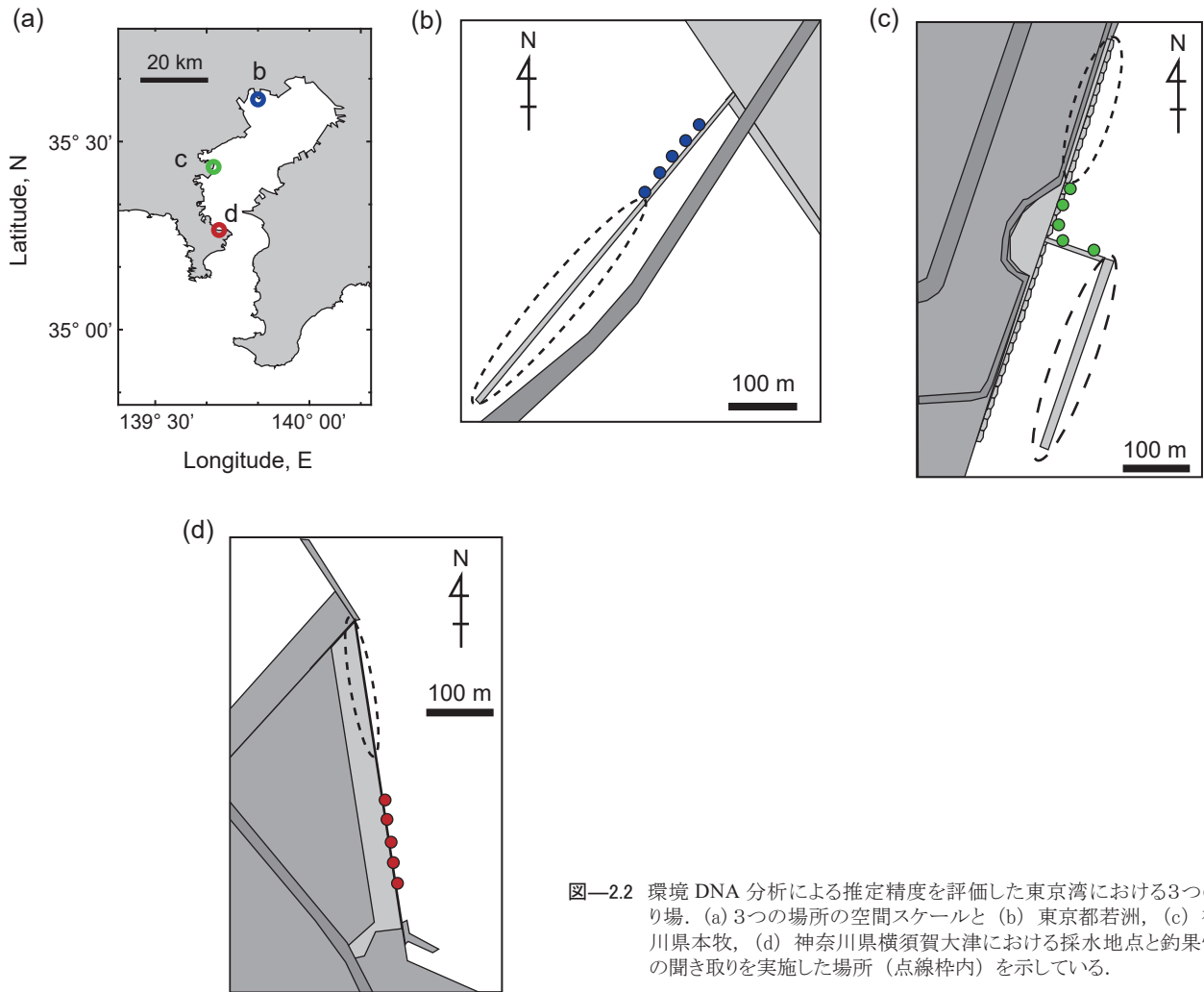
図—2.1 本研究で採用する環境 DNA 分析による推定精度の評価モデル。未検出同士の適中は評価できないため、点線の3つのカテゴリで評価した。気象予報における予測精度の評価モデル<sup>19)</sup>を応用した。

東京湾内の釣り場では、2019年1月において環境 DNA の採水ポイント近くの釣り人から釣果情報を聞き取った。釣果は一般人から聞き取ったため、魚種は一般名となり同定精度は悪い。アマモ場では、そりネットを沿岸方向(岸と平行方向)におよそ 50 m 程度を曳航してアマモ場内に生息する魚類を採集した。採集した魚は、専門家により可能な限り種レベルまで同定した。

そりネットによる採集は、2018年夏季(9月)と2019年冬季(1月)の広島県尾道と山口県笠戸湾においては1回のみ実施し、2019年夏季の山口県笠戸湾(7, 8月)では3回、神奈川県久里浜(6, 7月)では4回実施した。なお、そりネットのサイズはそれぞれの場所と年度で異なる(2018年夏季及び2019年冬季の広島県尾道・山口県笠戸湾、開口幅 1.5 m, 網の目合い 10 mm; 2019年夏季神奈川県久里浜、開口幅 0.6 m, 網の目合い 3 mm; 2019年山口県笠戸湾、開口幅 0.6 m, 網の目合い 0.8 mm)。

#### b) 環境 DNA 分析のための採水

環境 DNA 分析のための採水は、釣果情報の聞き取り及びそりネットによる調査と同じ日に行った(ただし、神奈川県久里浜においては4回のそりネット調査のうち3回のみで実施)。採水は、海面から 0.5 m の層の海水を採取するよう行った。採水では、事前に次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄したハイロート採水器を用いた。ハイロート採水器は、採水直前に採取する水で十分に共洗った。保存容器として 2 L のプラスチック滅菌瓶を採用した。調査員は、採水時の汚染を抑えるため、ラテックスロング滅菌手袋を装着して採水した。サンプル中の DNA の分解を抑えるため、採水後、直ちに塩化ベンザルコニウム 0.01% 溶液(オスパン S)を 2 mL (サンプル 1 L 当たり 1 mL)を添加した<sup>22)</sup>。サンプルは、採水後直ちに冷蔵保存し、調査終了後に分析者へ冷蔵で輸送した。

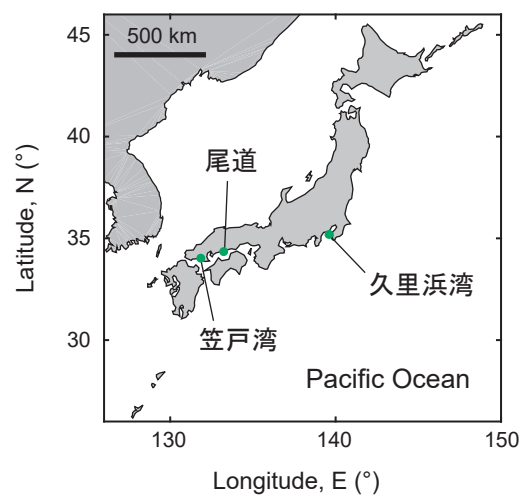


図—2.2 環境 DNA 分析による推定精度を評価した東京湾における3つの釣り場. (a) 3つの場所の空間スケールと (b) 東京都若洲, (c) 神奈川県本牧, (d) 神奈川県横須賀大津における採水地点と釣果情報の聞き取りを実施した場所 (点線枠内) を示している.

東京湾内の釣り場においては、それぞれの場所で護岸から5サンプルを採水した。アマモ場においては、小型船舶でアマモ場まで行き、船上から採水した。2018年夏季の広島県尾道と山口県笠戸湾においては3サンプル、2019年冬季の広島県尾道と山口県笠戸湾においては5サンプル、2019年夏季の山口県笠戸湾と神奈川県久里浜においては24サンプル（1回のそりネット調査当たり8サンプル）を採取した。なお、そりネットによる調査は、アマモ場を攪乱させるため、環境DNAのための採水後に行った。

#### c) 環境DNAの分析方法

MiFishを用いた環境DNA分析は、環境DNAの濃縮から精製まで、精製したDNAの増幅及びタグ付け、DNA配列データの取得及び魚種の推定の流れで行われた。MiFishによる推定の特徴は、解析対象の絞り込みにこのプライマーを用いる点であり、精製したDNAにMiFishを添加してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって対象のDNA領域を増幅した。



図—2.3 環境DNA分析による推定精度を評価した3つのアマモ場. それぞれのアマモ場において、そりネットを使って魚を直接採取した。



環境 DNA の濃縮におけるろ過量は、2018 年夏季の広島県尾道以外の場所では概ね 2 L としたが、可能な限りろ過するよう努めたため 10% 程度のばらつきがある。2018 年夏季の広島県尾道においてはサンプルに濁りがあったため、ろ過量は 1 L 程度とした。

解析対象の絞り込みにおいて、硬骨魚類に共通する MiFish-U と軟骨魚類に最適化した MiFish-E を必ず用いた。また、2019 年夏季の山口県笠戸湾と神奈川県久里浜のサンプルについては、温帯の沿岸域に生息するアナハゼ類に最適化した MiFish-U2 も含めた 3 つのプライマーのセットで解析対象の絞り込みを行った。

分析結果として、推定された種ごとに読み取られた DNA の数（リード数）が記録される。リード数が 99 以下の魚種は、推定精度が疑わしいと考え、本論文では断りがない限り評価対象から除外した。解析対象として採用された魚種は検出とし、検出と未検出の二値のデータとして扱った。

#### d) 推定精度の評価方法

環境 DNA 分析によって推定された魚種と直接的な方法によって調べた魚種を比較し、それぞれの魚種について、適中、空振り、見逃しの 3 つのカテゴリで評価した（図—2.1）。環境 DNA 分析に関しては、複数のサンプルを採取しているため、その推定されたサンプル数の割合（出現頻度）も整理した。ただし、直接的な方法で得られた各魚種の個体数については整理せず、1 つの調査の中で 1 個体でも確認されれば検出として扱った。

環境 DNA 分析による推定結果のうちの一部のデータセットにおいて、サンプル当たりの検出力とサンプル数の重要性を示すため、サンプル数に対する期待種数の変化（サンプル数をサンプリングエフォートとした希薄化曲線<sup>23)</sup>）を描いた。また、ブートストラップ法により期待種数の 95% 信頼区間も求めた。この希薄化曲線の解析においては、統計解析向けのソフトウェアのための言語である R<sup>24)</sup> の iNEXT パッケージを使った<sup>25)</sup>。

### (3) 結果と考察

#### a) 適中、見逃し、空振り

推定精度の検証を行ったすべての場所において空振りが多く、環境 DNA 分析の方が直接的な方法に比べて多くの魚種を推定できた（表—2.1、表—2.2、及び表—2.3）。特に、釣果情報との比較においては、見逃しは本牧におけるアナゴとメバルのみであり、環境 DNA による適中率が高い（表—2.1）。なお、東京都若洲の釣り人の多くは、カレイを狙った投げ釣りをしており、釣果は確認されなかった。アマモ場におけるそりネットによる調査結果との比較においてもやはり空振りの方が多く、釣果情報との比較と比べて見逃しが多く、場所によっては見逃した種数の方が適中の種数よりも多い（表—2.2）。

#### b) 見逃しの特徴

見逃しが少ない一つの傾向として、環境 DNA 分析のサンプル数が多いことが挙げられる。山口県笠戸湾のアマモ場における 2018 年と 2019 年の夏季の環境 DNA 分析による推定結果を比較すると、2019 年においては 8 倍のサンプルで 2018 年よりも 20 種程度多くの魚種を推定している（図—2.4）。そりネットによって採取された魚種の数も異なることから、正確な比較はできないものの、サンプル数を増やすことは、見逃しを減らす重要なポイントであることが理解できる。

魚種別に見逃しの特徴を見ると、アナハゼ類に最適化した MiFish-U2 の有無の影響が見られる。MiFish-U2 を用いた 2019 年の夏季のアマモ場では *Pseudoblennius*（アナハゼ属）が推定されているものの（表—2.3）、2018 年の夏季における山口県笠戸湾では見逃しとなっている（表—2.2）。現在では MiFish-U2 は広く使われていることから、この見逃しは今後問題にならなくなるものと考えられる。

*Sebastes*（メバル属）は、釣果情報の聞き取りとそりネットによる調査に係わらず、見逃されやすい傾向にあった。また、2019 年冬季の山口県笠戸湾では、*Sebastes ventricosus*（クロメバル）が空振りとなっている一方で、*Sebastes* の多くの種が見逃されている（表—2.2）。2019 年の神奈川県久里浜と山口県笠戸湾の比較では、環境 DNA 分析では種の特定まで至っていないものの *Sebastes* に属する種がそりネットによって採取されていることから、緩い条件の下で適中として評価している（表—2.3）。後述するとおり、*Sebastes* の複数の種は、MiFish で解析する DNA 領域の配列が類似しているため、環境 DNA 分析では特定に至らない傾向にある（2.3 と 3.3）。*Ditrema*（ウミタナゴ属）と *Takifugu*（トラフグ属）も同様の傾向にあり、*Takifugu* に関しては、2019 年冬季の広島県尾道において見逃しとなっている *Takifugu pardalis* が解釈によっては適中として評価できる（表—2.2）。

*Hippocampus*（タツノオトシゴ属）と *Pholis crassispina*（タケギンポ）は、環境 DNA 分析では属のレベルでも適中したことがない（表—2.2 及び 2.3）。これらは、MiFish による推定が困難な魚種を反映しているか、もしくは環境 DNA が放出されにくい魚種である可能性もある。今後、その原因の解明が進み、分析精度の改善が期待される。

なお、*S. ventricosus*、*S. cheni*（シロメバル）、*S. inermis*（アカメバル）は、近年によりやく遺伝的に別種であることが解明されたものの<sup>26)</sup>、それまでは色の違いがある同一種として認識されてきた経緯がある。このことから、2019 年冬季の山口県笠戸湾におけるこれらの見逃し及び空振りは、直接的な方法による同定の精度に問題があった可能性も否定できない。

#### c) 空振りの特徴

空振りとして推定された種数は多く、環境 DNA 分析による検出力の強さが理解できた。しかし、空振りの中には生息し



表—2.1 環境 DNA 分析による魚類の推定結果と釣果の聞き取り結果との比較 (2019 年 1 月). 環境 DNA の採水はそれぞれの場所で 5 サンプルずつ採取し, それぞれの魚種が推定できた割合を示している.

評価	東京都若洲	神奈川県本牧	神奈川県横須賀大津
適中		コノシロ (5/5) カサゴ (5/5) スズキ (3/5) アジ (3/5) ウミタナゴ (2/5) ハゼ (1/5) フグ (4/5)	カサゴ (5/5) メバル (5/5) クロダイ (5/5) ウミタナゴ (5/5) ハゼ (2/5) フグ (4/5)
見逃し		アナゴ メバル	
空振り	<i>Seriola dumerili</i> , カンパチ (1/5) <i>Salmo salar</i> , タイセイヨウサケ (1/5) <i>Gadus macrocephalus</i> , マダラ (1/5) その他 12 種	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> , ドジョウ (1/5) その他 11 種	<i>Thunnus thynnus</i> , タイセイヨウクロマグロ (5/5) <i>Salmo salar</i> , タイセイヨウサケ (4/5) <i>Semicossyphus reticulatus</i> , コブダイ (1/5) その他 37 種

※プライマーは, MiFish-U 及び MiFish-E を用いた.  
※東京都若洲では釣果情報は得られなかった.

表—2.2 アマモ場における環境 DNA 分析による魚類の推定結果とそりネットによる調査結果の比較. 広島県尾道と山口県笠戸湾の2つのアマモ場において夏季 (2018 年 9 月) と冬季 (2019 年 1 月) に実施した結果を示している. 環境 DNA の採水は, 夏季においては 3 サンプル, 冬季においては 5 サンプルずつ採水し, それぞれの魚種が推定できた割合を示している. そりネットの調査は, 環境 DNA の採水と同じ日に 1 回実施した.

