

令和 4 年 6 月 9 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：2019～2021

課題番号：19K23698

研究課題名（和文）形態変化プロファイリングと核酸の分解程度による食品害虫の侵入・死亡時期推定

研究課題名（英文）Estimation of food pest invasion period and death time using morphological changes profiling and nucleic acid degradation degree

研究代表者

松元 咲樹（Matsumoto, Saki）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・研究員

研究者番号：80846965

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）：本課題は、食品害虫の形態変化プロファイルおよび核酸の残存量による侵入・死亡時期の推定を目指すものである。流通工程を想定した落下試験を行い、落下衝撃による害虫形態の破損程度を調査した。害虫から生成された破片数、体表に生じた亀裂が、落下高さと同相関があった。破片数、亀裂の害虫破損指標としての可能性が見出された。また、死後日数に伴い分解していく核酸を量的に比較した。その結果、殺虫方法、死後経過時間により分解程度が異なることが明らかになった。侵入・死亡時期推定法の開発に資する成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品流通において害虫が発見された際、専門機関（企業、公的機関）において食品表示や保管状況、害虫が発見された系などの情報と種同定の結果から混入時期を推定している。しかし得られる情報の制限によって混入時期が推定できないケースが3割程度あることが報告されている。本課題の学術的意義は、害虫の形態変化プロファイリングによる、これまで用いられなかった新しい指標を提示したことにある。害虫混入に関する状況判断に新しい選択肢をもたらしたことは、社会的に大きな意義を有している。

研究成果の概要（英文）：This project aims to estimate the timing of invasion and death of pest insects based on their morphological change and the amount of nucleic acid remaining. Drop tests were conducted to evaluate the damage to insect morphology caused by drop shock. The number of fragments produced and the cracks on the body surface were correlated with the drop height. The number of fragments and cracks were found to be potential indicators of insect damage. Quantitative comparison of nucleic acids degrading with the time elapsed after death was also conducted. It was found that the degree of degradation varied depending on the insecticidal method and the time elapsed after death.

研究分野：食料工学

キーワード：異物混入 食品害虫 破損指標 核酸残存量

1. 研究開始当初の背景

食品流通中に害虫が混入した場合、さらなる被害を予防するために侵入時期や経路の特定が必要である。混入した害虫は、積荷の中継時などにおける荷扱いなどの衝撃により、破損した状態で見つかることがある。害虫の破損状況から害虫が受けた衝撃の履歴を引き出せれば、混入時期や場所の特定につながる可能性がある。

また、混入害虫が死んだ状態で見つかった場合、死虫に存在する核酸は、分解酵素の働きによって、あるいは分子そのものの安定性の喪失により分解する。残存する核酸は死亡経過時間や、死に至った条件や死虫保管環境などにも影響を受けると考えられる。そこで死亡条件や保管環境等を変えた条件での核酸分解程度を解析することで、死亡時期の推定作業に利用できる可能性がある。

現状では、害虫の混入が起こった場合、民間の衛生関係企業や公的機関などにおいて同定作業が行われる。食品表示や保管状況、害虫が発見された経緯などの情報と種同定の結果から混入時期を推定している。一方、害虫混入事例のうち、得られる情報の制限によって混入時期が推定できないケースが3割程度あることが報告されている。

本課題は、落下衝撃を与えた際の形態変化プロファイルおよび核酸の残存量による侵入・死亡時期の推定法の開発を目指す。侵入・死亡時期の推定作業を通じて、侵入経路を予測し、食品流通における害虫リスク対応に寄与する。

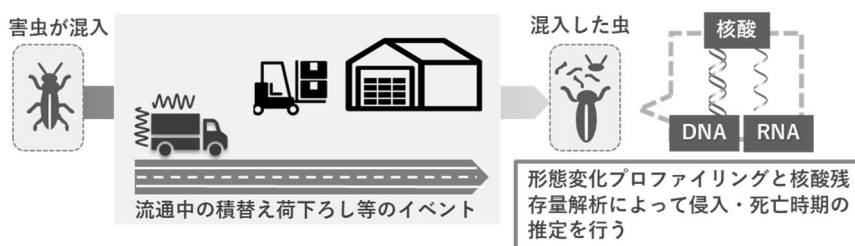


図1 本課題の概要

2. 研究の目的

本課題の目的は、貯穀害虫形態の損傷程度による侵入タイミング推定と、核酸残存量による死亡時期推定の新規手法の検討である。流通・貯蔵工程において害虫が発見された場合には素早い発生源の特定が必要であるが、現状は侵入経路が解明できないケースも多い。食品製造工程に至るまで、長期間振動を伴う移動や、積み替えや荷下ろしの衝撃に晒されることを利用し、昆虫形態のプロファイリングを行い衝撃による変化を調査する。また、死後徐々に分解されていく核酸の残存量に着目し、死虫の経時的な核酸残存量の変化を調査する。

