

## 環境 DNA 分析による食品工場害虫調査の研究

洲 崎 雄 四 本 瑞 世 澤 谷 淳 一  
(エンジニアリング本部)外 丸 美 海 緒 方 浩 基  
(エンジニアリング本部)

## Study on food factory pest investigation using environmental DNA analysis

Yu Suzaki Mizuyo Yotsumoto Junichi Sawaya

Miu Tomaru Hiroki Ogata

## Abstract

Trap surveys that are used to monitor pests in food factories have some problems. Therefore, the authors examined whether environmental DNA analyses could be used to supplement trap surveys. We conducted an environmental DNA analysis using nine sets of universal primers for arthropods and noted that the types of pests detected differed depending on the primers used. Next, we conducted an environmental DNA survey in a food factory and noted that the pests detected differed depending on the cleanliness classification of the factory. In addition, pests that were not captured by the traps were detected using the environmental DNA analysis. Therefore, an environmental DNA analysis can complement trap surveys.

## 概 要

食品工場では一般的に、トラップ調査によって害虫の侵入・発生状況をモニタリングしている。しかしながら、トラップ調査には捕獲した虫の同定や計数に時間とコストがかかることや、トラップを設置できない場所があること、自力で移動しない発育段階の虫は捕獲できないことなどの課題がある。そこで著者らは、近年生物調査の手法として注目されている環境 DNA 分析を利用して、トラップ調査を補完することができるか検討した。最初に、節足動物用ユニバーサルプライマー9組を用いて環境 DNA 分析を行ったところ、プライマーの種類によって検出される害虫の種類が異なることが分かった。次に、稼働中の食品工場で環境 DNA 調査を実施したところ、工場の清潔度の区分によって検出される害虫が異なる傾向にあることがわかった。また、トラップで捕獲できていなかった害虫も、環境 DNA 分析で検出することができた。したがって、環境 DNA 分析によってトラップ調査を補完できると考えられる。

## 1. はじめに

近年、食品への異物混入が社会的な問題となっている<sup>1)</sup>。異物混入事故が発生すると、製品の回収や売上の低下などの経済的損失や、企業のイメージダウンなど多大な悪影響が生じる恐れがある<sup>1)</sup>。食品に混入する異物には、毛髪や獣毛などの動物性のものや、紙片や繊維などの植物性のもの、ガラスや金属片、石などの鉱物性のものなどがあるが、最も多く報告されているのが昆虫やクモなどのいわゆる「虫」である<sup>1)</sup>。虫は不衛生な印象や見た目の嫌悪感から大きな問題につながりやすいため、製造現場における防虫管理は非常に重要である<sup>1,2)</sup>。

食品工場では一般的に、ライトトラップや床置きトラップ、フェロモントラップなどを用いたトラップ調査によって害虫の侵入・発生状況をモニタリングしている<sup>1-3)</sup>。モニタリングは最も基本的な防虫管理であり、害虫の侵入・発生状況をいち早く把握したり、防虫対策の効果判定をしたりするのに非常に有用である<sup>1,3)</sup>。しかしながら、トラップ調査には、1) トラップを設置して

から害虫が捕獲されるまで一定期間（1か月程度）待つ必要がある；2) トラップで捕獲された害虫の計数と同定作業に労力がかかる<sup>4,5)</sup>；3) 埃や粉塵、結露の多い場所ではトラップの粘着力が弱まる<sup>6)</sup>；4) 卵や幼虫、蛹など移動力の弱い発育段階の虫は捕獲しにくい<sup>7)</sup> という課題がある。

そこで筆者らは、メタバーコーディング法を用いた環境DNA調査<sup>8)</sup>に着目した。環境DNAとは、水や空気、土壌などの様々な環境中に含まれる生物由来のDNAである<sup>8,9)</sup>。環境中に生息する生物は、はく離れた皮膚や体毛、粘液、排泄物、配偶子、死骸など、様々な形でDNAを放出している<sup>9)</sup>。環境DNA調査は、水や空気などの環境サンプルからDNAを取り出し、次世代シーケンサーで解析することで、その環境中に存在している調査対象の分類群を網羅的に明らかにすることができる画期的な技術である（メタバーコーディング法）。環境DNA調査は、トラップ調査や捕獲調査と異なりサンプル採取に特別な技能が必要なく、水や空気、土壌などの環境サンプルを採取すればその場所の生物相や対象種の在

不在を明らかにできることから、生物モニタリングや希少生物調査などに活用されている<sup>8,9)</sup>。食品工場内部は基本的に清潔に保たれている場所が多いが、製造機械の下や部屋の隅、天井配管の上、清潔エリアよりサニタリーレベルが低いエリアなど、埃が堆積しやすい場所が存在する<sup>1,3)</sup>。屋内に堆積した埃の中には、侵入・発生した害虫の虫体や脱皮殻、排泄物などに由来する環境DNAが含まれているため<sup>10)</sup>、著者らは、室内の埃を採取し、そこから取り出したDNAを次世代シーケンサーで分析することで、そこに存在している害虫を網羅的に明らかにする手法を考案した。この技術を用いることによって、トラップを設置できない場所や、トラップで捕獲できない発育段階（卵、蛹など）の虫が存在するかどうかを明らかにすることができると考えられる。また、次世代シーケンサーは多数のサンプルを同時に解析することができるため、トラップよりも多くの場所をピンポイントで調査することが可能になると期待される。

本稿では、環境DNA調査を用いた食品工場害虫の侵入・発生状況調査の有効性について検討するために、1) 埃サンプル中に含まれる害虫の環境DNAをPCR<sup>\*1)</sup>で増幅するために使う節足動物用ユニバーサルプライマー<sup>\*2)</sup>の性能を比較検討し、2) 某食品工場にて環境DNA調査を実施した結果について報告する。

## 2. ユニバーサルプライマーの性能評価

各種節足動物用プライマーが、それぞれどのような昆虫を検出しやすいのかや、トラップ調査と比較してどのような昆虫を検出しやすかったり、しにくかったりするのかを明らかにするために、各種ユニバーサルプライマーを使用した環境DNA分析と、トラップ調査の結果を比較した。詳細は以下の通りである。

