

1 4 イノシシ環境 DNA 検出手法の開発

農業技術研究センター

○小山 浩由

I はじめに

野生イノシシは農作物に対する加害獣となるだけでなく、飼養豚に対する豚熱感染リスク要因の一つと考えられている。そのため、野生イノシシに対する豚熱対策として、サーベイランスの強化、捕獲の強化、経口ワクチンの散布、感染拡大防止のための周知等が実施されている¹⁾。このうち、捕獲の強化や経口ワクチンの散布を効率的に実施するためには、野生イノシシの生息範囲や密度の把握が重要となる。

野生動物の生息調査は、踏査による痕跡調査や自動撮影カメラによるカメラトラップ調査等で行われるが、現地での調査時間が長いことや、多地点の調査に労力がかかるといった課題がある。そのような中で、近年、短期間に多地点の調査が可能な手法として環境 DNA 調査に注目が集まっている。環境 DNA とは海や池などの水や土壌、大気中に含まれる DNA のことで、環境 DNA の調査により環境中に生息する生き物を検知できることが知られている。実際、環境 DNA 調査は陸上哺乳類において、ヌートリアやアメリカミンク、ファイラングスなどのモニタリングに向けた技術の活用が報告されている²⁻⁴⁾。

そこで本試験では野生イノシシのモニタリングへの環境 DNA 調査技術の活用に向け、環境試料からイノシシの DNA を特異的に検出する手法を開発した。

II 材料および方法

1 プライマー・プローブの設計

イノシシ及び近縁種のミトコンドリア DNA (mtDNA) D-loop 領域の参照配列を比較し、イノシシに特異的な領域にプライマーを設計した。設計したプライマーセットを用いて複数種の哺乳類 DNA を鋳型に PCR を実施し、増幅産物の有無をゲル電気泳動により確認した。

次に、シーケンス解析により、県内野生イノシシと埼玉県農業技術研究センター飼育個体の家畜ブタ（ランドレース種、バークシャー種）の D-loop 領域の塩基配列を取得した。これらと高橋ら(2011)⁵⁾で解析に使用されている複数のイノシシやブタの系統の塩基配列を比較し、野生イノシシと家畜ブタで配列が異なる領域にプローブを設計した（図 1）。設計したプライマー・プローブを用いて、複数種の哺乳類 DNA を鋳型にリアルタイム PCR を実施し、検出の有無を確認した。

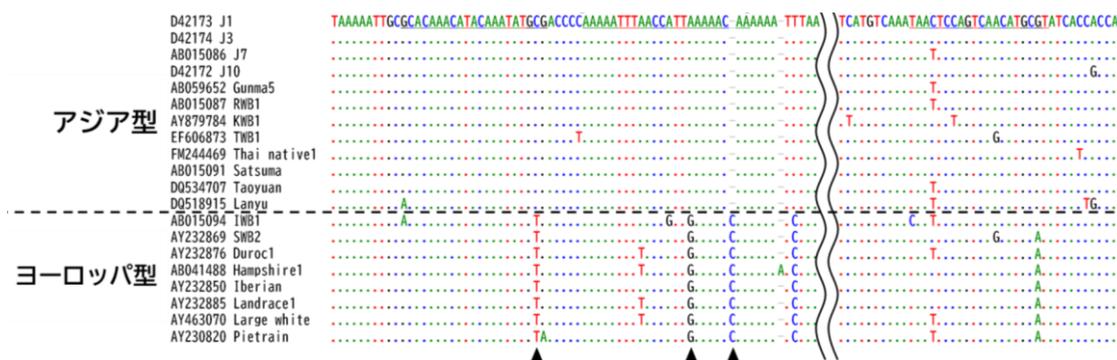


図 1 イノシシ・ブタ系統の D-loop 領域塩基配列の比較
 図中の矢印はアジア型とヨーロッパ型で異なる塩基配列の位置を示す。

2 疑似環境試料を用いた検討

埼玉県農業技術研究センター（熊谷市須賀広）の敷地内で環境水及び土壌を採取した。環境水 1mL または土壌 1g あたり 0.01~10.0μL のイノシシ血清を混合し、人工的な疑似環境試料を調整した。環境水からの DNA 抽出は環境 DNA 学会マニュアル⁶⁾に従い、DNeasy Blood and Tissue Kit（キアゲン社）を用いて実施した。土壌からの DNA 抽出は、DNeasy Power Soil Pro Kit（キアゲン社）を用いて、抽出前に土壌ヘスキムミルクを添加する手法により実施した。抽出した DNA を鋳型に、設計したプライマー・プローブセットを用いてリアルタイム PCR を実施した。