評価	広島県尾道		山口県笠戸湾	
	夏季	冬季	夏季	冬季
適中	<i>Acentrogobius pflaumii</i> (1/3) <i>Acentrogobius sp.</i> (2/3)	<i>Acentrogobius pflaumii</i> (3/5) <i>Acentrogobius sp.</i> (4/5) <i>Favonigobius gymnauchen</i> (2/5) <i>Takifugu niphobles</i> (5/5)	<i>Acentrogobius pflaumii</i> (2/3) <i>Acentrogobius sp.</i> (2/3) <i>Gymnogobius heptacanthus</i> (3/3) <i>Rudarius ercodes</i> (1/3) <i>Siganus fuscescens</i> (1/3) <i>Stephanolepis cirrhifer</i> (2/3)	<i>Favonigobius gymnauchen</i> (2/5) <i>Gymnogobius heptacanthus</i> (4/5) <i>Hexagrammos agrammus</i> (4/5) <i>Paracentropogon rubripinnis</i> (3/5)
見逃し	<i>Hippocampus sp.</i> <i>Inimicus japonicus</i> <i>Platycephalus sp.</i> <i>Rudarius ercodes</i> <i>Syngnathus schlegeli</i>	<i>Acanthopagrus latus</i> <i>Repomucenus curvicornis</i> <i>Rudarius ercodes</i> <i>Syngnathus schlegeli</i> <i>Takifugu pardalis</i>	<i>Paracentropogon rubripinnis</i> <i>Pholis crassispinna</i> <i>Pseudoblennius sp.</i> <i>Sebastes cheni</i> <i>Sebastes inermis</i> <i>Sebastes schlegelii</i> <i>Syngnathus schlegeli</i>	<i>Sebastes cheni</i> <i>Sebastes inermis</i> <i>Sebastes oblongus</i> <i>Sebastes schlegelii</i>
空振り	16 種	18 種	<i>Carassius auratus</i> , キンギョ (1/3) <i>Katsuwonus pelamis</i> , カツオ (1/3) <i>Nipponocypris temminckii</i> , カワムツ (1/3) <i>Odontobutis obscura</i> , ドンコ (1/3) <i>Tribolodon hakonensis</i> , ウグイ (1/3) <i>Zacco platypus</i> , オイカワ (1/3) その他 21 種	31 種

※プライマーは, MiFish-U 及び MiFish-E を用いた.

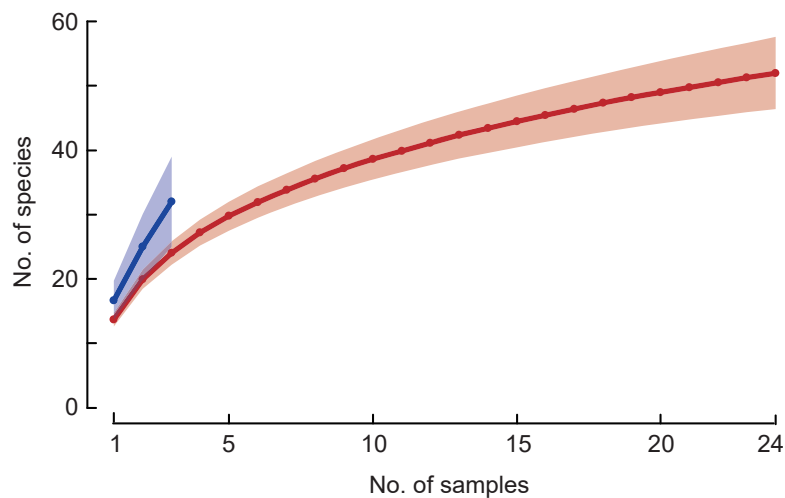
表—2.3 アマモ場における環境 DNA 分析による魚類の推定結果とそりネットによる調査結果との比較。神奈川県横須賀市久里浜（2019年6月、7月）と山口県笠戸湾（2019年7月、8月）で実施した結果。環境 DNA の採水は、24 サンプルずつ採水し、それぞれの魚種が推定できた割合を示している。環境 DNA の採水は合計で3回実施した（1回当たり8サンプルの採水）。そりネットの調査結果は、それぞれの場所環境 DNA の採水と同じ日に1回ずつ実施し、久里浜湾においてはさらに1回追加した。

評価	神奈川県久里浜湾	山口県笠戸湾
適中	<i>Acentrogobius pflaumi</i> (21/24) <i>Aulichthys japonicus</i> (1/24) <i>Ditrema viride</i> (24/24) <i>Favonigobius gymnauchen</i> (10/24) Gobiidae (24/24) <i>Heteromycteris japonica</i> (1/24) <i>Paracentropogon rubripinnis</i> (22/24) <i>Plotosus japonicus</i> (2/24) <i>Pseudoblennius cottoides</i> (7/24) <i>Pseudoblennius percoides</i> (7/24) <i>Pterogobius</i> (5/24) <i>Rudarius ercodes</i> (14/24) <i>Sebastes cheni</i> (19/24) <i>Sebastes inermis</i> (19/24) <i>Syngnathus schlegeli</i> (1/24) <i>Takifugu pardalis</i> (23/24)	<i>Acentrogobius pflaumi</i> (13/24) <i>Paracentropogon rubripinnis</i> (1/24) <i>Pseudoblennius cottoides</i> (3/24) <i>Rudarius ercodes</i> (9/24) <i>Sebastes cheni</i> (15/24) <i>Sebastes inermis</i> (15/24) <i>Syngnathus schlegeli</i> (1/24)
見逃し	<i>Apogonichthyoides niger</i> <i>Hippocampus coronatus</i> <i>Pholis crassispina</i>	<i>Hippocampus coronatus</i>
空振り	<i>Carassius cuvieri</i> , ゲンゴロウブナ (1/24) <i>Cyprinus carpio</i> , コイ (21/24) <i>Oncorhynchus sp.</i> , タイヘイヨウサケ属の一種 (1/24) <i>Paramisgurnus</i> , ドジョウ属 (1/24) その他 58 種	<i>Carassius spp.</i> , フナの種 (3/24) <i>Lepomis macrochirus</i> , ブルーギル (1/24) その他 44 種

※プライマーは、MiFish-U, MiFish-U2, 及び MiFish-E を用いた。

※ *Ditrema viride*, *Sebastes* の 2 種, *Takifugu pardalis* については、それぞれ、環境 DNA で *Ditrema sp.*, *Sebastes sp.*, *Takifugu sp.* として推定されたものを適中として評価している。

※ *Pseudoblennius cottoides* は、環境 DNA 分析で推定されていたものの近縁種であることから *Pseudoblennius percoides* に含めて整理されていた。このことから、ここでは、環境 DNA 分析で *Pseudoblennius percoides* として推定されたものを適中として評価している。



図—2.4 環境 DNA 分析によって推定された魚類の種数に関するサンプルベースの希薄化曲線の比較。山口県笠戸湾における夏季の 2018 年（青色，全 3 サンプル；MiFish-U 及び MiFish-E）と 2019 年（赤色，全 24 サンプル；MiFish-U, MiFish-U2, 及び MiFish-E）の結果を示している。ハッチは 95% 信頼区間を示している。

ているはずがないと考えられる種も推定された。例えば、横須賀大津で検出されたクロマグロ（表—2.1）、横須賀大津、若洲、横須賀久里浜で検出されたタイセイヨウサケ（表—2.1及び2.3）、笠戸大島で検出されたキンギョやブルーギル等（表—2.2及び2.3）は、その場にいるとは考えにくい。

舞鶴湾においてマアジを対象とした環境 DNA 分析では卸売市場周辺で高い DNA 濃度が検出されており、人間活動による影響を強く受けた結果が示されている<sup>10)</sup>。横須賀大津の調査地点付近にも魚市場があり、出現頻度が高かったクロマグロとタイセイヨウサケは、その影響を受けた可能性がある。また、ブルーギルは自然由来であったとしても、調査対象とした海に生息していたとは考えにくく、陸域からの影響を受けたものと推測される。このような過剰な推定は、沿岸域だけでなく閉鎖性空間でも見られ<sup>6),7)</sup>、環境 DNA 分析における重要な注意点と言える。過剰な推定の要因については2.4で詳細に検討する。

#### (4) まとめ

本節では、釣り場とアマモ場において MiFish を用いた環境 DNA 分析による魚類の推定精度の把握を行った。この結果、釣果情報や網による直接的な手法に比べてより多くの魚種を推定できることを確認した。

しかし、見逃しのケースもあった。見逃しを減らすためには、採水・ろ過量を増やしてサンプル当たりの検出力を高めるか、サンプルの数を多く取ることが重要である。近年新しく開発された MiFish-U2 はアナハゼ類の推定精度を改善させたが、MiFish による特定が困難な種もいた。この困難さについては、今後の技術開発による解決が期待される。

また、その場には生息していないと考えられる種の推定（過剰な推定）があることも示した。過剰な推定については、人間活動や他の場所由来の環境 DNA が影響している可能性があり、2.4 において詳細に検討する。

### 2.3 検出力と同定精度—分析者間の比較—

#### (1) 本節の目的

MiFish を用いた環境 DNA の分析方法は、標準的な方法が確立されており<sup>1)</sup>、分析者によって大きく異なることはない。しかし、分析過程の中の個別の処理方法については、分析者のノウハウが活かされており、このノウハウの違いによって推定結果に差が生じる可能性が考えられる。

本節では、同じ場所で同時に採水した環境 DNA サンプルを2つに分けて異なる分析者によって推定した結果を比較し、分析者の違いによる検出力及び同定精度の差を検証した。

#### (2) 方法

##### a) 調査及び分析方法

異なる分析者による検出力と同定精度を比較するため、2018年1月に茅ヶ崎から房総半島先端までの東京湾周辺の

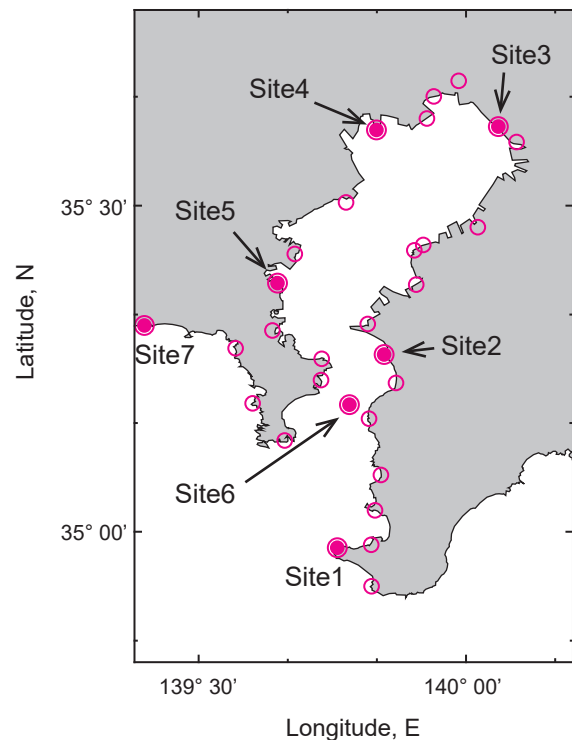
7つの場所（図—2.5 に示す Site1 から 7）で採水した。サンプルは、Site6 以外の6つの場所においては、陸上から海へアクセスして 1 L のプラスチック滅菌瓶を用いて手で採水するか、次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄済みのバケツで採水した。バケツによって採水したサンプルは、1 L のプラスチック滅菌瓶へ移し替えた。それぞれの方法では、ラテックスロング滅菌手袋を装着して採水したが、手によって採水する場合においては、手が海水に浸らないよう注意した。Site6 においては、港湾空港技術研究所が東京湾フェリーのかなや丸に設置している水質測定装置から海水を分取した。採水後、直ちに冷蔵保存し、調査終了後に2つのサンプルを別々の分析者（A 社と B 社）に送付した。

分析の過程については、2.2 で記述したとおりである。また、両社ともに、ろ過量は 1 L 程度とし、アナハゼ類に最適化した MiFish-U2 を用いていない。しかし、それぞれの分析過程の中で用いられる試薬や細部の処理方法については、分析者のノウハウが用いられている。

A 社は、リード数等から推定結果の妥当性を検証した後の検出・未検出の二値の結果を報告した。B 社は推定された種のリストをリード数の結果と共に報告した。

#### b) 解析方法

二社の検出力を比較するため、それぞれから報告された



図—2.5 東京湾周辺において環境 DNA のサンプルを採取した場所。中抜き丸は A 社のみ、Site1-7 は A 社と B 社の二社が分析した地点を示している。

表—2.4 環境 DNA 分析による魚類種数の推定結果の分析者間の比較。サンプルは同じ場所（図—2.5 参照）で同時（2018 年 1 月）に採水したものであり、分析までの過程は同じである。B 社においてはリード数が 99 以下のものを棄却した結果（100 以上の種を採用）とすべての結果の両方を併記している。

場所	出現種数			共通種数
	A 社	B 社		
		リード数 $\geq 100$	すべて	
Site1	24	13	14	6
Site2	18	24	33	4
Site3	17	6	9	1
Site4	24	10	12	5
Site5	29	8	11	6
Site6	36	4	4	3
Site7	28	0	0	0

※プライマーは、MiFish-U 及び MiFish-E を用いた。

※共通種数については、B 社のいずれの結果と比較しても同じである。

種数をウィルコクソンの符号順位検定（Wilcoxon signed-rank test）を用いて比較した。B 社の推定結果については、本論文で採用している棄却ルール（リード数が 99 以下は棄却）に則って推定した場合に加え、そのルールを適用せずにリストされた種すべてを推定した場合の 2 つを対象として、棄却ルールの感度解析を行った。

本節で比較した 7 つの場所のうち Site4 は、釣果情報との比較（2.2）を行った東京都若洲である。本節における二社の推定結果と併せて東京都若洲の結果を比較することで、二社の間で結果が異なった原因を検証した。なお、東京都若洲の採水はおよそ 1 年のずれがある。その分析については、比較対象の二社のうちの二社が請け負った。

### (3) 結果と考察

#### a) 検出力の差

東京湾周辺の 7 つの場所における環境 DNA 分析による推定結果は、A 社で 17 から 36 種、B 社で 0 から 24 種であった（表—2.4）。その内訳は 6 つの場所で A 社の推定種数の方が多く、検出力は A 社の方が有意に高かった（Wilcoxon signed-rank test;  $W_+ = 27, p = 0.034 < 0.05$ ）。しかし、棄却ルールを採用しない B 社の種数と比較すると、二社の間で有意な差は得られなかった（ $W_+ = 24, p = 0.109$ ）。

これらの比較は、分析上の検出力の差は、結果の取り扱いに依存するもの実際にあった可能性を示している。環境 DNA 分析の検出力は、ろ過量やフィルタの孔径等の DNA 抽出過程や PCR サイクルや温度等の分析条件の影響を強く受けることが知られており<sup>16),27)</sup>、分析過程の中の分析者のノウハウの違いが検出力の差の要因になったものと考えられる。

B 社が検出できなかった Site7 のサンプルは、海岸の波打ち際に得られたものであり、砂等の夾雑物の混入が避けられなかった。夾雑物は PCR における阻害要因になることもあり、

この影響の除去は環境 DNA 分析において重要な要素となる<sup>1),21)</sup>。この影響の除去が分析者の間の検出力に差をもたらした可能性が考えられる。

検出力は、分析上の影響に限らず、採取する底泥の量<sup>28)</sup>や水のろ過量<sup>29)</sup>等のサンプルサイズの影響も受ける。このように多重の要因が影響する検出力を標準化することはおそらく困難であり、環境 DNA 分析によって推定された種数を単純に比較することに生態学上の意味はないと言える。

#### b) 二社で検出された種の傾向

二社の比較をした場所のうち、B 社が推定できなかった Site7 を除き、すべての場所で共通する種が存在した（表—2.4）。Site4 における共通の種は 5 種であり、翌年（2019 年）に実施した環境 DNA 分析において 3/5 以上の頻度で推定された 8 種のうちの 4 種がこの共通種であった（表—2.5）。この 4 種の *Acanthopagrus sp.*（クロダイ属の一種）、*Konosirus punctatus*（コノシロ）、*Lateolabrax japonicus*（スズキ）、*Mugil cephalus*（ボラ）は、若洲周辺に生息している一般的な魚種である。翌年に 3/5 以上の頻度で推定された残りの 4 種の内訳は、A 社のみで推定された種が 2 種、B 社のみで推定された種が 1 種、どちらの社でも推定されなかった種が 1 種である。2019 年の環境 DNA 分析で 3/5 以上の頻度で推定された 8 種に限定して見れば、分析者の間の検出力に大きな差はない。

