

## SGF-LAMP 法によるスクミリンゴガイ環境 DNA の検出

鈴木良地<sup>1)</sup>・恒川健太<sup>1)</sup>・水上優子<sup>1)</sup>

**摘要** : 侵略的外来生物のスクミリンゴガイについて、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)を利用した環境DNA分析法を開発した。目詰まりし難く、ろ過処理が容易なsuspended glass fiber (SGF)法を用いて水田の田面水から環境DNAを濃縮した後、核酸増幅阻害物質の影響を受けにくい遺伝子解析法であるLAMP分析により、田面水に含まれるスクミリンゴガイの環境DNAを検出できた。県内の35か所の水田で行った野外調査では、スクミリンゴガイの生息が目視で確認できた13か所のうち、8か所からスクミリンゴガイの環境DNAが検出された。

**キーワード** : 環境 DNA、水田、スクミリンゴガイ、SGF-LAMP

## Detection of Environmental DNA from the Apple Snail *Pomacea canaliculata* using the SGF-LAMP Method

SUZUKI Ryoji, TSUNEKAWA Kenta, and MIZUKAMI Yuko

**Abstract**: An environmental DNA detection method using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) analysis was developed for the apple snail *Pomacea canaliculata*, an invasive alien species. DNA was filtered and concentrated using the suspended glass fiber (SGF) method, which helps easily filter the DNA and does not clog the paddy field water, and was combined with LAMP analysis, a genetic analysis method that is less susceptible to the effects of nucleic acid amplification inhibitors. This SGF-LAMP method can detect environmental DNA of apple snails in paddy field waters.

**Key Words**: Environmental DNA, Paddy fields, *Pomacea canaliculata*, SGF-LAMP

---

本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「農業被害をもたらす侵略的外来種の管理技術の開発」JPJ007966により実施した。

<sup>1)</sup>環境基盤研究部

(2023.9.8受理)

## 緒言

スクミリンゴガイ(*Pomacea canaliculata*)は、俗名ジャンボタニシとも呼ばれ、南米原産のリンゴガイ属の巻貝である。日本では、1980年代に食用のために輸入された後に野生化し、雑食性かつ食欲が旺盛で特に生育初期のイネを好むことから、水稲作にとって深刻な問題となっている<sup>1,2)</sup>。同様に日本に侵入・定着している同属のラプラタリンゴガイ(*P. maculata*)が低温や乾燥に弱く、生息域が限られているのに対して、スクミリンゴガイは関東以南の水田や水路に広く定着している<sup>1,3,4)</sup>。スクミリンゴガイの駆除対策は、石灰窒素散布やロータリー耕うん、水路での産卵抑制など、数多くの試みがなされている<sup>2,5,6)</sup>。しかし、一旦定着した水田から根絶することは困難であり、被害を軽減または予防するためには、侵入初期の個体数が少ない段階で対処することが重要である<sup>2)</sup>。こうした侵略的外来種の侵入初期における生息状況の把握には環境DNA分析技術が有効であるが<sup>7,8)</sup>、スクミリンゴガイについてはそうした技術は開発されていない。その最大の要因として、スクミリンゴガイが主に生息する水田の水(以下、田面水)からのDNA抽出が困難なことが考えられる。水試料からの環境DNAの抽出は、環境DNA学会で公開している「環境DNA調査・実験マニュアル」<sup>9)</sup>が標準的な方法である。この方法は、緻密なガラス繊維ろ紙を用いて水試料を吸引ろ過した後ろ紙からDNAを抽出するものである。しかし、田面水のような土壤粒子や有機物を多く含む水の場合は、ろ過時にガラス繊維ろ紙が目詰まりしやすく、ろ過処理が困難な場合が多い<sup>10)</sup>。