3 生息地域の環境試料を用いた検討

野生イノシシの生息地域から環境水や土壌、食痕試料を採取した（図 2）。環境水及び土壌からの DNA 抽出は前述と同様の手法により実施した。また、食痕試料からの DNA 抽出はスワブで食痕表面を拭った後、CTAB 法により実施した。各試料のイノシシ DNA の検出は前述の手法と同様にリアルタイム PCR によって実施した。



図 2 イノシシ生息地域から採取した環境試料

III 結果

1 設計プライマー及びプローブの特異性検証

設計したプライマーを用いた PCR による特異性を検証した結果、野生イノシシの他にランドレース種、バークシャー種でも DNA の増幅が認められた（図 3）。県内野生イノシシとランドレース種、バークシャー種の D-loop 領域の塩基配列を解析した結果、野生イノシシはアジア型の、ランドレース種とバークシャー種はヨーロッパ型の塩基配列を有していた。プライマーのみではこれらを区別できなかったため、アジア型の塩基配列を対象としたプローブを設計し、リアルタイム PCR による検証を行った結果、野生イノシシのみで蛍光の増加が認められた（図 4）。

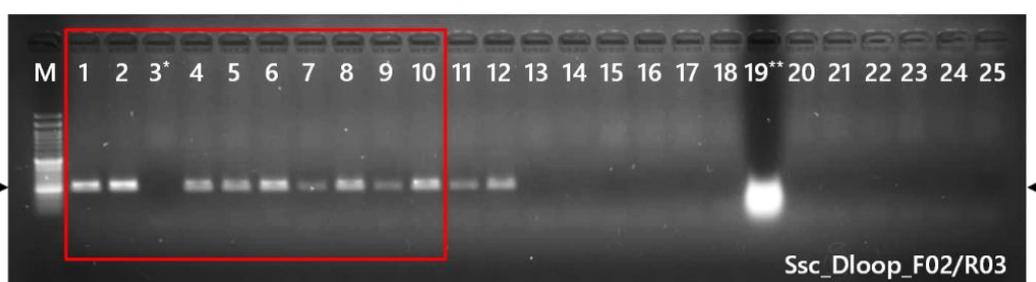


図 3 設計プライマーセットを用いた PCR によるイノシシ特異性の検証
 1～10：県内野生イノシシ、11～12：家畜ブタ（11：ランドレース、12：バークシャー）、
 13～25：その他哺乳類（13：クビワペッカー、14：ニホンカモシカ、15：ニホンジカ、
 16：アライグマ、17：ツキノワグマ、18：ハクビシン、19：アカギツネ、20：ネコ、
 21：イヌ、22：マスカラット、23：ハツカネズミ、24：ヒト、25：ニホンザル）
 *：DNA 抽出が不十分と推察、**：反応液に夾雑物が混入
 図中の矢印は目的の増幅産物長の位置を示す。

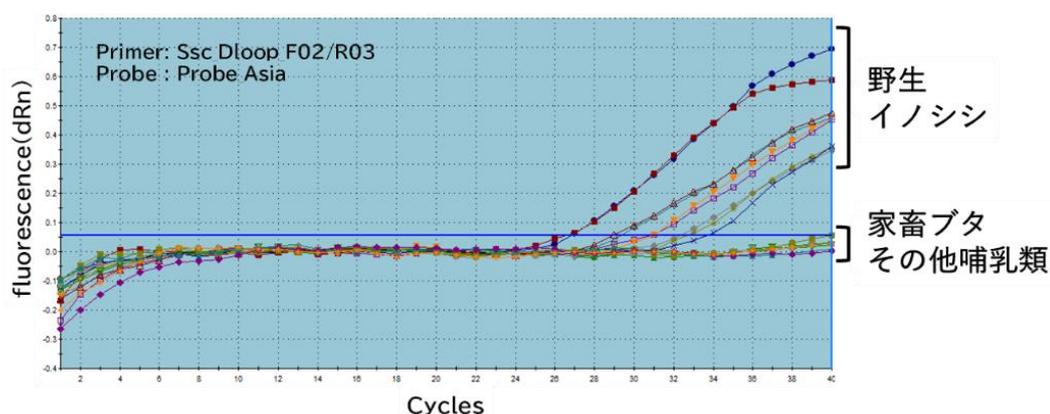


図 4 設計プライマー・プローブセットを用いたリアルタイム PCR によるイノシシ特異性の検証

2 擬似環境試料からの DNA 検出

設計したプライマーとプローブを用いて擬似環境試料から検出を行った結果、環境水では 0.1 μ L/mL 以上の混合量で、土壌では 10 μ L/g の混合量でイノシシ DNA が検出された（表 1）。

表 1 疑似環境試料からのイノシシ DNA の検出

環境水 1mL あたり 血清混合量 (μL)	検出結果	土壌 1g あたり 血清混合量 (μL)	検出結果
0.01	○	0.01	×
0.1	○	0.1	×
1.0	○	1.0	×
10.0	—	10.0	○

