

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20605

研究課題名（和文）免疫測定法による「田んぼの生きもの」の新たな簡易調査法

研究課題名（英文）New Survey Method of Aquatic Organisms in Paddy Areas by Immunoassay

研究代表者

渡部 恵司（Watabe, Keiji）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門・上級研究員

研究者番号：50527017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：水田水域（水田や農業用水路、ため池等）の水に含まれる水生生物由来のタンパク質の検出方法を検討した。イムノクロマト法による魚類および甲殻類の検出キットと数種の水生生物との反応の有無を明らかにし、異なる希釈倍率での試験により10ppm程度まで検出しうることを明らかにした。また、ドット・プロット法・ホールマウント染色法により、海産イガイ類の幼生を基に作出された抗体がカワヒバリガイの検出に利用できることを明らかにし、カワヒバリガイを検出可能なイムノクロマト検出キットを試作した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定外来生物に指定されるカワヒバリガイの早期検出に向けて、本成果は、現地で簡易に検出できる方法として応用が期待される。これに向けて、感度の向上や種特異性の検討、サンプリング方法の最適化などが更なる課題として挙げられる。

魚類検出キットおよび甲殻類検出キットは、水田水域で採食する高次捕食者（トキやコウノトリ、サギ類等）の餌資源の指標として活用しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A method for detecting proteins derived from aquatic organisms contained in the water of paddy areas (paddy fields, agricultural canals, reservoirs etc.) were investigated. The presence or absence of reactions between several species of aquatic organisms and immunochromatographic kits for fish and crustaceans were clarified, and it is demonstrated that the detection kits are possible to detect up to about 10 ppm by testing at different dilution ratios. In addition, it is demonstrated that antibodies produced based on marine mussel larvae can detect golden mussels (*Limnoperna fortunei*) using the dot blot method and whole-mount immunostaining method, and a prototype immunochromatographic detection kit capable of detecting the golden mussels was developed.

研究分野：農村環境工学

キーワード：イムノアッセイ 田んぼの生きもの調査 水生生物 農業水路

1. 研究開始当初の背景

水田水域（水田や農業用水路、ため池等）での生物調査（田んぼの生きもの調査）は、研究者や行政機関によって行われるだけでなく、いまや地域のイベントや小・中・高等学校の環境学習・部活動などの様々な場面で行われている。これらの調査活動の中で、捕獲による生物の死傷や踏み荒らしによる環境破壊を防ぎたい、あるいは危険なカミツキガメなどの生息を安全に調べたい、小さくて発見の難しいカワヒバリガイなどの外来生物を数の少ない侵入初期に発見したいといった理由から、捕獲によらない間接的・高感度な生物調査法の開発が望まれている。

捕獲によらない生物調査法として、環境 DNA 分析法の研究が注目されている。この方法では、採水サンプルに含まれる DNA を抽出・分析し、生物種の在否や多寡を推定する。現場作業が採水だけでよく、検出力が高い反面、分析作業には高額な機材や高度な手技、分析時間を要し、分析を外注する場合の費用も高い。これに対して本研究では、DNA ではなく、検出がより容易な生物由来のタンパク質をターゲットとして、免疫測定法（イムノアッセイ）により生物種の在否や多寡を推定できないかと考えた。免疫測定法は、抗原抗体反応を利用した微量物質や微小物質の検出技術であり、医療や農業、食品などの分野で利用されている。この測定法の適用により、例えばインフルエンザの検査キットのように、水田水域に生息する水生生物を簡易に検出できることが期待される。

2. 研究の目的

水田水域の水に含まれる水生生物由来のタンパク質を免疫測定法により検出し、対象生物種の在否・多寡の推定可能性を探求することを目的とした。具体的には、(1) 食品中のアレルギー物質（アレルゲン）検査用に市販されている魚類および甲殻類のイムノクロマト検出キット（図 1）を水田水域に生息する生物に適用し、これらのキットで検出可能な種を明らかにし、(2) 水田水域に生息する淡水二枚貝を検出する新たな方法を検討した。

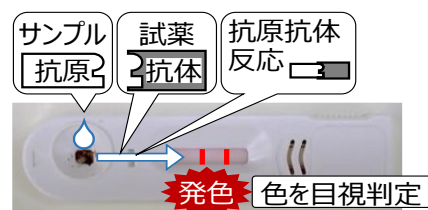


図 1 イムノクロマト法のイメージ。インフルエンザの検査等に用いられしており、簡単な操作で、10 分程度で結果判定できる。

3. 研究の方法

(1) 魚類・甲殻類の既存キットの水田水域への適用

魚類検出キット（Hygiena 社 AlerTox Sticks Fish Kit）および甲殻類検出キット（プリマム社 アレルゲンアイクイック甲殻類）と水田水域に生息する生物サンプルとの反応の有無を検討した。対象種は、魚類（メダカ、ドジョウ、モツゴ、ヨシノボリ類）、両生類（ニホンアカガエル幼生、アズマヒキガエル幼生）、甲殻類（スジエビ類、アメリカザリガニ）、貝類（タイワンシジミ）、昆虫類（コオイムシ成虫、ハイイロゲンゴロウ成虫）とし、いずれも茨城県内で採集した。①各個体の全部または一部をすり潰し、②蒸留水で 100 倍に希釈し、③溶液 3g と緩衝液 3g を混和し、④検出キットで発色の有無を確認した。