そこで本研究では、浮遊物の多い水でもろ過処理が可能な環境DNAろ過濃縮法(Suspended Glass Fiber method 以下、SGF法)<sup>11)</sup>を利用し、田面水に含まれる環境DNAの抽出を試みた。また、SGF法で抽出した環境DNA(以下、SGF-eDNA)の分析は、標準的なqPCR法だけではなく、より簡易な装置で遺伝子診断が可能なloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法での分析が適していることから<sup>11)</sup>、本研究ではqPCR法ではなくLAMP法によりスクミリンゴガイの環境DNA検出を行った。さらに開発した手法を用い、県内の35か所の水田においてスクミリンゴガイの生息調査を行うとともに、SGF法とLAMP法を組み合わせたSGF-LAMP法による

環境DNA分析を行い、有効性を検証した。

## 材料及び方法

### 1 SGF-eDNAの抽出

Suzuki et al (2023)<sup>11)</sup>に従い、懸濁態のガラス繊維(GA-55、アドバンテック、東京)(以下、SGF)10mgと田面水1Lを、1.8Lのパウチパック(マルエム、大阪)内で混合し、直ちに0.18 mmの目合いのナイロンメッシュに重ろ過または吸引ろ過した。ナイロンメッシュ上のSGFをカラムフィルター(Filter Column、FAFTC-C50、FAVORGEN、台湾)を内蔵した1.5mLチューブに回収し、MightyPrep reagent for DNA (タカラバイオ、草津)を100  $\mu$ Lを加え、95°Cで10分間熱処理した。その後、3000 rpmで3分間遠心分離を行い、カラムフィルターを取り外した。得られたろ液を15000 rpmで2分間遠心し、上清をSGF-eDNA試料とし、分析に用いるまで-30°Cで保存した。

### 2 LAMPプライマーの設計およびLAMP分析

日本に分布するスクミリンゴガイはCOI配列からAおよびBの2つのグループに分けられる<sup>12)</sup>。このうち本研究では、グループAのミトコンドリアCOI塩基配列(GenBank Accession No. AB433761)を基に、LAMP法プライマー設計支援ソフトウェアPrimerExplorer ver. 5(栄研化学、東京)を用いてLAMPプライマーPc7を設計した(表1)。また、スクミリンゴガイのグループB(AB433762)、同属のラプラタリンゴガイ(AB433781)、水田に生息するマルタニシ(*Cipangopaludina chinensis laeta*、LC028526)、ヒメタニシ(*Sinotaia quadrata histrica*、LC028491)およびオオタニシ(*Cipangopaludina japonica*、LC028538)の配列と比較した(図1)。

LAMP反応液は、20 mM Tris-HCl (pH8.8)、10 mM KCl、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Tween 20、0.8 M ベタイン(富士フイルム和光、大阪)、8 mM MgSO<sub>4</sub>、1.4 mM dNTPs、各0.2  $\mu$ M F3およびB3プライマー、各1.6  $\mu$ M FIPおよびBIPプライマー、各0.8  $\mu$ M FloopおよびBloopプライマー、8ユニット*Bst*ポリメラーゼ(ニッポンジーン、東京)を混合した。さらに1  $\mu$ LのDNA抽出液を加えて、全量を20  $\mu$ Lとした。リアルタイム濁度測定装置LoopampExia(栄研化学、東京)を用いて65°Cで

表1 スクミリンゴガイ検出用のLAMPプライマー

プライマー名	配列 (5' - 3')
Pc7	F3 AGGTTTAAGTTTACTTATTCGTG
	B3 TAATAATAGTAATAGAGAAGGTGGT
	FIP GACAAAAGCATGAGCTGTAACAAT-CTGAATTAGGTCAGCCTGGTG
	BIP ACCTATAATAATTGGTGGATTTGGT-ATTAAGACGCGGAAAAGCC
	Floop AGCTGATCATCTCCTAGTAAAG
	Bloop AATACTAGGAGCTCCTGACAT



