

沖縄県における健康被害に関わる生物種の同定への DNA バーコーディングの利用

安座間安仙・岡野祥^{*1}・大城聡子・福地斉志
喜屋武向子・高嶺朝典・佐久川さつき・久高潤

Application of DNA barcoding for identification of bio species which causes health problems in Okinawa Prefecture

Yasuhito AZAMA, Sho OKANO^{*1}, Akiko OSHIRO, Yoshimune FUKUCHI,
Hisako KYAN, Tomonori TAKAMINE, Satsuki SAKUGAWA and Jun KUDAKA

要旨：DNA バーコーディングによる県内の健康被害に関わる生物種の同定を目的として、県内で入手した生物サンプルのCOI遺伝子領域のDNA塩基配列解析を行った。解析を実施したサンプルは、ハブクラゲ2サンプル、ハイイロゴケグモ1サンプル、タイワンキドクガ1サンプル、日本海裂頭条虫1サンプル、センチニクバエ1サンプルである。また、DNA バーコーディングを実際に県内で発生した健康被害事例（バンケーキシンドローーム原因食品中のダニ検出、日本海裂頭条虫の同定、ハエ症の原因種の同定、久米島のヌカカ科 *Leptconops* 属の一種の種の推定）に利用した結果、形態学的同定の補助的な手法として有効であることが示唆された。

Key words: DNA バーコーディング, COI, 沖縄県, 健康被害, 病害生物

I はじめに

沖縄県は周囲を海に囲まれた島嶼県であることや、国内でも少ない亜熱帯地域に属している県であることから、他の都道府県ではあまり見られない地域特有の生物種による感染症、刺咬症被害、食中毒などの健康被害が見られる。このような健康被害事例が発生した場合、原因となる生物種の同定が重要となる。生物種の同定は、実際のサンプルの観察による形態学的同定が基本である。しかし、形態学的同定には、①サンプルの損傷がほとんどないこと、②同定の専門的な知識・経験・資料が必要なこと、③生物種によっては特定の発育段階や雌雄どちらかでしか同定できないことなどの問題がある。特に健康被害に関わる事例の場合は、原因となる生物種が駆除や調理などによって破損していたりする場合が多い。また、刺咬症被害では原因となる生物は確認されないが、棘や触手が患部に残る事例もある。従来ではこのような事例は原因となる生物種が不明の事例として取り扱われることが多かった。近年、このような課題に対して特定のDNA塩基配列を用いた生物種の同定法（DNA バーコーディング）が注目されている¹⁾。本法は主に植物、動物、菌類などの種の同定への利用が想定されており、世界各国で様々な生物種の特定のDNA塩基配列のデータが蓄積されている。

県内でDNAバーコーディングを用いた事例としては、

平良らが実施した蚊類のハマダラカ属、ヤブカ属、イエカ属の報告がある²⁾。琉球列島には亜種を含めて17属77種（亜種を種として数える）の蚊が記録されており、上記3属だけで48種を占める。本報告では、その中でも公衆衛生上で重要と考えられる30種について解析を実施している。これらの蚊はデング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、日本脳炎、ウエストナイル熱、マラリアやフィラリアなど多くの感染症に関っている^{3,4)}。また、蚊類は形態が破損しやすく、同定が難しいことからDNAバーコーディングは非常に有効な手法であると考えられる。

本手法は生物種の同定に非常に有用であるが、登録されている生物種や遺伝子領域には偏りがあり、当所が同定を目的とする生物種が登録されていない場合もある。そこで、当所では将来的にDNAバーコーディングを利用するために、県内の健康被害に関わる生物種のDNA塩基配列情報の収集を開始することとした。DNAバーコーディングに用いられるプライマーセットはいくつか提唱されているが、当所ではThe Consortium for the Barcode of Life (CBOL)によって幅広い動物種のバーコーディングに推奨されているミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素サブユニットI (COI) 遺伝子の一部を増幅するプライマーセットを用いることとした^{5,6)}。