魚類検出キットとモツゴのサンプル、および甲殻類検出キットとアメリカザリガニのサンプルの組み合わせについては、さらに希釈倍率を変えて試験し、検出可能な濃度を把握した。

(2) 貝類を対象とした検出法の検討

水田水域に生息する淡水二枚貝と、海産イガイ類の幼生を基に作出された既存の抗体（例えば太田ら 2012）との反応の有無を、ドットプロット法により検討した。ドットプロット法は、ろ紙の上に抗原・抗体・色素を滴下して反応させ、発色を確認する方法である。対象種は、茨城県内で採集したカワヒバリガイ、ヌマガイおよびタテボシガイの幼生・成貝および青森県内で採集したイケチョウガイの幼生・成貝とした。抗体には、11 種類のマウスモノクローナル抗体（Ab1～Ab4：抗ムラサキイガイ附着期幼生抗体、Ab5～Ab7：抗マガキ附着期幼生抗体、Ab8～Ab11：ミドリイガイ附着期幼生抗体）を用いた。

また、ドットプロット法で発色が確認された抗体とサンプルの組み合わせについて、ホールマウント染色法により、夾雑物と反応していないかどうかを確認した。ホールマウント染色法は、細胞組織ごと抗体・色素と反応させ、染色の状態を確認する方法である。

4. 研究成果

(1) 魚類・貝類の既存キットの水田水域への適用

魚類検出キットについては、魚類（4 種）は明瞭に発色、貝類（1 種）は発色なし、両生類（2

種)・甲殻類(2種)・水生昆虫(2種)は明瞭〜かすかに発色するケースと発色しないケースがあった(表1)。一方、甲殻類検出キットについては、甲殻類は明瞭に発色、魚類・両生類・貝類は発色なし、水生昆虫類は明瞭またはかすかに発色するケースがあった(表1)。

表1 魚類・甲殻類の検出キットによる発色結果(数字は検体数)

対象種(検体数)	魚類キット			甲殻類検出キット		
	+	±	-	+	±	-
魚類						
ドジョウ(4)	4	0	0	0	0	4
モツゴ(6)	6	0	0	0	0	6
メダカ(4)	4	0	0	0	0	4
ヨシノボリ類(5)	5	0	0	0	0	5
両生類						
ニホンアカガエル幼生(4)	0	0	4	0	0	4
アズマヒキガエル幼生(4)	0	1	3	0	0	4
甲殻類						
スジエビ属(4)	0	0	4	4	0	0
アメリカザリガニ(3)	0	1	2	3	0	0
貝類						
タイワンシジミ(4)	0	0	4	0	0	4
昆虫類						
コオイムシ成虫(4)	1	1	2	3	1	0
ハイロゲンゴロウ成虫(4)	0	2	2	0	4	0

+: 明瞭に発色。±: かすかに発色。 -: 発色なし。

また、魚類検出キットとモツゴのサンプル、および甲殻類検出キットとアメリカザリガニのサンプルの組み合わせについて、希釈倍率を変えて発色の有無を確認したところ、モツゴおよびアメリカザリガニともに、 10^4 倍(100ppm)までは発色が明瞭であったが、 10^5 倍(10ppm)ではかろうじて目視で確認できる程度となり、 10^6 倍(1ppm)では発色が確認できなかった。このことから、両検出キットで検出可能な濃度は 10^5 倍(10ppm)程度と考えられた。

(2) 貝類を対象とした検出法の検討

ドットプロット法の結果、4種類の抗体(ムラサキガイ: Ab2、Ab3。ミドリイガイ: Ab10、Ab11)が、カワヒバリガイと反応した一方、いずれの抗体もイケチョウガイ、ヌマガイおよびタテボシガイとは反応しなかった(表2)。

表2 ドットプロット法による判定結果

	Ab1	Ab2	Ab3	Ab4	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8	Ab9	Ab10	Ab11
ヌマガイ幼生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
タテボシガイ幼生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
カワヒバリガイ幼生	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
イケチョウガイ幼生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
カワヒバリガイ成体 開殻すすぎ液	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
カワヒバリガイ成体足	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
イケチョウガイ成体足・外套膜	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: 反応あり、-: 反応なし。