表2 LAMPプライマーPc7の特異性試験に供試した巻貝類

個体 No.	種名	採取日	採取地	LAMP 閾値時間 (Tm 値) <sup>1)2)</sup>
12	スクミリンゴガイ	2019.9.24	豊川市八幡町	13.2 (81.9)
13	スクミリンゴガイ	2019.9.24	豊川市八幡町	13.5 (81.9)
14	スクミリンゴガイ	2019.9.24	豊川市八幡町	13.9 (81.9)
275	マルタニシ	2020.7.29	安城市榎前町	-
276	マルタニシ	2020.7.29	安城市榎前町	-
277	マルタニシ	2020.7.29	安城市榎前町	-
278	マルタニシ	2020.7.29	安城市榎前町	-
272	ヒメタニシ	2020.7.29	豊田市堤町	-
273	ヒメタニシ	2020.7.29	豊田市堤町	-
274	ヒメタニシ	2020.7.29	豊田市堤町	-
354	オオタニシ	2020.9.18	長久手市茨ヶ廻間	-
355	オオタニシ	2020.9.18	長久手市茨ヶ廻間	-

- 1) -記号は非検出を示す  
2) 閾値時間の単位は分、Tm値は°Cを示す

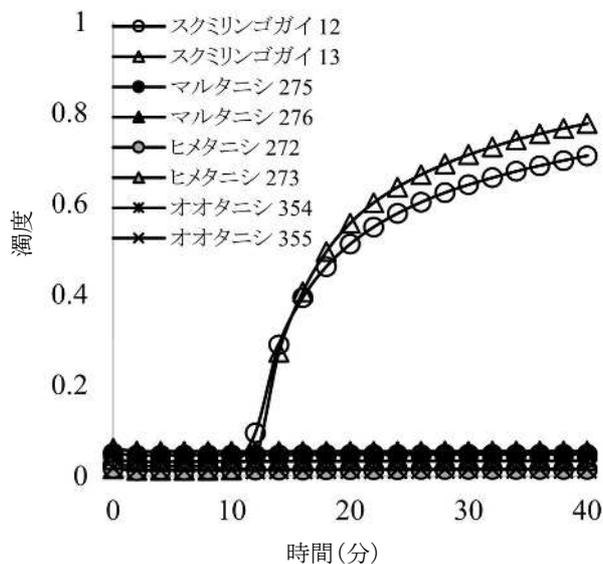


図2 LAMPプライマーPc7の特異性  
各種2個体の反応曲線を抜粋した

を用いてLAMPプライマーPc7の特異性を検定した結果を表2および図2に示した。スクミリンゴガイは閾値時間が約14分以内で全て反応したのに対し、マルタニシ、ヒメタニシおよびオオタニシは反応しなかった。本研究ではラプラタリンゴガイは供試しなかったが、Pc7の各プライマーのアニーリング部位において、増幅反応に強い影響を及ぼすF1cおよびB1cプライマーの5'末端、またはF3、F2、B3およびB2プライマーの3'末端からそれぞれ5塩基目までの配列のうち<sup>13,14)</sup>、F1cおよびB1cプライマーの5'最末端から1塩基目、B2プライマーの3'

表3 LAMPプライマーPc7の検出感度

1 反応当 たりの DNA コピ ー数	LAMP 閾値時間 (Tm 値)		
	1 回目	2 回目	3 回目
0	-	-	-
1	-	23.7 (81.8)	26.8 (81.8)
5	23.3 (81.9)	22.1 (81.8)	23.2 (81.7)
10	-	24.8 (81.7)	21.7 (81.7)
50	18.7 (81.8)	19.7 (81.8)	18.8 (81.9)
100	17.8 (82.0)	18.3 (81.9)	18.3 (81.8)
500	15.2 (81.8)	16.7 (81.8)	16.2 (81.8)
1000	16.0 (81.8)	15.8 (81.9)	16.3 (82.0)

- 1) -記号は非検出を示す  
2) 閾値時間の単位は分、Tm値は°Cを示す

最末端から1塩基目およびB3プライマーの3'最末端から4塩基目にミスマッチ配列があることから(図1)、Pc7によりラプラタリンゴガイのDNAが増幅する可能性は低いと考えられた。本研究で採取したスクミリンゴガイ個体のグループは不明だが、グループAおよびグループBで、Pc7の増幅に影響する各プライマーの5'末端または3'末端から5塩基目までの配列内にミスマッチがないことから(図1)、Pc7はいずれのグループのスクミリンゴガイも検出可能と考えられた。Pc7の適用性に