### 2.1 方法：トラップ調査

トラップ調査を東京都清瀬市の大林組技術研究所内で実施した。実験室 A と機械室 B、機械室 C にライトトラップ（MP600; ベンハー芙蓉）と床置きトラップ（SHIMADA）をそれぞれ 1 台ずつ設置した。実験室 A は実験棟の 1 階にあり、職員通用口およびエントランスと接続されている。外部に面する壁面はガラス張りとなっており、上部には通気用の欄間が設けてある。機械室 B は実験棟の地下 1 階にあり、汚水処理設備が設置



(a) ライトトラップ

Light Trap



(b) 床置きトラップ

Sticky Trap

Photo 1 調査に用いたトラップ

Traps Used in This Survey

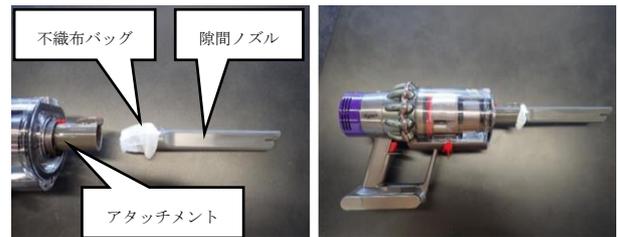


Photo 2 サンプル捕集装置

Sample Collection Device

してある。機械室 C も実験棟の地下 1 階にあり、排気用の空調施設が設置してあるため、部屋は常に負圧の状態である。また、一部の壁面の裏側には空調配管が通っており、夏季は結露のため湿度が増加することがある。トラップを 2022 年 5 月 27 日に設置し、同年 7 月 5 日に回収した。トラップに捕獲された虫を目レベルまで同定した。

### 2.2 方法：環境 DNA 調査

**2.2.1 環境 DNA サンプル採取** 埃サンプルの採取は、室内塵埃に含まれるダニアレルゲンの測定に用いる吸引採取法<sup>11)</sup>を参考にした。具体的には、HEPA フィルターと同程度の性能を有する排気フィルターを備えた掃除機の本体と隙間ノズルの間にサンプル回収用の不織布バッグを挟み、トラップを回収する際に、トラップを設置した場所の近傍の塵埃を約 1 分間吸引することで、塵埃サンプルを採取した（Photo 2）。コンタミネーションを防ぐために、サンプリングポイント毎に隙間ノズルと取り付け用のアタッチメントを交換した。

**2.2.2 メタバーコーディング解析** 今回採取した埃サンプルには土埃が多く含まれていたため、DNA抽出には土壌サンプル用のDNA抽出キットである DNA Entrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄環境）を用いた。抽出の手順はキットに付属しているプロトコルに従った。

DNAのライブラリーをTwo-step tailed PCR法を用いて作成した。目的領域の増幅とアダプター配列を付与するための1st PCRには、先行研究において節足動物の環境

\*1 PCR：PCR (Polymerase Chain Reaction, ポリメラーゼ連鎖反応)とは、熱変性によるDNA鎖の解離、プライマーとの対合、DNAポリメラーゼによる相補鎖の合成を繰り返すことによって、特定のDNA領域を増幅させる方法である。

\*2 ユニバーサルプライマー：プライマーとは、標的DNAと相補的な配列をもつ短いDNA鎖のことで、これが標的DNAと結合することによって、ポリメラーゼによる相補鎖の合成が開始される。一般的に、プライマーは対象の生物特有の配列をもとに設計されるが、ユニバーサルプライマーは対象の分類群が共通で持つ配列を対象に設計されるため、対象の分類群のDNAをまとめて増幅することができる。

DNA調査に有効であることが確認された、16S rRNA領域を対象にしたもの2種<sup>12, 13)</sup>、ミトコンドリアCO1領域を対象にしたもの7種<sup>14-16)</sup>の計9種類のユニバーサルプライマーを用いた (Table 2)。PCR用の酵素はポリフェノールや多糖類などのPCR阻害物質に耐性を有しているKAPA3G Plant (KAPA BIOSYSTEMS)を使用した。PCR条件はTable 2の通りである。PCR産物をMonoFAS DNA精製キット (GLサイエンス)で精製した。次に、シーケンスアダプターとサンプル識別用のindex配列を付与するために、2nd PCRを行った。2nd PCRは、Nextera XT Index Kit (Illumina)のプロトコルに従って行った。PCR条件はTable 3の通りである。2nd PCRの後、PCR産物をNucleoMag NGS Clean-up and Size Select (タカラバ

イオ)で精製した。精製した2nd PCR産物は、Agilent 2100バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent Technologies)を用いて品質を確認し、ライブラリー調整を行った。調整した試料を次世代シーケンサーIllumina Miseq Sequence System (Illumina)による超並列シーケンシングへ供した。解析にはMiSeq Reagent Kit v3 (600cycle; Illumina)を用いた。

2.2.3 遺伝子配列の解析 MiSeqが出力した、各資料の塩基配列とそのクオリティスコアが記述されたfastq ファイルを、アンプリコシーケンス解析パイプラインである Qiime2 2020.6.17)を用いて解析した。ペアエンドのクオリティを確認した後、DADA2プラグイ

Table 1 実験に使用したユニバーサルプライマーの一覧  
List of Universal Primers Used in This Experiment