#### c) 同定精度の差

同定精度においても分析者の違いによる差が見られた。*Acanthopagrus schlegelii*（クロダイ）、*Ditrema temminckii temminckii*（ウミタナゴ）、*Hexagrammos agrammus*（クジメ）、*Sardinops melanostictus*（マイワシ）、*Sebastes ventricosus*（クロメバル）、*Takifugu niphobles*（クサフグ）に関して、一方の分析者は属の一種として同定していた。これらは、MiFish によって特定しにくい魚種であり（2.2）、一方の社が慎重に検討して属の一種までの同定に留めた可能性がある。

#### (4) まとめ

本節では、同じサンプルであっても分析者の違いによって分析上の検出力に差があることを示した。また、検出力は、分析者の違いの他にも多重な要因が影響することから、標準化することは困難であり、サンプル当たりの種数に生態学上の意味を持たせることはできない。ただし、検出力に差はあっても、出現頻度が高い種は推定されやすい傾向にあった。このことは、検出力に差が多様性比較において問題とならない可能性を示唆している（3.2）。

また、分析者が違えば同定精度も異なる可能性を示した。環境 DNA 分析の技術やデータベースは日々進歩していることから、同じ分析者であっても分析手法の改善に伴って同定精度が変化することも十分に考えられる。同定精度の差は、多様性比較の解析に影響を及ぼすため（3.3）、十分な注意

表—2.5 環境 DNA 分析によって推定された魚種の分析者間の比較。サンプルは、東京都若洲（図—2.5 における Site 4）で同時（2018 年 1 月）に採水したものであり、B 社においてはリード数が 99 以下のものを棄却した結果を示している。また、ほぼ同じ場所（図—2.2b）で 1 年後（2019 年 1 月）に採水して推定した結果を示している。2019 年 1 月については、5 サンプル採水しており、その推定割合を示している。

カテゴリ	2018 年 1 月		2019 年 1 月	
	魚種名	A 社分析	B 社分析	(B 社)
共通検出種	<i>Acanthopagrus sp.</i>	検出	検出	4/5
	<i>Konosirus punctatus</i>	検出	検出	5/5
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	検出	検出	3/5
	<i>Mugil cephalus</i>	検出	検出	5/5
	<i>Rhynchopelates oxyrhynchus</i>	検出	検出	
一社のみ検出種	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	検出		4/5
	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	検出		
	<i>Chasmichthys dolichognathus</i>	検出		
	<i>Chasmichthys gulosus</i>	検出		
	<i>Cololabis saira</i>	検出		
	<i>Dictyosoma burgeri</i>	検出		
	<i>Engraulis japonicus</i>	検出		4/5
	<i>Lepomis macrochirus</i>	検出		
	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	検出		
	<i>Omobranchus punctatus</i>		検出	
	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	検出		
	<i>Plecoglossus altivelis</i>	検出		
	<i>Repomucenus sp.</i>	検出		
	<i>Rhinogobius sp.</i>	検出		
	<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>	検出		
	Salmonidae	検出		(1/5)
	<i>Sebastes sp.</i>		検出	
	<i>Sebastiscus marmoratus</i>		検出	
	<i>Theragra chalcogramma</i>	検出		
	<i>Tribolodon brandtii</i>		検出	3/5
<i>Tridentiger obscurus</i>	検出			
<i>Tridentiger trigonocephalus</i>		検出		
<i>Tripterygion etheostoma</i>	検出			
<i>Zacco platypus</i>	検出			
未検出種	<i>Dasyatis akajei</i>			(2/5)
	<i>Gadus macrocephalus</i> , マダラ			(1/5)
	<i>Pagrus major</i>			(1/5)
	<i>Parablennius yatabei</i>			3/5
	<i>Sardinella zunasi</i>			(2/5)
	<i>Seriola dumerili</i> , カンパチ			(1/5)
<i>Seriola quinqueradiata</i>			(1/5)	

※プライマーは、MiFish-U 及び MiFish-E を用いた。

が必要である。

#### 2.4 過剰な推定の傾向

##### (1) 本節の狙い

空振りは環境 DNA 分析の大きな強みだが、人間活動に由来したり、自然由来であったとしても遠くから運ばれた環境 DNA を検出したものと考えられる空振りもあった (2.2)。このような過剰な推定は、沿岸域だけでなく閉鎖性空間でも見られ<sup>6),7)</sup>、環境 DNA 分析における推定結果を取り扱う上で重要な注意点である。Miya et al. (2015)<sup>7)</sup> は、水族館の水槽に

おける検証で偽陽性（空振り）が生じた種の傾向として、他のサンプルとの同時分析による混入、他の水槽からの混入、及び水槽で撒かれた餌を由来としたもの等を挙げている。すなわち、このことを現地調査に当てはめて考えると、過剰な推定は、分析上のもの、調査方法によるもの、調査場所によるもの等の多様な要因に起因しているものと推測できる。

本節では、過剰な推定における調査者の立場からの原因を検証することを目的とし、まず、調査方法に起因する汚染の程度を検討するため、フィールドブランクを用いたネガティブコントロールを行った。次に、調査場所に起因する汚染の



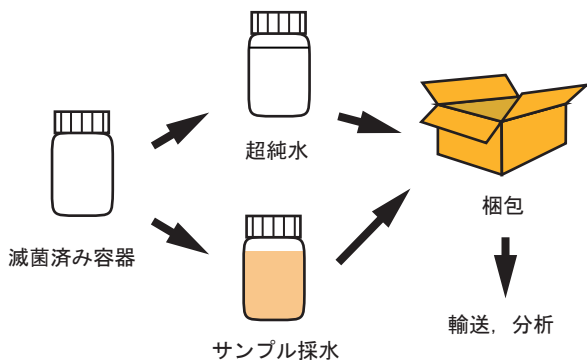
程度を検討するため、東京湾周辺の沿岸域において、対象場所に生息する生物以外を由来とする環境 DNA 分布の把握を試みた。

(2) 方法

a) ネガティブコントロール

ネガティブコントロールとは対照実験の一つであり、陰性 (MiFish で検出されないこと) が分かっているブランクサンプルを同時に分析することで、見ようとするサンプルの正味の効果を見るものである。

ネガティブコントロールは 2019 年夏季の神奈川県久里浜と山口県笠戸湾の調査において実施した。ブランクサンプルは、調査前に滅菌済み容器に超純水 (Milli-Q) を入れて封をし、それ以外は環境 DNA サンプルと同様に扱った (図



図—2.6 ネガティブコントロールの説明。超純水を入れたブランクサンプルを容易し、サンプル採水以外の過程を現地サンプルと同様に扱い分析した。

表—2.6 ネガティブコントロールで検出された例。計 15 サンプルのブランクサンプルのうち、3 サンプルで検出された。カッコ内の数字はリード数を表している。

サンプル名	検出された魚種とリード数
サンプル1	<i>Mugil cephalus</i> , ボラ (4)
サンプル2	<i>Barbatula barbatula</i> , フクドジョウ (72559) <i>Mugil cephalus</i> , ボラ (4)
サンプル3	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> , クロダイ (1016) <i>Cyprinus carpio</i> , コイ (619), <i>Scomber australasicus</i> , ゴマサバ (258)

※プライマーは、MiFish-U, MiFish-U2, 及び MiFish-E を用いた。

—2.6). 環境 DNA サンプル 4 本に 1 本の割合 (郵送単位) でブランクサンプルを入れ、分析者に輸送して分析した。分析したブランクサンプルは計 15 本であった。

b) 過剰な推定の種の分布の把握

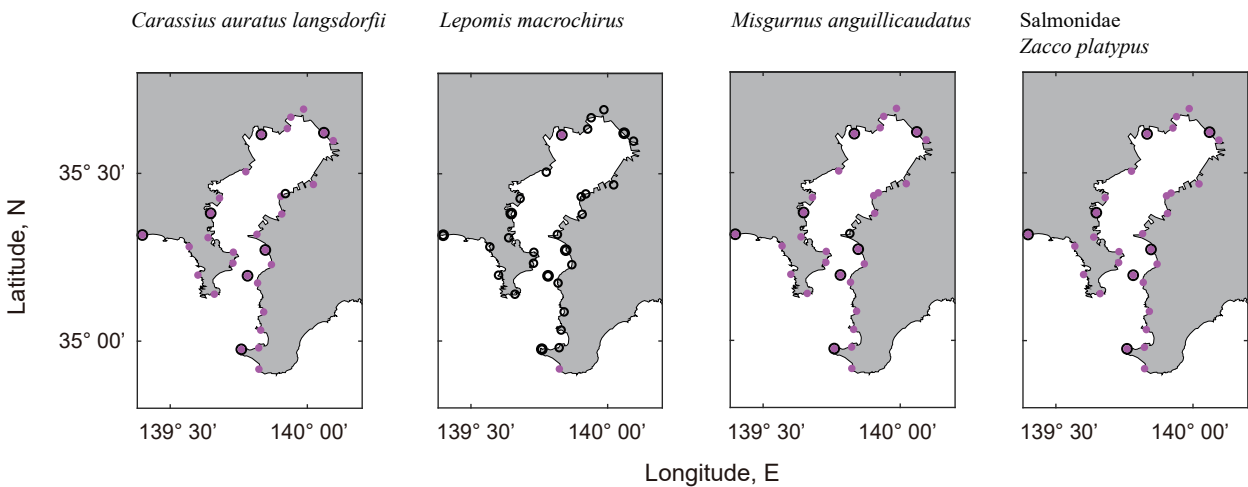
過剰な推定の種の空間分布を把握するため、茅ヶ崎から房総半島先端までの東京湾周辺の 30 地点において採水を行った (図—2.5)。調査は、2018 年 1 月に 4 班により 1 日のうちに実施した。その他の方法については 2.3 における方法と同じであり、A 社が分析した。

(3) 結果と考察

a) ネガティブコントロール

ブランクサンプルにおいて、15 本のうち 3 本から 5 種の魚が検出された (表—2.6)。2 本のブランクサンプルで検出された *M. cephalus* はリード数が一桁であることから、本研究においては排除される対象であり結果に影響することはない。しかし、その他の 4 種は高いリード数で検出された。

ブランクサンプルで検出される理由の一つとして、分析中



図—2.7 東京湾周辺において生息しないと考えられるものの環境 DNA 分析によって推定された魚種の分布 (A 社による分析結果)。例として、4 パターン (5 種) の推定結果を示している。プライマーは、MiFish-U 及び MiFish-E を用いた。



表—2.7 東京湾周辺において環境 DNA 分析によって推定されたものの生息しないものと考えられるもののうち、多くの地点で推定された魚種（A社による推定結果）。サンプルを採水した全 30 地点及び分析した二社の比較をした 6 地点の中で出現した地点数を示している。

魚種名	出現地点数	
	30 地点中	6 地点中
<i>Anguilla japonica</i> , ニホンウナギ	17	3
<i>Carassius auratus langsdorfii</i> , ギンブナ	29	6
<i>Cololabis saira</i> , サンマ	30	6
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> , ドジョウ	29	6
<i>Plecoglossus altivelis</i> , アユ	21	4
<i>Rhinogobius sp.</i> , ヨシノボリ属の一種	27	6
Salmonidae, サケ科	30	6
<i>Silurus asotus</i> , ナマズ	22	4
<i>Theragra chalcogramma</i> , スケトウダラ	30	6
<i>Zacco platypus</i> , オイカワ	30	6

※プライマーは、MiFish-U 及び MiFish-E を用いた。

の汚染は広く認識されている<sup>1),7)</sup>。特に、増幅された後の DNA 濃度は濃くなっていることから、他のサンプルの汚染の原因となりやすい。また、例えば実験室で扱っていたとしても共用で使う Milli-Q 水は汚染の原因となりやすい。本研究で見られた汚染がどの過程で生じたのか定かではないが、本結果は、ブランクサンプルを活用して、一連の調査の精度を監視することの重要性を示している。

#### b) 過剰な推定の種の分布の把握

東京湾周辺の広い範囲においては、生息しないと考えられる多くの種が推定された(図—2.7)。*C. auratus langsdorfii* (ギンブナ), *M. anguillicaudatus* (ドジョウ), *Z. platypus* (オイカワ) は淡水魚であるにも係わらず、ほぼ全ての地点で推定

された。淡水魚の *L. macrochirus* (ブルーギル) も 2 地点のみであるが推定された。Salmonidae (サケ科) は全ての地点で推定された。

淡水魚の環境 DNA は河川を由来したものと考えられるが、大きな河川から離れている湾口付近においても推定されていることから、DNA は海水中でも分解されずに流れに伴って湾内に拡がったものと考えられる。Salmonidae (サケ科) は、東京湾に生息している可能性もあるものの、広く定着しているとは考えにくい。人間活動に伴って東京湾内に流入した後に残存した環境 DNA や洋上養殖を由来とした環境 DNA が検出された可能性が考えられる。

これら 5 種の他にも、広い範囲で推定されたものの生息が疑わしい魚種は多い(表—2.7)。魚類の環境 DNA は、自然に近い環境下では 1 日の内に半減期を迎え、数日程度で検出できなくなるが(表—2.8)、河川のような流れが速い場所では 240 m 下流側でも検出される<sup>34)</sup>。また、底質に吸着する環境 DNA は、量が多く、かつ、長く保持されるため<sup>35)</sup>、河川由来の環境 DNA が、底質に吸着した状態で沿岸域に流下した可能性は十分にある。分析感度が高ければ、たとえその量がわずかでも検出されるものと考えられる。

環境 DNA の劣化の速度は、水質<sup>30)</sup> や水温<sup>31)</sup> によって変動することから、季節的にも変動することが予想される。また、環境 DNA の放出量は魚種<sup>33)</sup> やそれぞれの魚の生活史<sup>32)</sup> によっても変化する。本論文で示した東京湾周辺での過剰な推定のスナップショットは冬季のものであるが、他の季節では環境 DNA の放出や劣化の要因が変化し、異なった

表—2.8 環境 DNA の劣化実験に関する既往の研究。半減期に関して、報告されている論文についてはそのまま記載し、指数関数の係数のみを報告している論文については、その係数に基づいて本論文で算出した。<DL は、DNA が検出限界よりも下回るまでの日数を意味している。

実験対象	半減期 (hrs)	<DL (days)	実験条件			出典
			水温	光	水槽	
淡水魚						
<i>Cyprinus carpio</i> , コイ	6.6	4.2	25.0° C	自然光	4 L 水槽	30)
<i>Cyprinus carpio</i> , コイ	20.5		10.0° C			
<i>Cyprinus carpio</i> , コイ	4.9		20.0° C			
<i>Cyprinus carpio</i> , コイ	2.8		30.0° C			
<i>Lepomis macrochirus</i> , ブルーギル (稚魚)	5.3–6.0		20.0° C	12 時間日夜サイクル	3.4–64.8 L の 循環水槽	32)
<i>Lepomis macrochirus</i> , ブルーギル (成魚)	4.4–13.6					
<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i> , アユ	19.6		10.0° C	4 L 水槽		31)
<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i> , アユ	4.9		20.0° C			
<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i> , アユ	2.8		30.0° C			
海水魚						
<i>Platichthys flesus</i> , ヨーロッパヌマガレイ	51.7	6.7	15.0° C	12 時間日夜サイクル	54 L の 循環水槽	5)
<i>Gasterosteus aculeatus</i> , イトヨ	23.7	0.9				
<i>Engraulis mordax</i> , カタクチイワシ	6.9		22.0° C	5200 L の 循環水槽		33)
<i>Sardinops sagax</i> , カリフォルニアアイワシ	10.2–12.2		18.7° C			
<i>Scomber japonicas</i> , マサバ	9.9–12.6		18.7° C			

分布になる可能性もある。

#### (4) まとめ

過剰な推定の原因となる調査に起因する汚染の程度を検討し、東京湾周辺に生息しないと考えられる種の抽出を試みた。この結果、調査に起因する汚染は、頻度は低かったものの過剰な推定の要因となり得ることを示した。その原因の特定は難しいものの、環境 DNA 分析のための調査では、一連の作業の決まり事として組み入れて、調査・分析の質のチェックに使うことが推奨される<sup>1)</sup>。また、対象場所には生息しないものの河川や人間活動に由来する環境 DNA が東京湾内に広く分布し、環境 DNA 分析で検出されてしまうことが明らかとなった。このような過剰な推定は、多様性の解析を行う上で大きく影響することから取り扱いに十分な注意が必要である(3.3)。今後、環境 DNA 分析の沿岸域における応用を高度化するためには、これらの過剰な推定の知見を積み重ねていくことが重要である。