表4 スクミリンゴガイの環境DNA調査のまとめ

水田 No.	調査地	調査日	採水試料	スクミリンゴガイ 生息状況 <sup>1)</sup>	SGF-LAMP	
					判定 <sup>2)</sup>	閾値時間 (Tm 値) <sup>3)</sup>
1	豊橋市寺沢	2020/9/8	田面水	-	+	25.6 (81.8)
2	豊橋市寺沢	2020/9/8	田面水	+	+	20.0 (81.8)
3	豊橋市寺沢	2020/9/8	田面水	-	-	-
4	豊橋市寺沢	2020/9/8	田面水	-	-	-
5	岡崎市桑谷	2020/8/29	田面水	-	-	-
6	岡崎市桑谷	2020/8/29	田面水	-	-	-
7	岡崎市桑谷	2020/8/29	田面水	-	-	-
8	岡崎市桑谷	2020/8/29	田面水	-	-	-
9	岡崎市桑谷	2020/8/29	田面水	-	-	-
10	豊川市萩	2020/8/1	田面水	+	+	22.5 (81.4)
11	豊川市萩	2020/8/28	収穫後の残水	-	+	25.0 (81.0)
12	豊川市萩	2020/8/28	収穫後の残水	-	+	19.8 (81.7)
13	豊川市御津	2020/9/8	田面水	+	-	-
14	豊川市御津	2020/9/8	田面水	-	+	23.7 (81.5)
15	豊川市御津	2020/9/8	田面水	-	-	-
16	豊川市平尾	2020/8/1	田面水	+	+	16.1 (81.9)
17	豊川市平尾	2020/8/29	田面水	+	+	19.1 (81.5)
18	豊川市麻生田	2020/8/1	田面水	+	+	21.4 (81.3)
19	豊川市国府	2020/8/1	田面水	+	+	20.0 (81.6)
20	豊川市野口	2020/8/1	田面水	+	+	17.3 (81.8)
21	安城市榎前	2020/9/11	田面水	+	-	27.6 (-)
22	安城市榎前	2020/9/11	田面水	+	-	-
23	安城市榎前	2020/9/11	田面水	+	-	-
24	安城市榎前	2020/9/11	田面水	+	-	-
25	安城市榎前	2020/9/11	田面水	+	+	18.3 (81.8)
26	西尾市吉良吉田	2020/9/9	収穫後の残水	-	-	-
27	西尾市吉良吉田	2020/9/9	収穫後の残水	-	-	-
28	西尾市吉良吉田	2020/9/9	収穫後の残水	-	-	-
29	西尾市吉良吉田	2020/9/9	収穫後の残水	-	-	-
30	西尾市吉良吉田	2020/9/9	収穫後の残水	-	-	-
31	新城市作手	2020/9/9	田面水	-	-	-
32	新城市作手	2020/9/9	田面水	-	-	-
33	新城市作手	2020/9/9	田面水	-	-	-
34	新城市作手	2020/9/9	田面水	-	-	-
35	長久手市岩作	2020/8/1	田面水	-	-	-

1) +記号は生息確認を、-記号は生息未確認を示す

2) +記号はスクミリンゴガイeDNA陽性を、-記号は陰性を示す

3) 閾値時間の単位は分、Tm値は°Cを示す

については、今後、各地に分布するスクミリンゴガイ個体を用いた検出精度の検証を行う必要がある。

検出感度については、Pc7の検出限界は反応液当たり1DNAコピーだったが、10コピー以下では非検出の場合もあり、安定して検出できるのは50コピー以上だった(表3)。LAMP法により環境DNAを分析した先行研究の検出限界