本稿では、県民や観光客に多くの刺症被害を発生させ

*1 沖縄県保健医療部中央食肉衛生検査所

ているクラゲ類のハブクラゲ *Chironex yamaguchii*, 特定外来生物で県内での分布が確認されているクモ類のハイイロゴケグモ *Latrodectus geometricus*, 例年県内で幼虫の大量発生による刺症被害が問題となる蛾類のタイワンキドクガ *Orvasca taiwana* の DNA 塩基配列の解析を行った。また、県内で発生した健康被害事例において入手したサンプルに対し、形態学的同定と併せて COI 遺伝子の DNA 塩基配列の解析を行い、DNA バーコーディングの健康被害事例への利用についても検討した。

II 方法

1. 生物サンプルの入手及び同定, 保存

サンプルは職員による採取, 提供, 同定依頼のいずれかにより, 全て沖縄県内で入手した。サンプルの形態学的同定は当所の職員で行った。同定後の生物種サンプルは, DNA 塩基配列解析用に組織の一部を 95%エタノールに液浸して-30°Cで保存し, サンプル全体は 10%ホルマリン水溶液または 95%エタノールで液浸保存し証拠標本とした。サイズが 1 cm以下の小さいサンプルについては, 使用前に全体及び一部を写真撮影し画像を保存することで証拠標本の代替とした。撮影後のサンプルは, 95%エタノールに液浸して-30°Cで保存した。

2. DNA の抽出

サンプルの破碎は, ①セラミックビーズ (直径 1.5 mm) を含む 2 ml チューブに 300 µl の PBS と共に懸濁し, FastPrep FP120 homogenizer (Q-Biogene) により SPEED レベル 5 で 30 秒かけて破碎, ②1.5 ml のマイクロチューブに 300 µl の PBS と共に懸濁し, Fisherbrand Pellet Pestle (Fisher Scientific) を用いて破碎, のいずれかにより行った。DNA の抽出は, QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を添付のプロトコルに従い行った。

3. PCR

DNA バーコーディングのための遺伝子領域の塩基配列は COI 遺伝子の一部 (658 bp) を標的としたプライマーセット LCO1490 及び HCO2198^{5,6)} を用いた。裂頭条虫類については, COI 遺伝子の一部 (300 bp) を標的とした DBCOI-1 及び DBCOI-2 を用いた⁷⁾。PCR の反応液は PerfectShot Ex Taq (Loading Dye mix) (タカラバイオ株式会社) を用いて, テンプレートは 5 µl を使用した。PCR は C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laborototies) を用いて行い, PCR 条件は①98°C・10 秒, ②45°C・30 秒, ③72°C・60 秒を 35 サイクル行った。非特異的な塩基配列が増幅する場合は, 上記の条件の②を 50°C・30 秒へ変更した。得られた PCR 産物は, 添付のマニュアルに従い,

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

4. シークエンスおよび相同性検索

シークエンス反応は, 添付のマニュアルに従い, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて, ダイレクトシークエンスにより行った。得られた反応産物は CleanSEQ (Beckman Coulter) を用いて精製を行った。塩基配列の解析は, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた DNA 塩基配列は MEGA version 5.0⁸⁾ で編集し, BLAST (DNA Data Bank of Japan: 以下 DDBJ) を用いて DDBJ/EMBL-Bank (EBI)/GenBank (NCBI) (以下, DNA データバンク) に登録された DNA 塩基配列と相同性検索を行った。

III 結果

1. 生物サンプルの DNA 塩基配列の解析

ハブクラゲ (2 サンプル), ハイイロゴケグモ (1 サンプル), タイワンキドクガ (1 サンプル) および後述する健康被害事例で当所に持ち込まれたセンチクバエ *Sarcophaga peregrina* (1 サンプル), 日本海裂頭条虫 *Diphyllobothrium nihonkaiense* (1 サンプル) について DNA 塩基配列を決定することができた (表 1)。ハブクラゲについては, DNA データバンクに沖縄県で採取された同種の COI 遺伝子の DNA 塩基配列データが登録されており, 99.8%と高い相同性を示した。しかし, 今回増幅した COI 遺伝子領域 658 bp に対して登録されている COI 遺伝子領域は 624 bp と短かった。ハイイロゴケグモの DNA 塩基配列については, 海外産の同種と 99.8%と高い相同性を示した。タイワンキドクガについては COI 遺伝子の DNA 塩基配列が登録されておらず, 近縁のドクガ科 *Orvasca* 属の別種と 99.8%と高い相同性を示した。