Primer sets	Gene	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
gInsect <sup>12)</sup>	16S rRNA	GATAGAAACCAACCTGGCT	GACGAGAAGACCCTATA
Chiar16S <sup>13)</sup>		TARTYCAACATCGRGGTC	CYGTTCDAAGGTAGCATA
LCO1480-HCO2198 <sup>14)</sup>	mitochondrial CO1	GGTCAACAAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA
BF1-BR1 <sup>15)</sup>		ACWGGWTGRACWGTNTAYCC	ARYATDGTRATDGCHCCDGC
BF1-BR2 <sup>15)</sup>		ACWGGWTGRACWGTNTAYCC	TCDGGRTGNCCRAARAAYCA
BF2-BR1 <sup>15)</sup>		GCHCCHGAYATRGCHTTYCC	ARYATDGTRATDGCHCCDGC
BF2-BR2 <sup>15)</sup>		GCHCCHGAYATRGCHTTYCC	TCDGGRTGNCCRAARAAYCA
BF3-BR1 <sup>16)</sup>		CCHGAYATRGCHTTYCCHCG	ARYATDGTRATDGCHCCDGC
BF3-BR2 <sup>16)</sup>		CCHGAYATRGCHTTYCCHCG	TCDGGRTGNCCRAARAAYCA

Table 2 1st PCR 条件  
1st PCR Conditions

ステップ	反応	温度 (°C)	時間 (秒)
1	初期熱変性反応	95	180
2	熱変性反応	95	20
3	アニーリング反応	62	15
4	伸長反応	72	30
5	最終伸長反応	72	300

Table 3 2nd PCR 条件  
2nd PCR Conditions

ステップ	反応	温度 (°C)	時間 (秒)
1	初期熱変性反応	95	180
2	熱変性反応	95	30
3	アニーリング反応	62	30
4	伸長反応	72	30
5	最終伸長反応	72	300

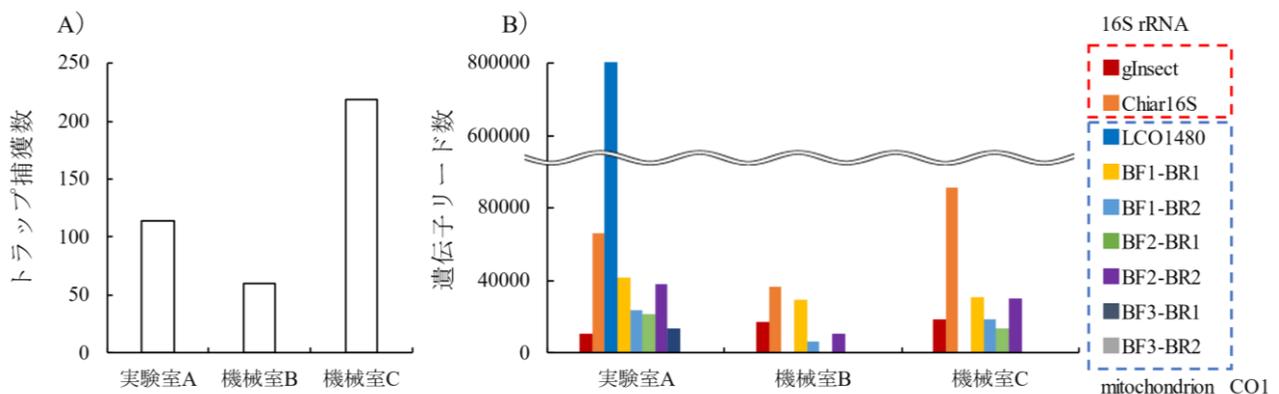


Fig.1 各調査場所における A) トラップ調査で捕獲された節足動物の数と B) 環境DNA分析で検出された節足動物の遺伝子リード数

A) Number of Arthropods Captured in the Trap Survey and B) Number of Arthropod Genetic Reads Detected in the Environmental DNA Survey at Each Research Site

ン<sup>18)</sup>を用いてエラー配列や低品質配列(Q値<30), キメラ配列と重複配列の除去を行い, Forward配列とReverse配列をマージした後, ASV (amplicon sequence variant, アンプリコン配列変異体)へのグルーピングを行った。ASVとは, 操作上の分類単位(Operational Taxonomic Unit, OTU)の一種で, PCRで増幅されたDNAのエラー配列を修正・除去し, 類似度の高い配列を一つの分類単位としてまとめたものである<sup>18)</sup>。ただし, LCO1480-HCO2198のプライマーセットではシーケンスリード長が600bpを超え, 今回使用したMiseq Reagent Kit v3 (600 Cycles)では全長を読み込めない恐れがあるため, シーケンスリードのForward側とReverse側をマージするペアエンド解析ではなく, Forward側のみを使用

するシングルエンド解析で解析を行った。各ASVと最も近縁な種を調べるために, BLASTという検索プログラムを使用した。各ASVの配列をアメリカ国立生物工学情報センターNCBIのDNAデータベースであるnt databaseと照合して, 配列が90%以上一致したものを最近縁種として採用し, 目レベルで集計した。

2.3 結果

各調査場所におけるトラップ調査で捕獲された節足動物の総数をFig. 1Aに, 環境DNA解析で検出された節足動物の遺伝子リード数の総数をFig. 1Bにそれぞれ示す。各調査場所のトラップ調査で捕獲または環境DNA調査で検出された節足動物の一覧をTable4-6にまとめた。

Table 4 実験室Aにおいてトラップ調査で捕獲された節足動物と各種ユニバーサルプライマーによる環境DNA分析で検出された節足動物の一覧表  
List of Arthropods Captured in the Trap Survey and Detected by Environmental DNA Analysis Using Various Universal Primers in Laboratory A

	トラップ		ユニバーサルプライマー								
	ライト トラップ	床置き トラップ	gInsect	Chiar 16S	LCO 1480	BF1- BR1	BF1- BR2	BF2- BR1	BF2- BR2	BF3- BR1	BF3- BR2
ハエ目	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
カメムシ目	○	○									
ハチ目	○					○					
その他飛翔昆虫	○	○									
コウチュウ目	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
バッタ目											
ゴキブリ目											
カジリムシ目	○	○		○		○					
トビムシ目											
クモ目		○			○						
ダニ目											
その他歩行虫											
検出分類群数	6	6	2	3	3	4	2	2	2	2	0

