

港湾空港技術研究所 資料

TECHNICAL NOTE
OF
THE PORT AND AIRPORT RESEARCH INSTITUTE

No.1406 March 2023

フィルターと分析者の違いが沿岸域における魚類の環境 DNA 網羅的解析の結果に
どう影響するか？

細川 真也, 小室 隆, 大倉 翔太, 和泉 隆夫

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
1.1 網羅的解析の可能性と本論文の狙い	4
1.2 沿岸域における環境 DNA の特徴	4
1.3 本研究の目的	5
2. 分析方法と評価指数	5
2.1 分析方法とリード数	5
2.2 評価に用いる指数	5
2.3 種の優占度ランク曲線と指数の関係	6
2.4 指数の解釈方法	7
3. フィルターの違いが及ぼす影響	7
3.1 はじめに	7
3.2 方法	8
3.3 結果	10
3.4 考察とまとめ	13
4. 分析者の違いが及ぼす影響	14
4.1 はじめに	14
4.2 方法	15
4.3 結果	17
4.4 考察とまとめ	22
5. あとがき	23
5.1 本論文のまとめ	23
5.2 今後の課題	23
謝辞	24
参考文献	24
付録 A 検出される種数の統計解析	27
付録 B 久里浜湾における塩分の空間分布	29

How do the differences in filter and analyzer affect the data quality of environmental DNA metabarcoding for fish species in estuary?

Shinya HOSOKAWA*,**
Takashi KOMURO***
Shota OKURA****
Takao IZUMI*****

Synopsis

The analysis of environmental DNA (eDNA) metabarcoding is expected to reduce the labor and cost of the survey and monitoring of fish communities. However, in coastal and estuarine areas, because the spatial distribution of eDNA is complex, and because there are factors that inhibit the analysis of eDNA, challenges for practical application are remaining. The filtering water sampled and the chemical analyses are the important processes in eDNA metabarcoding. We evaluated the effects of the differences in filter and analyzer on the results of metabarcoding analysis from three perspectives: whether the species that are major in the read count are detected or not, whether the number of species detected is certain or not, and whether the specificity in species detection exists or not? As a result, we concluded the following: 1) The detection of the species that are major in the read count was independent of filters and analyzers compared in this study; 2) The number of species detected was greater in a filter with smaller pore size. The difference in the chemical analyzer may affect the number of species detected. However, we could not be evaluated whether the difference was significant or not; and, 3) the pore size of the filter can be a possible factor to sort the species in coastal and estuarine areas. These conclusions indicate that filters should be selected according to the purpose of using eDNA metabarcoding analysis. However, the exact reasons to choose the chemical analyzer for the eDNA metabarcoding were not obtained from these conclusions.

Key words: Environmental DNA, Metabarcoding of fish community, Estuary, Filter, Analyzer

* Head of MarineEnvironmental Information Group, Marine Environment Control System Department
** Head of Big Data Technology Group, Infrastructure Digital Transformation Engineering Department
*** Postdoctoral Researcher, Marine Environmental Information Group, Marine Environment Control System Department
**** Researcher, Marine Environmental Information Group, Marine Environment Control System Department
***** Member, Marine Environmental Information Group, Marine Environment Control System Department
3-1-1, Nagase, Yokosuka, Kanagawa, 239-0826 Japan
Phone : +81-46-844-5107 Fax : +81-46-844-1274 e-mail: hosokawa@p.mpat.go.jp

フィルターと分析者の違いが沿岸域における魚類の環境 DNA 網羅的解析の結果にどう影響するか？

細川 真也^{*,**}・小室 隆^{***}・大倉 翔太^{****}・和泉 隆夫^{*****}

要 旨

環境 DNA に基づく網羅的解析は、魚類調査の低労力化・低コスト化が期待される。しかし、沿岸域における環境 DNA の空間分布は複雑で、かつ、分析を阻害する要因も存在することから、実用化までには課題がある。本研究では、網羅的解析の要素技術のうち、フィルターと網羅的解析の分析に着目し、これらの違いが網羅的解析の結果に与える影響について、主要な魚種を取りこぼすことなく検出できるか、確かな種数の検出ができるか、特定の魚種の検出に差はないか、の3つの視点で検証した。この結果、以下の結論を得た。1) 主要な種の検出においては、本研究で比較したフィルターの間では差はなく、分析者が違っても差はない。2) 検出される種数は、孔径が小さなフィルターほど多い。一方、分析者が違えば、検出される種数に影響する可能性はあるものの、重大な差を引き起すかどうかわからない。3) 環境 DNA の起源が多様な沿岸域では、フィルターの孔径の違いで、捕捉する種を生活様式別に選別できる可能性がある。これらの結論は、網羅的解析を使う目的に応じて、フィルターを正しく選択する必要があることを示しているが、これらの結論から、分析者を指定する明確な根拠は得られなかった。

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

* 海洋環境制御システム研究領域 海洋環境情報研究グループ長
** インフラ DX 研究領域 ビッグデータ研究グループ長
*** 海洋環境制御システム研究領域 海洋環境情報研究グループ 専任研究員
**** 海洋環境制御システム研究領域 海洋環境情報研究グループ 研究官
***** 海洋環境制御システム研究領域 海洋環境情報研究グループ 技術補助員
〒 239-0826 神奈川県横須賀市長瀬 3-1-1 国立研究開発法人 海上・港湾・航空技術研究所 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

1.1 網羅的解析の可能性と本論文の狙い

環境 DNA 分析は、コストと労力を低減させることから、生物のモニタリングや保全研究のツールとしての期待が広がっている^{1)–3)}。環境 DNA 分析には、特定の種に着目した種特異的解析と分類群の中の生物相を対象とする網羅的解析があり、それぞれの利点に応じて使い分けられる。

網羅的解析は、生物群集のモニタリングへの応用が期待される。魚類の網羅的解析は、2012年に魚類共通を対象とした先駆的なプライマーが発表されて以降^{4),5)}、より多くの種を包括して検出できるプライマーが開発され^{6),7)}、実用化への現実味を帯びつつある。沿岸域は多様な魚が生息場として利用する場であることから、これを使った調査やモニタリングが期待される⁸⁾。しかし、後述する沿岸域特有の課題はこの実用化の1つの障壁となっている。

網羅的解析は、複数の専門性の強い過程によって成り立っており(図—1.1)、すべての過程を理解できる技術者を育成することは容易ではない。しかし、少なくとも、沿岸域をフィールドとして事業を統括する技術者は、沿岸域特有の課題が網羅的解析のどの過程でどの程度結果に影響するのか理解していなければ、効率的な調査計画を立てられないし、場合によっては誤った評価を導く計画を立ててしまう恐れもある。本論文では、沿岸域特有の課題を示し、網羅的解析の要素技術がその課題にどう対処できるのかを示すことで、沿岸域をフィールドとする技術者の魚類の網羅的解析に関する理解が進み、現場での応用事例が増えて実用化へ前進する事を狙っている。

1.2 沿岸域における環境 DNA の特徴

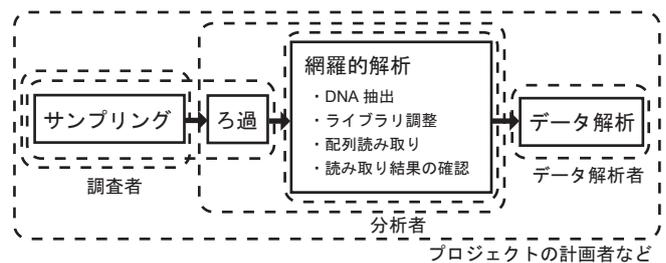
環境 DNA は、生物から排出された細胞や組織片を由来としていと考えられているものの、その実情は未だによくわかっていない⁹⁾。しかし、魚類の環境 DNA は、1 μm から 10 μm の粒子状として存在している事は分かっており^{10),11)}、このサイズの粒子の動態により魚類の環境 DNA の空間分布は強く支配されるものと考えられている。

沿岸域では、河川の上流に生息する魚類の環境 DNA が流下したり^{12)–14)}、人間活動を由来とする DNA によって汚染されやすい場でもある¹⁵⁾。実際に、東京湾沿岸でも湾内には明らかに生息していない魚類が網羅的解析で検出されている¹⁶⁾。一方で、これらの平面的な拡がりとは逆に、藻場に生息する魚類の環境 DNA は、藻場からわずか 1 m 上でも検出されない局所性もある¹⁷⁾。

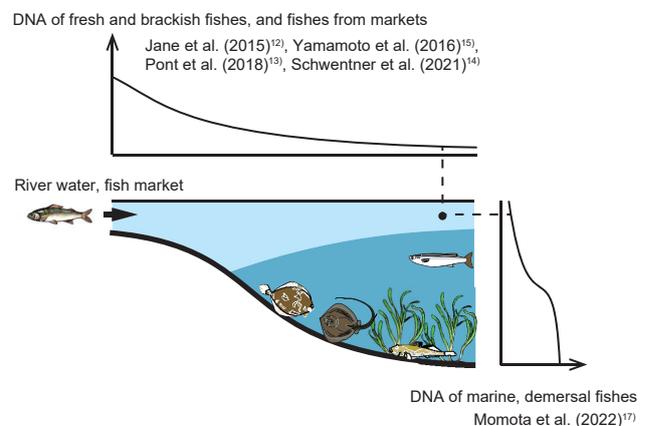
この魚類の環境 DNA の複雑な空間分布は、調査やモニタリングのためのサンプルをどこで採ればいいのか、もしくは、検出の感度をどこに設定すればいいのか、調査計画を

立てる者の頭を悩ませる。例えば、上述した既往の知見から描くことができる鉛直二次元の環境 DNA の空間分布の中では(図—1.2)、表層から採取するサンプルで、下層の DNA も対象としたいと考える場合もあるであろう。この場合、検出の感度を上げることで下層 DNA の検出は達成できそうだが、同時に、明らかに検出したくない河川由来の DNA を検出する可能性も高めてしてしまう。検出感度を上げることにより偽陰性を減らせる代わりに、偽陽性の確率を上げるトレードオフは、既に Ficetora et al. (2015)¹⁸⁾ によって指摘されていることであり、沿岸域はそれが起こりやすい構造であると言える。

沿岸域は、環境 DNA の分析に影響する因子が多く存在する場でもある。例えば、海藻の多糖類は、ろ過を阻害したり、DNA の単離の邪魔もする¹⁹⁾。また、沿岸域に広く分布する腐食酸などが高濃度に含まれるサンプルでは、網羅的解析において重要となる DNA の量を増幅させるポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction : PCR) が阻害される^{20),21)}。環境 DNA の分析に影響する因子及びその影響の大きさについては、他にもわかっていないことは多く、分析する者の独自のノウハウにより対処されている。



図—1.1 環境 DNA の網羅的解析を使った調査から解析までの流れ。実務では、複数の専門家が分業して各過程に取り組む。



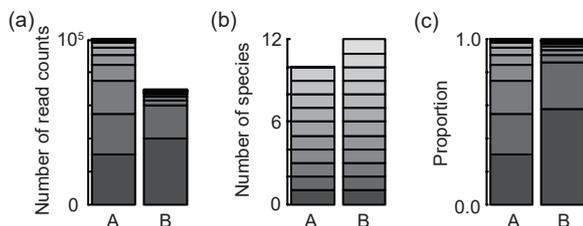
図—1.2 沿岸域における環境 DNA の分布。沿岸域では、魚の生息場所が多様であり、魚から排出される DNA の分布が空間的に複雑であることが既に知られている。

1.3 本研究の目的

魚類の網羅的解析では、ろ過した残渣を分析の対象とするが、孔径の小さなフィルターでろ過して細かい粒子まで捕捉することで、より多様な DNA を採取して網羅的解析の感度を高められる期待がある。しかし、上述の偽陽性とのトレードオフのとおり、このことが沿岸域のサンプルにおいてメリットになるとは限らない。また、網羅的解析の分析者が独自に有しているノウハウは、分析に影響する因子には対処できるかもしれないが、標準的な手法に対して分析結果に差をもたらしてしまう可能性も考えられる。

本論文では、ろ過と分析者が有するノウハウに着目し、沿岸域をフィールドとする技術者がこれらを選択する際の参考となる指針を示すことを目的とした。このため、まず、これらの要素技術が沿岸域の特有の課題にどこまで対処できるのか、次の3つの視点で評価した。1つ目は、サンプルの中で相対的に高い DNA 濃度を有する主要な種を取りこぼすことなく検出できるかどうかである。主要な種を取りこぼしてしまう技術であれば、群集把握の信頼性は低く、実務での応用には値しないと考えていいだろう。次に、網羅的解析の結果としてよく使われる種数に着目し、網羅的解析の分析感度を評価した。最後に、魚の生活様式に着目して検出される魚種を評価した。この評価は、環境 DNA が辿ってきた距離や物理過程が違えば、環境 DNA の存在形態が変化し²²⁾、検出の感度も異なるという予測に基づいたものである。

2つ目と3つ目の評価の視点は、網羅的解析の検出感度が重要な視点となっているが、著者らの知る限り、この感度を統一的に理解するための理論はない。そこで、本論文では、第2章において、網羅的解析の分析方法から結果が出力されるまでの過程を整理し、検出の感度に影響する要因を予測し検証した。この検証結果を踏まえ、第3章では、少なくとも魚類の環境 DNA の多くが存在する $1\ \mu\text{m}$ から $10\ \mu\text{m}$ の



図—2.1 環境 DNA の網羅的解析で得られる結果。仮定のサンプル A とサンプル B のリード数を一例として示している。(a) 1回の解析で種ごとのリード数 (number of read counts) が出力され、1つのサンプルに含まれる種のリード数の合計がそのサンプルの全リード数となる。(b) リード数が得られた種を1としてカウントすれば種数 (number of species) が得られる。(c) 種のリード数をサンプル中の全リード数で割れば、リード数に基づく種の割合 (Proportion) が得られる。

粒子^{10),11)}を捕捉する2つの孔径が異なるフィルターを比較することで、フィルターの違いが網羅的解析の結果に及ぼす影響を評価した。第4章では、1つ1つに分解した分析ノウハウに着目するのではなく、分析者が有する結集したノウハウの違いが分析結果に及ぼす影響を評価した。最後に、これらの評価結果に基づき、沿岸域をフィールドとする技術者がフィルター及び分析者を選択するための指針を導いた。

なお、本論文では、分析者による種の同定精度の違いを着眼点の1つとしている。このことから、断りの無い限り、記載する種名は、すべて、分析者から報告されるものとした。

2. 分析方法と評価指数

2.1 分析方法とリード数

環境 DNA の網羅的解析では、大量の DNA 配列を読むことができる次世代シーケンス技術が用いられる。次世代シーケンス技術では、大量の DNA 配列を読むことができるため、複数のサンプルが同時に解析され、1サンプル当たり割り当てられる情報量はその中で決まる²³⁾。具体的には、1回のランで決定する DNA 配列の数を 1500 万本に設定して 150 サンプルを同時に解析した場合、1つのサンプル当たり割り当てられる配列の数は平均で 10 万本となる⁹⁾。

網羅的解析によって検出されるそれぞれの種の DNA 配列の読み取り数は、さらに、1サンプル当たりの配列読み取り数の中から割り当てられる (図—2.1a)。この読み取る配列の数について本論文ではリード数と呼ぶとすると、上述のとおり、全リード数は、分析上設定するものであり生態学的な意味はないが、種のリード数を在・不在に変換したり (図—2.1b)、全リード数に対する割合 (以下、相対リード数) に変換することで (図—2.1c)、生態学的に意味のある情報に置き換えられる。

2.2 評価に用いる指数

(1) 1つのサンプルを評価する種数と有効種数

種のリード数を在・不在に変換し、それを積み上げた数が種数 (S) であり、これは最もよく知られた多様性指数の1つである。相対リード数は、明示して使われることは少ないが、種の DNA 濃度の相対量として考えられており、第3章と第4章で用いられている定量 MiSeq 法でもこの考え方が採用されて種の DNA 濃度が推定される²⁴⁾。

種の多様性においては、種数とともに種の優占の度合いを表す均等度が重要な概念であり、これらに基づいた多様性指数がいくつか提案されている。シャノン指数とシン普森指数は、均等度を考慮した最も有名な多様性指数である。Hill (1973)²⁵⁾は、種数とこれらの指数を統合した式を提示している。例えば、シン普森指数 (λ) は、種 i の出現確率 p_i によつ