2. DNA バーコーディングの健康被害事例への利用

(1) パンケーキシンドローム原因食品中のダニ検出

2013 年 3 月, 県内でダニ繁殖食品の摂取後にアナフィラキシーを来した症例, いわゆる『パンケーキシンドローム』と疑われる事例が発生した。医療機関において当該食品中にダニが確認され, 当所にその食品中のダニの同定検査の依頼があった。当所で食品よりダニを回収し, 形態学的観察による同定を行った結果, 本ダニはコナヒョウヒダニと同定された。また, 食品より直接採取したダニから DNA を抽出し, 得られた PCR 産物の DNA 塩基配列をダイレクトシークエンスで解析した。DNA データ

表1. DNA塩基配列を解析した生物サンプル.

No.	和名	学名	採取地
1	ハブクラゲ	<i>Chironex yamaguchii</i>	那覇市
2	"	"	那覇市
3	ハイロゴケグモ	<i>Latrodectus geometricus</i>	名護市
4	センチクバエ	<i>Sarcophaga peregrina</i>	北中城村
5	タイワンキドクガ	<i>Orvasca taiwana</i>	南城市
6	日本海裂頭条虫	<i>Diphyllobothrium nihonkaiense</i>	県内

バンクに登録された塩基配列データを用いて相同性検索を行ったところ、海外のコナヒョウヒダニのCOI遺伝子のDNA塩基配列と99.8~100%という高い相同性を示し、形態学的同定の結果と一致した。

(2) 日本海裂頭条虫の同定

2011年、県内医療機関より成人男性の排便時に排出された寄生虫の同定依頼があり、虫体と虫卵の形態学的所見から裂頭条虫類と推察できた。しかし、形態学的検査のみでは種の同定は容易ではないため、遺伝子学的同定を試みた。ミトコンドリアCOI遺伝子を増幅するPCRのプライマーセットを用い、約300bpにDNA増幅産物を確認した。得られたDNA増幅産物の塩基配列を解析し、DNAデータバンクに登録された塩基配列データを用いて分子系統解析を行ったところ、日本海裂頭条虫のクラスターに属した。塩基配列の相同性は、日本海裂頭条虫と100%一致し、類症鑑別が必要となる広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum* とは91.9~92.3%、マンソン裂頭条虫 *Spirometra erinaceieuropaei* とは82.3~84.6%であった。以上の結果より、当該条虫を日本海裂頭条虫と同定した。

(3) ハエ症の原因種の同定

2015年6月、県内の医療機関から当研究所へ蛆と思われる幼虫の同定依頼があった。医療機関のスタッフによると、蛆は入院患者の鼻腔内から鼻血混じりで出てきたとのことであった。計9匹を預かり当所で形態学的同定を行った。幼虫の形態からクバエ類であることは推測できたが、正確な種の同定には雄の成体が必要なため当所で飼育した。成体に変態後、形態学的同定を行ったところセンチクバエであることが確認された。この個体の組織の一部を使用しDNA塩基配列解析を行い、BLASTを用いて相同性検索を行ったところ、海外のセンチクバエに99.5%という高い相同性を示した。

(4) 久米島のヌカカ科 *Leptconops* 属の一種の種の推定

久米島ではヌカカ科 *Leptconops* 属の一種と形態学的に推測される微小の飛翔昆虫(通称アサ虫)が、地元住民や観光客への刺症被害を起こしている⁹⁾。しかし、*Leptconops* 属については国内の専門家に確認すること