は、3コピーまたは100~10000コピー<sup>11,15)</sup>と幅広いが、Pc7の検出限界はこの範囲内であることが確認された。

## 2 愛知県内水田におけるスクミリンゴガイの生息状況および環境DNA調査

野外調査の結果を表4および図3に示した。全てのフィー

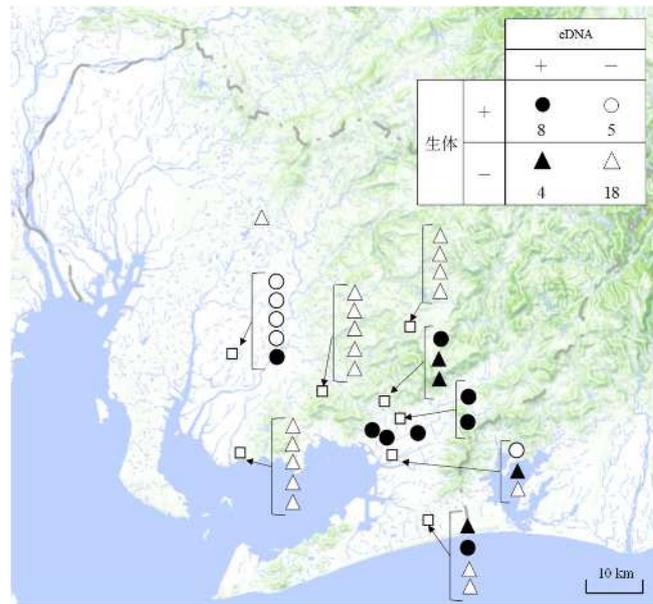


図3 スクミリンゴガイの生息調査および環境DNA調査のまとめ  
 +は生体ありまたはeDNA陽性を、-は生体なし(生体未確認を含む)またはeDNA陰性を示す

ルドブランクサンプルからはスクミリンゴガイ環境DNAは検出されなかった(データ省略)。また、水田番号21はLAMP増幅産物のTm値が計測されなかったため、非検出とした(表4)。調査した35か所の水田のうち、スクミリンゴガイの生息が目視で確認された水田は13か所だった。このうちの8か所からPc7プライマーによるLAMP分析でスクミリンゴガイ環境DNAが検出されたが、5か所については検出されなかった。Pc7プライマーの検出感度は標準的であることから、これら5か所で環境DNAが非検出だった要因は、DNAが検出限界以下であったか、またはDNAの抽出および検出時において何らかの障害が生じた可能性が考えられた。環境DNA量は生成と分解に係わる様々な要因(個体密度、生理、代謝、温度、細胞外酵素、紫外線、化学物質など)によって大きく変動することが知られている<sup>10)</sup>。さらに田面水の場合は、DNA抽出や核酸増幅反応を阻害することが明らかな土壌粒子や腐植酸を豊富に含むことから、特に環境DNAの抽出および検出が困難なことが容易に予想される。また、調査か所ごとに水面に繁茂する浮き草類や藻類の有無、有機物残渣の混入割合、水深、土壌粒子の巻き上げやすさなどの採水時の状況が大きく異なることも、環境DNAの検出結果に影響した可能性がある。本研究だけでは環境DNAが検出されなかった要因を特定することはできないが、今後は検出精度を高めるために、プレフィルターや抽出DNAの精製処理など、田面水からの採水条件の均一化および安定したDNA抽出法を検討する必要がある。また、できるだけ多くの地点から複数回の分析を行うことも重要と考えられる。一方、スクミリンゴガイの生息が目視で確認されなかった水田22か所のうち、18か所が環境DNA分析でも陰性だった。陽性だった4か所のうち2か所(水田番号11および12)は、調査時に田面水がなかった水田だった。これらの周辺の水田ではスクミリンゴガイの生息が確認されていることから、湛水時点ではスクミリンゴガイの個