て下式から求まり、

$$\lambda = \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad (1)$$

この逆数が Hill (1973)²⁵⁾ によって統合された式による結果の 1 つとなる :

$${}^2D = \lambda^{-1} \quad (2)$$

ここに、左辺の左肩の 2 は均等度に関するパラメータであり、パラメータを 1 としたものはシャノン指数の指数関数に一致する。Hill (1973)²⁵⁾ は、均等度に重みを付けたものをすべて有効種数と呼んでいるが、本論文では、有効種数と言えば、このシン普森指数の逆数で定義されるものを意味することとする。

ここに、種 i の出現確率を相対リード数で代用すれば、図—2.1 のサンプル A と B の有効種数は、それぞれ、4.8 及び 2.4 となる。これらの値には明確な意味はないものの、全リード数を占める種の数、すなわち、主要な種の数把握するのに有効な数値である。なお、有効種数は、個体数に基づくものとサンプル数に基づくものもあり混同しやすい。有効種数の詳細な説明については、細川・百田 (2019)²⁶⁾ を参照できる。

(2) 2つの組成を比較する類似度

網羅的解析では魚類相を推定することから、フィルターの違いと分析者の違いの影響について、種組成の観点から評価することも重要となる。種組成を比較する方法については、異なる群集の存在を重要と考える β 多様性の分野で発展し、類似度と呼ばれる多くの指数が使われており^{27),28)}、網羅的解析で得られる検出種数と相対リード数についてもいくつかの類似度を適用できそうである。

例えば、種の在・不在に基づく類似度である Sørensen 指数がある :

$$\text{Sørensen index} = \frac{2a}{2a + b + c} \quad (3)$$

ここに、 a は 2 つの組成に共通する種の数であり、 b と c は、それぞれ、片方の組成に特有の種の数である。網羅的解析で得られた種の在・不在の結果をこれに当てはめることで、2 つの組成の類似性を測ることができる。

また、個体数等の連続変数に基づいた 2 つの組成を比較する指数として、Bray-Curtis 指数がある :

$$\text{Bray-Curtis index} = \frac{\sum_{i=1}^S |X_{ij} - X_{ik}|}{\sum_{i=1}^S (X_{ij} + X_{ik})} \quad (4)$$

ここに、 X_i は種 i の個体数であり、 j と k は、それぞれ、比較する場所 (もしくはサンプル) を意味している。 X_i には種 i

の相対リード数を代入できる。

Bray-Curtis 指数に種の在・不在データを代入した結果と 1 から Sørensen 指数を差し引いた結果は一致する^{28),29)}。このことから、これら 2 つの指数を比較することで、種数と相対リード数の 2 つの観点を比較した洞察が可能となる。この洞察については、2.4 に後述する。

ここで、2 つの組成を比較するための解析では、1 から類似度を差し引いた非類似度が用いられることが一般的である。すなわち、Bray-Curtis 指数は式 (4) のまま用いられるが、Sørensen 指数は非類似度に変換されて用いられる。しかし、このことを毎回説明すると冗長的になるため、本論文では、Bray-Curtis 指数と Sørensen 指数は、いずれも非類似度を意味することとする。

2.3 種の優占度ランク曲線と指数の関係

(1) 種の優占度ランク曲線

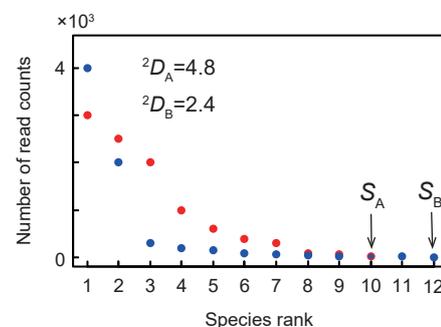
リード数を積み上げて棒グラフにした図—2.1a は、横軸に種、縦軸にリード数をプロットした図として表すこともできる。リード数が多い順番に種を並べると種の優占度ランク曲線 (図—2.2) と呼ばれる生態学の分野で古くから利用されている曲線となる^{30),31)}。この曲線により、種の優占度と種数の両方を同時に視覚的に理解できる。なお、種 i のリード数 f_i と検出された種数 S から、全リード数 R は以下となる :

$$R = \sum_{i=1}^S f_i \quad (5)$$

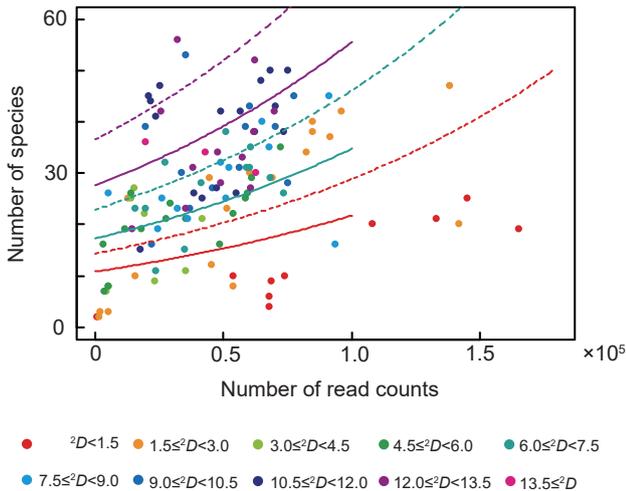
なお、種の優占度ランク曲線が切り立った形状であるほど、先述した有効種数は小さくなる。

(2) 検出種数を決める因子

種の優占度ランク曲線の形状が生態学的な条件のみによって決まるとすると、全リード数 R が変動することで、種の優占度ランク曲線は縦軸方向に移動する。すなわち、検出される種数 S は、全リード数 R が低くなるほど少なくなり、その逆も



図—2.2 種とリード数の関係を表す種の優占度ランク曲線。赤と青のプロットは、それぞれ、サンプル A とサンプル B で検出された種のリード数を示している。



図—2.3 全リード数と種数との関係。横軸と縦軸は、それぞれ、MiFish-U種に限定した全リード数と種数である。有効種数 (2D) もMiFish-U種に限定したリード数に基づいて算出している。実線と点線は、それぞれ、内部標準種、MiFish-Ev2種、MiFish-U2種を含むすべてを対象とした全リード数が10万と100万の場合を示している。

起こる。また、種の優占度ランク曲線の裾野尾が長いほど、全リード数 R の変化に対して検出される種数 S は敏感に変化する。ただし、これらは、種の優占度ランク曲線の形状が生態学的な条件のみによって決まる事を仮定したことによって導かれる予測であって、仮説の域を出ていない。

この仮説を検証するため、本論文で出てくるデータを用いて、種数の変動が全リード数と種の優占度ランク曲線の形状によって説明されるかどうかを検証した。目的変数に種数 (S)、説明変数に全リード数 (R) とした。また、種の優占度ランク曲線の形状については有効種数 (2D) によって表現し、これも説明変数の1つとした。一般化線形モデル (Generalized Linear Model : GLM) を用いて検証した結果、やはり、種数は全リード数と有効種数によって説明された (付録 A)。種の優占度ランク曲線がなだらかな形状であるほど、また、全リード数が多いほど、検出される種数は多くなる事が示された (図—2.3)。

この結果では、まだうまく解釈できていない点も残っており (付録 A)、検出種数と全リード数及び種の優占度ランク曲線の形状との関係が普遍的なものとして結論づけるには早計である。しかし、この結果は、少なくとも本論文で扱うデータの傾向を説明していることから、フィルターの違いと分析者の違いが網羅的解析の結果へ及ぼす影響の考察に十分に使えるものである。

2.4 指数の解釈方法

有効種数と種数の2つ指数を使うことで、主要な種の数とそれ以外の種の数が比較対象の間でどれくらい同質に検出で

きているのか、もしくは異質なのか評価できる。これと同様の解釈は、類似度についても適用できる。複数サンプルの比較の中で、Bray-Curtis 指数で異なるグループは、主要な種が異なっているものと判断できる。一方、Bray-Curtis 指数では同質で、かつ、類似するグループが、Sørensen 指数ではそうでない場合、主要ではない種に偏りがあったり、ランダムな異質性が生じていることが疑われる。種の偏りに関しては、既に報告されている分析者の間での同定精度の差に起因することが予想される¹⁶⁾、ランダムな異質性については、相対リードの低い種が、種の優占度ランク曲線や分析上の設定によって、検出されたりされなかったりすることが予想される。

3. フィルターの違いが及ぼす影響

3.1 はじめに

魚類の環境 DNA 分析では、DNA を保持した粒子を水中から取り出し、その残渣から DNA を抽出する。ろ過は、DNA を保持した粒子を取り出す重要な過程である。ろ紙の孔径、材質、DNA 抽出までの保存方法は、取りこぼしを防ぐためには重要なポイントであり、これらの最適化を目指した研究は多い³²⁾⁻³⁸⁾。

環境 DNA を保持する粒子を捕捉するフィルターの孔径は、網羅的解析の分析感度を定める要因であることは容易に想像できる。実海域における環境 DNA を保持する粒子の大きさは、1 μm から 10 μm の間に分布していると考えられており^{10),11)}、これよりも小さな孔径のフィルターを選択すれば、少なくとも DNA 濃度の割合を占める主要な種を取りこぼすことなく検出できそうである。さらに、より小さな粒子を捕捉することで、大きな粒子には保持されていない魚の DNA の検出に寄与できそうである。実際に、Miya et al. (2016)³⁹⁾ は、水族館の水槽から採取した 1 L の水サンプルを孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターと 0.7 μm のデプスフィルターでろ過して、メンブレンフィルターで3倍くらい多くの種を検出できる事を示している。

さらに、粒子の大きさによって、網羅的解析による検出傾向に差があるのであれば、フィルターの孔径の違いによって、検出したい種を操作できるようになるという仮説を立てることができる。細粒化した粒子は、大きな粒子よりも浮遊時間が長く、表層に長く滞在できることは明らかである⁴⁰⁾。さらに、DNA の起源から長い距離を辿った粒子ほど細粒化していることが予想され²²⁾、沿岸域をサンプリングポイントにする場合、フィルターの孔径を変えることで、河川から下ってきた遠方を起源とする環境 DNA の検出傾向を調整できるかもしれない。

サンプリングポイントを表層にする場合、底層から浮遊した環境 DNA についても同様の事が予想される。また、植生が季節的に変化する沿岸域では、フィルターの孔径の違いによ

る検出傾向の違いも季節的に変化するかもしれない。

本章では、DNA を保持した粒子を水中から取り出すフィルターに着目し、沿岸域の藻場が繁茂する環境下において、フィルターの孔径の違いが網羅的解析の結果に及ぼす影響を評価した。評価は本論文の狙いである次の3つの視点で行った：1) 孔径が1 μm のフィルターであれば、DNA 濃度の割合を占める主要な種を取りこぼすことなく検出できるか、2) より孔径の小さなフィルターほど多くの種を検出できるか、3) フィルターの孔径により起源が異なる魚種を選別できるか。

3.2 方法

(1) 調査の場所及び時期

1つのサンプルを異なるフィルターでろ過することで比較検証した。サンプルの採水は、平作川の下流に位置する久里浜湾において、港湾空港技術研究所の敷地内で実施した(図—3.1a)。塩分は、平作川の表層付近で20 PSU 近くまで低くなる鉛直構造が形成されているが、久里浜湾内全域及び採水場所付近では鉛直方向にはほぼ一様である(付録 B)。採水は、2021年11月24日から2022年1月26日までの間に、およそ1週間の間隔で計10回実施した。別の日のサンプルで比較する理由は、特定の種組成による検出傾向の偏りの影響を排除するためである。採水場所付近では、冬季にア

ラム・カジメが優占する海藻藻場が形成されることが報告されているが⁴¹⁾、この期間の中旬以降にも藻場の形成が目視で確認できた。

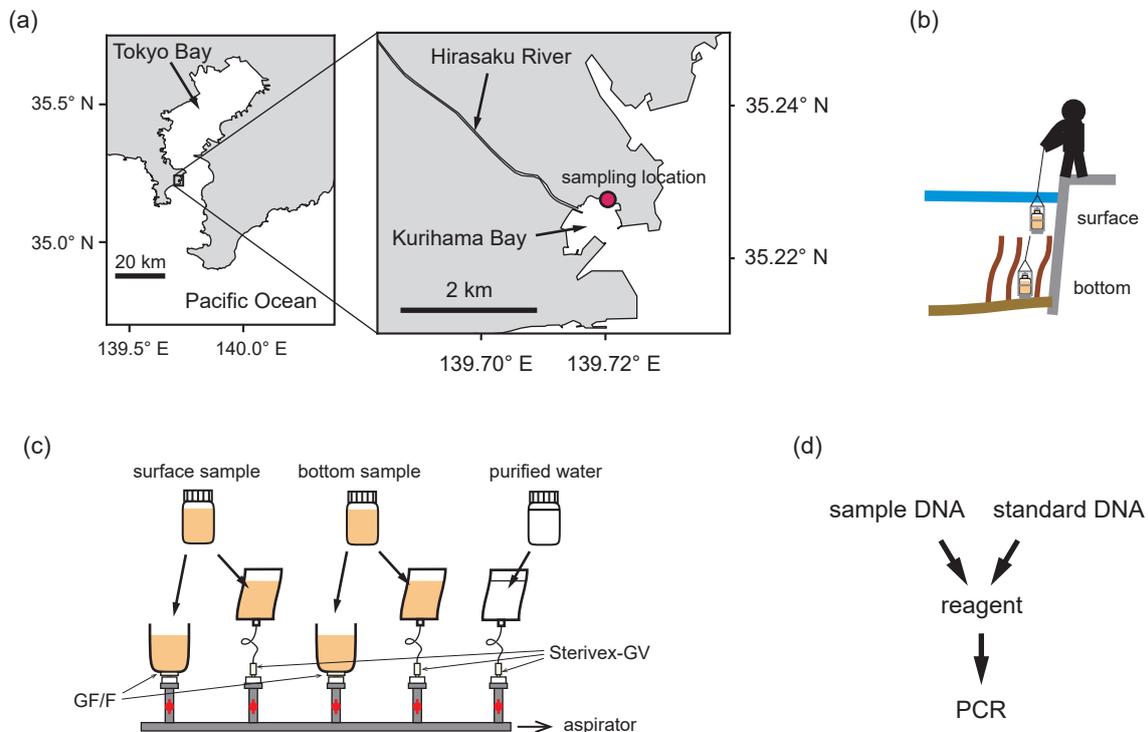
(2) 調査方法

採水は、ハイロート採水器を用いて、表層から0.2 m 程度(以下、表層)と1.5 m 程度(以下、底層)の深さの2層で実施した(図—3.1b)。表層のサンプリングポイントは期間中を通して藻場よりも上に位置していたが、底層のサンプリングポイントは藻場が繁茂した時には藻場の中に位置していた。採水は、ハイロート採水器にセットした2 L の滅菌ポリエチレン瓶により行った。1回の採水では、表層と底層から1つのサンプル(1 反復)を採取した。

サンプルは、採水後に速やかに港湾空港技術研究所内の実験室へ持ち帰ってろ過した。1つのサンプルを2つの1 L サンプルに分けた後、それぞれを材質がガラス繊維、粒子保持能が0.7 μm のデプスフィルター(GF/F, Whatman 社製)と材質がポリフッ化ビニリデン、フィルター孔径が0.22 μm のメンブレンフィルター(Sterivex-GV, Merck Millipore 社製)を使い吸引ろ過した(図—3.1c)。ろ過後のフィルターは、しばらくの間冷凍保存し、後日、まとめて分析業者へ送付した。

(3) DNA 分析

環境 DNA の網羅的解析は、主に、フィルターからの DNA



図—3.1 フィルター比較のための調査方法の概要。(a) 久里浜湾と平作川及び採水場所。(b) サンプルはハイロート採水器を用い、表層と底層から採水した。(c) 1つのサンプルは、2つに分けて、異なるフィルターでろ過した。(d) サンプルから抽出した DNA 溶液に内部標準 DNA 溶液を加えた試薬について、ポリマーゼ連鎖反応(PCR)を実施した。

表—3.1 解析対象のカテゴリ、採水場所（久里浜湾）から見たその意味、及びカテゴリに当てはまる種の FishBase⁴³⁾からの検索条件.