ができず、形態学的同定が困難であった。そのため、正確な生物種の同定はできていない。本種についてCOI遺伝子領域のDNA塩基配列の解析を試みたが、BLASTでは本種と相同性を示す生物種のDNA塩基配列は確認されなかった。そこで、本種のサンプルと本州に生息する *Leptconops* 属のトクナガクロヌカカ *Leptconops nipponensis* 及びその亜種で鹿児島県奄美大島や加計呂麻島に生息しているトクナガクロヌカカ奄美亜種 *Leptconops nipponensis oshimaensis* のサンプル間のCOI遺伝子の遺伝的距離(K2P)を計算した。その結果、本種とトクナガクロヌカカ及びトクナガクロヌカカ奄美亜種とは遺伝的距離(K2P)は9.2-11.0%であった。

IV 考察

1. 生物サンプルのDNA塩基配列の解析

ハブクラゲのDNA塩基配列については、国内の同種とに対して高い相同性を示した。しかし、データベースに登録されているCOI遺伝子領域は、当所で解析した塩基配列より短かった。これは、COI遺伝子領域の増幅に用いたプライマーセットが違うためと考えられる。DNAデータバンクには多くの種でCOI遺伝子が登録されているが、登録されている遺伝子領域については若干の違いが見られる。今後DNAバーコーディングを利用する際にはその点についても注意したい。

ハイロゴケグモについては、海外の同種と比較して99.8%と高い相同性を示した。ハイロゴケグモなどの外来生物が県内に侵入した場合、対策を検討するためには生物種を同定する必要がある。しかし、海外の生物種の場合、国内の資料には記載されていない場合がほとんどである。そのため、それらの生物種の資料を一から収集する必要があり、形態学的同定にはかなりの時間を要する。そのような場合に遺伝子学的同定を行うことができれば、迅速な対策が可能になると考えられる。

タイワンキドクガについてはCOI遺伝子のDNA塩基配列が登録されておらず、近縁のドクガ科 *Orvasca* 属の別種と高い相同性を示した。今回の結果より、生物種によってDNA塩基配列のデータの登録状況に違いがあることが確認された。

DNAバーコーディングを目的としたDNA塩基配列情報を解析するうえでいくつかの課題があった。1つは、証拠標本の保存である。DNAバーコーディングに用いるDNA塩基配列の解析は形態学的同定が正確に行われた証拠標本から行われるのが基本とされている¹⁾。しかし、証拠標本とする生物が微小な場合、全体を破碎しDNA抽

出に使用せざるを得ないサンプルがあった。このようなサンプルについて、今回はDNA抽出に用いる前に写真を撮影することで証拠標本の代わりとした。この課題の解決方法としては、国立環境研究所で実施されているユスリカのDNAバーコーディングで用いられている非破壊DNA抽出¹⁰⁾などが有効かもしれない。2つ目の課題は、生物の同定である。当所で同定が必要となるサンプルは健康被害に関わる幅広い生物種であるが、当所の職員が正確に同定できる生物種は限られている。今後、DNAバーコーディングを目的としたサンプルの入手および同定を行う際は、効率性や信頼性の面から、外部の研究機関と協力して実施することが望ましいと考えられる。

2. DNAバーコーディングの健康被害事例への利用

本県で発生した4例の健康被害事例でDNAバーコーディングを補助的に利用した結果、生物種の同定に有効であることが示唆された。事例1のパンケーキシンドローム原因食品中のダニ検出の事例、事例2の日本海裂頭条虫の同定事例、事例3のハエ症の原因種の同定事例では、持ち込まれた検体の保存状態が良好で形態学的同定が可能な事例であった。しかし、持ち込まれるサンプルによっては破損により形態学的特徴が明瞭でなく、大まかな分類でさえ困難な事例も想定される。また、事例2のように、形態学的観察によりある程度の分類はできるが種の判別が難しい場合でも、DNAバーコーディングは有効であった。事例3では、検体として生きた幼虫が持ち込まれたが、正確な種の同定には雄の成虫が必要であり、1週間程度の飼育が必要であった。迅速な同定が必要な場合や飼育が上手くいかない場合、雌雄のどちらかしか手に入らない場合においてもDNAバーコーディングは有効であると考えられる。これら3事例の詳細については、各担当職員より別途報告がされている^{11,12,13)}。