※○は1頭以上の捕獲またはDNAが100リード以上検出されたことを示す

Table 5 機械室Bにおいてトラップ調査で捕獲された節足動物と各種ユニバーサルプライマーによる環境DNA分析で検出された節足動物の一覧表  
List of Arthropods Captured in the Trap Survey and Detected by Environmental DNA Analysis Using Various Universal Primers in Machine Room B

	トラップ		ユニバーサルプライマー								
	ライト トラップ	床置き トラップ	gInsect	Chiar 16S	LCO 1480	BF1- BR1	BF1- BR2	BF2- BR1	BF2- BR2	BF3- BR1	BF3- BR2
ハエ目	○	○	○	○		○	○		○		
カメムシ目		○		○		○					
ハチ目	○					○					
その他飛翔昆虫		○	○			○	○		○		
コウチュウ目		○		○							
バッタ目									○		
ゴキブリ目						○					
カジリムシ目	○	○		○		○					
トビムシ目				○							
クモ目		○		○							
ダニ目						○			○		
その他歩行虫				○							
検出分類群数	3	6	2	7	0	7	2	0	4	0	0

※○は1頭以上の捕獲またはDNAが100リード以上検出されたことを示す

Table 6 機械室Cにおいてトラップ調査で捕獲された節足動物と各種ユニバーサルプライマーによる環境DNA分析で検出された節足動物の一覧表  
List of Arthropods Captured in the Trap Survey and Detected by Environmental DNA Analysis Using Various Universal Primers in Machine Room C

	トラップ		ユニバーサルプライマー								
	ライト トラップ	床置き トラップ	gInsect	Chiar 16S	LCO 1480	BF1- BR1	BF1- BR2	BF2- BR1	BF2- BR2	BF3- BR1	BF3- BR2
ハエ目	○	○									
カメムシ目						○		○			
ハチ目	○										
その他飛翔昆虫		○				○	○		○		
コウチュウ目											
バッタ目				○		○	○	○	○		
ゴキブリ目			○	○		○	○	○	○		
カジリムシ目		○		○							
トビムシ目	○	○	○	○		○	○	○	○		
クモ目	○	○									
ダニ目											
その他歩行虫		○				○		○			
検出分類群数	4	6	2	4	0	6	4	5	4	0	0

※○は1頭以上の捕獲またはDNAが100リード以上検出されたことを示す

Table 7 本実験で捕獲・検出された各分類群に属する食品工場害虫の代表例とその侵入・発生経路<sup>1,2,3)</sup>  
Representative Examples of Food Factory Pests Belonging to Each Taxonomic Group Captured and Detected in This Experiment and Their Routes of Infestation and Development

	代表的な害虫	侵入・発生経路
ハエ目	ユスリカ, クロバネキノコバエ, タマバエなど	飛翔侵入
	チョウバエ, ノミバエ, ショウジョウバエなど	内部発生
カメムシ目	カメムシ, ウンカ, アブラムシなど	飛翔侵入
ハチ目	ハナバチ, カリバチ, 寄生蜂など	飛翔侵入
	アリ類	歩行侵入
その他飛翔昆虫	アザミウマ, カゲロウ, チョウなど	飛翔侵入
	メイガ類	内部発生
コウチュウ目	シバンムシ, カツオブシムシ, ヒメマキムシなど	内部発生
	ゴミムシなど	歩行侵入
バッタ目	コオロギなど	歩行侵入
ゴキブリ目	ゴキブリ類	内部発生
カジリムシ目	チャタテムシ類	内部発生
トビムシ目	トビムシ類	内部発生
クモ目	クモ類	歩行侵入
ダニ目	コナダニなど	内部発生
	タカラダニなど	歩行侵入
その他歩行虫	ムカデ, ゲジなど	歩行侵入

なお、環境DNA解析において、100リード以上検出されなかった分類群は、信頼性が低いものとして除外した<sup>19,20)</sup>。

今回トラップ調査で捕獲あるいは環境DNA分析で検出された節足動物にどのような害虫が含まれているのかをTable 7に補足としてまとめた。

## 2.4 考察

本研究の結果から、プライマーによって検出できる節足動物の種類が大きく異なることが分かった。

16S rRNA領域を対象としたユニバーサルプライマーでは、gInsectはリード数がやや少ないながらもすべてのサンプルで節足動物のDNAを検出でき、Chiar16Sでは全てのサンプルで30,000リード以上検出することができた (Fig. 1B)。検出できた分類群に関しては、gInsectがハエとその他飛翔昆虫、コウチュウ目、ゴキブリ目、トビムシ目のDNAを検出したのに対して (Table 4-6)、Chiar16Sはそれらに加えてバッタ目やカジリムシ目、クモ目なども検出することができている (Table 4-6)。また、すべての調査場所において、Chiar16Sの方がより多くの種類の節足動物のDNAを検出していた (Table 4-6)。したがって、Chiar16Sはより食品工場害虫の調査に適していると考えられる。

ミトコンドリアCO1領域のユニバーサルプライマーでは、BF1-BR1やBF1-BR2、BF2-BR2はすべてのサンプルでDNAを増幅できた。特に、BF1-BR1は全てのサンプルで29,000リード以上検出することができた (Fig. 1B)。一方、LCO1480やBF2-BR1、BF3-BR1、BF3-BR2では節足動物のDNAを増幅できないサンプルが見られたため (Fig. 1B)、食品工場害虫の調査には適当でないと考えられる。これは、CO1領域の遺伝子の塩基配列の保存性<sup>21)</sup>や、1st PCRの際の温度条件などの影響と考えられる<sup>22)</sup>。検出できた分類群に関して、BF1-BR1とBF1-BR2、BF2-BR2は全てのサンプルで節足動物を検出できていたが (Fig. 1B)、BF1-BR1は残りの2つのプライマーセットと比べて検出できる分類群の数が多かった (Table 4-6)。また、BF1-BR1は他のプライマーが検出できなかったハチ目のDNAを検出することもできたため、今回試験に用いたミトコンドリアCO1領域のプラ