3. 研究の方法

(1) 形態変化プロファイリング

流通過程中の衝撃を落下試験機で再現し、箱の中で押しつぶされた際に生じる破片を評価した。供試虫はコクヌストモドキ *Tribolium castaneum*、コクゾウムシ *Sitophilus zeamais* の成虫を用いた。試験条件は、生存および死後1日、1か月後の3条件であった。落下試験機を用いて、虫が入った箱(図2)を0.2、0.4、0.6、0.8 mから1回落とし、落下高さ毎の破片数について顕微鏡写真を用いて解析した。

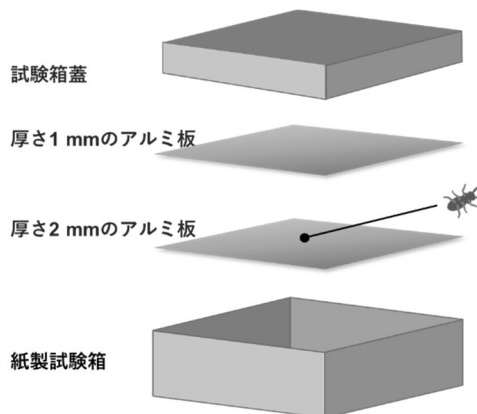


図2 落下試験用試験箱

(2) 核酸残存量の調査

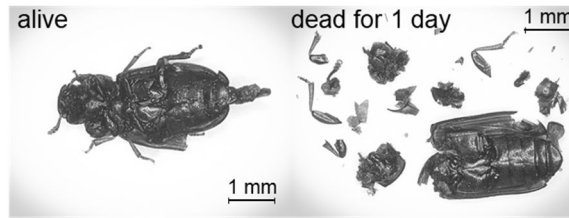
核酸の死後経過時間による残存量を調査するため、全RNA量を蛍光光度計により測定した。また数種の遺伝子についてリアルタイム定量PCR法により発現解析を行った。供試虫はコクヌストモドキを用い、流通・加工工程で想定される複数の死因を検討した。1個体からDNAとRNAを分別して調製し、死後日数に伴う残存量の変化を定量PCR法により解析した。

4. 研究成果

(1) 形態変化プロファイリング

落下試験後の破片数について計測した。落下衝撃により1個体から生成される破片数は、衝撃を受けたときの昆虫の生死に依存することがわかった(図3)。

(a) *Tribolium castaneum*



(b) *Sitophilus zeamais*

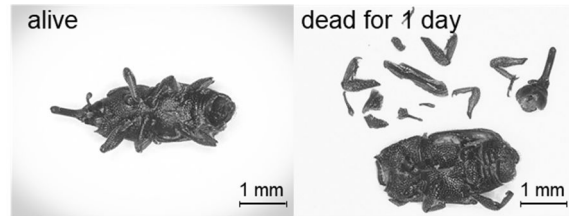


図 3 (a) コクヌストモドキ *T. castaneum* , (b)コクゾウムシ *S. zeamais* の落下高さ 0.8 m から落としたときの顕微鏡写真．左側が生きている状態で落下した個体．右側が死後 1 日後に落下した個体 (Matsumoto et al., 2022) ．

落下衝撃を受けるときに生きていた個体では、破片は生成されにくく (図 4a), 落下高さとの相関がなかった．一方、死後に落下衝撃を与えると、落下高さが高くなるにつれ、破片数も増加していた (図 4b)．破片数を解析することで、害虫が受けた落下衝撃の大小を推定できる．害虫混入がみられた食品の流通経路が明らかであれば、流通経路における荷下ろしや積替えなどの落下衝撃が起こるポイントと害虫の形態損傷の情報を照らし合わせることで、食品の流通中に混入した害虫の混入時期の簡易推定に応用できる．