### 2.5 結論

沿岸域を対象として、MiFish を用いた環境 DNA 分析による魚類の推定精度を把握した結果、環境 DNA 分析による推定は、直接的な方法と比べてより多くの魚種を推定できることを確認した。採水によって魚類推定する環境 DNA 分析では、現場での作業量も直接的な手法に比べると格段に少なく、現地調査の有効な手段になると考えられる。

ただし、環境 DNA 分析による推定に特有の注意点も見出された。一つは、検出力と同定精度が分析者に強く依存する点であり、異なる分析者によって推定された結果に基づいて種数や種組成を比較する際に問題になることが予想される。もう一つの注意点は過剰な推定であり、誤った魚類分布の推定を導く恐れがある。これらの注意点については、応用方法ごとに具体的な影響を分析し、その回避方法に関する知見を積み重ねていく必要がある。

### 3. 抽出された注意点多様性評価への影響と回避方法

#### 3.1 はじめに

環境 DNA 分析による網羅的な推定の応用方法の一つとして、2つ以上の推定結果を比較した多様性の評価が想定される。前章で示したとおり、環境 DNA 分析による検出力を標準化することは難しく、同定精度についても分析者に依存する可能性があることから、これらが種数や種組成の比較に影響することが予想される。また、過剰な推定についても、当然、その比較における懸念となる。本章では、多様性評価に焦点を合わせ、第2章で抽出された注意点が種数と種組成の比較の解析にどのような問題を生じさせるのかを考察し、その回避方法を示した。

### 3.2 検出力の違いに着目した比較解析への影響の考察

#### (1) 本節の目的

本節では、種数比較における検出力の差の問題を回避できる可能性のある指数を採用し、その機能について説明した。種組成の比較については、比較に重要となる種の特徴を整理し、第2章で抽出された注意点が解析に影響するメカニズムを考察した。

#### (2) 方法

##### a) データセット

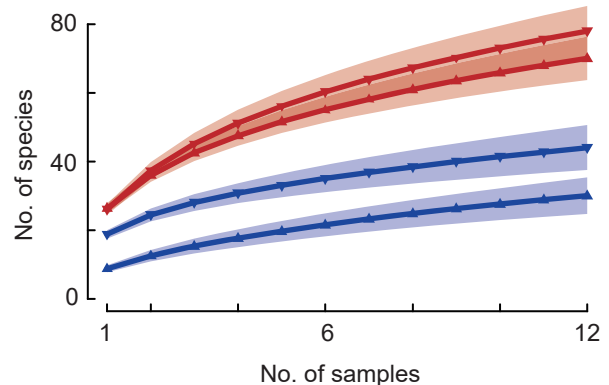
例題として、アマモ場における環境 DNA 分析によって得られた、それぞれ、12 サンプルを含む4つのデータセットを用いて考察した。期待種数は、赤色の2つのデータセットにおいて同程度でサンプリングエフォートの増加に伴った変化を示し、青色の2つのデータセットの期待種数はそれらよりも低い(図—3.1)。しかし、データセット間でサンプル当たりの検出力が違えば、種の多様性を比較したことにはならず、これらの差が生態学的な差によるものかどうか、この比較から判断することはできない。

##### b) 種数比較—検出力の違いの回避—

Chao & Jost (2012)<sup>36)</sup> は、サンプリングエフォートを標準化した0から1の値を取る sample coverage と呼ばれる指標を導入し、これが種数の比較において標準化の指標になることを主張している。Sample coverage は、検出力の差から独立した指標であることから、この指標を基準にすることで種数を公平に比較できる可能性がある(付録 A)。ここでは、sample coverage に着目し、4つのデータセット間の種数の比較を検討した。サンプルベースの希薄化曲線と sample coverage の算出については、R<sup>24)</sup> の iNEXT パッケージ<sup>25)</sup> を使った。

##### c) 種組成解析—検出力の違いの影響の検証—

魚類の種組成は様々な角度から見て理解する必要があるが、最もシンプルでかつ重要な見方として、視覚的に見るこ



図—3.1 多様性比較の例題として用いた4つのデータセットの希薄化曲線。それぞれのデータセットは12サンプルで構成されている。ハッチは95%信頼区間を示している。

と（視覚化）がある。種組成は、通常、それを構成する種の数の次元を持つ複雑な構造を有するが、2つの場所の魚類の塊が明確に違えば、その違いは直観的に理解できる。この違いを分かり易くするための技法として、視覚化が使われる。

サンプル間の種組成の類似性を表現するため、類似度等の距離が提案されている。この距離として、いろいろな尺度に基づいたものが提案されているが、本論文で対象とする環境 DNA 分析では検出・未検出（在・不在）の二値を扱うことから、これらに基づいた Sørensen（0 から 1 までの値の指数）によりサンプル間の類似性を表現した<sup>37)</sup>。なお、在・不在に基づいた類似度として、他にも Jaccard があるが、これらの類似度の間に大きな違いはない。データセット間での類似度の違いは Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA)<sup>38)</sup> で検定した。

次に、4つのデータセットの種組成を視覚化するため、非計量多次元尺度法 (Nonmetric multidimensional scaling : nMDS) を用いて二次元化した。nMDS は、類似度の大きさに従って順位付けをしたものを低次元化する多変量解析

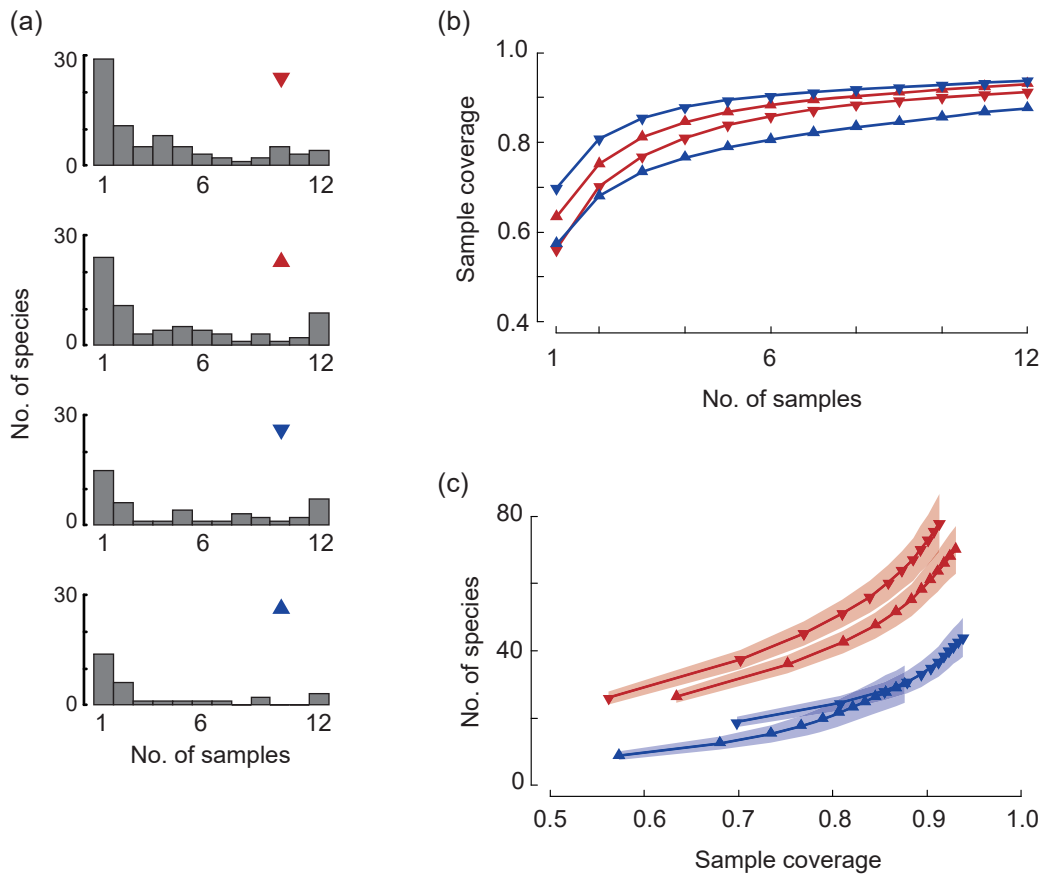
法であり、類似度をそのままの形で視覚化するよりも頑健である<sup>39)–41)</sup>。nMDS による二次元化の適切さについては、STRESS と呼ばれる指標で評価した。STRESS は 0.2 以下であれば問題は生じていないとされ、0.05 以下であれば非常によい結果とされている<sup>40),41)</sup>。PERMANOVA と nMDS は、R の *vegan* パッケージ<sup>42)</sup> を用いて解析した。

種組成の違いの視覚化に対して貢献する種を検証するため、3つの異なる出現頻度のグループに分け、各グループの下で nMDS 解析を実施した。出現頻度については、12 サンプル中、9 から 12 サンプルに出現した高頻出な種のグループ、1 から 4 サンプルにしか出現しなかった低頻出な種のグループ、それら以外の中頻出な種のグループの3つに分けた。

### (3) 結果と考察

#### a) 出現確率の推定

複数のサンプルがあれば、あるサンプル数だけ出現した種の数を示す頻度分布を描くことができ（図—3.2a）、この分布より、多くのサンプルで出現した種（出現確率が高い種）と少ないサンプルで出現した種（出現確率が低い種）の数を



図—3.2 4つのデータセットの構成と種数比較の例。(a) 種が出現したサンプル数とその種数の関係、及びそれぞれのデータセットにおける (b) サンプル数の増加に伴う sample coverage の変化と (c) sample coverage に対する種数の変化。種数については、95% 信頼区間も示している。Sample coverage についても 95% 信頼区間を描くこともできるが、煩雑になるためここでは示していない。

把握できる。出現頻度とその種の数より、確率論に基づいた様々な予測が可能となる。その予測の中で最も重要となるものが未出現種数の推定である<sup>43)–45)</sup>。この推定により、調査対象場所における sample coverage の把握が可能となる（付録 A）。

b) 種数比較における検出力の違いの回避

Sample coverage を4つのデータセットに適用すると、すべてのデータセットにおいて、1つのサンプルで0.6から0.7程度の充足率で種を観測できており、その指数は2つ目のサンプルになると0.1程度増加している（図—3.2b）。しかし、さらにサンプルを増やしても sample coverage は上がりにくく、12サンプルを採ったとしても0.8から0.9程度に留まっている。

2つの青色のデータセットの種数は、サンプリング数に対する期待種数の変化（希薄化曲線）で比較すると差があるように見えたものの（図—3.1）、sample coverage に基づいて比較すると差はなくなった（図—3.2c）。これらの結果は、2つ

の青色のデータセットの種数の間に生態学的な差はないものの、青色下三角は検出力が高いことからサンプル当たりの種数が多く、そこに差があったように見えただけであると解釈できる。

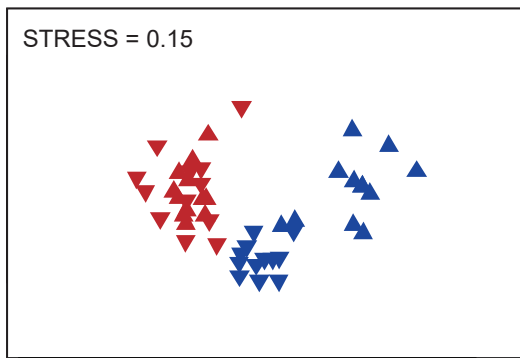
c) 検出力の違いの影響の検証

種組成はデータセット間で異なり（PERMANOVA ;  $pseudo-F_{3,44} = 15.1, p < 0.001$ ）、nMDSでも青色と赤色の違いと青色の中でも上三角と下三角との間で違いを視覚化できた（図—3.3）。異なる出現頻度別のnMDSを見ると、明らかに高頻出な種（12サンプル中、9から12サンプルに出現する種）の種組成がデータセット間で異なっており（図—3.4）、出現頻度の高い種が全体の視覚化に貢献していることが理解できる。

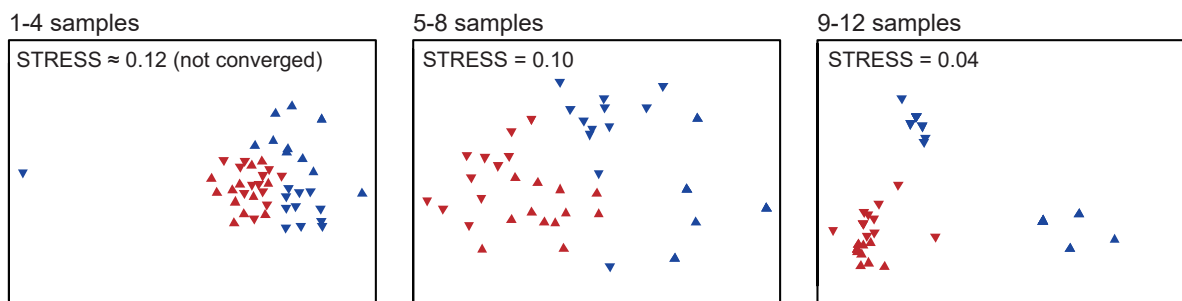
二次元化の STRESS に関しては高頻出な種のグループのものが、非常によい結果とされる $0.05^{40),41)}$ を下回っている。このことは、高頻出な種の組成の差は低次的であることを意味しており、その差があれば、環境DNA分析の結果が表で出力されていたとしても、その違いは直感的にイメージしやすくなる。また、分析上の検出力に差があったとしても出現頻度が高い種は推定されやすいことから<sup>(2,3)</sup>、このことは、分析上の検出力の差は、種組成の比較において、さほど重要にならない可能性を示唆している。

(4) まとめ

本節では、環境DNA分析の検出力の差が種数と種組成の比較に及ぼす影響を考察し、種数に関してはその回避方法を提示した。本節の1つ目の成果は、Chao & Jost (2012)<sup>36)</sup>によって提案された sample coverage の採用であり、これに基づけば、検出力に差があったとしても種数を公平に比較できる可能性があることが示された。また、分析上の検出力の違いに限らず、調査時のサンプルサイズの影響<sup>28),29)</sup>や抽出までの環境DNAの劣化<sup>22)</sup>の影響も標準化できる可能性が



図—3.3 4つのデータセットを対象とした種組成比較。非計量多次元尺度法（nMDS）による種組成の視覚化の結果を示している。



図—3.4 4つのデータセットを対象とした種組成比較の分析。それぞれのデータセットの中で1から4サンプルのみで出現した種、5から8サンプルのみで出現した種、9から12サンプルのみで出現した種の3つのグループに分割し、それぞれのグループごとに非計量多次元尺度法（nMDS）を用いて二次元による種組成の見え方を比較している。9から12サンプルのみで出現した種のグループでは、複数のサンプルが重なっているためサンプル数が12未満に見える。



ある。ただし、この指標にも限界があることに注意する必要がある(付録 A)。2つ目の成果は、検出力の違いは種組成比較においてさほど影響しない可能性を示した点である。ただし、この期待は、検出力の強さが引き起こす過剰な推定による別の問題が顕在化により打ち消される可能性がある。その詳細については3.3で説明する。

### 3.3 分析者の違いの影響の検証

#### (1) 本節の目的

本節では、異なる分析者による推定結果の比較解析を通じて、sample coverageの種数比較における機能を説明しつつ、同定精度の差が種組成の比較に及ぼす影響を検証した。さらに、前節で示した検出力の差が種組成比較にさほど影響しない可能性について、実際の現地データに基づいて検証した。