イマーの中では、BF1-BR1もっとも調査に適していると考えられる。以上より、食品工場等の害虫の環境DNA調査をする際は、Chiar16SとBF1-BR1の両方を用いて解析すると、より多くの害虫のDNAを検出することができると考えられる。

また、環境DNA分析では、トラップ調査で捕獲されなかった節足動物も検出することができた。機械室Bでは、ゴキブリ目やトビムシ目、ダニ目、その他歩行虫などがトラップで捕獲が確認されなかったが (Table 5)、環境DNA分析ではChiar16Sがトビムシとその他歩行虫を、BF1-BR1がゴキブリ目とダニ目をそれぞれ検出している (Table 5)。機械室Cでは、トラップが捕獲できなかったカメムシ目とバッタ目、ゴキブリ目のDNAを環境DNA分析で検出することができた (Table 6)。したがって、環境DNA調査はトラップ調査で把握できなかった害虫の発生・侵入状況を補完することができると考えられる。

一方で、一部のプライマーを除いて環境DNA分析で検出された節足動物の種類は、トラップ調査で捕獲されたものより少なかった。これは、虫が落とすDNAの量が少なかった可能性や、プライマーが対応できていなかった可能性もあるが、DNAが水分などの影響で自然に分解され、古い環境DNAが残っていなかった可能性も考えられる。害虫のDNAが環境中で比較的速やかに分解されるのであれば、トラップ調査が一般的に約1か月の累積の情報であるのに対し、環境DNAはトラップよりも即時性のある情報であり、より直近の害虫の侵入・発生状況を知ることができると考えられる。今後、害虫のDNAが分解される速度を測定し、この仮説を検証する必要がある。

害虫の環境DNA調査を稼働中の某食品工場にて適用し、実物件での有効性の検証を行った。

### 3.1 調査方法

2023年7月某日に、某食品工場 (関東) にて害虫の環境DNA調査を実施した。

サンプルの採集方法は2章と同様に掃除機で埃を吸引した。床が濡れている場所や、埃の堆積が少ない場所など、埃の吸引が困難な場所では、ふき取り検査用綿棒 (ふきふきチェックII, 栄研化学; Photo 3) で、綿棒のヘッド部分全体に汚れが付くように建材表面を拭き取った。

サンプルは工場内の清潔区4か所、準清潔区1か所、汚染区5か所の計10か所採取した。当工場の清潔区は製品の最終加工や充填を行っており、最も清潔レベルの高いエリアである。準清潔区は原料の下処理や製品の包装を行うエリアで、汚染区は原料の保管や入出荷、容器や器具の洗浄を行うエリアである。

清潔区のサンプルは全てふき取り綿棒で採取し、その他の区域のサンプルは掃除機で埃を吸引した。



Photo 3 調査に使用したふき取り検査用綿棒  
Wipe Test Swabs Used in This Research

### 3. 某食品工場における調査

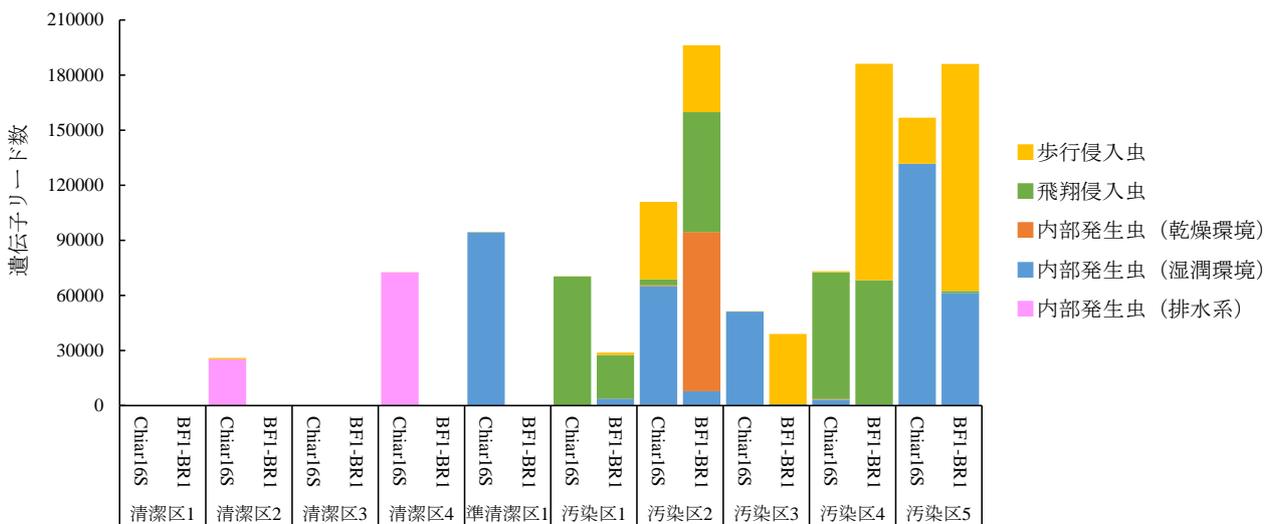


Fig. 2 某食品工場の各サンプリング場所において検出された食品工場害虫の遺伝子リード数。  
各カテゴリーに含まれる害虫の種類はTable 8, 9を参照。

Number of Genetic Reads of Food Factory Pests Detected at Each Sampling Points in the Certain Food Factory.  
See Table 8 for the Types of Pests Included in Each Category.

