

異物試験における DNA を用いた 虫の同定方法について

はじめに

昨今の異物混入、偽装表示等の事件により、食の安全・安心に対する消費者の関心はますます高まっています。食品に混入した異物の同定試験は、通常、目視観察、実体顕微鏡観察を経て、有機物であれば赤外分光分析やガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、NMR（核磁気共鳴法）等で行います。無機物であれば蛍光X線分析や原子吸光分析等を行います。

生体組織が異物である場合は、これらに加え DNA を用いた解析を行うことが多くなりました。骨片・毛・植物片等の DNA 配列を解析し、種を同定します。

異物が虫の場合は、形状・形態観察による試験を行います。今回は、食品異物として発見されることがある虫について、DNA を用いた同定方法をご紹介します。

DNA 解析の有用性

虫の形状・形態観察による試験は、異物として発見されたときに、虫体の大部分が残っていれば、非常に有用な試験です。しかし、一部分しか発見されないときは、種の同定が困難です。一方、DNA を用いた手法は、細胞を含む部位を一部採取することができさえすれば、解析を行うことができます。異物として発見される虫は一部分であることが多いため、DNA を用いた同定方法はこの点で優位性があります。

解析方法の流れ

異物として得られた虫検体は、外部からの DNA のコンタミネーション（汚染）を防ぐため、可能な限り純水及びエタノールで洗浄します。足や胴などを細断し、数片を採取します。DNA を抽出し、PCR（複製連鎖反応）法により目的の DNA 部分を量的に増幅します。PCR 法に用いるプライマー（DNA を酵素的に合成する際に使われる 20~30 塩基対の短い DNA 断片）は、ミトコンドリア DNA^{*1} の共通保存領域の、特定の 3 種類を用います。増幅した DNA の塩基配列をシーケンサ（電気泳動によって構成塩基配列等を調べる機械）を用いて調べ、決定した配列を BLAST 検索^{*2} によって解析します。この方法によって、虫検体が、既知のどの虫と何%の相同性があるのかを解析することが可能です。

*1 ミトコンドリア DNA

DNA は生物の細胞に存在しています。特に、細胞内小器官であるミトコンドリアの DNA の特定領域には、共通保存領域と呼ばれる、各動物種で塩基配列の類似している領域があります。また、ミトコンドリア DNA については多くの機関で研究がされていて、各動物種の塩基配列の情報がインターネット上で公開されています。

*2 BLAST 検索

NCBI (National Center for Biotechnology Information : アメリカ国立バイオテクノロジー情報センター) のホームページには膨大なデータベースが公開されており、各種解析に使用することができます。シーケンサを用いて得られた DNA 配列を BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索で照合することにより、既知の DNA 配列との相同性を解析することができます。

相同性解析の結果例

形状・形態観察等によって種が同定されており，食品中に異物として発見されることが多い虫について上記の解析を行い，結果を表-1 に示しました。

表-1 BLAST 検索による相同性解析結果

種	BLAST 検索の結果(相同性一致率)
クロゴキブリ	クロゴキブリ(213/213 bp, 100%)，コモンゴキブリ(202/213 bp, 94%)，トビイロゴキブリ(188/213 bp, 88%)
セイヨウミツバチ	セイヨウミツバチ(163/163 bp, 100%)，ニホンミツバチ(147/158 bp, 93%)，クロヒメミツバチ(144/158 bp, 91%)
ニクバエ	ハナバチノストリニクバエ(202/202 bp, 100%)，ケブカクロハエ(185/199 bp, 92%)，ヒツジキンハエ(185/199 bp, 92%)
ショウジョウバエ	キロショウジョウバエ(203/203 bp, 100%)，セイエルショウジョウバエ(189/201 bp, 94%)，モリシヤスショウジョウバエ(189/203 bp, 93%)
コナガ	コナガ(167/167 bp, 100%)
アカイエカ	アカイエカ(166/166 bp, 100%)，コナタアカイエカ(165/166 bp, 99%)，ヤマダオカ(164/166 bp, 98%)

bp : 塩基対数

表-1 に示した，クロゴキブリ，セイヨウミツバチ，ニクバエ，ショウジョウバエ，コナガ及びアカイエカについては，種名が完全に(100%)一致しました。

さらに，クロゴキブリ，セイヨウミツバチ，ニクバエ及びショウジョウバエについては，近縁の種と相同性の大きな差異を得ることができました。

なお，今回は 15 種類の虫について検討しましたが，解析することができたのは 6 種類でした。

おわりに

DNA 解析には問題点がいくつかあります。一つは，DNA が高温による加熱や加圧，炭化，発酵によって分解・断片化されやすいことです。しかし，加工度によっては解析可能な場合もあります。また，ヒトの手が触れている等，他の動物種とのコンタミネーションが起こっていると，解析困難になることがあります。この場合は，抽出前に洗浄を行うことにより，コンタミネーションをある程度防ぐことができます。

さらに，相同性の結果例より，ゴキブリ，ハチ，ハエ，カ及びガといった主要な虫については，DNA を用いて種を同定できたものの，解析できた例数は全体の 4 割ほどでした。これは，解析する DNA の領域がまだ少ないことがその理由です。

DNA を用いた虫の同定試験は，まだ緒に就いたばかりであり，同定可能な虫の種類も限られたものです。今後の課題として，解析領域の拡大について検討を加え，解析可能な虫の種類を増やしていきたいと考えております。

参考資料

- Simon., et al. :Ent Soc Am, **94**, 651-701(1994)
- Parker, A., et al. :Genome, **39**, 793-797(1996)
- Kambhampati, S., et al. :Insect Molecular Biology, **4**(4), 233-236(1995)
- 村上史一ら：第 96 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集，p. 77(2008)