#### (2) 方法

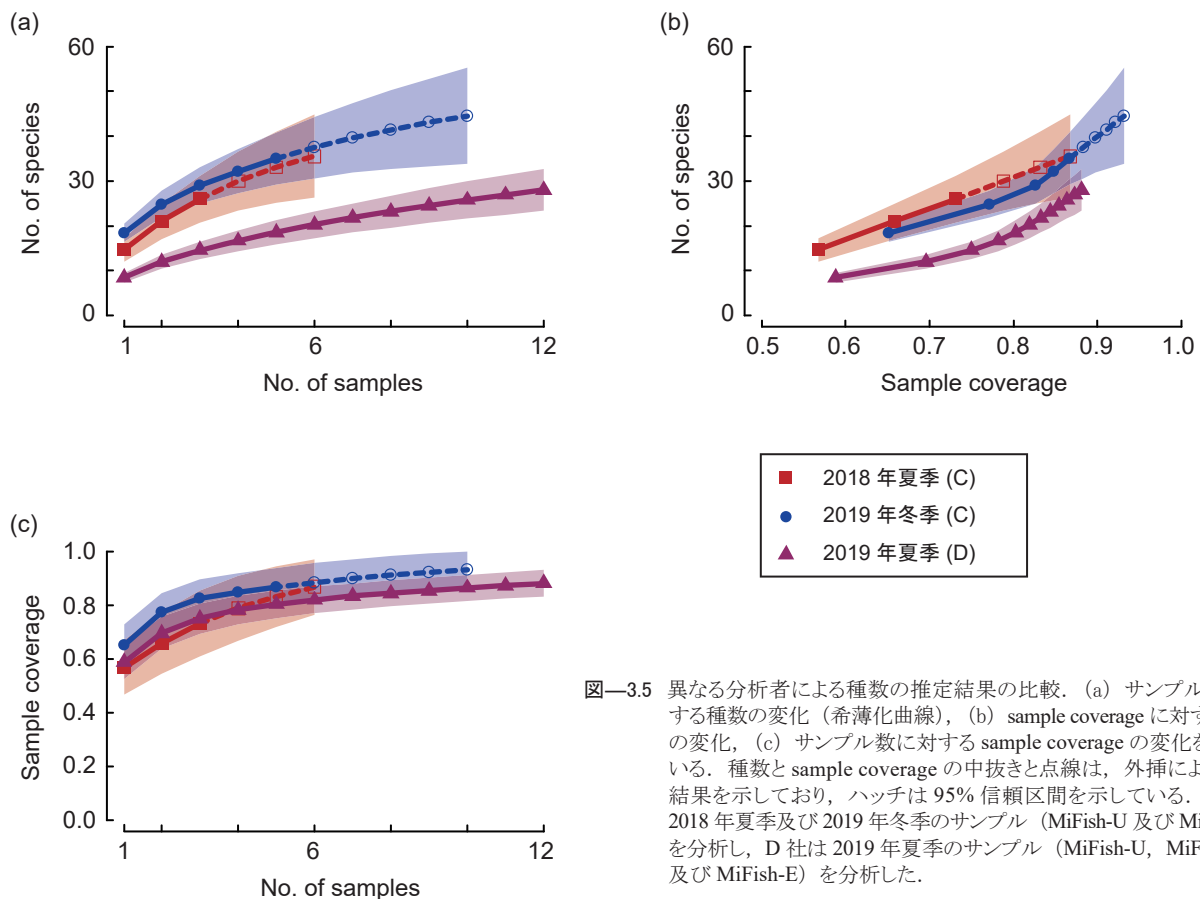
##### a) 同定精度の違いの影響の検証

既出の山口県笠戸湾のアマモ場の3つのデータセット(2.2)を用い、分析者の違いによる同定精度の違いの影響を検証した。データセットのうちの1つは2018年夏季に採水したもので3サンプルによって構成され、もう1つは2019年冬季に

採水したもので5サンプルによって構成されている。いずれもアマモの上層で採水されており、C社が環境DNA分析を行った。3つ目のデータセットは2019年夏季に採水したものであり、D社が環境DNA分析を行った。既出では24サンプルを対象として解析したが、12サンプルは、アマモの草体の中で採水されたものであり、条件が異なることから比較対象から外し、アマモの上層で採水した残りの12サンプルを比較対象とした。

Sample coverageの機能を把握するため、サンプルベースの希薄化曲線とsample coverageの下で種数を比較した。サンプル数が少ない2018年夏季と2019年冬季については外挿による方法<sup>46)</sup>を適用し、可能な限り比較範囲を広げた。ただし、定量比較を目的としていることから、外挿の範囲はサンプル数の2倍に留めた<sup>36),46)</sup>。

2つの分析者の間では同定精度に差が見られたことから、たとえ同じ種の環境DNAを検出していたとしても、推定結果のリスト上には異なる種として記載された可能性がある。すなわち、データ間の共通種数や固有種数の計数が影響を受け、Sorensenの指数も影響を受けた可能性がある。この種組成比較における影響の程度を検証するため、異なる精度で同定された種について、異なる種として扱った場合と同定精度



図—3.5 異なる分析者による種数の推定結果の比較。(a) サンプル数に対する種数の変化(希薄化曲線)、(b) sample coverageに対する種数の変化、(c) サンプル数に対する sample coverage の変化を示している。種数と sample coverage の中抜きと点線は、外挿による推定結果を示しており、ハッチは95%信頼区間を示している。C社は2018年夏季及び2019年冬季のサンプル(MiFish-U及びMiFish-E)を分析し、D社は2019年夏季のサンプル(MiFish-U、MiFish-U2、及びMiFish-E)を分析した。

を統一した場合の解析結果の比較を行った。2つの種組成比較においては、PERMANOVAによりデータセット間の類似度の差を検定した。

b) 検出力の違いの影響の検証

検出力の違いが種組成比較にさほど影響しない可能性を検証するため、東京湾周辺における二社（A社とB社）の推定結果を比較したデータセット（2.3）を用いた。ただし、Site7についてはB社が未検出であったことから（表—2.4）、二社が共に検出できた6つの場所を比較対象とした。ここでは、検出力に差があっても種組成の比較解析は影響を受けにくい可能性の検証を主目的としているが、一方で、A社による多くの過剰な推定（2.4）も種組成の比較に影響する可能性がある。この影響も検証するため、生息が疑わしく、かつ、広い範囲で推定された10種（表—2.7）を含めたデータセットとこれらを除外したデータセットの2つについて解析し、その結果を比較した。種組成の比較においては、PERMANOVAによりデータセット間の類似度の差を検定し、さらに、類似度のばらつきについて、Permutational analysis of multivariate dispersions (PERMDISP) により検定した。それぞれの解析では、Rのveganパッケージを使った。

(3) 結果と考察

a) 同定精度の違いの影響の検証

山口県笠戸湾のアマモ場における種数は、希薄化曲線で比較した場合、2019年夏季が他の時期のよりも半分程度低い（図—3.5a）。Sample coverageを基準にした場合、sample coverageがおおよそ0.8以下までであればやはり2019年夏季が低いが、sample coverageが0.9付近まで到達すれば信頼区間は重なり、差は目立たなくなった（図—3.5b）。これらの結果は、C社とD社の間に検出力の差があるものの、sample coverageを基準にすれば、3つの時期に種数の明確

な差はないことを示している。ただし、この比較では、検出力の差が分析者間の検出力の差によるものか、環境DNAの濃度の差によるものか判断できない。なお、3つのデータセットのsample coverageの信頼区間は狭く（図—3.5c）、これらの解釈は妥当なものとは判断される。

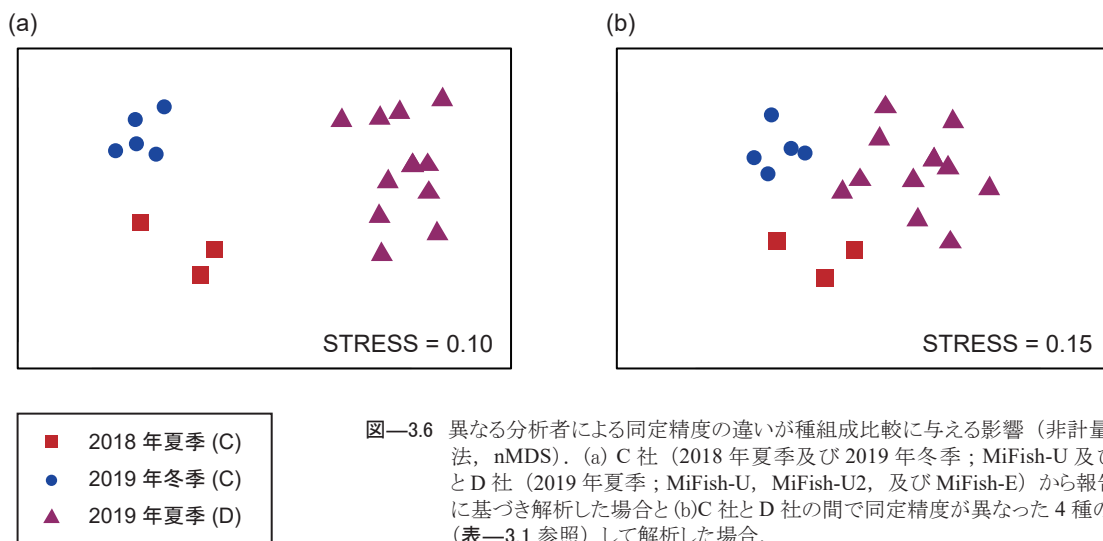
種組成は時期による違いがあり（PERMANOVA；pseudo- $F_{2,17} = 12.3$ ,  $p < 0.001$ ）、C社が分析した2018年夏季と2019年冬季の間でも差は見られたが、D社の結果はより離れていた（図—3.6a）。C社が分析した2018年夏季と2019年冬季の間の非類似度（1-Sorensen類似度）は0.52（0.39から0.60）であり、D社の結果に対するC社の非類似度は、2018年夏季の種組成に対して0.69（0.50から0.90）、2019年冬季の種組成に対して0.74（0.56から0.86）であった。

同定精度の違いについては、*Acanthopagrus schlegelii*（クロダイ）、*Ditrema temminckii temminckii*（ウミタナゴ）、*Sebastes ventricosus*（クロメバル）、*Takifugu niphobles*（クサフグ）について見られ、一方の分析者は属までの特定であった。これら4分類の同定精度を属のレベルに統一して解析した結果、依然として種組成に違いがみられるものの

表—3.1 分析者間で異なる同定精度で推定されたと考えられる魚種とその出現頻度（山口県笠戸湾のアマモ場）。一方の分析者は種名を特定し、もう一方の分析者は種名の特定には至っていなかった。

魚種名	C社		D社
	2018年夏季	2019年冬季	2019年夏季
<i>Acanthopagrus sp.</i>	3/3	5/5	12/12
<i>Ditrema sp.</i>	3/3	5/5	4/12
<i>Sebastes sp.</i>	0/3	5/5	3/12
<i>Takifugu sp.</i>	1/3	5/5	9/12

※二社ともにMiFish-U及びMiFish-Eのプライマーを用い、加えて、D社はMiFish-U2も用いた。



図—3.6 異なる分析者による同定精度の違いが種組成比較に与える影響（非計量多次元尺度法，nMDS）。(a) C社（2018年夏季及び2019年冬季；MiFish-U及びMiFish-E）とD社（2019年夏季；MiFish-U，MiFish-U2，及びMiFish-E）から報告された結果に基づき解析した場合と(b)C社とD社の間で同定精度が異なった4種の種名を統一（表—3.1参照）して解析した場合。



(PERMANOVA ; pseudo- $F_{2,17} = 6.39, p < 0.001$ ), D 社の結果は他の2つに近くなった (図—3.6b). D 社の結果に対する 2018 年夏季及び 2019 年冬季の非類似度は、それぞれ、0.56 (0.40 から 0.76) 及び 0.57 (0.33 から 0.79) となり、C 社内の非類似度とほとんど差がなくなった。これらの同定精度に差が見られた 4 種は、各時期で高い頻度で出現している種であることから (表—3.1), この 4 種の精度の違いだけで種組成の比較が影響を受けたことになる。

b) 検出力の違いの影響の検証

東京湾周辺の種組成は、分析者間の差の方が場所間の差よりも大きく (図—3.7a), 分析者間の差は有意であった (PERMANOVA ; pseudo- $F_{1,10} = 6.59, p < 0.01$ ). また、二社の種組成の間の均質性には差が見られた (PERMDISP ; pseudo- $F_{1,10} = 37.8, p < 0.001$ ). 生息が疑わしい 10 種を解析対象から除外すると A 社の推定種数は B 社に近づき (表—3.2), 二社間の種組成の均質性の差はみられなくなった (PERMDISP ; pseudo- $F_{1,10} = 1.59, p = 0.229$ ). 種組成の二

表—3.2 東京湾周辺において環境 DNA 分析によって推定されたものの生息しないものと考えられる魚種 (表—2.7) を含む場合 (調整前) と含まない場合 (調整後) の A 社による推定種数と B 社による推定種数の比較。

場所	種数		共通種数	
	A 社	B 社		
	調整前	調整後		
Site1	24	14	13	6
Site2	18	8	24	4
Site3	17	6	6	1
Site4	24	15	10	5
Site5	29	18	8	6
Site6	36	24	4	3

※プライマーは、MiFish-U 及び MiFish-E を用いた。

者間の違いは依然として有意であるものの (PERMANOVA ; pseudo- $F_{1,10} = 2.95, p = 0.007 < 0.01$ ), nMDS では 1 つのペアを除いて、それぞれのペアが混在することはなくなった (図—3.7b).

これらの結果は、A 社に多くいた過剰に推定された種が A 社内の類似度を高くし、種組成比較に影響したことを意味している。この A 社の過剰な推定の多さは、A 社の検出力の高さに起因しているものと考えられ、検出力の高さが種組成の比較解析の難易度を高くしたものと言える

(4) まとめ

異なる分析者による環境 DNA 分析の推定結果の比較を通じ、sample coverage を使うことで種数比較の解釈の幅が広がることを示した。また、分析者間の同定精度と検出力の差が種組成の比較に影響することを示した。同定精度に関しては、解析前にデータセット間の差を確認し、必要に応じて統一する必要がある。検出力の差に関しては、過剰な推定があった場合に種組成の比較に影響することに注意しなければならないことを示した。

前節の検討も踏まえると、データ間で共通する種が種組成の比較において重要であり、たとえ検出力が弱くても出現頻度が高い種を検出するよう努めること、過剰な推定に陥らない程度に検出力を抑えること、もしくは、そのような種を適切に除去する方法を準備しておくことが環境 DNA 分析に基づいた種組成比較の鍵を握ると言える。

3.4 結論

本章では、多様性の評価に焦点を合わせ、環境 DNA 分析の検出力と同定精度の違いが種数と種組成の比較解析に及ぼす影響を把握し、その回避方法を示した。種数については、検出力が標準化できないことからサンプル当た



図—3.7 検出力の違いが種組成比較 (非計量多次元尺度法, nMDS) に与える影響。環境 DNA 分析によって推定されたものの生息しないと考えられる魚種 (表—3.2 参照) を (a) 含めて解析した場合と (b) 含めずに解析した場合。中抜き丸は A 社による分析結果、マゼンタは B 社による分析結果を示し、線でつながれた2つのデータは同じ場所 (図—2.5 の Site1-6) を示している。それぞれ、同定精度の違いを調整した後に解析した。プライマーは、二社ともに MiFish-U 及び MiFish-E を用いた。

りの比較に生態学的な意味が与えられないものの、sample coverage を使えば公平な比較ができる可能性を示した。種組成の比較に関しては、データセット間の同定精度の差や検出力の高さに起因する過剰な推定が影響することから、これらは解析の前に排除しなければならないことを示した。

#### 4. 多様性評価に必要な空間距離とサンプル数

##### 4.1 はじめに

比較する場所の間の統計的な差を見出せる限界について、あらかじめ把握しておけば、その知見は調査計画の立案に活かすことができる。

その重要な知見の一つは空間解像度である。環境 DNA は、体から放出された後に流動に伴って空間的に分布するが、その過程の中で劣化すれば<sup>5),30)–33)</sup>、拡がる範囲には限界が生じる。一方、環境 DNA は、底質に吸着した場合、比較的長期間保持されることから<sup>35)</sup>、底質の移動に伴って分布することが予想される。流動が比較的穏やかな舞鶴湾では、800 m 程度離れば環境 DNA 分析で推定した魚類の種組成に相関がなくなることが示されているが<sup>20)</sup>、東京湾では、河川や人間活動を由来とした環境 DNA が広く分布していることは既に示したとおりである(2.4)。空間解像度に関する知見を把握しておけば、調査場所の配置計画に活かされる<sup>47)</sup>。

もう一つの重要な知見はサンプル数である。サンプル数は、統計的な確からしさを得るためには多い方がいいが、その反面、費用が高くなる。確かさを得られるサンプル数を把握しておくことで、費用の抑制につながる。