体が確認できた可能性が高いと考えられた。

本研究では、スクミリンゴガイに特異的に反応するLAMPプライマーを開発し、SGF法を適用することにより、従来では困難だった田面水から目詰まりを生じることなく本種の環境DNAを抽出、検出することに成功した。また、タイヤの轍に残った収穫後の残水からでも本種の環境DNAが検出されたことから、SGF-LAMP法は、調査時期を選ばず、スクミリンゴガイの分布調査に活用できる可能性が示唆された。一方、スクミリンゴガイが目視で確認されたにもかかわらず環境DNAが検出されなかった水田も認められ、検出精度は必ずしも高くなかった。田面水の場合は、検出阻害要因を特定することが極めて困難なため、実用化に向けては、可能な限り採水条件を均一化するとともに、多地点分析やDNAの精製処理などにより検出精度を改善する必要があると考えられた。今後これらの課題を解決することにより、スクミリンゴガイの定性的な在、不在の調査に本法を活用できる可能性がある。また、本法の対象はスクミリンゴガイだけでなく、水質が不良な環境に生息する他の生物種にも応用可能と考えられ、環境DNA解析のための新たな手法として活用が期待できる。

**謝辞:** 本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「農業被害をもたらす侵略的外来種の管理技術の開発」JPJ007966により実施した。

## 引用文献

1. 牧山正男, 伊東太一. スクミリンゴガイ被害の実態と水田浅水管理による抑制効果. 農業土木学会誌. 73, 793-796(2005)
2. スクミリンゴガイ防除対策マニュアル. (移植水稻). 農林水

- 産省消費・安全局植物防疫課. p.1-27(2023)
3. 農林水産省農林水産技術会議事務局. 水田生態系におけるスクミリンゴガイの総合的管理技術の開発. 391, 1-151(2002)
  4. 松倉啓一郎. リンゴガイ類の分類方法と侵入地への侵入状況. 植物防疫. 69(3), 175-179(2015)
  5. 林嘉孝, 永井清文, 恒吉隆, 戸高隆. スクミリンゴガイに対する石灰窒素の施用効果. 九州病害虫研究会報. 34, 121-123(1988)
  6. 高橋仁康, 田坂幸平. スクミリンゴガイの物理的防除と水路における産卵抑制. 植物防疫. 69(3), 165-168(2015)
  7. Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F. and Taberlet, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*. 4, 423-425(2008)
  8. Amberg, J., Merkes, C., Stott, W., Rees, C. B. and Erickson, R. Environmental DNA as a tool to help inform zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, management in inland lakes. *Management of Biological Invasions*. 10 (1), 96-110(2019)
  9. 環境DNA調査・実験マニュアルver.2.2. 一般社団法人環境DNA学会. p.1-105(2020)
  10. 糠澤桂, 深川柊, 鈴木祥広. 高濁度水への環境DNA法の適用に向けたろ過・濃縮手法の基礎. 土木学会論文集G(環境). 76(5), 19-26(2020)
  11. Suzuki, R., Kawamura, K. and Mizukami, Y. Simple extraction and analysis of environmental DNA using glass fibers in suspension form. *Limnology*. 24, 25-36 (2023)
  12. Matsukura, K., Okuda, M., Kubota, K. and Wada, T. Genetic divergence of the genus *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae) distributed in Japan, and a simple molecular method to distinguish *P. canaliculata* and *P. insularum*. *Applied Entomology and Zoology*. 43(4), 535-540(2008)
  13. Wang, D. Effect of internal primer-template mismatches on loop-mediated isothermal amplification. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 30, 314-318 (2016)
  14. LAMPプライマー設計の手引き (PrimerExplorer V5). 栄研化学株式会社マーケティング推進室. p.1-62(2016)
  15. Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., Engle, C., Salach, P., Fakher, U., Stedtfeld, T., Dreelin, E., Jan Stevenson, R., Latimore, J. and Hashsham, S. A. Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of *Dreissena* sp.. *PLoS One*. 12(10), e0186462(2017)
  16. Buxton, A. S., Groombridge, J. J., Zakaria, N. B. and Griffiths, R. A. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific Report*. 7, 46294(2017)