トラップ調査は、当工場にモニタリング調査を委託されている害虫駆除業者が取得したデータを使用した。調査はライトトラップ11台と床置きトラップ33個を用いて

実施された。ライトトラップは2023年3月31日~2023年4月30日、床置きトラップは2023年4月7日~2023年5月11日の間の捕獲データをそれぞれ使用した。

Table 8 清潔区と準清潔区において防虫業者によるトラップ調査で捕獲された害虫と環境DNA調査でDNAが検出された害虫の一覧

List of Pests Caught by Insecticide Trapping Surveys in Clean and Semi-Clean Areas and Those Whose DNA Was Detected by Environmental DNA Surveys

		清潔区 1			清潔区 2			清潔区 3			清潔区 4			準清潔区 1		
		トラップ	C	B	トラップ	C	B	トラップ	C	B	トラップ	C	B	トラップ	C	B
		内部発生虫	排水系					◎					◎			3
その他排水系					1						20					
内部発生虫	湿潤環境													24	◎	
	カジリムシ目 (チャタテムシ)															
外部侵入虫	飛行侵入														1	
	ユスリカ科															
	歩行侵入					△										
外部侵入虫	ダニ目															
	その他歩行虫							5								

※記号の意味は以下の通り; C : Chiar16S, B : BF1-BR1, △ : リード数 101~1000, ◎ : リード数 10000~。モニタリング調査の報告書に具体的な種名が記載されていない場合は、その他として捕獲数のみ記載している。

Table 9 汚染区において防虫業者によるトラップ調査で捕獲された害虫と環境DNA調査でDNAが検出された害虫の一覧

List of Pests Caught by Insecticide Trapping Surveys in Contaminated Areas and Those Whose DNA Was Detected by Environmental DNA Surveys

		汚染区 1			汚染区 2			汚染区 3			汚染区 4			汚染区 5		
		トラップ	C	B	トラップ	C	B	トラップ	C	B	トラップ	C	B	トラップ	C	B
		内部発生虫	排水系				2	△					1			2
ノミバエ科					2											
ショウジョウバエ科											1					
その他排水系	2				3			7								
内部発生虫	湿潤環境			○			1					△	2		○	
	カジリムシ目 (チャタテムシ)															
	ハネカクシ科										○					
内部発生虫	乾燥環境					△	◎					△				
	カツオブシムシ科															
外部侵入虫	飛行侵入		○	○	77	○	◎				29	◎	◎	26		
	ユスリカ科															
	クロバネキノコバエ科												◎			
	その他ハエ目				8		○				4			8		
	カメムシ目				2	△	◎					△	○		○	
	アザミウマ目						△									
	ハチ目 (アリ科を除く)				1											
	その他飛翔虫	4	◎	◎	7						4	△		8		
外部侵入虫	歩行侵入			○								△				
	その他コウチュウ目															
	クモ目				1	◎	◎							◎	◎	
	ダニ目						○						◎			
外部侵入虫	その他歩行虫	7								4	△					

※記号の意味は以下の通り; C : Chiar16S, B : BF1-BR1, △ : リード数 101~1000, ◎ : リード数 10000~。モニタリング調査の報告書に具体的な種名が記載されていない場合は、その他として捕獲数のみ記載している。

### 3.2 環境DNA分析

埃サンプルのDNA抽出は先述した方法と同様に行った。綿棒で採取したサンプルは、綿棒容器のリン酸緩衝溶液を孔径0.2 μmのメンブレンフィルターで吸引ろ過し、メンブレンフィルターと綿棒の先端部分からDNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは、埃から抽出したものと同様に解析に供した。以降の解析は、2.2.3と同様の方法で行った。なお、1st PCRで使用したユニバーサルプライマーはChiar 16S と BF1-BR1である。各ASVの最近縁種は、BLAST検索の結果、一致率90%以上のものを目、94%以上のものを科として集計した。

### 3.3 結果

環境DNA分析で検出された節足動物の遺伝子リード数を、侵入・発生原因ごとにまとめたものをFig. 2に示す。また、各サンプリング場所でDNAが検出された害虫の種類と、各サンプリング場所の近くに設置されたモニタリング用のトラップに捕獲された害虫の種類を侵入・発生原因ごとにまとめたものをTable 8, 9に示す。

### 3.4 考察

実際に稼働している工場内で採取した塵埃からDNAを抽出し、次世代シーケンサーによって解析した結果、多数の節足動物由来のDNAが検出することができた。また、埃を採取できない場所からでも、ふき取り検査用綿棒を用いてDNAサンプルを採取することができた。

検出される節足動物のDNAは清潔度の区分によって異なる傾向が見られた。清潔区や準清潔区では、汚染区よりも検出された節足動物の種数が少なかった。したがって、本物件は適切に害虫管理ができていと考えられる。また、検出された節足動物の種類に関して、清潔区ではチョウバエなどの排水系発生虫が、準清潔区ではチャタテムシなどの湿潤環境発生虫が、汚染区では外部侵入虫と内部発生虫のどちらのDNAも検出された (Fig. 2, Table 8, 9)。環境DNA調査を実施した時期とトラップ調査を実施した時期が数か月異なっており、

参考程度ではあるが、両者のデータには同様の傾向がみられるため (Table 8, 9)、環境DNA分析の結果は害虫の侵入・発生状況を十分に反映できていると考えられる。

また、環境DNA分析では、トラップ調査では捕獲できていない汚染区1のチャタテムシや、汚染区2, 3, 5のトビムシ、汚染区2のカツオブシムシなど、トラップ調査で捕獲されていない害虫のDNAも検出できていた。したがって、環境DNA調査はトラップ調査によって把握することができなかった害虫の侵入・発生状況を補完することが可能であることが実地調査でも証明された。これによって、より正確に害虫の侵入・発生状況を把握し、迅速かつ的確な害虫対策を立てることが可能になると期待できる。

本調査では、Chiar16SとBF1-BR1の2種類のユニバーサルプライマーを分析に使用した。Chiar16SはBF1-BR1よりも多くのサンプルでDNAを増幅することができた一方で、BF1-BR1はChiar16Sが検出できなかった害虫を検出することができた (Fig. 2, Table 9)。したがって、調査を実施する際は、複数のユニバーサルプライマーを用いて分析することで、より幅広い害虫の侵入・発生状況を把握することができると考えられる。

## 4. トラップ調査と環境DNA調査の比較

一連の結果を受けて、トラップ調査と環境DNA調査の強み・弱みを一覧表にまとめたものがTable 10である。トラップ調査は、害虫の実個体を確認できることや、個体数を推定できること、ある程度長期のデータを取得することができることから、工場の定期モニタリングに適しているといえる。同定にかかるコストに関しては、機械学習による自動分類が研究されており<sup>23)</sup>、実用化されれば大きくコストを低減できると考えられる。