本節では、調査計画の立案のための知見を整理することを目的とし、まず、環境 DNA 分析を用いて沿岸域の魚類多

様性を把握するための空間解像度について検証した。さらに、サンプル数に関して、種数の差を見いだすための考え方とそのための方針を検討した。

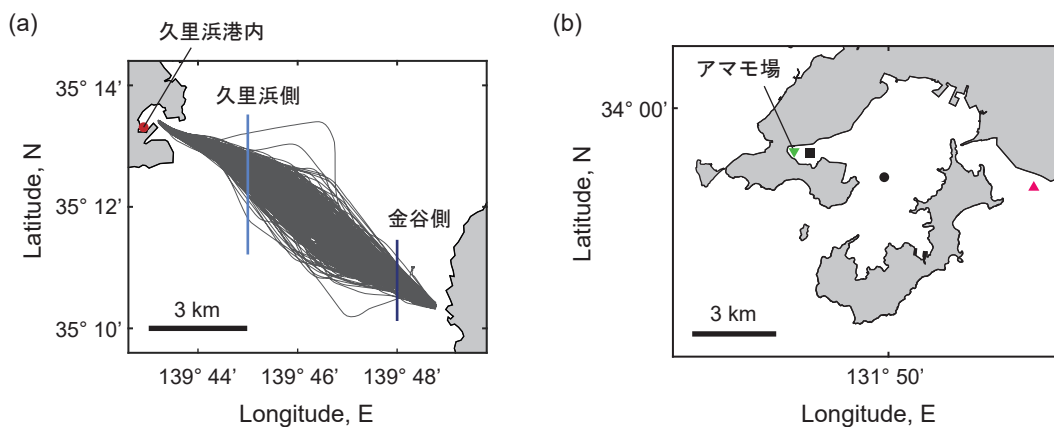
##### 4.2 方法

###### (1) 空間解像度の検証方法

空間解像度の検証は、数十 km 程度と数 km 程度の2つの空間スケールの下で得られた海水サンプルの環境 DNA 分析結果を比較することにより実施した。数十 km 程度の空間スケールの検証は、既出の東京湾内の3つの釣り場(図—2.2)の結果を用いた。この調査で採用したサンプル数は5つであった。

数 km 程度の空間スケールの検証は、東京湾口と山口県笠戸湾において実施した。東京湾口における検証は、久里浜港内、湾口久里浜側、湾口金谷側の3つの場所で行った(図—4.1a)。東京湾フェリー株式会社が運航する「かなや丸」の航路上のそれぞれの場所において、2018年12月にサンプルを採取した。サンプルは、港湾空港技術研究所が「かなや丸」に設置している水質測定装置から分取して採取した。「かなや丸」は、一日の間に久里浜港と金谷港を6もしくは7往復することから、1つの経度上で一日の中で均等に4サンプルを採水できるよう時間を調整した。しかし、久里浜港内においては、1つのサンプルの DNA が分析において増幅しなかったため、計3サンプルとして解析した。なお、航路は緯度方向に変動することから、採水場所は経度で定めた。

山口県笠戸湾においては、アマモ場、笠戸湾内の2つの場所、笠戸湾外の計4つの場所で採水した(図—4.1b)。笠戸湾内と笠戸湾外の採水は、2019年8月2日において、小型船舶及び中国地方整備局の港湾業務艇「おおつ」に



図—4.1 数 km スケールの魚類多様性の違いを把握することを目的としてサンプル採取した場所。(a) 東京湾フェリーの航跡及び採水した3つの経度と (b) 山口県笠戸湾周辺における4つの採水地点。

より海面から 0.5 m の層にハイロート採水器を垂下させて実施し、計 3 サンプルを採取した。アマモ場のデータは、2.2 で既出の 24 サンプルのうちのアマモ場の草体の中で採水した 12 サンプルを解析対象とした。笠戸湾内と笠戸湾外における採水は同日のほぼ同じタイミングで実施したが、アマモ場における採水はそれらとは数日前後した異なる 3 日間で実施した。

#### (2) 解析方法

比較の前に、同定精度と過剰な推定について対処した。同一分析者の比較であっても、DNA 配列の一致の程度に注意し、*Sebastes* (メバル属) と *Takifugu* (トラフグ属) については属までの同定に抑えてこれらに属する種を一つにまとめた。過剰な推定については、東京湾の3つの釣り場については表—2.1、山口県笠戸湾については表—2.3 の空振りの欄に魚種名を記載した種を過剰な推定として解析対象から除外した。東京湾口については、*Carassius auratus* (キンギョ)、*Cobitis sp.* (シマドジョウ属の一種)、*Zacco platypus* (オイカワ) を解析対象から除外した。

種数と種組成の比較解析については、3.3 と同様の方法を採用し、サンプル数が少ないものについては、その 2 倍もしくは比較対象のサンプル数と同じ数まで外挿した。

### 4.3 結果

#### (1) 数十 km スケールの比較

東京湾内の3つの釣り場における魚種の種組成は有意に異なっていた (PERMANOVA ; pseudo- $F_{2,12} = 10.5$ ,  $p < 0.001$ ; 図—4.2a)。場所ごとのばらつきは小さく (PERMDISP; pseudo- $F_{2,12} = 0.17$ ,  $p = 0.83$ )、場所間で明確に異なる種組成が推定されていた。横須賀大津の種数は最も多く、本牧に比べて倍程度であった (図—4.2b)。若洲における種数は、sample coverage に対する増加が小さく、sample coverage が 0.8 程度で比較すると横須賀大津の 1/4 程度であった。Sample coverage の大きさは3つの場所で同程度であり、その信頼区間は大きくないことから (図—4.2c)、種数の比較には確からしさがある。

#### (2) 数 km スケールの比較—東京湾口—

東京湾口のフェリー航路上の3つの場所の種組成は、場所間で有意な差があったものの (PERMANOVA ; pseudo- $F_{2,8} = 1.61$ ,  $p = 0.030 < 0.05$ )、場所内のサンプルは大きくばらついていた (図—4.3a)。3つの場所の sample coverage が重なる範囲は 0.5 付近のわずかであり、この辺りの種数は久里浜港内で大きいものの、明確な違いが見られなかった (図—4.3b)。ただし、湾口の2つの場所の sample coverage の信頼区間は広いことから、この比較は確かなものとは言えない (図—4.3c)。なお、湾口金谷側においては、サンプル間の種組成が異質であるため (図—4.3a)、サンプルが1つの場合

の sample coverage が小さくなっている (図—4.3c)。

#### (3) 数 km スケールの比較—笠戸湾—

笠戸湾の種組成は、地点間で異なり (PERMANOVA ; pseudo- $F_{3,17} = 6.83$ ,  $p < 0.001$ )、かつ、そのばらつきにも差があった (PERMDISP; pseudo- $F_{3,17} = 6.95$ ,  $p = 0.004 < 0.01$ )。アマモ場内の種組成の均質さが特徴的である (図—4.4a)。アマモ場に近い笠戸湾内も比較的均質であるが、笠戸湾外の種組成が大きくばらついている。

Sample coverage が 0.8 付近で比較すると、アマモ場内の種数は笠戸湾内の2つの場所に比べて大きい (図—4.4b)。笠戸湾外の sample coverage は 0.8 に到達しておらず比較が難しいが、平均値で比較するとアマモ場と同等の種数である。ただし、笠戸湾内と外の sample coverage の信頼区間は広く (図—4.4c)、上述の種数の比較は確かではない。この sample coverage の信頼区間の広さは、サンプル数の少なさに起因している。また、東京湾口の金谷側と同様、笠戸湾外のサンプル間の種組成は異質であり、サンプルが1つの場合の sample coverage も非常に小さい。

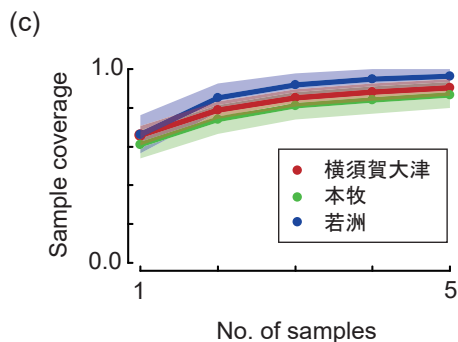
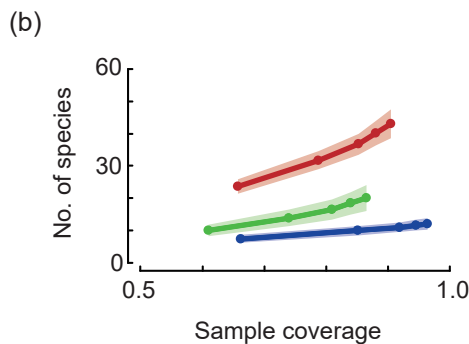
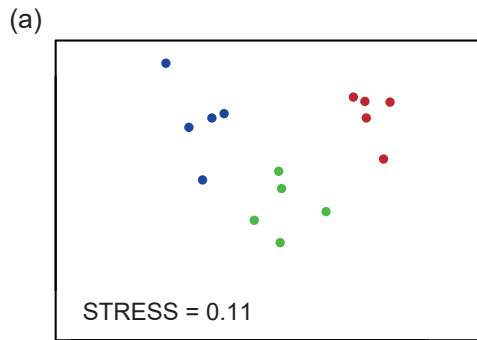
### 4.4 考察

環境 DNA 分析によって推定された魚種の種数及び種組成は、東京湾内で数十 km の距離が離れた場所であれば明確な違いが見出された。東京湾口における数 km スケールの比較においても種組成の違いが見いだされ、環境 DNA 分析による多様性の空間分解能が数 km 程度あることが示された。しかし、東京湾口の種数の差は明確ではなかった。これは、1つの場所の採水時間に差があったことが影響している可能性がある。

湾口金谷側において sample coverage が非常に小さく、かつ、種数が少なかった結果は、金谷側の海水に含まれる環境 DNA の量が少なかったことを示している可能性がある。東京湾口においては、湾内の海水が久里浜側から流出し、外洋水が金谷側から流入する流動構造が形成されることが知られている<sup>48)</sup>。一般的に有機物濃度は外洋水よりも閉鎖性内湾の水の方が高いことを踏まえれば、この解釈は既往の知見と一致する。

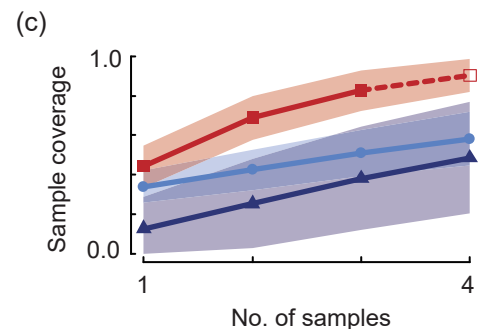
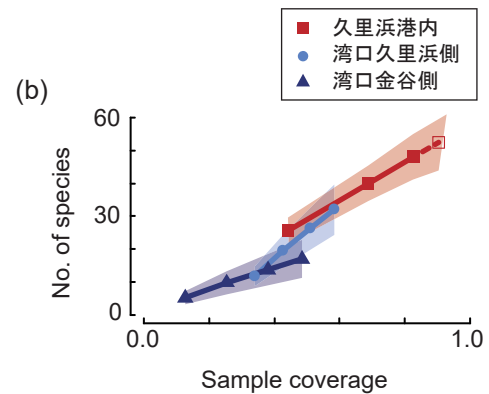
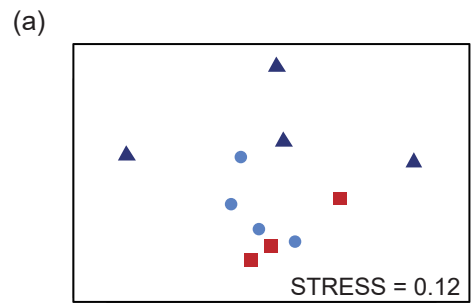
笠戸湾周辺の比較においては、アマモ場内の種組成が明らかに他の場所の種組成よりも均質であり、1 km 以内しか離れていない地点の種組成とも異なっていた。さらに、アマモ場の中とアマモ場から 1 m 程度上層で比較しても異なる種組成が推定される結果も得られている (Momota et al., 未発表)。このことは、環境 DNA 分析による種組成の識別においては、局所的な水塊の差でさえも影響したものと考えられる。すなわち、調査場所を決める際には、環境 DNA の挙動を予測することが重要であると考えられる。

サンプルの数については、3 個あれば統計解析が可能とな



図—4.2 東京湾における3つの釣り場の魚類多様性の比較（数十 km スケールの比較の例）. (a) 非計量多次元尺度法（nMDS）による種組成比較, (b) sample coverage に対する種数の比較, (c) サンプル数に対する sample coverage を示している. ハッチは 95% 信頼区間を示している. プライマーは, MiFish-U 及び MiFish-E を用いた.

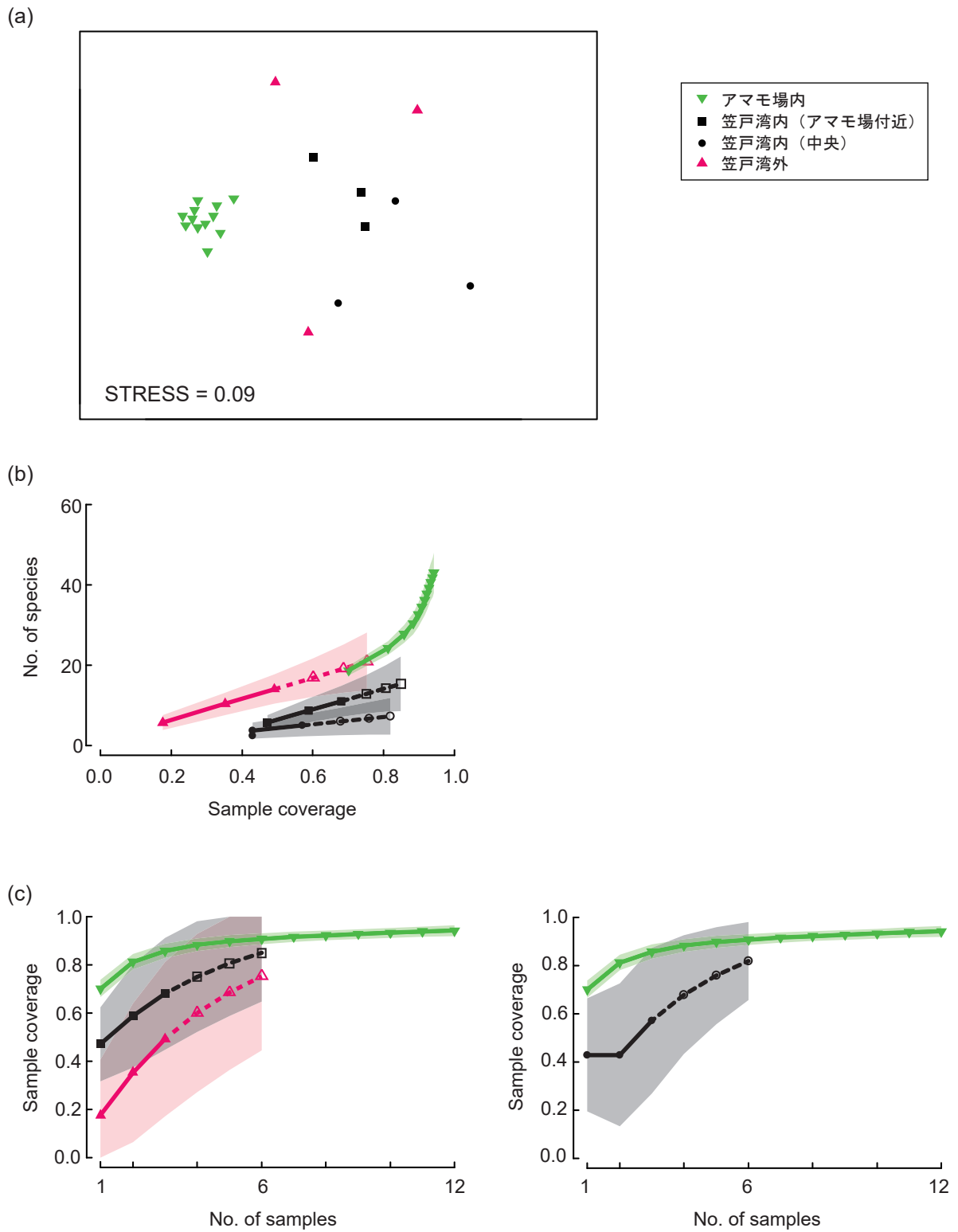
るが、サンプル数が 3 個もしくは 4 個あった東京湾口と笠戸湾では、sample coverage の信頼区間が広すぎることで、種数の差に関して確かな解釈を導くことができなかった。必要となるサンプル数を議論するためには、種数を比較するための妥当な sample coverage を定めることが重要であり、少なくとも 5 個なければ、確かな解釈は難しくなると考えられる（付録 B）。



図—4.3 東京湾口における3つの場所（久里浜港内、湾口中央、湾口金谷側）の魚類多様性の比較（数 km スケールの比較の例）. (a) 非計量多次元尺度法（nMDS）による種組成比較, (b) sample coverage に対する種数の比較, (c) サンプル数に対する sample coverage を示している. 種数と sample coverage の中抜きと点線は、外挿による推定結果を示しており、ハッチは 95% 信頼区間を示している. プライマーは, MiFish-U 及び MiFish-E を用いた.