カテゴリ	採水場所から見たカテゴリの意味	FishBase による区分	
		タイプ	生活場所
淡水魚・汽水魚	明らかに上流を起源とする環境 DNA	“Fresh” のみの種 “Fresh” と “Brack” のいずれも含む種	指定なし
底生魚	久里浜湾内の底層を起源とした環境 DNA である可能性	“Saltwater” のみの種 “Saltwater” と “Brack” のいずれも含む種 “Saltwater”, “Brack”, 及び “Fresh” のいずれも含む種	“demersal”
岩礁魚	久里浜湾内の浅場や護岸近傍を起源とした環境 DNA である可能性	同 上	“reef-associated”
遊泳魚	久里浜湾内を起源とした環境 DNA である可能性	同 上	“pelagic-neritic”

抽出、抽出した DNA の増幅及びその増幅産物の精製と濃縮、サンプルごとのタグ付け、DNA 配列の読み取り、読み取り結果の確認の過程に分けられる。この中で、抽出した DNA の増幅とサンプルごとのタグ付けの2つの工程で PCR を行うことから、それぞれ、1st PCR 及び 2nd PCR と呼び分けられている。なお、サンプルごとのタグ付けは、DNA 配列の解読を1回のランで複数のサンプルから同時に行うことから (2.1)、サンプルの識別のために必要となる。

フィルターからの DNA 抽出方法については、第 4 章の A 社のおりである。また、1st PCR 及び増幅産物の精製と濃縮の方法については第 4 章の D 社のおりである。網羅的解析の精度を左右するプライマーについては、MiFish のプライマーセット（硬骨魚類全般に適用可能な MiFish-U⁶⁾、温帯の沿岸域で一般的なアナハゼ類に最適化した MiFish-U2^{2),3)}、サメ・エイ類に最適化した MiFish-Ev2^{2),3)} の複数のプライマーによって構成されるセット）を用いた。

網羅的解析では、濃度が分かっているサンプル中に存在しない魚種の DNA（内部標準 DNA）を添加することで、サンプル中の魚種の DNA 濃度を定量できる定量 MiSeq 法²⁴⁾ を用いた。このため、1st PCR の前に内部標準 DNA を混ぜて試薬を調製した（図—3.1d）。なお、内部標準については、内部基準と記述している例もあるが⁹⁾、本論文では内部標準として用語を統一する。

DNA 配列の解読については次世代シーケンサー（MiSeq Reagent Kit V2 × 150PE / × 250 PE, Illumina 社）を用いた。解読した DNA 配列については、解析パッケージを用いて、結合、プライマー配列除去、トリミング、クオリティフィルタリング、デノイズ、キメラ配列を除去を経て実施した⁴²⁾。その後、種名の割り当てと種リストを作成した。

(4) データ解析

検出した魚種の傾向をみるため、FishBase⁴³⁾と照合し、そ

の生活様式でカテゴリ化した（表—3.1）。Bray-Curtis 指数と Sørensen 指数によりサンプル間の種組成を比較した（第 2 章）。これら指数に基づく種組成の変動に対する時間（採水日）、層、フィルター、時間と層の交互作用、時間とフィルターの交互作用の効果について Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) により検定した。有意な効果が認められた変数を用い、距離に基づく冗長性分析（distance-based Redundancy Analysis : db-RDA）を行って主要な変動を二次元で視覚化した。

種組成を解析した後、フィルターの間での結果の違いを検証した。まず、いずれのフィルターでも検出された種とどちらか片方のフィルターで検出された種について、定量 MiSeq 法によって推定した DNA 濃度の分布を求めた。次に、種数のフィルター間での差について、対比較による Wilcoxon の順位和検定により検定した。この検定は、全種数と生活様式のカテゴリ別の実施した。

種数の変動を引き起こす要因を明らかにするため、サンプル中の MiFish-U 種を対象として、その種数を目的変数とし、全リード数、有効種数、フィルターの違い、層の違いを説明変数とした GLM を構築した。つまり、構築したモデルは、第 2 章で解析したデータのうち、本章のデータに限定しつつ、さらにフィルターと層の効果を加えたものである。目的変数である種数は、正の値を取る離散型の変数であるため、誤差分布としてポアソン分布を適用した。最適モデルは、ステップワイズ法により選択した。説明変数間の効果量を比較できるよう、説明変数を標準化して解析した。

解析はすべて R⁴⁴⁾を用いて実施した。魚種のカテゴリは rfishbase 4.0.0⁴⁵⁾で実施した。PERMANOVA は、パッケージ vegan 2.6-4⁴⁶⁾にある adonis2 関数を用いて実施した。db-RDA は、同パッケージの capscale 関数を用いて解析した。ステップワイズ法には step 関数を用いた。対比較による

表—3.2 全種数に対するカテゴリに属する種数の割合。値は、パーセンタイル値で示している。冗長的になるため、ここではデプスフィルターの結果のみを示している。

カテゴリ	種数の割合	
	表層	底層
淡水魚・汽水魚	2.6 ± 4.6	2.4 ± 3.3
底生魚	58.5 ± 5.0	61.3 ± 5.8
岩礁魚	18.1 ± 5.2	18.4 ± 2.8
遊泳魚	8.0 ± 4.7	7.5 ± 3.2

Wilcoxon の順位和検定, フィルター間の分散の検定, GLM は, それぞれ, R のデフォルトの `wilcox.test` 関数, `var.test` 関数, `glm` 関数を用いた。GLM の多重共線性のチェックに使う分散拡大係数 (VIF) は, パッケージ `car`⁴⁷⁾ の `vif` 関数を用いた。

3.3 結果

(1) 網羅的解析結果の要約

網羅的解析によって検出された全種数は, 表層で 31.8±6.3, 底層で 36.3±8.4 であった。全種数のうちの 60% 近くが底生魚で最も優占し, 次に岩礁魚が多く 20% 近くを占めていた (表—3.2)。淡水魚・汽水魚も全体の 2.5% くらい占めていた。

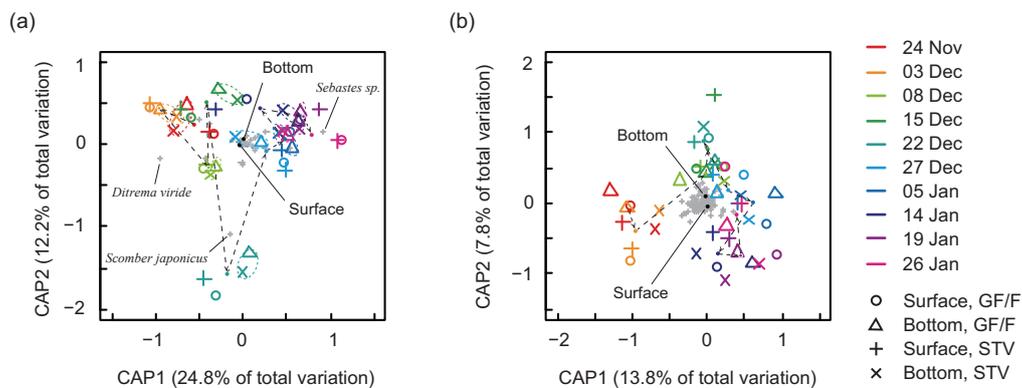
種組成は, Bray-Curtis 指数でも Sorensen 指数でも時間有意に変動していた (表—3.3)。さらに, 時間の r^2 は, いずれの指数においても他の説明変数に比べて倍以上大きく, 種組成の変動は時間変化に強く支配されていることが理解できる。Bray-Curtis 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットからも, 層間やフィルター間の変動よりも, 時間変動が支配的であることが分かる (図—3.2a)。また, メバルの一種 (*Sebastes sp.*) とアオオナゴ (*Ditrema viride*) が, 横軸方向 (主要な変動方向を意味する方向) に分布しており, 主にこれら

表—3.3 環境 DNA の網羅的解析で推定された魚類相の非類似度のばらつきを検定結果 (PERMANOVA)。調査日 (time), 層 (layer), フィルター (filter), 調査日と層及びフィルターの交互作用を説明変数として考慮している。

Explanatory variables	df	Sum of squares	r^2	pseudo-F	p
Bray-Curtis index					
Time	9	2.92	0.60	8.00	<0.001
Filter	1	0.03	0.01	0.67	0.771
Layer	1	0.16	0.03	3.95	<0.01
Time×filter	9	0.44	0.09	1.20	0.185
Time×layer	9	0.90	0.19	2.48	<0.001
Residual	10	0.41	0.08		
Total	39	4.85			
Sorensen index (dissimilarity)					
Time	9	1.55	0.46	3.20	<0.001
Filter	1	0.01	0.00	0.23	0.997
Layer	1	0.11	0.03	2.09	<0.05
Time×filter	9	0.60	0.18	1.24	0.101
Time×layer	9	0.55	0.16	1.13	0.236
Residual	10	0.54	0.16		
Total	39	3.36			

の種の相対リード数の時間変化が Bray-Curtis 指数による種組成の時間変動を支配されていたことが理解できる。12月22日の種組成は, 他の日の種組成と縦軸方向に離れる特徴を有していた。この方向に分布する魚は, 回遊性のマサバ (*Scomber japonicus*) であった。Sorensen 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットでは (図—3.2b), Bray-Curtis 指数よりも同じ色の中でのばらつきが大きいことから, 相対リード数の低い種の時間的な特徴が弱かったものと解釈される (2.4)。

種組成の層間変動は有意であったが, その r^2 はいずれの指数でも 0.03 であり種組成の変動の説明力は小さい (表—



図—3.2 環境 DNA の網羅的解析で推定された種組成についての距離に基づく冗長性分析 (db-RDA) の二次元プロット。(a) Bray-Curtis 指数と (b) Sorensen 指数を対象とした結果を示している。中塗りプロットは各時間 (調査日) もしくは層の重心を表し, 点線の矢印は時間変化を示している。Bray-Curtis 指数の冗長性分析では時間と層の交互作用も有意であったため, 同じ調査日の中でも表層と底層の違いが分かるよう底層を点線の枠で囲んでいる。

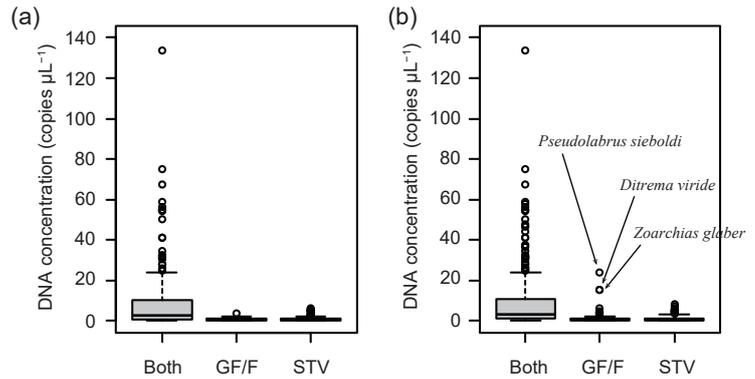
表—3.4 フィルター間と層間の種数の差. GF/FとSTVは、それぞれ、デブスフィルターとメンブレンフィルターを意味している.

カテゴリ	層間比較 (底層-表層)		フィルター間比較 (STV-GF/F)	
	GF/F	STV	表層	底層
全種	4.5 ± 4.7(*)	-8.7 ± 5.9(**)	7.1 ± 6.9(*)	-6.1 ± 9.3
淡水魚・汽水魚	0.1 ± 0.9	-0.4 ± 1.2	0.9 ± 0.6(**)	0.4 ± 1.4
底生魚	3.5 ± 3.3(*)	-5.6 ± 3.6(**)	4.4 ± 4.3(*)	-4.7 ± 6.2
岩礁魚	0.9 ± 1.8	0.1 ± 1.4	0.4 ± 1.6	-0.4 ± 1.7(*)
遊泳魚	0.3 ± 2.1	-1.8 ± 2.3(*)	1.4 ± 1.4(*)	-0.7 ± 2.4

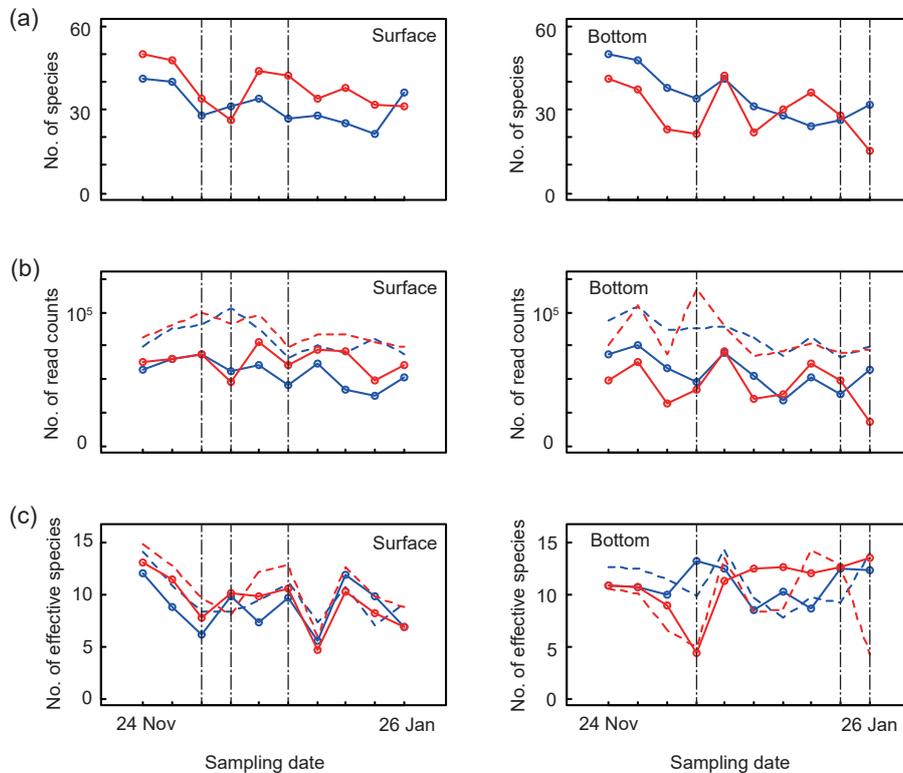
Wilcoxon rank sum test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

3.3). Bray-Curtis 指数と Sørensen 指数のいずれの db-RDA の二次元プロットでも表層と底層の重心は、座標の中心付近に分布しており、時間変動に比べて目立たない (図—3.2). 一方, Bray-Curtis 指数では時間と層の交互作用も有意で、かつ、その r^2 は 0.19 であり種組成変動を説明する寄与率は大きい (表—3.3). これらの結果は、層の違いによる種組成の違いは一意的ではなく、相対リード数に基づく種組成の時間変化のパターンが層間で異なっていたことを意味している.

種数は、全種と底生魚、及びメンブレンフィルター-遊泳魚において、層間で差があった (表—3.4). 全種と底生魚の層間の種数の差の傾向は、フィルター間で逆であった.



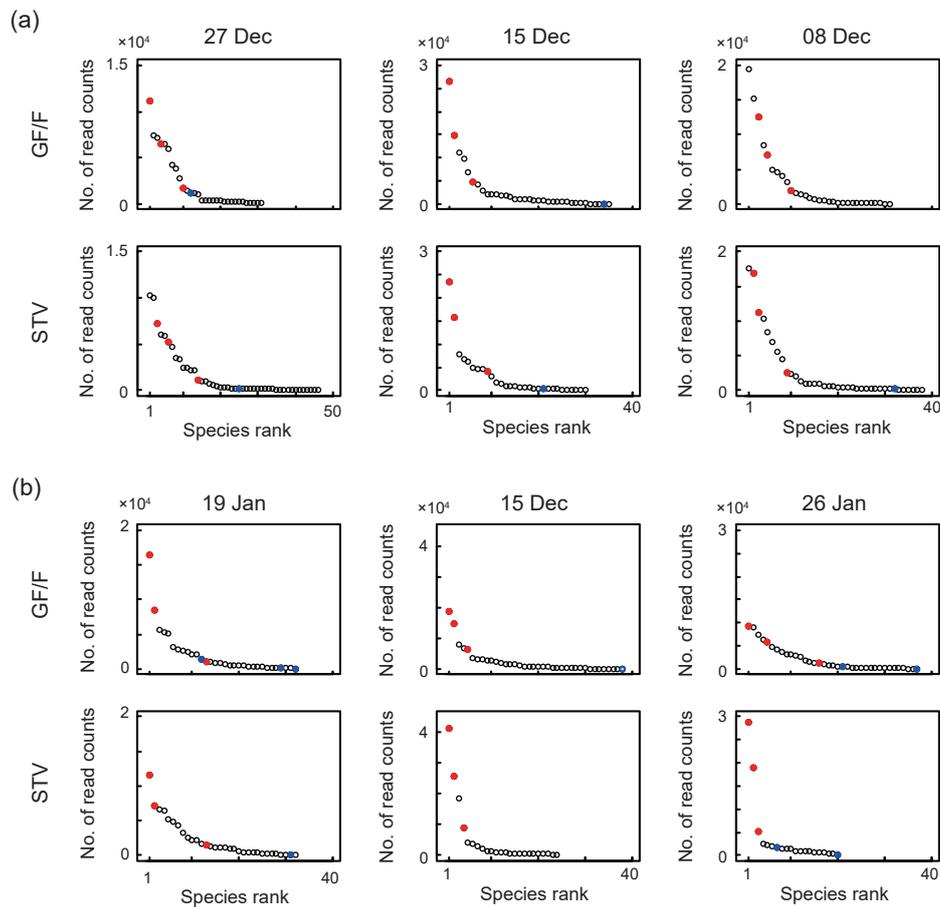
図—3.3 検出された種の DNA 濃度のフィルター間比較. (a) 表層と (b) 底層のそれぞれにおいて、いずれのフィルター (Both)、デブスフィルターのみ (GF/F)、メンブレンフィルターのみ (STV) で検出された種の DNA 濃度を示している. パネル b で示した *Pseudolabrus sieboldi* (ホシササノハベラ), *Ditrema viride* (アオタナゴ), *Zoarchias glaber* (トビイトギンボ) は、1月26日に比較的高いにもかかわらずデブスフィルターのみで検出された種である.