一方、環境DNA調査は、環境サンプルの採取だけで調査できることや、害虫の発育段階や遺骸の状態に影響されないこと、DNAが分解されやすいため比較的直近の存在情報を反映していることなどから、工場の害虫の侵入・発生源を大規模かつ迅速に調査するのに適していると考えられる。環境DNA調査はユニバーサルプラ

Table 10 トラップ調査と環境DNA調査の長所・短所の比較表  
Comparison of Advantages and Disadvantages of Trap Surveys and Environmental DNA Surveys

	トラップ調査	環境DNA調査
長所	<ul style="list-style-type: none"> <li>害虫の実個体を確認可能</li> <li>害虫の個体数を推定可能</li> <li>長期間のデータを取ることが可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>環境サンプル (埃, バイオフィームなど) の採取だけで調査が可能</li> <li>結果が調査者の技術や経験に影響されにくい</li> <li>動かない卵や幼虫, 蛹でも検出可能</li> <li>虫体が完全に残っていても検出可能</li> <li>DNAは分解されやすいため, 比較的直近の侵入・発生情報がわかる</li> </ul>
短所	<ul style="list-style-type: none"> <li>トラップを設置できる場所に制限がある</li> <li>捕獲した害虫の同定に人員・時間が必要</li> <li>同定結果が調査者の技量の影響を受ける</li> <li>虫体が破損していると同定しにくい</li> <li>動かない卵や幼虫, 蛹は捕獲できない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>害虫の実個体を確認できない</li> <li>結果がユニバーサルプライマーの性能の影響を強く受ける</li> <li>データベースに登録されていない害虫は正確に検出されない</li> </ul>

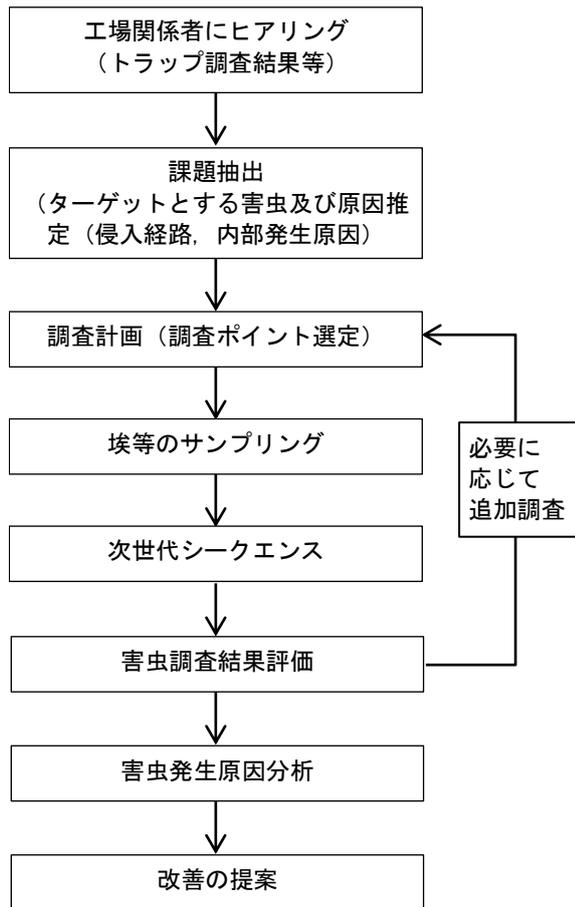


Fig. 3 環境DNAを用いた害虫調査システム  
Pest Survey System Using Environmental DNA

イマーの性能や、環境サンプルからの DNA 抽出の成否、配列情報を照合する DNA データベースなどの影響を受けるため、ユニバーサルプライマーの性能向上や、様々な環境サンプルに対応した DNA 抽出方法の開発、害虫の DNA データベースの拡充などが今後の課題である。

## 5. 環境DNA調査を用いた害虫調査システム

我々が提案する環境 DNA 調査を用いた害虫調査の運用方法のフローを Fig. 3 に示す。まず、トラップ調査を基に工場関係者にヒアリングを実施し、問題となっている害虫の侵入経路や内部発生原因等の課題抽出を行う。これらの課題解決のために侵入経路や発生源の可能性がある場所を選定する。次に、選定した場所で埃等のサンプリングを実施する。サンプルから抽出した DNA をターゲットとなる害虫に合わせたプライマーを用いた PCR で増幅し、次世代シーケンスにかける。この結果を基に、害虫調査結果をまとめるが、侵入経路や発生原因が依然として不明確な場合は、追加調査を実施する。これにより正確な推定が可能となる。これらの調査結果を基に、より効果的な改善提案を実施していく。

## 6. まとめ

本研究では、環境DNA分析技術によって、食品工場で実施されているトラップ調査によるモニタリングを補完することができるか検討し、以下の知見を得ることができた。

- 1) 室内で採取した埃から抽出した DNA を次世代シーケンサーで分析することで、昆虫の DNA を検出することができた。
- 2) 16S rRNA 領域を対象としたユニバーサルプライマーは、ミトコンドリア COI 領域を対象としたユニバーサルプライマーよりも安定的に虫の DNA を増幅することができた。
- 3) プライマーによって検出しやすい分類群が異なるため、環境 DNA 調査を実施する際は複数のプライマーを使って検出精度を上げるのが望ましい。
- 4) 稼働中の食品工場にて調査を実施し、トラップでも確認されている害虫の DNA を検出することができた。また、トラップで捕獲されていない害虫の DNA も検出することができた。
- 5) 以上より、環境 DNA 調査は、トラップ調査によるモニタリングで把握できなかった害虫の侵入・発生状況の情報を補完できると考えられる。