#### 4.5 結論

本節では、環境 DNA 分析に基づく魚類の多様性評価のための調査計画に資する知見の整理を目的とし、その空間分解能と統計的な確からしさを得るためのサンプル数について検討した。空間分解能の検討の結果、東京湾内であれば数十 km あれば多様性の違いを見出せ、東京湾口と笠戸湾周辺では数 km の空間スケールであっても、異なる水塊や異なる場の下であれば多様性の違いを見出せる可能性を示し



図—4.4 山口県笠戸湾周辺の魚類多様性の比較（数 km スケールの比較の例）. (a) 非計量多次元尺度法（nMDS）による種組成比較, (b) sample coverage に対する種数の比較, (c) サンプル数に対する sample coverage を示している. 種数と sample coverage の中抜きと点線は、外挿による推定結果を示しており、ハッチは 95% 信頼区間を示している. プライマーは、MiFish-U, MiFish-U2, 及び MiFish-E を用いた.



た。その差は、環境 DNA の挙動を支配する水塊の違いに強く依存している可能性があり、調査場所を決める際には、環境 DNA の挙動を予測しておく必要がある。また、sample coverage を用いて種数を比較する場合、サンプル数は 5 個あることが望ましい。

## 5. あとがき

### 5.1 本論文の要約

魚類の網羅的な推定が可能な環境 DNA 分析は、沿岸域でも高い推定能力を発揮することから、港湾分野でも有効な調査手法となる可能性が示された。しかし、いくつかの注意点も抽出され、それが多様性評価に影響することが示された。多様性評価のための解析においては本論文で提示した影響の回避方法を参考にしつつ、注意深く結論を導く必要がある。最後に、環境 DNA 分析によって推定される魚類に基づいた多様性評価が可能となる空間距離とその解析に必要となるサンプル数の目安を示した。

### 5.2 今後の期待される展開

本論文では、魚類の多様性比較の観点から環境 DNA 分析の応用の可能性を検討したが、近年はエビやカニ類を網羅的に推定できるプライマーも開発されている<sup>9)</sup>。今後、MiFish とこのプライマーを併用することで、食物連鎖の構造の解明等へ展開することが期待される。

また、本研究で示した応用は比較的厳密なものであり、1 つの場所で複数のサンプルを要することから費用も高くなる。今後は、厳密さを緩和しつつ、サンプルを空間的に広く配置することで、有用魚種の分布の把握に応用したり、過剰な推定の分布の把握により環境 DNA 分析のデータの質の監視への応用も期待される。そのためには、環境 DNA の放出量や劣化率、及び底質への吸着に関する知見の蓄積や空間構造を考慮した統計モデリング<sup>49)</sup>や流動や底質の輸送に関するシミュレーション等の技術開発が期待される。

### 5.3 まとめ

環境 DNA 分析は、魚類把握のための有力な推定方法であり、現地調査に係る労力と費用の軽減に貢献する可能性がある。港湾分野に携わる管理者や技術者が環境 DNA 分析を活用した調査計画の立案や評価のための解析方法を検討する際、本論文が参考となることを期待する。なお、環境 DNA 分析の応用は本論文で示したものに限らない。今後は、基礎研究や技術開発を平行して進めていくことで、実務への応用の幅が広がることが期待される。

(2020 年 6 月 5 日受付)

**謝辞**：本研究は、国土交通省関東地方整備局横浜港湾空港技術調査事務所及び中国地方整備局広島港湾空港技術調査事務所からの受託研究（それぞれ、平成 29 年度から令和元年度までの3年間と平成 30 年度及び令和元年度の2年間）の一部として実施した。これらの受託研究の関係者には多大なるご支援をいただいた。横須賀市東部漁業協同組合、浦島漁業協同組合、尾道漁業協同組合、吉和漁業協同組合、山口県漁業協同組合周南統括支店のみなさまには、本研究の重要性をご理解いただきつつ、現地調査にご協力いただいた。環境 DNA の分析及び調査については、株式会社環境総合リサーチ、三洋テクノマリン株式会社、株式会社 CTI アウラ、株式会社生物技研、株式会社東京久栄、復建調査設計株式会社、株式会社プライア・コンサルタントに請け負って頂いた。また、調査の一部に関しては、井上徹教海洋環境情報研究グループ長及び松崎義孝主任研究官にお手伝い頂いた。部内討議では、新型コロナウイルスの影響がある中でオンラインを使う等の苦労をしながらも、みなさまからは活発に貴重な意見を頂いた。本論文を査読していただいた宮井真一郎特別研究主幹から有益なコメントをいただいた。みなさまに対して、ここに感謝の意を表す。

## 参考文献

- 1) 環境 DNA 学会：環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.2, 2020.
- 2) Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett* 4: 423–425, 2008.
- 3) Tsuji S, Takahara T, Doi H, Shibata N: The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA* 1: 99–108, 2019.
- 4) Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z: Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13: 193–197, 2012.
- 5) Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E: Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7: e41732, 2012.
- 6) Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB: Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE* 9: e86175, 2014.
- 7) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W: 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, 2015.
- 8) Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, Gaboriaud C, Jean P, Poulet N, Roset N, Copp GH,



- Geniez P, Pont D, Argillier C, Baudoin JM, Peroux T, Crivelli AJ, Olivier A, Acqueberge M, Le Brun M, Møller PR, Willerslev E, Dejean T: Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol* 25: 929–942, 2016.
- 9) 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: 1–19, 2019.
- 10) Yamamoto S, Minami K, Fukaya K, Takahashi K, Sawada H, Murakami H, Tsuji S, Hashizume H, Kubonaga S, Horiuchi T, Hongo M, Nishida J, Okugawa Y, Fujiwara A, Fukuda M, Hidaka S, Suzuki KW, Miya M, Araki H, Yamanaka H, Maruyama A, Miyashita K, Masuda R, Minamoto T, Kondoh M: Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE* 11: e0149786, 2016.
- 11) Murakami H, Yoon S, Kasai A, Minamoto T, Yamamoto S, Sakata MK, Horiuchi T, Sawada H, Kondoh M, Yamashita Y, Masuda R: Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fish Sci* 85: 327–337, 2019.
- 12) 赤塚真衣子, 高山百合子, 伊藤一教, 森本哲平, 源利文: 海草場を対象とした環境 DNA 検出方法と三次元数値解析の適用性に関する検討, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), 第 74 巻, 第 2 号: ppI\_1225–I\_1230, 2018.
- 13) 高山百合子, 赤塚真衣子, 伊藤一教, 源利文: アマモ場のモニタリング手法における環境 DNA の活用について, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), 第 74 巻, 第 2 号: ppI\_1231–I\_1236, 2018.
- 14) 高山百合子, 赤塚真衣子, 伊藤一教, 源利文: 環境 DNA を活用した固着性水生生物モニタリング手法の成立性について, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), 第 75 巻, 第 2 号: ppI\_1087–I\_1092, 2019.
- 15) 公益財団法人日本港湾協会: 2019 年度版数字でみる港湾, 国土交通省港湾局監修, 2019.
- 16) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 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, 第 66 巻, 583–599, 2016.
- 17) 環境省: 生物多様性国家戦略 2012–2020—豊かな自然共生社会の実現に向けたロードマップ—, 平成 24 年 9 月. URL <http://www.env.go.jp/press/files/jp/20763.pdf>
- 18) Collins RA, Bakker J, Wangensteen OS, Soto AZ, Corrigan L, Sims DW, Genner MJ, Mariani S: Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods Ecol Evol* 10: 1985–2001, 2019.
- 19) 立平良三: 気象予報による意思決定 不確実情報の経済価値, 東京堂出版, 142p, 1999.
- 20) Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, Sado T, Araki H, Kondoh M, Minamoto T, Miya M: Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports* 7: 40368, 2017.
- 21) Fujii K, Doi H, Matsuoka S, Nagano M, Sato H, Yamanaka H: Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. *PLoS ONE* 14: e0210357, 2019.
- 22) Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J, Sakurai S, Tsuji S, Motozawa H, Hongo M, Sogo Y, Kakimi N, Teramura I, Sugita M, Baba M, Kondoh A: A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology* 18: 233–241, 2017.
- 23) Colwell RK, Chao A, Gotelli NJ, Lin SY, Mao CX, Chazdon RL, Longino JT: Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *J Plant Ecol* 5: 3–21, 2012.
- 24) R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>
- 25) Hsieh TC, Ma KH, Chao A: iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol Evol* 7: 1451–1456, 2016.
- 26) Kai Y, Nakabo T: Taxonomic review of the *Sebastes inermis* species complex (Scorpaeniformes: Scorpaenidae). *Ichthyol Res* 55: 238–259, 2008.
- 27) Doi H, Fukaya K, Oka SI, Sato K, Kondoh M, Miya M: Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model. *Scientific Reports* 9: 3581, 2019.
- 28) Nascimento FJA, Lallias D, Bik HM, Creer S: Sample size effects on the assessment of eukaryotic diversity and community structure in aquatic sediments using high-throughput sequencing. *Scientific Reports* 8: 11737, 2018.
- 29) Cantera I, Cilleros K, Valentini A, Cerdan A, Dejean T, Iribar A, Taberlet P, Vigouroux R, Brosse S: Optimizing environmental DNA sampling effort for fish inventories in tropical streams and rivers. *Scientific Reports* 9: 3085, 2019.
- 30) Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM: Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ Sci Technol* 48: 1819–1827, 2014.
- 31) Tsuji S, Ushio M, Sakurai S, Minamoto T, Yamanaka H: Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS ONE* 12: e0176608, 2017.
- 32) Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T: The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS ONE* 9: e114639, 2014.
- 33) Sassoubre LM, Yamahara KM, Gardner LD, Block BA, Boehm AB: Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish.

- Environ Sci Technol 50: 10456–10464, 2016.
- 34) Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Schwartz MK, Lowe WH, Letcher BH, Whiteley AR: Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Mol Ecol Resour* 15: 216–227, 2015.
  - 35) Turner CR, Uy KL, Everhart RC: Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biol Conserv* 183: 93–102, 2015.
  - 36) Chao A, Jost L: Coverage-based rarefaction and extrapolation: Standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* 93: 2533–2547, 2012.
  - 37) Anderson MJ, Crist TO, Chase JM, Vellend M, Inouye BD, Freestone AL, Sanders NJ, Cornell HV, Comita LS, Davies KF, Harrison SP, Kraft NJB, Stegen JC, Swenson NG: Navigating the multiple meanings of  $\beta$  diversity: A roadmap for the practicing ecologist. *Ecol Lett* 14: 19–28, 2011.
  - 38) Anderson MJ: A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26: 32–46, 2001.
  - 39) Ramette A: Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecol* 62: 142–160, 2007.
  - 40) Zuur AF, Ieno EN, Smith GM: *Analysing Ecological Data*. Springer, 2007.
  - 41) Legendre P, Legendre L: *Numerical Ecology, Developments in Environmental Modelling* 24. Elsevier, 2012.
  - 42) Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H: *Community Ecology Package 2.3-5*, 2019. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
  - 43) Chao A: Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265–270, 1984.
  - 44) Chao A: Estimating the population size for capture - Recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43: 783–791, 1987.
  - 45) Chao A: Estimating population size for sparse data in capture-recapture experiments. *Biometrics* 45: 427–438, 1989.
  - 46) Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM: Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr* 84: 45–67, 2014.
  - 47) Evans NT, Li Y, Renshaw MA, Olds BP, Deiner K, Turner CR, Jerde CL, Lodge DM, Lamberti GA, Pfrender ME: Fish community assessment with eDNA metabarcoding: Effects of sampling design and bioinformatic filtering. *Can J Fish Aquat Sci* 74: 1362–1374, 2017.
  - 48) 鈴木高二朗, 竹田晃: 東京湾口フェリーによる海洋環境の2003～2005年の観測結果とその特性, 港湾空港技術研究所資料, No. 1134, pp 37, 2006. URL [https://www.pari.go.jp/report\\_search/detail.php?id=200606113401](https://www.pari.go.jp/report_search/detail.php?id=200606113401)
  - 49) 久保拓弥: データ解析のための統計モデリング入門—一般化線形モデル・階層ベイズモデル・MCMC—, 岩波書店, 2012.

## 付録 A Sample coverage の意味, 効果, 及び限界

個体サンプルに基づいた sample coverage は Chao & Jost (2012)<sup>1)</sup> によって提案され, 採取面積や体積等のサンプル単位に基づいた sample coverage (サンプルベースの sample coverage) については Chao et al. (2014)<sup>2)</sup> で記述されている. その詳細については, これらの原著論文を読めば理解できるが, ここでは著者らの解釈を踏まえ, sample coverage が種数を公平に比較するための指標となる理由を説明する.

### (1) サンプルベースの sample coverage の解釈

群集を構成する種は, 大きく, 観測された種と未出現の種に分けられる. 未出現種の数については, 確率論に基づいた手法によって推定され<sup>3)-5)</sup>, 条件が整えばこの信頼性は高くなる<sup>6)</sup>. しかし, その推定精度にも限界はあることから, 手法を開発した Chao らはこの推定値を使った直接的な比較を避けている. このため, Chao & Jost (2012)<sup>1)</sup> は, 種数を比較するための基準が必要と考え, sample coverage を提案した.

サンプルベースの sample coverage は, その場に存在する延べの種数に対するあるサンプルサイズの下で観測された延べ種数の割合として解釈できる. 1つのサンプルで観測された1種を1つの玉として例えると, 最も出現しにくい種の玉を1つとして, その出現確率との比率に応じて, その他の種の玉の数を用意し, すべての玉の集合を袋に入れた中からランダムな抽出によって得られた玉の数の割合 (全体に対する努力量の割合) がサンプルベースの sample coverage のイメージである.

Sample coverage が“あるサンプルサイズの下”での割合としているのは, 同じ種数から構成される群集を観測するとしても, サンプルサイズが異なればそれぞれの在・不在の確率の種間のバランスも異なるためである<sup>6)</sup>. すなわち, sample coverage は, 調査側の都合によって変わる指標でもある. それでは, 何故, このような回りくどい指標が種数の公平な比較に用いられるのか疑問となる.

群集全体の種数を観測して把握することはほとんど不可能である中で, 観測の努力量は, 観測した種数の程度に見当を付ける指標と言え, その努力量を標準化した sample coverage は, 種数の比較の土台となり得る有力な指標と言える. また, sample coverage は推定精度の面でも優位性がある. Sample coverage の算出にあたっては, 未出現種の数の推定が重要な役割を担っている. 上述のとおり, この推定精度には限界があるものの, sample coverage の算出にあたっては分母の一部として扱われるだけなので, その推定精度の限界は sample coverage の精度にあまり影響しないことが期待されている<sup>1)</sup>.

### (2) 仮想のサンプリング

#### a) 仮想の魚類分布とその出現確率

Sample coverage の機能を理解するため, 30種で構成され

表—A.1 仮想の魚類分布からのサンプリングの条件. 3つのケースの魚類種数は30種で同じであるものの, サンプリングの大きさの違いや環境 DNA 分析の検出力の違いによって, 出現確率の大きさ及びバランスがケース間で異なることを想定している.

Case 1		Case 2		Case 3	
出現確率	種数	出現確率	種数	出現確率	種数
0.4	8	0.9	10	0.9	5
0.3	7	0.7	10	0.4	7
0.2	8	0.5	10	0.3	6
0.1	7			0.2	6
				0.1	6
計	30	計	30	計	30

る魚類分布を異なる3つの条件でサンプリングすることを想定した (表—A.1). Case 1 は, 0.1 から 0.4 までの出現確率のサンプリングであり, 出現確率に対する種数の分布はほぼ均等であるのに対して, Case 2 の出現確率は Case 1 よりも倍程度大きく, その相対的な大きさはやや歪んでいる. これらの違いは, 検出力や DNA 濃度の違いに伴う出現確率の非線形性を想定している. Case 3 は, 出現確率が高い種が5種存在し, その他の出現確率は Case 1 と同じである. これは, 環境 DNA 分析における検出力の種特異性を想定している.