図—3.4 網羅的解析による (a) 種数, (b) リード数, (c) 有効種数 ($2D$) の時系列. 青色と赤色は、それぞれ、デブスフィルターとメンブレンフィルターの結果を示している. 実線は、サンプル中の MiFish-U の種のみを対象とした有効種数 ($2D_{sMFS}$) を示し、点線は、内部標準の種, MiFish-Ev2 の種, MiFish-U2 の種も含む全リード数とそれに基づく有効種数 ($2D_{all}$) を示している. 破線は、図—3.5 において種の優占度ランク曲線を詳細に見た日である.

表—3.5 種数の一般化線形モデル (GLM) の要約。ステップワイズ法により選択されたモデルと比較検討のモデルの説明変数と AIC を示している。説明変数の数字は、効果量 (平均±標準誤差) を表している。目的変数である種数はサンプル中の MiFish-U 種のみを対象としており、 R_{sMFU} 及び ${}^2D_{sMFU}$ は、それぞれ、サンプル中の MiFish-U 種の全リード数と有効種数である。 R_{all} と ${}^2D_{all}$ は、それぞれ、全ての種を対象とした全リード数と有効種数を示している。

	R_{all}	R_{sMFU}	${}^2D_{all}$	${}^2D_{sMFU}$	Filter	Layer	AIC	ΔAIC	VIF
Selected model		0.143 ± 0.035	0.121 ± 0.034				240.4		1.38
Model1		0.143 ± 0.035	0.121 ± 0.034		0.017 ± 0.055		242.3	1.9	1.39
Model2		0.143 ± 0.037	0.121 ± 0.035			0.002 ± 0.058	242.4	2.0	1.55
Model3		0.227 ± 0.030		0.095 ± 0.029			242.8	2.5	1.04
Model4	0.104 ± 0.029			0.077 ± 0.030			290.1	49.8	1.11
Null model							301.8	61.4	
Full model	0.015 ± 0.041	0.142 ± 0.068	0.109 ± 0.068	0.022 ± 0.056	0.012 ± 0.056	0.017 ± 0.064	247.9	7.5	5.68



図—3.5 種の優占度ランク曲線。(a) 表層及び (b) 底層のデプスフィルターとメンブレンフィルターにおける種の優占度ランク曲線を示している。赤色と青色は、それぞれ、内部標準の種と MiFish-Ev2 もしくは MiFish-U2 の種の結果を示しており、それ以外はすべてサンプル中の MiFish-U の種の結果である。それぞれのパネルにおいて、種の優占度ランク曲線にフィルター間で比較差的差がない日を左側、大きく異なる日を右側に示している。

(2) 検出される種と種数のフィルター間比較

DNA 濃度が高い種はいずれのフィルターでも検出された(図—3.3)。一方、どちらかのフィルターでしか検出されていない種の DNA 濃度は、高くても 20 copies μL^{-1} 程度であった。底層のデプスフィルターでは、DNA 濃度がやや高い種が見られているが、これらはすべて 1 月 26 日の検出結果であった。

全種数は表層ではメンブレンフィルターで有意に多く、淡水魚・汽水魚、底生魚、遊泳魚においても同様の傾向が見られた(表—3.4)。しかし、種組成の 20% 近くを占める岩礁魚の種数はフィルター間で有意な差はなかった。底層の種数は、底生魚を除き、フィルター間で有意な差はなかった。底生魚の種数は、表層のパターンとは逆にデプスフィルターで有意に多かった。

(3) 検出種数を説明する変数

検出された MiFish-Ev2 の種は、アカエイ (*Hemitrygon akajei*)、ホシザメ (*Mustelus manazo*)、トビエイ (*Myliobatis tobijei*) であり、MiFish-U2 の種はアサヒアナハゼ (*Pseudoblennius cottoides*) 及びアヤアナハゼ (*Pseudoblennius marmoratus*) であった。これら以外はすべて MiFish-U の種であった。

サンプル中の MiFish-U 種の種数は時間的に変動していた(図—3.4a)。底層の 1 月 26 日におけるメンブレンフィルターの種数は、同日のデプスフィルターと比べて低かった。この日は、デプスフィルターで比較的高い濃度であったにもかかわらず、メンブレンフィルターで検出されなかった 3 種がいた日である(図—3.3)。全ての種を含む全リード数は、概ね 10 万リードを上限として変動し、サンプル中の MiFish-U の種の全リード数は時間的に変動していた(図—3.4b)。

サンプル中の MiFish-U の種の有効種数 (${}^2D_{\text{sMFU}}$) は、表層ではフィルター間で同じ変動をしていた(図—3.4c)。しかし、底層でのフィルター間のばらつきは大きく、それは表層よりも有意に大ききばらつきであった (F test; $F_9 = 5.34, p < 0.05$)。メンブレンフィルターの ${}^2D_{\text{all}}$ が、 ${}^2D_{\text{sMFU}}$ から小さくなっている時があった。

種数の GLM は、サンプル中の MiFish-U の種の全リード数 (R_{sMFU}) と全ての種に基づく有効種数 (${}^2D_{\text{all}}$) を説明変数とするモデルが選択された(表—3.5)。このモデルにフィルターの違いを説明変数として追加したモデル (model1) と層の違いを説明変数として追加したモデル (model2) のそれぞれの効果量は、 R_{sMFU} と ${}^2D_{\text{all}}$ の効果量に比べて 1/10 程度以下であった。また、これらのモデルの ΔAIC は 2 に近く、変数が 1 つ増えることによって加えられるペナルティ (付録 A) とほぼ一致している。このことから、種数はフィルター間と層間で違いがあったものの(表—3.4)、これらが直接影響したわけではないことを意味している。

本章で選択されたモデルが含む有効種数は、第 2 章の最

良モデルが含む有効種数 (${}^2D_{\text{sMFU}}$) と異なった。しかし、本章で選択されたモデルが含む有効種数 (${}^2D_{\text{all}}$) をその有効種数 (${}^2D_{\text{sMFU}}$) に置き換えた model3 の ΔAIC は 2.46 であり(表—3.5)、 ${}^2D_{\text{sMFU}}$ もある程度の説明力はある。一方、サンプル中の MiFish-U のみの全リード数 (R_{sMFU}) を全ての種の全リード数 (R_{all}) に置き換えた model4 の ΔAIC は 10 を超えており、この説明力はほとんどないと判断できる⁴⁸⁾。

(4) サンプル中の MiFish-U の種の優占度ランク曲線

表層と底層のそれぞれから、全ての種のリード数に基づく有効種数 (${}^2D_{\text{all}}$) が特徴的な 3 日分を選定して、2 つのフィルターにおける種の優占度ランク曲線を示す(図—3.5)。MiFish-Ev2 種及び MiFish-U2 種のリード数は非常に小さく、全リード数に対してあまり寄与していない。

表層の種の優占度ランク曲線は、フィルターの違いによる極端な差はない。また、底層における 1 月 19 日の種の優占度ランク曲線もフィルターの違いによる極端な差は見られない。しかし、12 月 15 日と 1 月 26 日における底層のメンブレンフィルターでは、内部標準として用いた種のリード数が極端に大きくなり、これが全リード数に対して大きく占めていた。これらの日は、全ての種のリード数に基づく有効種数 (${}^2D_{\text{all}}$) と種数が、デプスフィルターに対してメンブレンフィルターで小さくなっていた日である(図—3.4)。

3.4 考察とまとめ

沿岸域での網羅的解析において、2 つのフィルターによる過がその結果に与える影響を検証した結果、1) DNA 濃度が高い種はいずれのフィルターでも検出され、どちらかのフィルターで検出される種の DNA 濃度は低いこと、2) 検出できる種数はフィルター間で差があるものの、表層と底層でその傾向が異なることを示した。さらに、3) 種数の変動を説明する要因として、フィルターによる直接的な効果は示されず、第 2 章の結果と同様に全リード数と有効種数が選択された。以上の結果は、フィルターの選択は、DNA 濃度が高い主要な種の検出には影響しないものの、検出される種数においては、リード数や有効種数の変化に影響を与えた可能性を示している。

いずれのフィルターでも DNA 濃度が高い種が検出された結果は、今回用いたデプスフィルターでも主要な種の DNA を捕捉するのに十分であったことを示している。このことは、環境 DNA を保持している多くの粒子の大きさが 1 μm 以上^{10,11)}と考えられているこれまでの知見を支持していると考ええていだろう。本章の結果だけでは、いずれのフィルターでも DNA 濃度が高い種をとりこぼしている可能性も否定できないが、用いた MiFish プライマーセットのカバー率は他のプライマーに比べても高く⁴⁹⁾、また、今のところ沿岸域でよく出現する種の取りこぼしは報告されていないことから、おそらく

問題はないと考えてよさそうである。

種数のフィルター間での差の傾向が表層と底層で異なっていたことは、フィルターが検出結果に与えた影響のメカニズムの解釈を難しくさせる。しかし、1) デブスフィルターによって検出された表層と底層の間での種数の傾向がこれまでの知見¹⁷⁾と一致すること、2) 表層ではメンブレンフィルターの方がデブスフィルターよりも多くの種を検出できるというこれまでの知見³⁹⁾とも一致することから、底層のメンブレンフィルターの結果が特異的であった可能性を疑わせる。底層においてデブスフィルターで比較的高い DNA 濃度の魚もメンブレンフィルターで取りこぼした 1 月 26 日は、その影響が強く現れたのかもしれない。

孔径が小さいフィルターでは、ろ過に時間がかかったり、目詰まりが起こることはよく知られているものの^{32),33),38)}、今回のすべてのサンプル及びフィルターで明確な目詰まりは見られなかった。メンブレンフィルターで特異な傾向が起きた理由としては、今回用いたカートリッジ式の複雑な形状が DNA の抽出効率に影響を及ぼした可能性も考えられるが⁵⁰⁾、それだけが原因であれば、表層のメンブレンフィルターでも特異な傾向が起きなければならない。すなわち、底層のサンプルをメンブレンフィルターでろ過した組み合わせが特異な傾向の原因となった可能性がある。

全リード数と有効種数を含むモデルが種数を説明するモデルとして選択されたことは、第 2 章の結果とほぼ同じであり、本章のデータでも、やはり、分析の設定と種の優占度ランク曲線が検出種数の変動要因であったと言えるであろう。この解析結果から考えると、内部標準として用いた種のリード数が極端に大きく、サンプル中の MiFish-U 種のリード数が少なくなっていたことと種数が少なくなったことは(図—3.5)、直接的な関係があったと言えそうである。内部標準はどのサンプルでも同じ濃度で添加していることから、この場合においては、サンプル中の MiFish-U 種の DNA の増幅が十分ではなかったことが可能性として考えられる。

DNA を増幅する PCR を阻害する要因は分かっていることもあるものの^{20),21)}、分かっていないことも多くある。底層で採取されるサンプルの特徴としては、一般的には底質の巻き上がりの影響を受けていることがあると言われている。今回の採取場所は、さらに、海藻の中であったことも特徴であり、これらを原因とする何かメンブレンフィルターのみならず、DNA 抽出や PCR の阻害を引き起こしたのかもしれない。しかし、今回の研究ではこれ以上の事は分からない。

表層においてメンブレンフィルターの方が多くの種を検出できた理由が、フィルターの孔径の差によるものであったとすると、0.22 μm から 0.7 μm までのサイズの粒子が 2 割程度(7.1/31.8、全種数については本文中で記述し、差については表—3.4 に示している)の種数の増加に貢献したことになる。

Miya et al. (2016)³⁹⁾ は、水族館の水槽で、本章で用いたものよりも孔径が少し大きい 0.45 μm のメンブレンフィルターと本章で用いたデブスフィルターを比較し、メンブレンフィルターで 3 倍くらい検出種数が多かったことを報告している。これは、我々の結果と比較するとかなり多い。この差は、実海域と水槽との間で、DNA が存在する形態の違いに起因したサイズの違いによって生まれたのかもしれない。同様に、久里浜湾の表層のメンブレンフィルターで種数が生活様式によって異なるパターンが見られたことは、サンプリングポイントである表層では、生活様式によって DNA を保持する粒子のサイズの違いがあった可能性を示唆する。

沿岸域では多様な起源の DNA が空間的に複雑に分布することは既に分かっている(図—1.2)。今回のサンプリングポイントは、平作川河口からおよそ 500 m ほど離れており(図—3.1a)、サンプリングポイントに到達するまでに少なくともこの距離を移動する必要があった淡水・汽水魚の DNA を含む粒子は、輸送の過程を経て、サンプリングポイントにおいては細粒化して存在していた可能性が考えられる。また、底層を起源とする底生魚の DNA は、水中に長く滞留できる小さな粒子⁴⁰⁾として存在していたのかもしれない。これに対し、岩礁魚は、鉛直方向に一樣な護岸を生活場としていることから、DNA を保持する粒子の多くが表層に存在していたため、フィルター間で差が出なかったのかもしれない。メンブレンフィルターのみが捕捉する 0.22 μm から 0.7 μm までの間で生活様式によるパターンの違いは、起源からサンプリングポイントまでの輸送による粒子の細粒化の過程とフィルターの径によって異なる生活様式の魚種を選択できる可能性を示している。

本章の研究による結論は以下の通りである：1) DNA 濃度が濃い種なら、デブスフィルターでもメンブレンフィルターでも検出できる。2) 2 つのフィルターの間で、検出される種数に 2 割程度の違いがあった。この差は、DNA を保持する粒子の形態によって異なる可能性がある。沿岸域では、3) フィルターの選択により、検出する種を生活様式によって選別できる可能性がある一方で、4) 孔径の小さなフィルターでは、PCR を阻害する要因の影響を受けやすくなる可能性がある。

4. 分析者の違いが及ぼす影響

4.1 はじめに

ろ過後の分析過程は、フィルターからの DNA 抽出、抽出した DNA の増幅 (1st PCR)、及びその増幅産物の精製と濃縮、2nd PCR、DNA 配列の読み取り、読み取り結果の確認である。それぞれの過程の中の手順については、環境 DNA 学会から出されているマニュアル^{2),3)}等を参照できる。しかし、現時点でも細部の技術の改良は重ねられており、分

析業者によっては、知見を収集して独自のノウハウを構築している。このように、必ずしも手順が統一されているとは言えない中で、事業を統括する技術者は、分析者の違いが分析結果のクオリティにどのように作用し、調査の目的が要求するクオリティに収まっているかどうか把握した上で、分析者を選択する必要がある。

本章では、ろ過後の分析過程について、DNA抽出とそれ以降の過程（以下、DNA増幅及び配列読み取り）に分け、それぞれの過程の中での分析者の違いが網羅的解析の結果に及ぼす影響を検証した。影響については第3章と同様に、いずれの分析者であっても主要な種を検出できるか、検出の感度が変わるか評価した。さらに、読み取り結果の確認では、分析者の違いによって種の同定に差が生じることが既に知られていることから¹⁶⁾、本章では、DNA増幅及び配列読み取りの分析者比較において、この影響についても再び検証した。