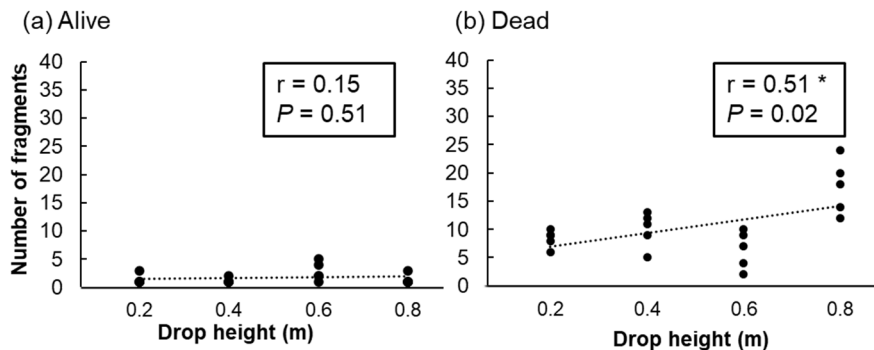


図 4 コクヌストモドキの(a) 生存虫, (b) 死虫を各落下高さから落としたときの破片数．図中の*は有意水準 5% で差があることを示す (Matsumoto et al., 2022) ．

(2) 核酸残存量の調査

死虫に残存している核酸の量的な経時変化を調査するために、蛍光光度計により一頭あたりに抽出された全 RNA 量の測定を行った (図 5)．全 RNA 量は死後経過時間に伴って減少する傾向にあった．ただし、分解した RNA をどれほど含むのかは手法の特性上測定できない．そこで定量 PCR 法を検討し、数種の遺伝子を選定し残存量マーカーとした．その結果、死後時間に伴う DNA と RNA の分解速度はそれぞれ異なることを明らかにした．食品の加工過程で想定される、加熱や低温などの死亡条件についても検討を行い、死亡条件によって遺伝子の分解程度が異なることを確認した．この結果から、RNA の残存量によって死亡直後から死後 2 日以上経過を推定できる可能性が示唆された．

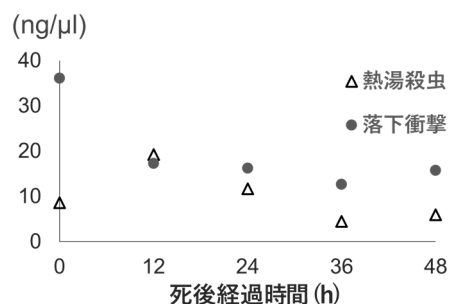


図 5 蛍光光度計による全 RNA 量の測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Saki, Kitazawa Hiroaki, Nagata Masayasu, Miyanoshita Akihiro	4. 巻 95
2. 論文標題 Effects of drop shock on fragmentation of two stored grain pest species, <i>Tribolium castaneum</i> and <i>Sitophilus zeamais</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Stored Products Research	6. 最初と最後の頁 101916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jspr.2021.101916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松元咲樹, 北澤裕明, 永田雅靖, 宮ノ下明大	4. 巻 12
2. 論文標題 落下衝撃によるコクゾウムシとコクヌストモドキの前胸背板に生じた亀裂の解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 都市有害生物管理	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Matsumoto Saki, Kitazawa Hiroaki, Nagata Masayasu, Miyanoshita Akihiro
2. 発表標題 Structural damage analysis of the contaminating insects subjected to drop shock
3. 学会等名 The 23rd Packaging World Conference, IAPRI Bangkok 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松元咲樹, 北澤裕明, 宮ノ下明大, 永田雅靖
2. 発表標題 食品害虫の死亡時期推定に向けた定量PCRによるRNAの死後残存量の調査
3. 学会等名 第65回 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元咲樹, 北澤裕明, 永田雅靖, 宮ノ下明大
2. 発表標題 落下衝撃により生じた貯穀害虫の破損程度(前胸背板のき裂)評価
3. 学会等名 2021年 農業施設学会学生・若手研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元咲樹, 北澤裕明, 永田雅靖, 宮ノ下明大
2. 発表標題 落下衝撃による貯穀害虫の虫体破損特性
3. 学会等名 2020年 農業施設学会学生・若手研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元咲樹, 北澤裕明, 宮ノ下明大, 永田雅靖
2. 発表標題 貯穀害虫の死亡時期推定に向けた死後のDNAおよびRNA分解程度の経時的変化
3. 学会等名 第64回 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------