#### b) シミュレーションの一例

仮想サンプリングの条件 (表—A.1) の下で5つのサンプルの採取をシミュレーションした (図—A.1). 出現確率の違いによって, 出現サンプル数と種数との関係も異なっている (図—A.1a). なお, 出現したサンプル数を5で除した値が出現確率の推定値となる.

この結果を希薄化曲線で表すと, ケース間に種数の差は無いにも関わらず, Case 2 のサンプル当たりの期待種数が他より多いことが見て取れる (図—A.1b). しかし, 環境 DNA 分析による推定においては, 調査・分析の手法がサンプル当たりの検出力に強く影響することから (本文 2.3), この比較に生態学的な意味がないことは明確である.

一方, sample coverage を基準とすれば, 同じ sample coverage の下の種数はほぼ一致した (図—A.1c). Sample coverage は, “あるサンプルサイズの下”での割合であり, 検出力の影響を間接的に受けている. しかし, ここで示した種数の概ねの一致は, 努力量に比べて, sample coverage がその影響を緩和した指標となっていることを意味している. Sample coverage は, 完璧な公平な比較を可能とするものではないものの, ここでの検証は, 少なくとも, 希薄化曲線よりも妥当性があることを示している.

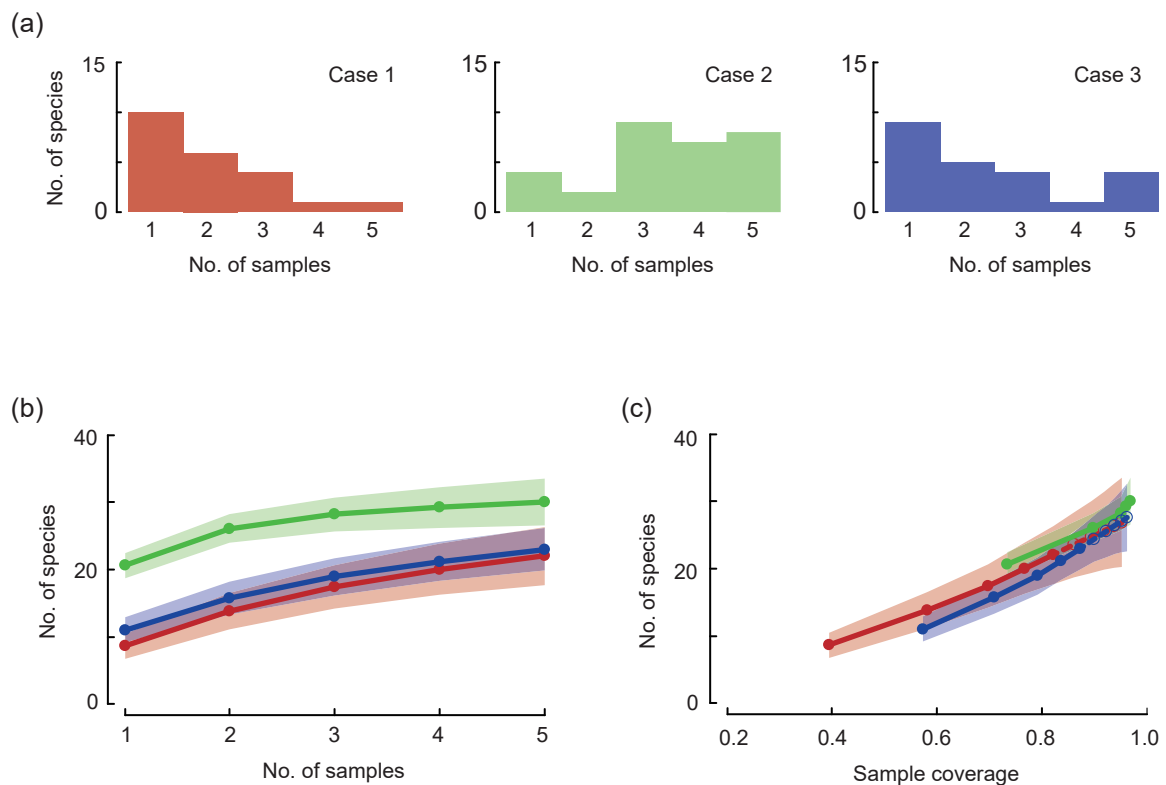
### (3) Sample coverage の限界

Sample coverage の算出において重要な役割を担う未出現種の数の推定は, 種の出現確率の連続性を前提とした理論に基づいている<sup>7),8)</sup>. サンプル数が少なく, この連続性を

担保できなくなれば、推定される未出現種数の妥当性が低下する<sup>6)</sup>。すなわち、不十分なサンプル数の下では **sample coverage** の指標としての妥当性がなくなる。この詳細については、付録 B において検証する。

**参考文献**

- 1) Chao A, Jost L: Coverage-based rarefaction and extrapolation: Standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology* 93: 2533–2547, 2012.
- 2) Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM: Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr* 84: 45–67, 2014.
- 3) Chao A: Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265–270, 1984.
- 4) Chao A: Estimating the population size for capture - Recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43: 783–791, 1987.
- 5) Chao A: Estimating population size for sparse data in capture-recapture experiments. *Biometrics* 45: 427–438, 1989.
- 6) 細川真也, 百田恭輔：港湾における小型無脊椎動物の種の多様性指数—2つのサンプリングエフォートの考え方の比較—, 港湾空港技術研究所資料, No.1361, pp30, 2019. URL [https://www.pari.go.jp/report\\_search/detail.php?id=20191205143541](https://www.pari.go.jp/report_search/detail.php?id=20191205143541)
- 7) Good IJ: The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237–264, 1953.
- 8) Harris B: Determining bounds on integrals with applications to cataloging problems. *The Annals of Mathematical Statistics* 30: 521–548, 1959.



図—A.1 仮想サンプリングのシミュレーションの一例。表—A.1 の条件の下で 5 個のサンプルを採取した結果であり、(a) 出現したサンプル数とその種数との関係、(b) サンプル数に対する種数の変化（希薄化曲線）、(c) **sample coverage** に対する種数の変化を示している。パネル c における中抜きと点線は、外挿による推定結果を示しており、パネル b と c におけるハッチは 95% 信頼区間を示している。

## 付録 B 目安となる sample coverage とサンプル数

ここでは、シミュレーションと本文の結果を通じて、環境 DNA 分析のサンプル数が種数と sample coverage の推定に与える影響を理解し、種数の比較において必要となるサンプル数を考察した。

### (1) 仮想のサンプリング

#### a) 理論値とシミュレーションの比較

付録 A で示した仮想サンプリングの条件（表—A.1）に基づき、シミュレーションを行った。この条件の下で、サンプル数を 3, 5, 10 としたランダムサンプリングによるシミュレーションをそれぞれ 100 回実施し、その結果に基づいて sample coverage に対する種数の関係を求め、サンプル数の 2 倍の範囲まで外挿した。また、この関係の理論値を求め<sup>1)</sup>、シミュレーションの結果と比較した。

この結果、出現確率が高い Case 2 のシミュレーションは、サンプル数が 3 個であっても理論値から大きく外れることはな

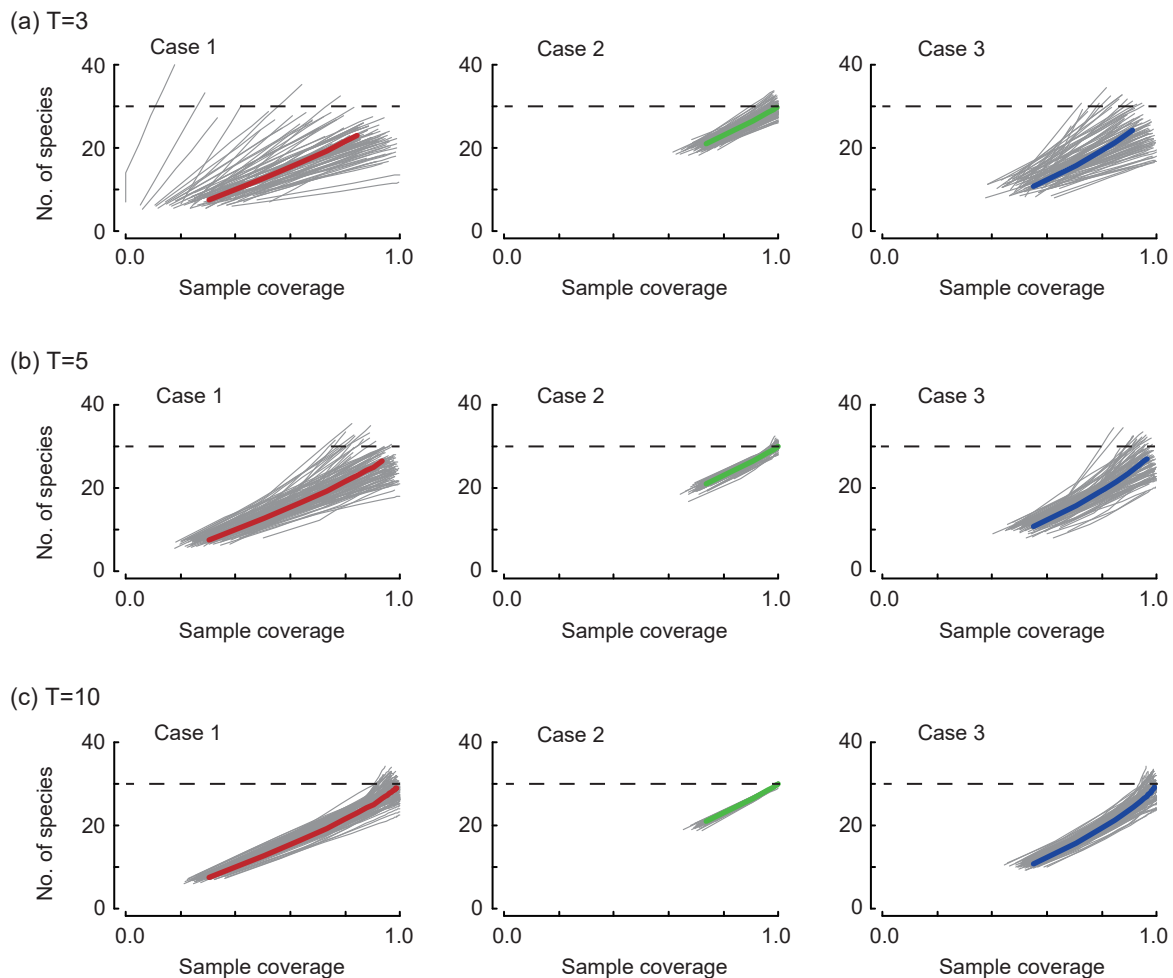
く、種数の推定幅は 10 程度に収まっていた（図—B.1）。一方、Case 1 においては sample coverage と種数の両方が大きくばらついた。このことは、Case 1 の条件で観測したとしても全く信用できない結果が得られる可能性を示している。

#### b) 推定結果がばらつく要因

サンプル数が小さい場合、推定結果（期待値）がばらつくことはよく知られた事実であるが、sample coverage の推定と種数の外挿においては、この影響に加えて、未出現種の数の推定精度も強く影響する。

ここで採用している未出現種の数の推定方法は、1 つのサンプルにしか出現しなかった種の数 ( $Q_1$ ) と 2 つのサンプルに出現した種の数 ( $Q_2$ ) のみを必要としている<sup>2)4)</sup>。すなわち、 $Q_1$  と  $Q_2$  がその推定のための確かな代表値となっているかどうか、sample coverage の推定と種数の外挿の精度の鍵を握っている<sup>5)</sup>。

サンプル数を  $T$  とすると、1 つのサンプルに出現した頻度



図—B.1 サンプル数と推定精度との関係。30 種で構成される魚類分布を表—A.1 の条件の下で、(a) 3 個のサンプル、(b) 5 個のサンプル、(c) 10 個のサンプルを採取した場合の理論値（色線）とシミュレーション結果（灰色の線）を示している。



と2つのサンプルに出現した頻度は、それぞれ、 $1/T$ と $2/T$ となり、この頻度が出現確率の推定値となる。すなわち、出現確率の推定値の解像度が $T$ に強く依存する。サンプル数が10個であれば、それらの推定値は0.1と0.2となるが、サンプル数が3個であれば、 $Q_2$ の出現割合は0.667 (=  $2/3$ )であり半分の0.5を超えた大きな値となる。

Case 2のすべての種の出現確率は大きく、サンプル数が3個であっても多くの種が観測され、未出現種の数の推定への依存の程度が低くなる。このことから、sample coverageの推定と種数の外挿の精度は高くなったものと考えられる。しかし、Case 1とCase 3の種の出現確率は高くなく、3個のサンプルでは観測できない種が多くいる。すなわち、これらのケースのsample coverageの推定と種数の外挿は、未出現種の数の推定に強く依存し、ばらつきが大きくなる。

Case 3のばらつきは、Case 1に比べて安定している。これは、Case 3では、既に観測された種が多く、未出現種数の推定値への依存の程度が低いためであると考えられる。

#### (2) 目安となる sample coverage

種数の比較においては、全体の種数の把握に努めるのではなく、そのための妥当な sample coverageを見極めることが重要となる。

本文 3.2 で用いた4つのデータセットは、1つのデータセット当たり12個のサンプルが含まれた規模の大きなデータセットであり、出現割合の解像度は比較的高く、目安となる sample coverageを見極めるのに適している。この4つのデータセットの sample coverage に対する種数は、sample coverage が0.8から0.9までの辺りで緩やかな上昇を示すが、それ以降は急な上昇を示している(図—3.2c)。この変化は、sample coverage が0.8から0.9までで多くの種が観測され、それ以降に出現しにくい種が観測されていることを示している。すなわち、この辺りまでの努力量で観測できる種とそれ以上の努力を必要としようやく観測できる種に境界があると言える。全種数を把握することはほとんど不可能であることを思い起こせば(付録 A)、この境界が種数を比較するための一つの目安と考えることができる。

#### (3) 目安となるサンプル数

サンプル数の一つの目安は、この境界に到達するサンプル数となる。上述のデータセットでは、0.8の sample coverageを達成するサンプル数は3個から6個であり(図—3.2b)、東京湾内(図—4.2c)、神奈川県久里浜湾(図—4.3c)、笠戸湾内とアマモ場(図—4.4c)でも同様に6個のサンプル数で0.8の sample coverageを達成しているか、もしくは、外挿によりその見込みがあると判断される。たとえ3個のサンプル数で0.8の sample coverageを満たせたとしても、推定結果がばらつく可能性を踏まえると、確かな解釈のためには5から6個のサンプルが望ましい。

一方、笠戸湾外ではサンプル数が6個でも sample coverageは0.8に到達しておらず(図—4.4c)、東京湾口の2つの場所でも0.8に到達する見込みはない(図—4.3c)。これらの場所は、海水交換が高いことが共通しており、環境DNA濃度の低さが sample coverageが上がりにくい原因となった可能性が考えられる。このような場所では出現確率を上げるよう(つまり、表—A.1においてCase 1からCase 2の条件に移行するよう)、ろ過量を増やすか分析上の検出力を上げる等の工夫が必要となる。

#### 参考文献

- 1) Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM: Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr* 84: 45–67, 2014.
- 2) Chao A: Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11: 265–270, 1984.
- 3) Chao A: Estimating the population size for capture - Recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43: 783–791, 1987.
- 4) Chao A: Estimating population size for sparse data in capture-recapture experiments. *Biometrics* 45: 427–438, 1989.
- 5) 細川真也, 百田恭輔: 港湾における小型無脊椎動物の種の多様性指数—2つのサンプリングエフォートの考え方の比較—, 港湾空港技術研究所資料, No.1361, pp30, 2019. URL [https://www.pari.go.jp/report\\_search/detail.php?id=20191205143541](https://www.pari.go.jp/report_search/detail.php?id=20191205143541)



港湾空港技術研究所資料 No.1373

2020.6

編集兼発行人 国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所

発行所 港湾空港技術研究所  
横須賀市長瀬3丁目1番1号  
TEL. 046(844)5040 URL. <http://www.pari.go.jp/>

Copyright © (2020) by MPAT

All rights reserved. No part of this book must be reproduced by any means without the written permission of the President of MPAT

この資料は、海上・港湾・航空技術研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部または一部の転載、複写は海上・港湾・航空技術研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。