次に、ホールマウント染色法により、4種類およびネガティブコントロール1種類の抗体とカワヒバリガイの幼生・成貝との反応を可視化した。この結果、上記の4種類の抗体についてはカワヒバリガイ幼生・成貝が染色され(図2)、これらの抗体がカワヒバリガイと反応することが確かめられた。

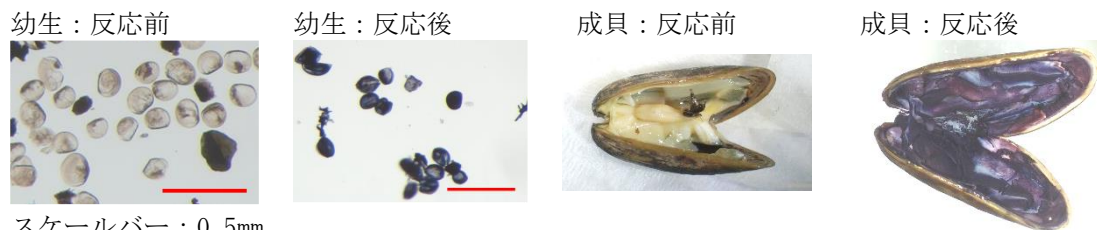


図2 ホールマウント染色法によるカワヒバリガイの発色状況の例(抗体はAb2)

このうち2種類の抗体を選定し、免疫クロマト法によるカワヒバリガイの検出キットを試作した。カワヒバリガイ幼生の冷凍個体約10個体を緩衝液0.2g中で粉碎した溶液について、検出キットに滴下したところ、やや薄いものの発色が確認され、試作した検出キットはカワヒバリ

ガイ幼生の検出に活用できると考えられた。

(3) 成果の活用可能性と今後の課題

カワヒバリガイは特定外来生物に指定され、現在 12 都府県の湖沼や河川、農業用ため池等への侵入が確認されており、取水口やパイプラインの通水障害、吸虫類の中間宿主となることによる漁業被害が問題となっている。カワヒバリガイの幼生は 0.1mm 程度と微小なため顕微鏡でないと有無を判別できないが、本研究成果のようなイムノクロマト検出キットにより検出可能と考えられる。カワヒバリガイの幼生密度は、例えば霞ヶ浦において多い時期で 600 個体/m³ 以上 (2013~2017 年の平均値) である (農研機構 2022)。このため、数 ml の採水サンプル中には幼生が含まれる可能性は極めて低いものの、例えば①現地の水 100L 程度をろ過、あるいはプランクトンネットで捕集、②ろ物を緩衝液中で粉碎、③溶液を検出キットに滴下して発色を確認することにより (図 3)、カワヒバリガイ幼生の有無を簡易に確認できると考えられる。残された課題として、①カワヒバリガイ幼生をより高感度に検出できる抗体の検討、②イシガイ類以外の貝類 (シジミ類やタニシ類など) を誤検出しないかどうかの確認、③水域の特性 (流水/止水、水質、夾雑物の多寡等) に応じた最適なサンプリング方法の検討、④環境 DNA 分析等の他の調査法との結果比較などが挙げられる。

魚類検出キットおよび甲殻類検出キットは、水田水域に生息する生物のうち魚類・甲殻類以外の種とも反応したことから、それぞれの生物群の特異的な検出には適さないものの、水田水域で採食する高次捕食者 (トキやコウノトリ、サギ類等) の餌資源の指標に活用しうると考えられる。例えば、①水田の排水や水路の水をろ過し、②ろ物を緩衝液中で粉碎、③溶液を検出キットに滴下して発色を確認する方法が想定される。

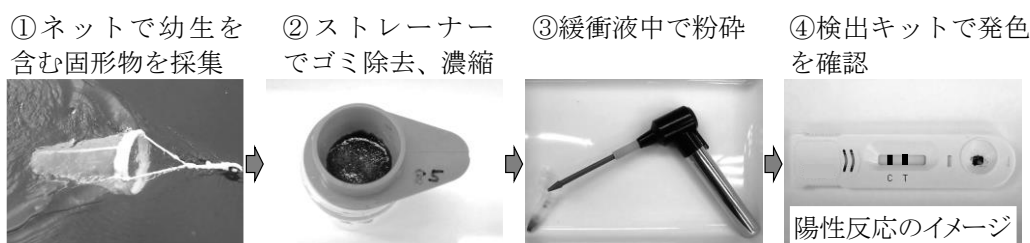


図 3 カワヒバリガイ幼生の検出法のイメージ

引用文献

- ①太田真紀, 中木舞, 神谷享子, 山下桂司, 柳川敏治, 川端豊喜 (2012) : 海産付着動物幼生の迅速検出・定量システムに関する研究開発, マリンエンジニアリング, 47(5), 670-674.
- ②農研機構 (2022) : カワヒバリガイ対策を目的とした貯水池の侵入検知及び落水標準作業手順書—公開版—.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------