## 参考文献

- 1) 飯島義之ほか 編：最新の異物混入防止・有害生物対策技術，テクノシステム，378p. 2019.3
- 2) 林晃史：実用ガイド「食」の害虫トラブル対策－食品製造現場から食卓まで－，八坂書房，347 p., 2011.7
- 3) 佐藤章弘 編：工場における”虫”侵入・発生防止対策，技術情報協会，358p., 2015.11
- 4) 石山壘，有馬誠一，上加裕子：携帯電話カメラでの捕虫シート撮影による害虫発生数の監視，研究報告コンピュータビジョンとイメージメディア (CVIM)，Vol. 2014, No. 30, pp. 1-6, 2014.2
- 5) 佐藤安志：ハマキガ類計数のための電撃型自動計数フェロモントラップの開発，野茶研集報，Vol. 1, pp. 61-65, 2004.3
- 6) 小峰幸夫，原田正彦，斉藤明子，佐藤嘉則，木川りか，藤井義久：日光の歴史的木造建造物における新たな害虫モニタリング手法の実用性の検討，保存科学，Vol. 56, pp. 77-88, 2017.3
- 7) 環境機器株式会社，” トリオス本体セット (コクヌストモドキ用) 10セット [フェロモン 誘引トラップ]”，虫退治.COM，2024-06-05. <https://www.mushi-taiji.com/products/detail144.html>，(参照 2024-06-05)

- 8) Deiner K., Bik H. M., Mächler E., Seymour M., Laco ursière-Roussel A., Altermatt F., Creer S., Bista I., Lodge D. M., de Vere N., Pfrender M. E., Bernatchez L.: Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities, *Molecular ecology*, Vol. 26, No. 21, pp. 5872-5895, 2017
- 9) Thomsen, P. F., Willerslev, E.: Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity, *Biological Conservation*, Vol. 183, pp. 4-18, 2015
- 10) Madden, A. A., Barberán, A., Bertone, M. A., Menninger, H. L., Dunn, R. R., Fierer, N.: The diversity of arthropods in homes across the United States as determined by environmental DNA analyses. *Molecular ecology*, Vol. 25, No. 24, pp.6214-6224, 2016
- 11) 山野由紀子, 石川哲也, 中村晴信, 森脇裕美子: 学校環境衛生におけるダニアレルゲン簡易検査法の性能比較に関する研究, *学校保健研究*, Vol. 48, No. 4, pp. 325-331, 2006
- 12) Oe, S., Sashika, M., Fujimoto, A., Shimozuru, M., Tsubota, T.: Predation impacts of invasive raccoons on rare native species, *Scientific Reports*, Vol. 10, pp. 1-12, 2020
- 13) Marquina, D., Andersson, A. F., Ronquist, F.: New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods, *Molecular Ecology Resources*, Vol. 19 No. 1, pp.90-104, 2019
- 14) Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, Vol. 3, No. 5, pp. 294-299, 1994
- 15) Elbrecht V., Leese F.: Validation and development of freshwater invertebrate metabarcoding COI primers for environmental impact assessment, *Frontiers in Environmental Science*, Vol. 5, pp. 1-11, 2017
- 16) Elbrecht, V., Braukmann, T. W., Ivanova, N. V., Prosser, S. W., Hajibabaei, M., Wright, M., Zakharov E. V., Hebert P. D. N., Steinke, D.: Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods, *PeerJ*, Vol. 7, pp. e7745, 2019
- 17) Bolyen E, Rideout JR, Dillon M. R., Bokulich N. A., Abnet C. C., Al-Ghalith G. A., Alexander H., Alm E. J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J. E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C. J., Brown C. T., Callahan B. J., Caraballo-Rodríguez A. M., Chase J., Cope E. K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P. C., Douglas G. M., Durall D. M., Duvallet C., Edwardson C. F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J. M., Gibbons S. M., Gibson D. L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G. A., Janssen S., Jarmusch A. K., Jiang L., Kaehler B. D., Kang K. B., Keefe C. R., Keim P., Kelley S. T., Knights D., Koester I., Kosciolk T., Kreps J., Langille M. G. I., Lee J., Ley R., Liu Y. X., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B. D., McDonald D., McIver L. J., Melnik A. V., Metcalf J. L., Morgan S. C., Morton J. T., Naimey A. T., Navas-Molina J. A., Nothias L. F., Orchanian S. B., Pearson T., Peoples S. L., Petras D., Preuss M. L., Pruesse E, Rasmussen L. B., Rivers A., Robeson M. S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S. J., Spear J. R., Swofford A. D., Thompson L. R., Torres P. J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P. J., Ul-Hasan S., van der Hooft J. J. J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J.: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2., *Nature Biotechnology*, Vol.37 No. 8, pp. 852-857, 2019
- 18) Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J., Holmes S. P.: DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nature Methods*, Vol. 13, No. 7, pp. 581-583, 2016
- 19) 上村了美, 上月康則, 大谷壮介, 平川倫, 岩見和樹, 竹山佳奈, 山中亮一: 環境 DNA メタバーコーディングによる運河・港湾に生息する魚類の種多様性検出に関する研究, *土木学会論文集 B3 (海洋開発)*, Vol. 74, No. 2, pp. I\_474-I\_479, 2018
- 20) 内藤太輔, 赤松良久, 都築隆禎, 横山良太, 畔上雅樹, 宮本健也, 乾隆帝: 環境 DNA による魚類の網羅的解析の河川水辺の国勢調査への導入に関する検討, *河川技術論文集*, Vol. 26, pp. 337-342, 2020
- 21) 岸本圭子, 神保宇嗣, 中濱直之: 日本産昆虫の DNA バーコーディングの現状, *昆虫と自然*, Vol. 57, No. 14, pp. 2-6, 2022
- 22) Deagle B. E., Jarman S. N., Coissac E., Pompanon F., Taberlet P.: DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match, *Biology Letters*, Vol. 10, No. 9, pp. 20140562, 2014
- 23) Teixeira, A. C., Ribeiro, J., Morais, R., Sousa, J. J., Cunha, A.: A systematic review on automatic insect detection using deep learning, *Agriculture*, Vol. 13, No. 3, pp. 713, 2023