4.2 方法

(1) 調査場所

分析者の比較のためのサンプルは、種組成によって分析者の間で差が出にくかったり、もしくはその逆の可能性もあるため、2つの異なる海域で各海域の中から2つの場所を選定して、計4つの場所から採取した。1つの海域は瀬戸内海に位置する山口県周南市の沿岸であり、大島半島を挟んで生物環境は大きく異なる徳山港と笠戸湾の2つの場所を選定した（図—4.1a）。徳山港では港に隣接する晴海親水公園内の潮だまりで採水し、笠戸湾においては護岸で採水した。

もう1つの海域は東京湾の湾口に位置する神奈川県横須賀市の沿岸であり、東京湾内だけでなく外洋の環境の影響も強く受ける海域である⁵¹⁾。この中で、東京湾スケールで湾口の環境に近い場所である燈明堂と防波堤で囲まれて湾口の環境からやや隔離され、かつ、小さな河川の下流に位置する久里浜湾を採水場所として選定した（図—4.1b）。久里浜湾の採水場所は、第3章の採水場所と同じである。

(2) 調査時期及び方法

比較は、DNA抽出者の違い（図—4.1c）とDNA増幅及び配列読み取り者の違い（図—4.1d）について行い、これら以外の条件はすべて同じとした。

DNA抽出者の比較のための採水は2022年1月に実施した。上述のそれぞれの場所において、2Lの滅菌ポリエチレン瓶を用いて手袋をつけた手により表層水から5つのサンプルを採水した。採水後、現場において直ちにろ過した。1つのサンプルを2つの1Lサンプルに分け、粒子保持能が0.7µmのガラス繊維のデプスフィルター（GF/F, Whatman社製）でろ過した。すなわち、1つの場所で1Lろ過した5つのフィルターを2セット準備した。フィルターは、ろ過後に直ちに冷蔵保存し、調査終了後、それぞれのセットを異なる分析者へ

冷凍で輸送した。

DNA増幅及び配列読み取り者の比較のための採水は2021年1月に実施した。なお、この採水はDNA抽出者の比較のためのサンプリングの前年に実施している。採水方法は、DNA抽出者比較における方法と同じであり、2Lのサンプルを採水した。この時は、ろ過もDNA抽出者に依頼したため、長時間海水サンプルの状態でも保存する必要があった。このため、DNAの分解を遅らせることを目的として、採水後、直ちに塩化ベンザルコニウム0.01%溶液（オスバンS）を2mL添加した⁵²⁾。以上の操作が終了した後、直ちにサンプルを冷蔵保存し、調査終了後に分析者へ冷蔵で輸送した。

(3) DNA分析

DNA抽出者比較においては、A社とB社がフィルターを受け取った後、環境DNAマニュアル^{2),3)}の方法に従って、Proteinase Kを添加してタンパク質の分解処理を行い、Blood and Tissue Kitを用いてDNAを精製した。ただし、A社は、DNA抽出の前に、余分な水分と塩化ベンザルコニウムを取り除くことを目的とした遠心⁵³⁾を実施した。ただし、上述のとおり、DNA抽出者比較のためのサンプルには塩化ベンザルコニウムを添加していないため、この遠心の効果は余分な水分の除去に留まる。

抽出したDNAは、冷凍保存でA社に集約し、A社がDNA増幅及び配列読み取りを実施した。DNA増幅及び配列読み取りについては、後述するD社の方法に従いつつ、加えて、AmpureXPによる阻害物質除去を1st PCRの前と後に2回実施した。A社が抽出したDNA溶液については、さらに4倍に濃縮されたが、B社が抽出したDNA溶液については濃縮作業は行われなかった。この相違は、著者らとA社との間の伝達ミスによるものである。

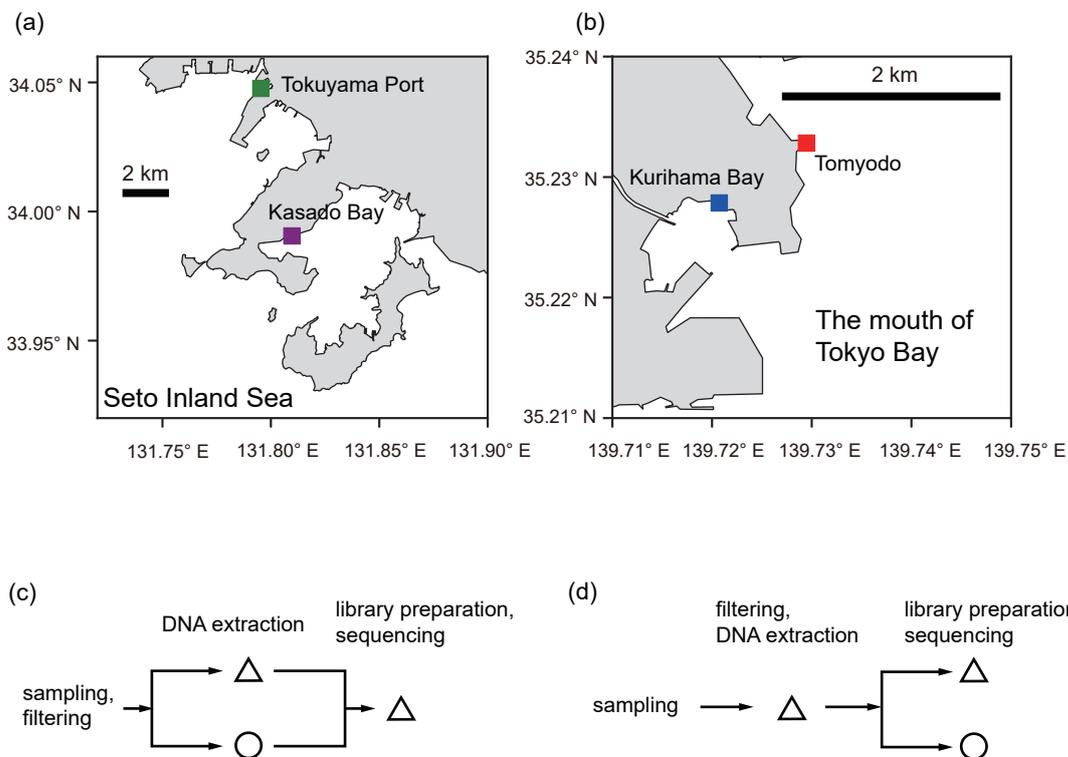
DNA増幅及び配列読み取り者の比較においては、海水サンプルを受け取ったC社が孔径0.45µmのメンブレンフィルター（Sterivex-HV, Merck Millipore社製）を用いてサンプルをろ過した後、環境DNAマニュアル^{2),3)}の方法に従ってDNAを抽出した。抽出したDNAのうち、1つはC社が冷凍保存し、もう1つはD社へ冷凍で輸送した。それぞれの者が、表—4.1に示す方法でDNA増幅及び配列読み取りを実施した。手順についてはいずれの者も環境DNAマニュアルを踏襲しているものの、試薬の組成に違いがある。なお、どちらの者でも定量MiSeq法²⁴⁾を実施したので、この手順は環境DNAマニュアルとは違う。例えば、C社の内部標準DNAの濃度が濃い（表—4.1）。

(4) データ解析

いずれの比較においても、検出した魚種の傾向をみるため、FishBase⁴³⁾と照合して、生活様式でカテゴライズした（表—3.1）。DNA分析によって出力された種リストの中には、FishBaseに一致しない種がいたため、これらの種については、

表—4.1 DNA 増幅及び配列の読み取り方法の比較表

項目	DNA 学会マニュアル ^{2),3)}	C 社 (△)	D 社 (○)
1st PCR	8 replicates	8 replicates	8 replicates
プライマー	5μM に希釈し, E-v2:U:U2= 1:2:1 で混合	10μM に希釈し, E-v2:U:U2= 1:2:1 で混合	10μM に希釈し, E-v2:U:U2= 1:2:1 で混合
試薬の組成 (標準 DNA 以外)	KAPA HiFi HS ReadyMix (6.0μL), プライマーミックス (2.8μL), ミリ Q 水 (1.2μL), DNA 溶液 (2.0μL)	KAPA HiFi HS ReadyMix (7.5μL), プライマーミックス (1.5μL), 脱イオン蒸留水 (4.0μL), DNA 溶液 (2.0μL)	KAPA HiFi HS ReadyMix (10.0μL), プライマーミックス (2.33μL), ミリ Q 水 (1.67μL), DNA 溶液 (4.0μL)
内部標準 DNA の濃度		10 copies μL ⁻¹ 50 copies μL ⁻¹ 100 copies μL ⁻¹	10 copies (2μL) ⁻¹ 50 copies (2μL) ⁻¹ 100 copies (2μL) ⁻¹
サーマルサイクラー	95 度の DNA 変性 3 分間 以下 35 サイクル ・98 度 DNA 変性 20 秒 ・65 度アニーリング 15 秒 ・72 度伸長反応 15 秒 さらに, 75 度の伸長反応 5 分間	95 度の DNA 変性 3 分間 以下 35 サイクル ・98 度 DNA 変性 20 秒 ・65 度アニーリング 15 秒 ・72 度伸長反応 15 秒 さらに, 75 度の伸長反応 5 分間	95 度の DNA 変性 3 分間 以下 35 サイクル ・98 度 DNA 変性 20 秒 ・65 度アニーリング 15 秒 ・72 度伸長反応 15 秒 さらに, 75 度の伸長反応 5 分間
その他		96 穴プレートを使用	8 連チューブを使用



図—4.1 分析者比較の場所と方法. (a) 山口県周南市から徳山港 (緑, Tokuyama Port) と笠戸湾 (紫, Kasado Bay), (b) 神奈川県横須賀市から久里浜湾 (青, Kurihama Bay) と燈明堂 (赤, Tomyodo) を選定し, サンプルを採取した. 比較する分析過程については, DNA 抽出と DNA 増幅以降 (DNA 増幅及び配列の読み取り) の2つの過程に分け, それぞれを比較するデザインとした (c 及び d).

表—4.2 DNA 増幅及び配列の読み取り比較において調整した種のリスト

Species recorded	Species changed
<i>Acentrogobius virgatus</i>	<i>Acentrogobius pflaumii</i>
<i>Carassius</i> sp. 'Ginbuna'	<i>Carassius</i> sp.
<i>Chelidonichthys cuculus</i>	<i>Chelidonichthys</i> sp.
<i>Diaphus kuroshio</i>	<i>Diaphus</i> sp.
<i>Ditrema temminckii</i>	<i>Ditrema</i> sp.
<i>Hexagrammos agrammus</i>	<i>Hexagrammos</i> sp.
<i>Lagocephalus spadiceus/Lagocephalus wheeleri</i>	<i>Lagocephalus</i> sp.
<i>Luciogobius guttatus</i>	<i>Luciogobius</i> sp.
<i>Platycephalus indicus</i>	<i>Platycephalus</i> sp. MAGOCHI
<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	<i>Pseudopleuronectes</i> / <i>Pleuronectes</i> / <i>Hippoglossoides</i>
<i>Rhinogobius brunneus</i>	<i>Rhinogobius</i> sp.
<i>Scomber japonicus</i>	<i>Scomber</i> sp.
<i>Sebastes aleutianus</i>	<i>Sebastes</i> sp.
<i>Takifugu alboplumbeus</i>	<i>Takifugu</i> sp.1
<i>Takifugu porphyreus</i>	<i>Takifugu</i> sp.2
<i>Takifugu snyderi</i>	<i>Takifugu</i> sp.3
<i>Trachurus japonicus</i>	<i>Trachurus</i> sp.
<i>Tridentiger brevispinis</i>	<i>Tridentiger</i> sp.
<i>Vinciguerria nimbaria</i>	<i>Vinciguerria</i> / <i>Woodsia</i>
<i>Amblychaeturichthys sciiustus</i>	<i>Amblychaeturichthys hexanema</i>
<i>Carassius</i> spp.	<i>Carassius</i> sp.
<i>Diaphus perspicillatus</i>	<i>Diaphus</i> sp.
<i>Dictyosoma burgeri</i> Form a	<i>Dictyosoma burgeri</i>
<i>Favonigobius gymnauchen</i> / <i>Acanthogobius lactipes</i>	<i>Favonigobius gymnauchen</i>
<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	<i>Plecoglossus altivelis</i>

生活様式に差がないと思われる種に置き換えてカテゴリ化した。

種組成の分析者間比較をするため、Bray-Curtis 指数と Sørensen 指数を算出し、これら指数の変動に対する分析者、場所、分析者と場所の交互作用の効果を PERMANOVA により検定した。有意な効果が認められた変数を用い、db-RDA を行って主要な変動を二次元で視覚化した。これらの種組成の解析により、いずれの分析者でも主要な種を検出できているか、相対リード数の低い種の検出傾向が異なるか検証した。ただし、この解析で用いる種リストは、次のとおりとした。1) DNA 抽出者比較においては、種リストを精査する者が同一であるため、その者から報告された種リストをそのまま用いて種組成を解析した。2) DNA 増幅及び配列読み取り者の比較では、まず、著者らによって、2者の同定精度の違いによって異なる名称を付されているものの同じ種と判断されたものに限定して、同じ種となるよう種リストを調整した後に種組成を解析した(表—4.2)。さらに、2者から報告された種リストのままで種組成を解析した。

種数については、1サンプル当たりの種数だけでなく、複数サンプルによる検出感度も検証した。この検証のため、サンプル数に対する期待種数の変化を内挿と外挿により求めた^{54),55)}。期待種数の95%信頼区間はブートストラップ法により求めた。

種数の変動に影響すると考えられる全リード数及び有効種数についても分析者の違いを検証した。全リード数については、全ての種を含む全リード数とサンプル中の MiFish-U 種のみ全リード数に分けた。有効種数は、サンプル中の MiFish-U 種のリード数に基づく有効種数とした。これらの平均と標準偏差を求め、等分散を仮定しないウェルチの t 検定により分析者間の差の有意性を検定した。

魚種のカテゴリ化、種組成の違いを検定する PERMANOVA、主な変動を二次元化する db-RDA は、すべて第3章と同じ方法で解析した。サンプル数の変化に対する期待種数の曲線については iNEXT3.0.0 パッケージ⁵⁶⁾の iNEXT 関数を用いた。ウェルチの t 検定は、R のデフォルトにある t.test 関数を用いて実施した。

4.3 結果

(1) 概要

DNA 抽出者比較で検出できた全種数は、場所間で最大3倍の差があり、DNA 増幅及び配列読み取り者比較で検出できた種数の場所間の差は最大で2倍であった(表—4.3)。いずれの年もいずれの場所でも、第3章と同様に、底生魚の割合が高く、岩礁魚と遊泳魚の割合は、場所の間でも調査年の間でも変動があった。淡水魚・汽水魚は、DNA 抽出者比較では久里浜における 2.0±1.0 種が最大であった一

表—4.3 比較検証に用いたサンプル中の生活様式の構成。検出された種数の平均及び標準偏差を示している。また、カッコ内の数値は、全種数に対するカテゴリの種数の割合を示している。DNA 抽出者比較では A 社の結果、DNA 増幅及び配列読み取り者比較については C 社の結果を示している。DNA 増幅及び配列読み取り者比較の結果は、異なる種リストで解析しているため、図—4.3 の結果と一致するとは限らない。

カテゴリ	DNA 抽出者比較 (2022 年 1 月)				DNA 増幅及び配列読み取り者比較 (2021 年 1 月)			
	徳山港	笠戸湾	燈明堂	久里浜湾	徳山港	笠戸湾	燈明堂	久里浜湾
全種	20.8 ± 2.5	11.6 ± 2.9	25.4 ± 3.0	33.8 ± 8.1	21.4 ± 4.2	19.6 ± 4.2	30.6 ± 5.9	39.0 ± 5.3
淡水魚・汽水魚	0.8 ± 0.4 (3.8)	0.0 ± 0.0 (0.0)	1.0 ± 0.0 (3.9)	2.0 ± 1.0 (5.9)	2.4 ± 0.9 (11.2)	2.4 ± 0.9 (12.2)	2.2 ± 0.8 (7.2)	4.6 ± 1.1 (11.8)
底生魚	12.2 ± 1.3 (58.7)	6.8 ± 2.4 (58.6)	16.4 ± 2.6 (64.5)	19.4 ± 6.3 (57.4)	11.4 ± 3.2 (53.3)	11.2 ± 2.5 (57.1)	16.4 ± 3.0 (53.6)	20.4 ± 2.6 (52.3)
岩礁魚	1.2 ± 1.1 (5.8)	1.4 ± 0.9 (12.1)	5.8 ± 1.8 (22.8)	5.8 ± 1.1 (17.2)	2.0 ± 0.7 (9.3)	1.6 ± 0.9 (8.2)	4.2 ± 2.7 (13.7)	5.6 ± 1.1 (14.4)
遊泳魚	4.2 ± 1.3 (20.2)	1.6 ± 0.9 (13.8)	1.2 ± 0.8 (4.7)	2.6 ± 1.1 (7.7)	4.2 ± 0.8 (19.6)	2.2 ± 1.1 (11.2)	3.2 ± 1.8 (10.5)	5.8 ± 1.1 (14.9)