事例4の久米島のヌカカ科 *Leptconops* 属の一種の事例は、DNAバーコーディングを用いた解析により種の推定を行った事例である。本サンプルと県外の近縁種間でCOI遺伝子の遺伝的距離(K2P)の計算を行った結果は、9.2-11.0%であった。同じ双翅目の蚊ではCOI遺伝子による遺伝的距離が10%前後の場合、多くが別種であるとの報告がされている²⁾。そのため、久米島の *Leptconops* 属は国内のトクナガクロヌカカとは同属別種である可能性が示唆された。DNAバーコーディングは、本事例のように生物種によってはCOI遺伝子のDNA塩基配列が登録されておらず同定に直接利用できない事例もあった。しかし、COI遺伝子は生物種によっては遺伝的距離などもよく検討されていることから、近縁の生物サンプルを入

手でできれば遺伝的距離や系統学的解析などを併用することにより、ある程度の種の推定には有効であることが確認された。

現時点でDNAバーコーディングのみでの健康被害生物の種の同定は難しいが、形態学的同定の補助的な手法としては非常に有効であると考えられる。今後は、感染症や刺咬症被害を起こす生物種に加え、シガテラ食中毒の原因魚などのDNA塩基配列のデータも蓄積していき、当県の健康被害事例の防止に繋げていきたい。

<謝辞>

国立環境研究所 生物・生態系環境研究センターの職員の皆様にはDNAバーコーディングに関する貴重な情報をご教示いただき感謝いたします。

V 参考文献

- 1) 伊藤元己・神保宇嗣・吉武啓 (2007) DNAバーコーディングー新たな生物多様性研究手法. 遺伝 61: 42-47.
- 2) Taira, K., Toma, T., Tamashiro, M., & Miyagi, I. (2012). DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 63(4), 289-306.
- 3) 當間孝子 (2006) [総説] 琉球列島の蚊相の特徴と疾病媒介蚊. 琉球医学会誌, 25(3), 123-133.
- 4) 国立感染症研究所 (2016) 蚊媒介ウイルス感染症: ジカウイルス感染症・チクングニア熱・デング熱, 2011年~2016年6月, IASR Vol. 37(7), p. 119-121.
- 5) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vriegenhoek R.. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294-299.
- 6) Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B* 270: 313-321.
- 7) 八木欽平, 三好正浩 (2005) ミトコンドリア遺伝子解析によるヒト寄生性裂頭条虫の種同定法の検討, 道衛研所, 55: 81-84.
- 8) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739. <http://www.megasoftware.net>.

9) 岡野祥, 安座間安仙, 神谷大二郎, 眞榮城徳之, 寺田考紀, 眞保栄陽子, 松田聖子, 大城聡子, 盛根信也, 喜屋武向子, 平良勝也, 玉那覇康二 (2012). 沖縄県久米島におけるヌカカ類による被害状況, 生態および防除法に関する調査 (2)—生態および防除法に関する研究—. 沖縄県衛生環境研究所報, (46), 37-45.

10) ユスリカ標本DNAデータベース, 国立環境研究所, 生物・生態系環境研究センター.
<http://www.nies.go.jp/yusurika/>

11) 岡野祥, 細田千花, 新垣洋平 (2014) パンケーキシンドローム原因食品中のダニ検出, 第45回沖縄県衛生監視員研究発表会抄録, 沖縄県保健医療部・環境部, p.17-18.

12) 喜屋武向子, 平良勝也, 仁平稔, 岡野祥, 眞榮城徳之, 久高潤 (2012) 日本海裂頭条虫の同定—沖縄県, 国立感染症研究所, IASR Vol. 33, p. 103-104: 2012年4月号

13) 福地斉志, 安座間安仙, 久高潤 (2016) 2015年に起きたセンチニクバエ幼虫による鼻腔ハエ症について. 沖縄県衛生環境研究所報, (50), 80-81.