○：検出、×：不検出、—：未測定

3 生息地域の環境試料からの DNA 検出

野生イノシシ生息地域の環境試料から抽出した DNA を用いて検出を行った結果、長瀨町のヌタ場の土壌及び環境水、栃木市渡良瀬遊水地の獣道の土壌、飯能市のクリ鬼皮の食痕試料から野生イノシシの DNA が検出された（表 2）。一方で、秩父市の誘引餌調査地周辺の土壌や沢の水から野生イノシシの DNA は検出されなかった。

表 2 イノシシ生息地域の環境試料からのイノシシ環境 DNA の検出

調査地	サンプル	検出結果	備考
長瀨町	土壌	○	ヌタ場
	環境水	○	〃
秩父市	土壌	×	誘引餌調査地周辺
	環境水	×	上記調査地付近の沢
栃木市 (渡良瀬遊水地)	土壌	○	獣道
飯能市	食痕	○	クリ鬼皮

○：検出、×：不検出

IV 考察

今回開発した特異的検出プライマー・プローブを用いることで、アジア型の mtDNA を有する野生イノシシとヨーロッパ型の家畜ブタを区別して検出することができた。ただし、飼養豚の中にはアジア型の mtDNA を有する系統（梅山豚(メイシャントン)、一部の大ヨークシャー系統など）も存在することから、それらの系統を飼養する豚舎周辺における利用では十分な注意が必要である。また、群馬県や福島県では一部の野生イノシシでヨーロッパ型の mtDNA を有する個体が報告されており^{5, 7)}、それらの野生集団が多い地域での利用にも注意する必要がある。

設計したプライマー・プローブにより、血清を混合した疑似環境試料からイノシシ DNA を検出可能であることが確認された。環境中の DNA は糞便や唾液に含まれる体外に排出された組織等に由来すると考えられており、設計プライマー・プローブによる環境試料からの DNA 検出の有効性が確認された。

イノシシ生息地域の環境試料のうち、イノシシ DNA が検出されたのはヌタ場や獣道上の土壌といった、イノシシが明確に接触したと考えられる試料であった。一方で、検出され

なかった試料は生息地域であってもイノシシの明確な接触がなく、DNA が存在しないか、または検出限界以下であったと推察される。また、食痕から DNA が検出できたことから、散布した経口ワクチンをイノシシが摂食したか確認する手法としても利用可能であると考えられる。

今後は、大気や広範囲の地表面等の環境試料を対象とした調査を行い、イノシシ生息地域において正確に DNA が検出可能となる調査手法を検討する。

V 謝辞

本試験は埼玉県農業協同組合中央会の受託試験により実施しました。また、試験で使用したクビワペッカー及びニホンカモシカ試料は埼玉県こども動物自然公園の皆様に分譲いただきました。県内野生イノシシ試料の使用にあたっては、川越家畜保健衛生所および畜産安全課の皆様にご協力いただきました。さらに、農研機構畜産研究部門の平田滋樹氏、小坂井千夏氏、小泉亮子氏には国内野生イノシシに関する有益なご助言をいただきました。ここに記して感謝の意を表します。

VI 参考文献

- 1) 農林水産省. “野生イノシシにおける豚熱対策”. <https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/csf/wildboar/inosisitaisaku.html> (2026 年 2 月 26 日時点)
- 2) 赤松良久, 後藤益滋, 乾隆帝, 山中裕樹, 小室隆, 河野誉仁. (2018). 環境 DNA を用いた山口県内 2 級河川におけるヌートリアの侵入状況と生息適地の把握. 応用生態工学, 21(1), 1-8.
- 3) Takaba, T., Sakata, M. K., Kanbe, T., Mitsuzuka, T., Inoue, S., Mizumoto, H., Nobetsu, T., & Araki, H. (2024). Human activity-associated establishment of invasive mink population estimated using environmental DNA. *Biological Invasions*, 26(11), 3733-3743.
- 4) 入口友香, 荒谷友美, 中尾遼平, 佐藤拓真, 城ヶ原貴通, 諸澤崇裕, 川本朋慶, 橋本琢磨. (2026). 環境 DNA によるファイリマングース *Urva auropunctata* の検出系の検討. 哺乳類科学, 66(1), 37-44.
- 5) 高橋遼平, 石黒直隆, 姉崎智子, 本郷一美. (2011). 群馬県に生息するニホンイノシシの DNA 解析. 群馬県立自然史博物館研究報告, (15), 129-136.
- 6) 環境 DNA 学会. (2024). 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver3.0.
- 7) 奥田圭, 藤間理央, 根岸優希, 玉手英利, 兼子伸吾. (2018). 福島第一原子力発電所事故後に逸出したブタはニホンイノシシへの遺伝子汚染をもたらしたのか. 保全生態学研究, 23(1), 137-144.