表—4.4 DNA 抽出者比較における種組成の違いの検定結果 (PERMANOVA)。場所 (location), 抽出者 (extractor), 場所と抽出者の交互作用を説明変数として考慮している。

Explanatory variables	df	Sum of squares	r ²	pseudo-F	p
Bray-Curtis index					
Location	3	7.58	0.61	19.0	<0.001
Extractor	1	0.33	0.03	2.51	<0.05
Location×extractor	3	0.34	0.03	0.86	0.603
Residual	32	4.26	0.34		
Total	39	12.52			
Sørensen index (dissimilarity)					
Location	3	3.80	0.39	9.24	<0.001
Extractor	1	0.74	0.08	5.37	<0.001
Location×extractor	3	0.73	0.08	1.77	<0.05
Residual	32	4.39	0.45		
Total	39	9.66			

表—4.5 DNA 増幅及び配列読み取り者比較における種組成の違いの検定結果 (PERMANOVA)。種の同定精度の調整を行った場合。説明変数の説明は表—4.4 と同じ。

Explanatory variables	df	Sum of squares	r ²	pseudo-F	p
Bray-Curtis index					
Location	3	6.70	0.73	37.0	<0.001
Extractor	1	0.32	0.04	5.48	<0.01
Location×extractor	3	0.25	0.03	1.40	0.174
Residual	32	1.88	0.21		
Total	39	9.14			
Sørensen index (dissimilarity)					
Location	3	3.45	0.56	20.2	<0.001
Extractor	1	0.75	0.12	13.2	<0.001
Location×extractor	3	0.15	0.02	0.86	0.630
Residual	32	1.83	0.30		
Total	39	6.17			

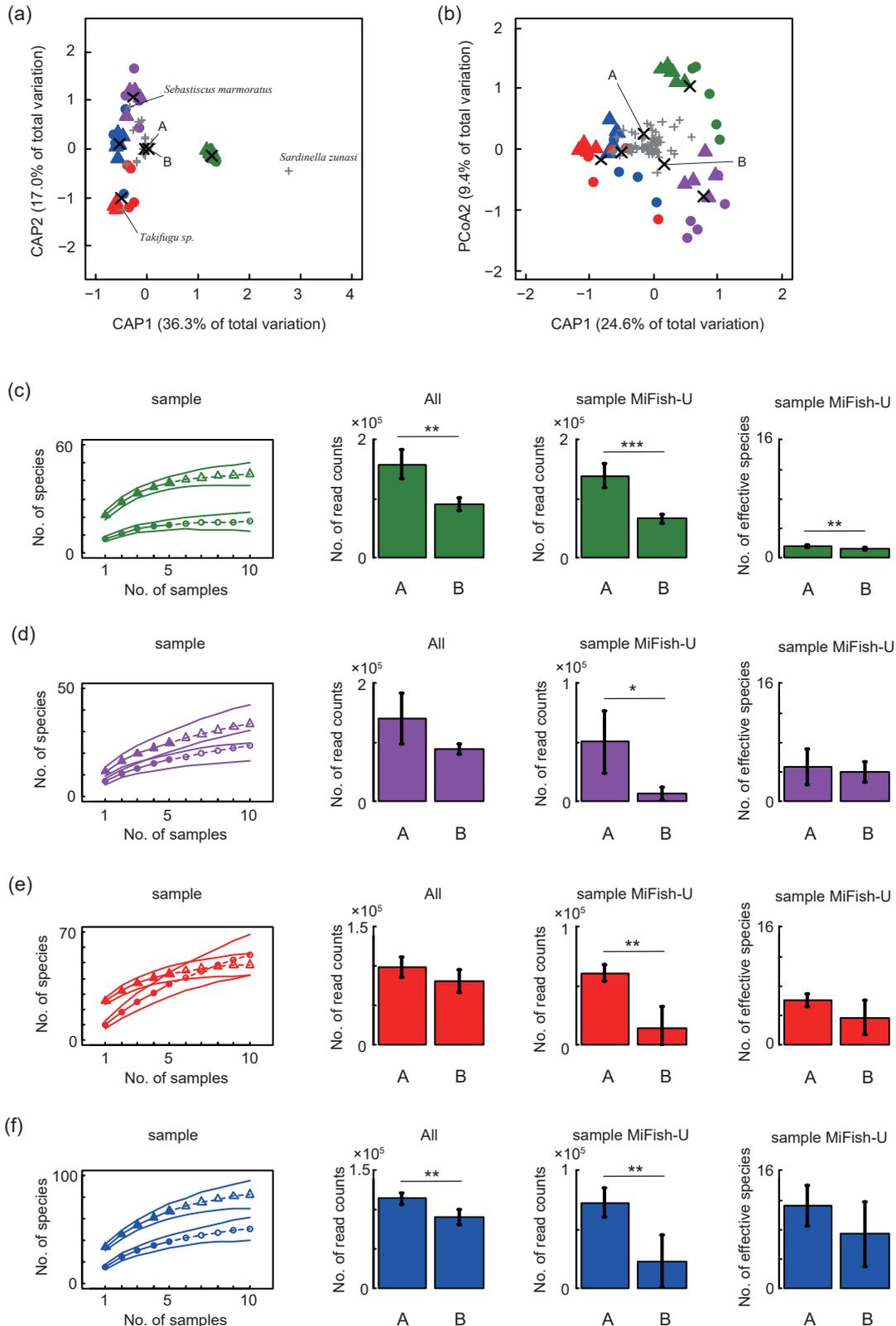
方で、DNA 増幅及び配列読み取り者比較では、少なくとも燈明堂で 2.2±0.8 種が検出されており、後者の方が全種数に対する割合も高かった。第 3 章の結果から、フィルターの影響が反映されているのかもしれないが、ここではこれ以上の検証はしない。

(2) DNA 抽出者の比較

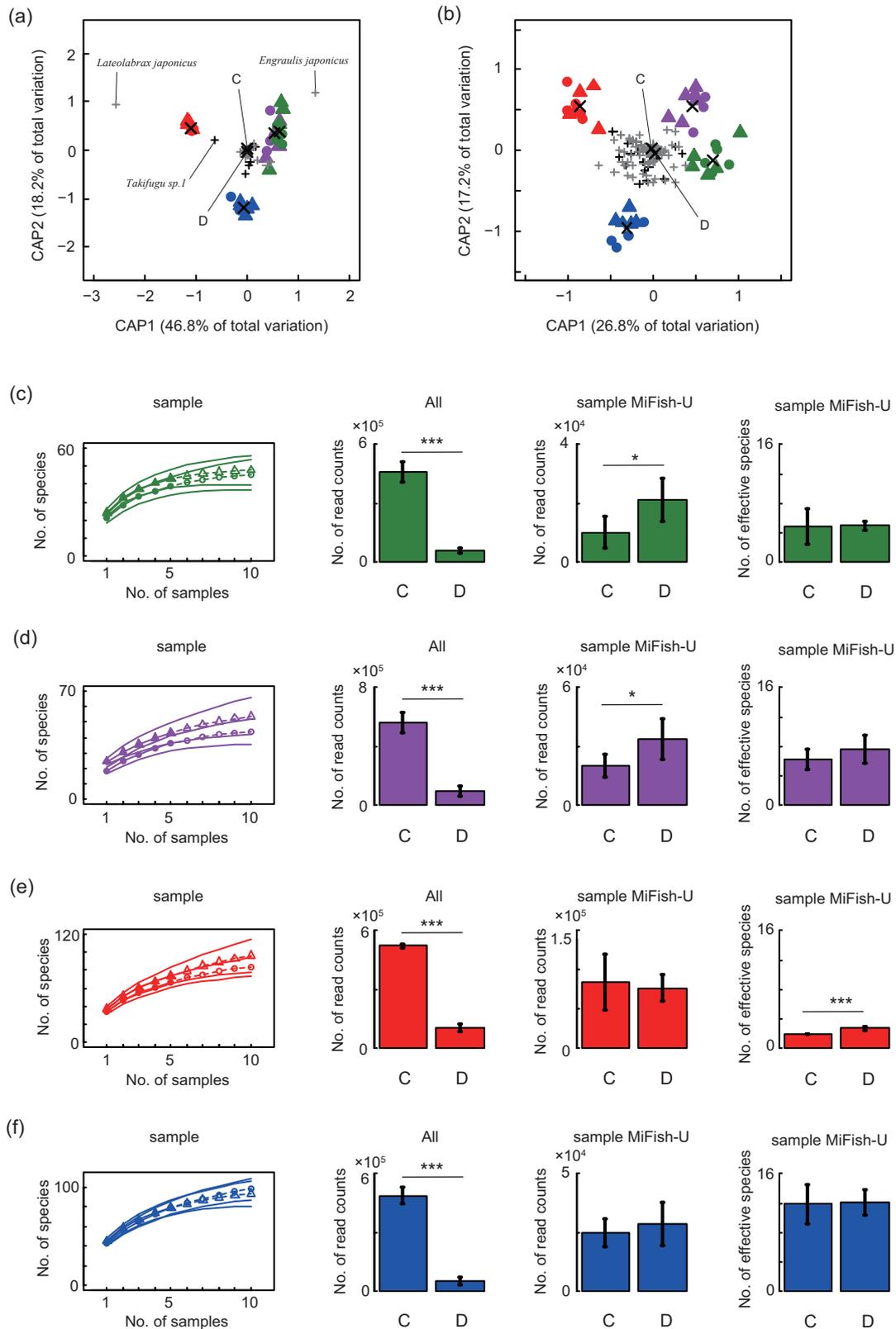
種組成は、Bray-Curtis 指数と Sørensen 指数のいずれにおいても、場所間で有意な変動があった (表—4.4)。場所の効果の r² は、Bray-Curtis 指数では 0.61 であるのに対して Sørensen 指数では 0.39 程度であり、相対リード数が高い主要な種の方が場所差を特徴づけていた。Bray-Curtis 指数の db-RDA の二次元プロットでは、サツパ (*Sardinella zunasi*) が横軸方向の片側にプロットされており、これが徳山港と他の 3 つの場所の違いを大きく特徴づけた種である (図—4.2a)。

また、縦軸方向には複数の種が分布しており、これらによって他の 3 つの場所が特徴づけられている。

いずれの指数においても、種組成は DNA 抽出者間で有意な変動があったが、その r² は 0.03 及び 0.08 と小さかった (表—4.4)。Bray-Curtis 指数における説明力は場所間に比べると 20 倍小さく、Bray-Curtis 指数の db-RDA の二次元プロットでは、場所の違いに比べて DNA 抽出者の違いでの差は目立たない (図—4.2a)。一方、Sørensen 指数における抽出者の説明力は、場所に比べて 4 倍程度であり、db-RDA の二次元プロットでは、DNA 抽出者の違いが Bray-Curtis 指数に比べて相対的に大きくなっている (図—4.2b)。Sørensen 指数では、さらに、場所と DNA 抽出者の交互作用が種組成の有意な変動要因があったが (表—4.4)、この結果は Sørensen 指数における DNA 抽出者の影響の程度が場所に



図—4.2 DNA抽出者の違いによる網羅的解析結果の比較。A社(▲)とB社(●)によるDNA抽出の違いによる結果を比較している。パネルaとbは、それぞれ、検出された種組成のBray-Curtis指数とSørensen指数を対象とした距離に基づく冗長性分析(db-RDA)による二次元プロットを示している。十字(✦)は魚のプロットを表し、×印はそれぞれの場所とそれぞれのDNA抽出者の重心を表している。パネルc, d, e及びfは、徳山港、笠戸湾、久里浜湾及び燈明堂の結果であり、左からサンプルベースの種数、全ての種を含む全リード数、サンプル中のMiFish-U種の全リード数、サンプル中のMiFish-U種のリード数に基づく有効種数を示している。サンプルベースの種数については、中塗が内挿、中抜きは外挿の結果を示している。棒グラフの比較は、ウェルチのt検定による検定結果を示している(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。



図—4.3 DNA 増幅及び配列の読み取り者の違いによる網羅的解析結果の比較. C 社 (▲) と D 社 (●) による DNA 抽出の違いによる結果を比較している. 詳細は図—4.2 と同じである. ただし, 黒色と灰色の十字 (+) は, それぞれ, 同定精度の調整をした種としなかった種を表している.

よって違いがあったことを意味している。さらに、Sørensen 指数を対象とした db-RDA では、B 社のプロットのばらつきが目立つ (図—4.2b)。このことから、相対リード数が低い種は、A 社ではサンプル間で同質性が強かったのに対し、B 社ではばらつきが強かったものと解釈される (2.4)。

種数は、DNA 抽出者の間に明らかな差があり、その差はすべての場所でサンプル数が小さいほど顕著であった (図—4.2c から f まで)。その差は、徳山港と久里浜湾では全サンプル数の下でも明確な差があった。笠戸湾と燈明堂では、サンプル数が 1 の場合に種数に明確な差があったものの、サンプル数が大きくなるに従って、その差は不明瞭になった。

サンプル中の MiFish-U 種のみ全リード数は、すべての場所において、A 社で有意に高く、倍程度以上の差があった。さらに、徳山港と久里浜湾では、全ての種を含む全リード数も A 社で有意に高かった。有効種数は、サツパによって強く特徴づけられた徳山港で他の場所に比べて小さくなっていった。有効種数の場所間の差は、徳山港のみで有意であったものの、他の場所では有意ではなかった。

(3) DNA 増幅及び配列読み取り者の比較

種組成は、Bray-Curtis 指数と Sørensen 指数のいずれにおいても、場所間に有意な変動があった (表—4.5)。Bray-Curtis 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットでは、特定の種 (スズキ, *Lateolabrax japonicus*) が横軸の片側にプロットされ、燈明堂と他の3つの場所との違いを特徴づけていた (図—4.3a)。縦軸方向では、瀬戸内海の2つの場所の方向にカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) が分布し、久里浜湾は瀬戸内海に対して反対方向に分布していた。

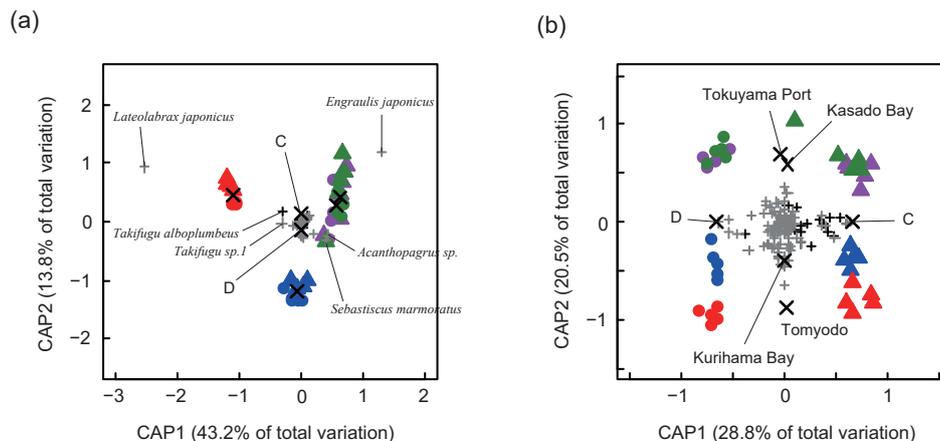
DNA 増幅及び配列読み取り者の間の種組成の変動は、いずれの指数においても有意であった (表—4.5)。Bray-Curtis 指数の r^2 は 0.04 と小さく、db-RDA の二次元プロットでも

表—4.6 DNA 増幅及び配列読み取り者比較における種組成の違いの検定結果 (PERMANOVA)。種の同定精度の調整を行わなかった場合。説明変数の説明は表—4.4 と同じ。

Explanatory variables	df	Sum of squares	r^2	pseudo-F	p
Bray-Curtis index					
Location	3	6.54	0.67	37.1	<0.001
Extractor	1	0.98	0.10	16.6	<0.001
Location×extractor	3	0.41	0.04	2.30	<0.05
Residual	32	1.88	0.19		
Total	39	9.80			
Sørensen index (dissimilarity)					
Location	3	3.33	0.42	19.2	<0.001
Extractor	1	2.45	0.31	42.5	<0.001
Location×extractor	3	0.26	0.03	1.52	0.09
Residual	32	1.85	0.23		
Total	39	7.89			

DNA 増幅及び配列読み取り者の重心は座標の中心にあった (図—4.3a)。Sørensen 指数の db-RDA の二次元プロットでもその差は小さいものであったが (図—4.3b), r^2 (=0.12) は Bray-Curtis 指数や DNA 抽出者の効果に比べて大きかった。場所と分析者の交互作用は DNA 抽出者比較では有意であった、この比較では有意ではなかった (表—4.5)。

種数の曲線は、すべての場所において、DNA 増幅及び配列読み取り者の間でほぼ一致していた (図—4.3c から f まで)。また、全ての種を含む全リード数は、すべての場所で C 社が有意に高かった。サンプル中の MiFish-U 種のみ全リード数は、徳山港と笠戸湾では D 社の方が有意に高かったものの、燈明堂と久里浜湾では有意な差はなかった。有効種数は、スズキによって強く特徴づけられた燈明堂で他の場所に比べて小さかった。また、有効種数の差は、燈明堂



図—4.4 DNA 増幅及び配列読み取り者の違いの間の同定精度の調整を行わない種組成の距離に基づく冗長性分析 (db-RDA) による二次元プロット。(a) Bray-Curtis 指数と (b) Sørensen 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットを示している。C 社 (▲) と D 社 (●) による DNA 抽出の違いによる結果を比較している。ただし、黒色と灰色の十字 (+) は、それぞれ、図—4.3 において同定精度の調整をした種としなかった種を表している。

のみで有意であったものの、他の場所では有意ではなかった。

(4) 同定精度の違いの影響

同定精度の差の調整を行った Bray-Curtis 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットに対して (図—4.3a), 調整を行わない分析者から報告された種リストに基づく Bray-Curtis 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットの構造に大きな変化はなかった (図—4.4a). これに対して, 同定精度の調整前の Sorensen 指数を対象とした db-RDA の二次元プロットは (図—4.4b), 同定精度の差を調整した場合 (図—4.3b) と比べると大きく変化した. 特に, 横軸方向に分析者の違いが明確に現れた点が大きな変化であり, 分析者の違いによる P^2 も調整した場合に比べ (表—4.5), 調整しない場合では大きい (表—4.6).

また, 同定精度の調整をした種だけでなく, しなかった種も横軸方向に広く分布しており (図—4.4b), 表—4.2 の調整が不十分であったことを示している. 実際, 上述のとおり, 同定精度の差を調整した場合において, 種組成に対する分析者の効果は比較的大きいものであり, その効果は場所に依存しない (場所と分析者の交互作用がない) ものであった (表—4.5). すなわち, DNA 増幅及び配列読み取り者比較では, 検出種の差が場所に係わらない特定の種への依存があったことが示されている.

これらの結果は, 配列読み取りの技術者の違いは同定精度に影響することを改めて示している. また, 事後解析で同定精度を調整することは, 可能であるものの容易ではないことを示している.

4.4 考察とまとめ

網羅的解析の分析者について, DNA 抽出者と DNA 増幅及び配列読み取り者の2つの過程に分け, それぞれの過程における分析者の違いが結果に及ぼす影響を検証した. この結果, いずれの過程の分析者が違っても, 場所を特徴づける種は検出された. しかし, DNA 抽出者が違えば, 検出できる種数に差があったこと, DNA 増幅及び配列読み取り者が違った場合, 種数の差はなかったものの同定精度に差があり, その影響の修正は容易ではなかったことを示した. これらの結果は, 分析者の違いは網羅的解析の結果に差をもたらす可能性があることを示している.

いずれの過程の分析者が違っても場所を特徴づける種を検出できたことは, 網羅的解析を依頼する上で一先ず安心できる点と言える. しかし, 同定精度の面では細川ら (2020) ¹⁶⁾ の懸念が再確認され, その修正は容易なものではなかった. 本章で用いた MiFish プライマーでは, 解析領域の塩基配列の変動が小さいマグロ属 (*Thunnus*) とウナギ属 (*Anguilla*), いくつかのサケ類に関しては種レベルまでの解像度が低く,

同様に, 種間でミトコンドリア DNA の違いが極端に小さいメバル属 (*Sebastes*) やトラフグ属 (*Takifugu*) も解像度が低いことは分かっている ⁴²⁾. 他にも種の解像度が低い分類もいくつか存在したり, また, 出力された結果を最新の学名に修正する必要も生じたりすることから, 同定においては, 読み取り結果の確認の中で人為的な操作が入りやすい. これらのことが, 同定精度に差が生じやすくなる理由である.

メバル属やトラフグ属は, 沿岸域でよく検出される魚種であり, 同定精度の影響を必ず受けると言っていいていであろう. 本論文の比較では, 主要な種の同定精度に差がなかったものの, 別の場所や別の季節においては, この影響がモニタリング評価等において致命的な誤りを誘導する可能性は十分に考えられる. 環境 DNA の網羅的解析の実用化へあたっては, 複数年にわたるモニタリングの可能性も視野にいれなければならない. 複数の分析者が請け負う可能性を考えれば, この影響は重要な課題となりそうである.

DNA 抽出者の違いで検出された種数だけでなく, サンプル中の MiFish-U 種の全リード数も A 社の方が高かったことは, 分析の設定の差が検出種数の差をもたらした可能性を示している (第 2 章参照). しかし, 分析の設定は, DNA 増幅及び配列読み取りを担当した A 社の一者によって実施されたものであり, 何故, 抽出者の違いがこれらの差を生じさせたのか疑問が残る.

いずれの抽出者も環境 DNA マニュアルに則った手順を実行していたが, A 社が抽出した DNA 溶液のみ 4 倍に濃縮されていた. この違いがサンプル中の MiFish-U 種のみ全リード数に差を生じさせる要因となっていたとすれば, 濃縮作業の差が検出される種数に差を生じさせる直接的な原因であったと言えるであろう. つまり, 今回の比較で生じた種数の差は, DNA 抽出技術の技量の問題ではなく, DNA 抽出者から DNA 増幅及び配列読み取り者への指示の伝達が正しく行われていなかったことの問題と言える.

DNA 増幅及び配列読み取り者の比較において, サンプル中の MiFish-U 種の全リード数が分析者間で差がない, もしくは全リード数ほどの差がなかったにもかかわらず, C 社の全リード数が極端に大きかったことは, 内部標準 DNA の濃度が濃かったためであろう (表—4.1). この差は, 定量 MiSeq 法の技術がまだ標準化されていないために生じたものと考えられる. もし, サンプル中の MiFish-U 種の全リード数が分析者間で大きな差があれば, 検出種数にも差が生まれていた可能性は十分に考えられる.

本章の結論は以下の通りである: 1) DNA 抽出者が違っても, DNA 増幅及び配列読み取り者が違っても, 場所を特徴づける種は検出できる. 2) DNA 抽出者が違った場合, 検出される種数に差はあったものの, これは次の分析過程を請け負う者へのサンプル情報の伝達が不足していた可能性が

表—5.1 フィルターと分析者の選択に関する指針. 分析者の選択に関しては、マニュアル等を正しく再現できる技量を有していることを前提としている。

項目 (調査目的)	指 針
主要な魚種 (DNA 濃度が相対的に濃い魚種) の検出	<ul style="list-style-type: none"> 孔径が 1 μm 以下のフィルターであれば、いずれでも差は出ない。ただし、分析阻害が起これば検出漏れする可能性がある。 分析者 (技術者) の技量に依存した種の同定精度の差に注意しなければならない。
種数 (検出感度)	<ul style="list-style-type: none"> 孔径が小さなフィルターは、多くの種を検出できるが、デメリットも増す。検出種数が不確かなことも踏まえて、種数を評価値とする事の原因を明確にし、適切に選択する必要がある。 分析者を指定する明確な根拠はない。
特定の魚種の検出	<ul style="list-style-type: none"> 孔径が大きなフィルターを選ぶことで、沿岸域特有の遠方を由来とする DNA の検出 (偽陽性) を避けられる可能性がある。 分析者を指定する明確な根拠はない。

あり、DNA 抽出の技量の問題によるものとは言えない。3) DNA 増幅及び配列読み取り者が違った場合、種の同定精度に差が生じ、場合によってはこれがデータの解釈において致命的な誤りの原因となる可能性がある。また、検出される種数に差はなかったものの、安心できる結果とは言えない。

5. あとがき

5.1 本論文のまとめ

(1) 結論

本論文では、フィルターの違いと分析者の違いが沿岸域における環境 DNA の魚類網羅的解析に与える影響を評価した。この結果、以下の結論を得た：1) 粒径が 1 μm よりも小さな孔径のフィルターであれば、フィルターの孔径に関係なく、DNA 濃度の濃い種を検出できそうである。また、フィルターの孔径を小さくすることで検出できる種数を多くできるメリットがある。しかし、フィルターの孔径を小さくすれば、逆に、沿岸域特有の遠方を由来とする DNA の検出確率を高めたり、分析阻害の確率を高める可能性がある。2) 分析者の違いは、フィルターの違いと同様に、主要な種の検出に大きな影響を及ぼさない。しかし、分析者のノウハウの影響により検出種数を変動させる可能性があり、技術者の技量の差による種の同定精度の差は確実にある。

(2) フィルターと分析者の選択に関する指針

本論文によって得られた結論より、網羅的解析を応用する3つの目的に対して、表—5.1 の指針を提示することができる。

孔径が小さなフィルターを選択するメリットは、多くの種を検出できることくらいであり、調査の目的がどこまで種数を重視しているのかが選択の分かれ目となる。孔径を小さくすることでどれくらい多くの種を検出できるかについては、本論文の結果 (2割程度) と水族館の水槽の結果 (3倍程度) との間でも大きな差があり明確な事は言えない。また、網羅的解析

によって検出できる種数は、第 2 章でも示したとおり分析上の設定に依存する可能性が高く不確かである。これらの事実と、孔径が小さなフィルターでは、ろ過に時間がかかったり分析阻害の確率が高まるかもしれないデメリットを考慮した上で、目的にあった適切なフィルターを選択する必要がある。

本論文では分析過程によって分析者を分離し、それぞれの過程の分析者の違いの影響を検証したが、むしろ、この分離が、分析結果の不確実さを増し結果に影響した可能性が強く疑われた。分析過程を分離することで、専業して効率的にサンプル数を処理できたり、複数社に事業への参加機会を与えるメリットがあったりするかもしれないが、特段の事情がなければ、不確実さを抑えるためにも同じ分析者が一貫して分析する方がいいかもしれない。

5.2 今後の課題

本論文では、網羅的解析で検出される種数の全リード数及び種の優占度ランク曲線への依存の普遍性 (第 2 章)、底層におけるメンブレンフィルターでの分析阻害の可能性とそのメカニズム (第 3 章)、分析者のノウハウの具体的な効果 (第 4 章) について、疑問を残したままである。これらの疑問は、検出される種数の生態学的な意味を不確かなものにする要因でもある。種数は、多様性の基本的な概念である種の豊富さを示す指数であることから、これらの疑問は、今後、明らかにされていくことが望まれる。

公共性が高く、かつ、継続的に続ける必要がある調査やモニタリングでは、同一の分析者を選択し続けることが難しく、種の同定精度の差は必ず課題となるであろう。将来的には、本論文で用いた MiFish のプライマーセットよりも網羅性が高く、種の解像度も高いプライマーが開発されれば、種の同定精度の分析者の技量への依存度が低くなる事が期待される。しかし、MiFish のプライマーセットは、現状では、他のプライマーよりも網羅性が高く⁴⁹⁾、多くのユーザーに使われていることから

ら、この問題はしばらく続きそうである。少なくともその間の同定精度の差を取り除くためにも、標準化等による解決は課題として残るであろう。

最後に、沿岸域における魚類相の把握において網羅的解析を確かな技術とするためには、その再現性の限界を明らかにするとともに、環境 DNA が空間的に複雑に分布する中でサンプルの空間代表性について理解を深めていく必要がある。今後は、本論文で対象としたような要素技術の評価だけでなく、調査・モニタリングの目的に応じたサンプリングデザインの最適化を支援する技術開発が必要になるであろう。

(2023年2月6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からの受託研究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。環境 DNA の分析については、いであ株式会社、株式会社環境総合リサーチ、中外テクノス株式会社に請け負って頂いた。特に、株式会社環境総合リサーチの元職員である芝田直樹氏からは、網羅的解析の手順についての詳細な情報を提供して頂いた。本研究の理論的なアイデア及び解析に関して、ビッグデータ研究グループの本間翔太研究官及び百田恭輔客員研究員（公益財団法人海洋生物環境研究所研究員）から貴重な意見を頂いた。また、中川康之特別研究主幹からは、本論文の査読を通じて有益なコメントを頂いた。みなさまに対して、ここに感謝の意を表す。なお、本論文で扱ったデータは、ビッグデータ研究グループによって試験的に運用されているオープンデータプラットフォーム (<https://pari.mpat.go.jp/bdhome/>) から取得できる。

参考文献

- 1) Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS: Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conserv* 17: e00547, 2019.
- 2) 環境 DNA 学会：環境 DNA 調査・実験マニュアル, ver. 2.2, 2020.
- 3) Minamoto T, Miya M, Sado T, Seino S, Doi H, Kondoh M, Nakamura K, Takahara T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Iwasaki W, Kasai A, Masuda R, Uchii K: An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA* 3: 8–13, 2021.
- 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) 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.
- 7) 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.
- 8) Nagarajan RP, Bedwell M, Holmes AE, Sanches T, Acuña S, Baerwald M, Barnes MA, Blankenship S, Connon RE, Deiner K, Gille D, Goldberg CS, Hunter ME, Jerde CL, Luikart G, Meyer RS, Watts A, Schreier A: Environmental DNA Methods for Ecological Monitoring and Biodiversity Assessment in Estuaries. *Estuaries Coast* 45: 2254–2273, 2022.
- 9) (一財)環境 DNA 学会, 土居秀幸, 近藤倫生: 環境 DNA—生態系の真の姿を読み解く—. 共立出版, 281p, 2021.
- 10) Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM: Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol Evol* 5: 676–684, 2014.
- 11) Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Lowe WH, Schwartz MK: Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genet Resour* 7: 639–641, 2015.
- 12) 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.
- 13) Pont D, Rocle M, Valentini A, Civade R, Jean P, Maire A, Roset N, Schabuss M, Zornig H, Dejean T: Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci Rep* 8: 10361, 2018.
- 14) Schwentner M, Zahiri R, Yamamoto S, Husemann M, Kullmann B, Thiel R: eDNA as a tool for non-invasive monitoring of the fauna of a turbid, well-mixed system, the Elbe estuary in Germany. *PLoS ONE* 16: e0250452, 2021.
- 15) 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.
- 16) 細川真也, 百田恭輔, 大倉翔太, 小室隆: 環境DNAによる沿岸域魚類の網羅的な推定と多様性評価. 港湾空港技術研究所資料, No.1373, pp31, 2020. URL https://www.pari.go.jp/report_search/detail.php?id=20200806165030
 - 17) Momota K, Hosokawa S, Komuro T: Small-scale heterogeneity of fish diversity evaluated by environmental DNA analysis in eelgrass beds. *Mar Ecol Prog Ser* 688: 99–112, 2022.
 - 18) Ficetola GF, Pansu J, Bonin A, Coissac E, Giguet-Covex C, De Barba M, Gielly L, Lopes CM, Boyer F, Pompanon F, Rayé G, Taberlet P: Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Mol Ecol Resour* 15: 543–556, 2015.
 - 19) Joubert Y, Fleurence J: DNA isolation protocol for seaweeds. *Plant Mol Biol Rep* 23: 1–7, 2005.
 - 20) 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.
 - 21) Uchii K, Doi H, Okahashi T, Katano I, Yamanaka H, Sakata MK, Minamoto T: Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. *Environmental DNA* 1: 359–367, 2019.
 - 22) Jo T, Takao K, Minamoto T: Linking the state of environmental DNA to its application for biomonitoring and stock assessment: Targeting mitochondrial/nuclear genes, and different DNA fragment lengths and particle sizes. *Environmental DNA* 4: 271–283, 2022.
 - 23) 中村昇太: 次世代シーケンス技術の現状と今後 – 2020, 生物工学会誌, 第99巻, 242–245, 2021. URL https://www.jstage.jst.go.jp/article/seibutsukogaku/99/5/99_99.5_242/_pdf
 - 24) Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M: Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e23297, 2018.
 - 25) Hill MO: Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54: 427–432, 1973.
 - 26) 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, pp31, 2019. URL https://www.pari.go.jp/report_search/detail.php?id=20191205143541
 - 27) 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 β diversity: A roadmap for the practicing ecologist. *Ecol Lett* 14: 19–28, 2011.
 - 28) 土居秀幸, 岡村寛: 生物群集解析のための類似度とその応用: Rを使った類似度の算出, グラフ化, 検定. 日本生態学会誌, Vol.61, 3–20, 2011.
 - 29) Legendre P, Legendre L: *Numerical Ecology, Developments in Environmental Modelling* 24. Elsevier, 2012.
 - 30) McGill BJ, Etienne RS, Gray JS, Alonso D, Anderson MJ, Benecha HK, Dornelas M, Enquist BJ, Green JL, He F, Hurlbert AH, Magurran AE, Marquet PA, Maurer BA, Ostling A, Soykan CU, Ugland KI, White EP: Species abundance distributions: Moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. *Ecol Lett* 10: 995–1015, 2007.
 - 31) 森章: 生物多様性の多様性. 共立出版, 205p, 2018.
 - 32) Lacoursière-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L: Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Mol Ecol Resour* 16: 1401–1414, 2016.
 - 33) Minamoto T, Naka T, Moji K, Maruyama A: Techniques for the practical collection of environmental DNA: Filter selection, preservation, and extraction. *Limnology* 17: 23–32, 2016.
 - 34) Djurhuus A, Port J, Closek CJ, Yamahara KM, Romero-Maraccini O, Walz KR, Goldsmith DB, Michisaki R, Breitbart M, Boehm AB, Chavez FP: Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Front Mar Sci* 4: 314, 2017.
 - 35) Hinlo R, Gleeson D, Lintermans M, Furlan E: Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE* 12: e0179251, 2017.
 - 36) Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, Knudsen SW, Sengupta ME, Mak SST, Sigsgaard EE, Hellström M: Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods Ecol Evol* 8: 635–645, 2017.
 - 37) Majaneva M, Diserud OH, Eagle SHC, Boström E, Hajibabaei M, Ekrem T: Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci Rep* 8: 4682, 2018.
 - 38) Capo E, Spong G, Königsson H, Byström P: Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR. *Environ DNA* 2: 152–160, 2020.
 - 39) Miya M, Minamoto T, Yamanaka H, Oka SI, Sato K, Yamamoto S, Sado T, Doi H: Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *J Vis Exp* 117: e54741, 2016.
 - 40) Winterwerp JC, van Kesteren WGM: Introduction to the physics of cohesive sediment in the marine environment, *Developments in Sedimentology* 56. Elsevier, 2004.

- 41) 日比野忠史, 豊田政史, 西守男雄, 細川恭史, 鶴谷広一: 久里浜湾の流れ特性と生態系に関する研究. 港湾技術研究所報告, Vol.38, No.2, 29–62, 1999.
- 42) Miya M, Gotoh RO, Sado T: MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86: 939–970, 2020.
- 43) Froese R, Pauly D: FishBase. World Wide Web electronic publication, version (08/2022), 2022. URL www.fishbase.org
- 44) R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022. URL <https://www.R-project.org/>.
- 45) Boettiger C, Chamberlain S, Lang DT, Wainwright P, Cazelles K: R Interface to ‘FishBase,’ 2022. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/rfishbase/rfishbase.pdf>
- 46) Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista HBA, John RF, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill MO, Lahti L, McGlenn D, Ouellette MH, Cunha ER, Smith T, Stier A, Ter Braak CJF, Weedon J: Community Ecology Package, 2022. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- 47) Fox J, Weisberg S, Price B, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, Bolker B, Ellison S, Firth D, Friendly M, Gorjanc G, Heiberger R, Krivitsky P, Laboissiere R, Maechler M, Monette G, Murdoch D, Nilsson H, Ogle D, Ripley B, Short T, Venables W, Walker S, Winsemius D, Zeileis A, R-Core: Companion to Applied Regression, 2022. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/car/car.pdf>
- 48) Burnham KP, Anderson DR: Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach. Second edition. Springer, 2002.
- 49) 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.
- 50) Wong MKS, Nakao M, Hyodo S: Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Sci Rep* 10: 21531, 2020.
- 51) Hosokawa S, Okura S: Long-term observation of current at the mouth of Tokyo Bay. *Coast Eng J* 64: 648–659, 2022.
- 52) Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J, Sakurai S, Tsuji S, Motozawa H, Hongo M, Sogo Y, Kakimi N, Teramura I, Sugita M, Baba M, Kondo A: A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology* 18: 233–241, 2017.
- 53) Tsuji S, Nakao R, Saito M, Minamoto T, Akamatsu Y: Pre-centrifugation before DNA extraction mitigates extraction efficiency reduction of environmental DNA caused by the preservative solution (benzalkonium chloride) remaining in the filters. *Limnology* 23: 9–16, 2022.
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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.

付録 A 検出される種数の統計解析

(1) 概要

本論文で用いた MiFish を使った定量 MiSeq 法は、複数のプライマーを用い、かつ、サンプル以外の DNA (内部標準 DNA) も同時に分析する方法である。MiFish-U と呼ばれるプライマー以外のプライマーに反応する魚種は少ないことから、サンプル中の検出種数のほとんどは、サンプル中の MiFish-U に反応する魚種である。このことから、検出種数を支配する全リード数と種の優占度ランク曲線は、MiFish-U に反応する魚種のものに限定されそうである (図—A.1)。

本文では、網羅的解析で検出される種数 (S) は、全リード数 (R) と有効種数 (2D) の2つによって説明できるという仮説を立てた。上述のことを踏まえると、この仮説は、MiFish-U に限定した中で成り立つ。しかし、ここでは、網羅的解析の手順を考え、他の要因も含めて検討した。

(2) 方法

サンプル中の MiFish-U の種数を説明する変数として、対象とする全ての種の全リード数 (R_{all}) とそれに基づく有効種数 (${}^2D_{\text{all}}$)、それから、サンプル中の MiFish-U の種の全リード数 (R_{sMFU}) とそれに基づく有効種数 (${}^2D_{\text{sMFU}}$) を考慮した。これら4つの説明変数によるすべての組み合わせの候補モデルを構築し、モデル選択により尤もらしいモデルを探索した。

解析には一般化線形モデル (GLM) を用いた。目的変数である種数は、正の値を取る離散型の変数であるため、誤差分布としてポアソン分布を適用した。説明変数間の独立性を仮定している GLM では、説明変数間の相関による多重共線性により、説明変数の効果を正しく説明できなくなる。このことから、一般化した分散拡大係数 (VIF) ¹⁾ を用いて、説明変数間の相関をチェックした。VIF は、説明変数間の相関が全くないモデルで 1 を取り、相関が強くなるに従って大きくなる。しかし、VIF の大きさから多重共線性の有無を一概に判

断することはできず、経験に頼らざるを得ない²⁾。ここでは、著者らの経験として、VIF が 2 を超えていれば、多重共線性が疑わしいモデルとして判断することとした。

GLM の評価は、以下の式で算出される赤池情報量基準 (AIC) ³⁾ に基づいて実施した：

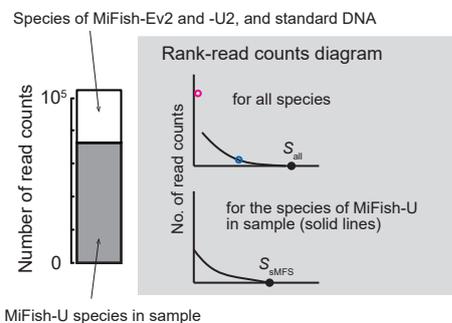
$$AIC = -2\ln L + 2K \quad (A.1)$$

L は最大尤度であり $\ln L$ は最大対数尤度である。 K は説明変数の数である。この式が示すとおり、説明変数が1つ増えると AIC は 2 だけ増える。科学哲学では、事象の説明には必要以上に多くの要因を仮定するべきではないと言われており、この加算は、説明変数を加えることによるペナルティとしても解釈できる。

モデルの選択は、AIC が低いものを選ぶ事が基本とされているが、データの構造に偏りがあったり、データ量が不十分であったりすれば、必ずしも最も AIC が低いモデルが最良とは言えないこともある。ここでは、AIC の低さだけでなく VIF も見ながら、妥当な最良モデルを選択しつつ、その AIC との差 (ΔAIC) も見ながら、他のモデルの良否の可能性も検討した。 ΔAIC は、確実ではないが重要な定量性を有しており、これが 10 以上あるモデルは情報量の観点から価値はないと判断される⁴⁾。

(3) 結果と考察

すべての変数を含んだモデル (Full model) は、AIC が最も低いモデルであったものの VIF が 3.6 と高く多重共線性が疑われることから、検討から除外した。この結果、 R_{all} ,



図—A.1 本論文で採用した網羅的解析の手法による種の優占度ランク曲線と検出種数の関係のイメージ。サンプル中の MiFish-U 種 (sMFU) の種数は、その全リード数と種の優占度ランク曲線によって支配されていると予想される。

表—A.1 検出種数を説明する一般化線形モデル (GLM) の結果。アスタリスク (*) は、モデルがその説明変数を含んでいる事を示している。それぞれのモデルには赤池情報量基準 (AIC) と最も大きな一般化分散拡大係数 (maxVIF) を示している。ベストモデル (model12) 以外については ΔAIC も示している。

	R_{all}	R_{sMFU}	${}^2D_{\text{all}}$	${}^2D_{\text{sMFU}}$	AIC	ΔAIC	maxVIF
Model12	*	*	*	*	1036.4		1.11
Model14		*	*	*	1038.4	2.0	2.14
Model9		*	*	*	1042.4	6.0	1.09
Model11	*	*	*	*	1050.4	14.0	1.55
Model13	*	*	*	*	1064.8	28.4	2.91
Model6	*	*	*	*	1076.0	39.6	1.52
Model10			*	*	1127.2	90.8	1.72
Model8		*	*	*	1134.7	98.3	1.02
Model3			*	*	1170.3	133.9	
Model7	*		*	*	1171.7	135.3	1.01
Model4			*	*	1173.8	137.4	
Model2		*			1326.6	290.2	
Model5	*	*			1328.1	291.7	1.00
Model1	*				1393.3		
Null model					1391.8	355.4	
Full model	*	*	*	*	1006.9	-29.5	3.61

R_{sMFU} , ${}^2D_{sMFU}$ を説明変数としたモデル (model12) が選択された (表—A.1).

2番目に選択されたモデル(model14)の ΔAIC は2.0であり, ${}^2D_{all}$ も R_{all} と同程度に検出種数を説明している可能性もあるが, VIF は2を超えており,多重共線性が疑わしい.このモデルに対し,3番目のモデル(model9)は, ${}^2D_{all}$ を除外しているものの ΔAIC は6.0(model14との差は4.0)であり,同等の説明力があると判断できる.このmodel9の ${}^2D_{sMFU}$ を ${}^2D_{all}$ に置き換えたモデル(model8)の ΔAIC がかなり大きいことを考えると, ${}^2D_{all}$ の説明力は低いと判断してよいであろう.そうすると,やはり,model14は, ${}^2D_{sMFU}$ と ${}^2D_{all}$ との間の多重共線性の結果,説明力が高くなったモデルであることを疑った方がよさそうである.

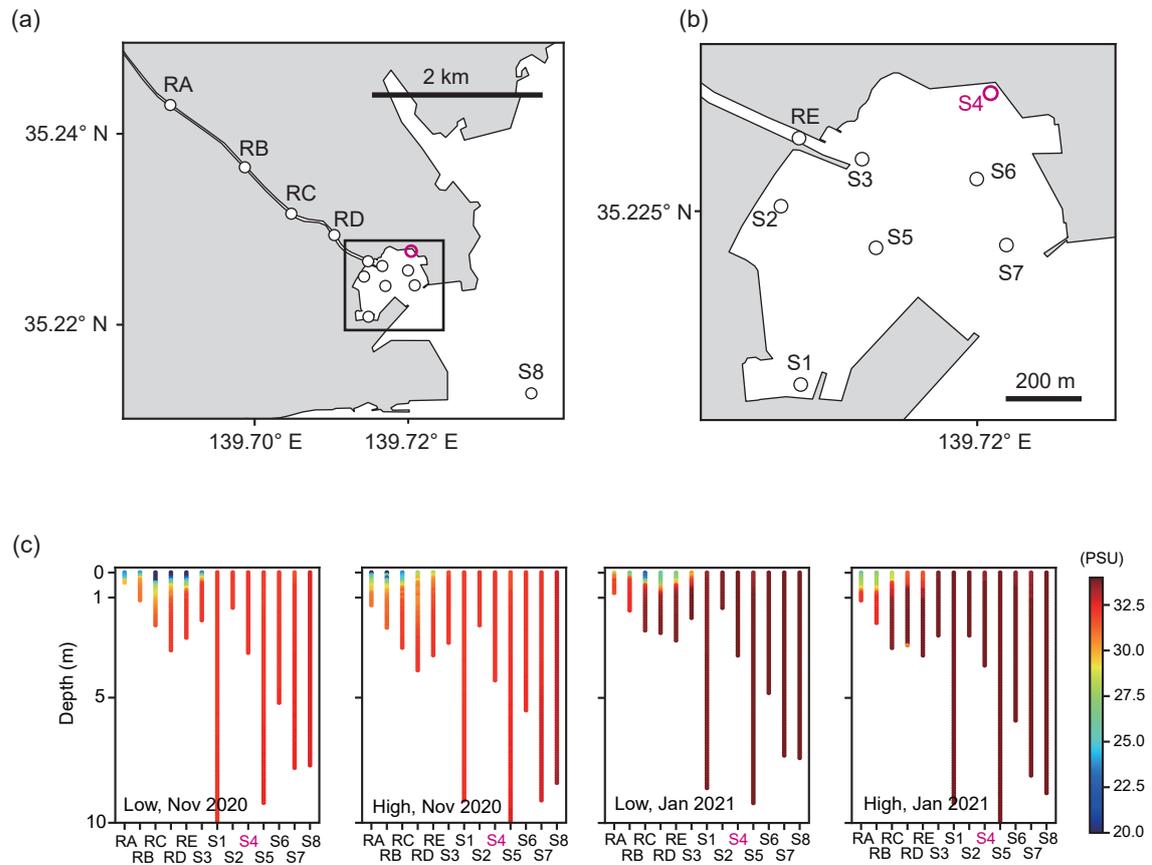
1番目のmodel12から R_{all} を除外した3番目のモデル(model9)の ΔAIC は6.0であり, R_{all} も劇的に検出種数の説明力を上げるものではない.また,何よりも,本付録の概

要で予想したメカニズムからは, R_{all} がどのように検出種数に影響しているのか定かではない.このことから,model12の説明変数が網羅的解析の検出種数を説明する普遍的な要因であると判断することは早計と言えそうである.しかし,このモデルの結果は,少なくとも本論文で扱うデータの傾向を説明していると言っているであろう.

参考文献

- 1) Fox J, Monette G: Generalized collinearity diagnostics. *J Am Stat Assoc* 87. 178–183, 1992.
- 2) Graham M: Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. *Ecology* 84. 2809–2815, 2003.
- 3) Akaike H: A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* AC-19: 716–723, 1974.
- 4) Burnham KP, Anderson DR: Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach. Second edition. Springer, 2002.

付録 B 久里浜湾における塩分の空間分布



図—B.1 久里浜湾における塩分の空間分布。(a) 久里浜湾周辺の外観と (b) 久里浜湾の詳細。2020年11月と2021年1月の満潮時と干潮時において、計13か所で塩分の鉛直分布を測定した結果を示している。塩分は、垂下式多項目水質計 (Rinko Profiler; JFEアドバンテック社) を用いて、表層から深さ0.1 mごとに測定した。塩分の単位は実用塩分 (Practical Salinity Unit : PSU) である。図中のS4は、第3章及び第4章における久里浜湾のサンプリングポイントに近い場所である。

港湾空港技術研究所資料 No.1406

2023. 3

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. <https://www.pari.go.jp/>

Copyright © (2023) 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。