

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02218

研究課題名(和文)人為的攪乱が野生動物に及ぼす影響の総合評価：そのメカニズムの解明に向けて

研究課題名(英文)The impacts of artificial disturbances on wildlife ecology and physiology

研究代表者

揚妻 直樹 (Agetsuma, Naoki)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：60285690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物に対する人為的攪乱の影響を複数の観点から評価する初めての試みを行った。屋久島のニホンジカを対象に駆除圧や交通量・人の入込などの人為的攪乱の大きな大川地域と矢筈地域、攪乱の小さな世界遺産地域内の西部地域で比較した。低攪乱地の西部と比べ、高攪乱地の大川では消化管寄生虫である原虫類の検出率が高く、矢筈ではストレスホルモン濃度が高いことが示された。一方、蠕虫類の検出率や食物の質、腸内細菌叢は高攪乱地と低攪乱地で明瞭な差が見られなかった。近年、低攪乱地である西部地域では、自然環境要因と考えられる個体数の減少が起きており、そのため高攪乱地とはっきりした違いがみられなかったのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生動物に対する人為的攪乱は生息地改変・駆除・日常的人間活動・レジャーなど多岐に渡る。これらの攪乱に対し、野生動物は様々な側面で影響を受けると指摘されてきたが、総合的に検討されてこなかった。特に日本の野生動物ではホルモンや寄生虫など人為的攪乱に対する内的側面の分析が立ち遅れていた。本研究は野生動物に対する人為的攪乱の影響を複数の側面から評価する初めての試みといえる。本研究では動物福祉の観点からも注目されている野生動物に負担をかけない非侵襲的手法で試料収集した。本研究を契機にこの手法が普及すれば、捕獲が困難な地域での研究を含め、野生動物に対する人為的影響の研究が進展できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This is the first attempt to evaluate the effects of anthropogenic disturbance on wildlife from multiple aspects. We chose two artificial disturbed sites (OK and YH: higher hunting pressure and traffic volume, and more leisure visitors) and one far less disturbed site (SB in Natural World Heritage Area), and compared infection of parasites (protozoa and helminth), stress hormone (cortisol), structure of bacterial flora in feces, and quality of foods of wild Japanese sika deer in Yakushima. Protozoa infection rate was higher in OK site and stress hormone concentration was higher in YH site than SB site. Whereas, infection of helminth, the bacterial flora and quality of foods were not different among the three sites. In recent years, deer population density in less disturbed site (SB) was rapidly decreasing probably by natural environmental factors. Natural stressors in SB site might obscure differences in the aspects relating anthropogenic impacts on wild deer with disturbed sites.

研究分野：哺乳類生態学

キーワード：人為的攪乱 野生動物 ストレス 食物の質 腸内細菌 寄生虫 駆除 保護管理

### 1. 研究開始当初の背景

野生動物に対する人為的攪乱は様々な開発（農林業・資源・宅地・道路など）による生息地改変、狩猟や駆除、日常的な人間活動（農作業や交通など）、野外レジャーなど多岐に渡る。これらの攪乱は野生動物に危険回避のためのエネルギーコストを増加させ、さらに慢性的なストレス状態におくことで、栄養状態の悪化や免疫力低下を引き起こさせると考えられる。その結果、寄生虫や病原菌・ウイルスの感染率の上昇、生存率や出産率の低下を招き、個体群の存続さえ脅かすと指摘されている (Tarlow & Blumstein 2007 など)。人為的攪乱の影響は生息密度・食性・出産率・日周活動性・逃走距離・形態の非対称性 (fluctuating asymmetry: FA)・ストレスホルモン・寄生虫および細菌感染など、様々な生態的側面および内的側面に表れると考えられてきた。海外では農業活動・観光客・生息地開発・都市化などの人為的攪乱と、野生動物のストレスホルモン (Navarro-Castilla et al 2014)、寄生虫感染 (Wells et al 2007)、ウイルス感染 (Giraudeau et al 2014) の関係が分析されるようになってきている。ただし、必ずしも一貫した傾向を見出すには至っていない。また、大半の研究では1つの側面の影響にしか着目せず、3つ以上の側面を同時に評価した研究はほとんど見当たらない。そのため、人為的攪乱が野生動物に影響を及ぼすメカニズム (Tarlow & Blumstein 2007 など) についても、十分に検討できていないのが実情である。なお、日本国内の野生動物に対する人為的影響の研究例としては、猛禽類の鉛中毒やマンガースによるアマミノクロウサギの捕食など希少種を対象としたものが目立っている。一方、生態系機能を多く担う普通種については、生息密度 (Agetsuma et al 2015; 2016; Enari & Enari-Sakamaki 2014; Hill et al 1994) や食性 (多くは農作物が採食品目に取り込まれる現象) が調査されている他は、行動についての研究例が少々あるに過ぎず (Agetsuma et al 2016; Kamei et al 2010)、さらに内的側面への影響を分析した研究はほとんどない。

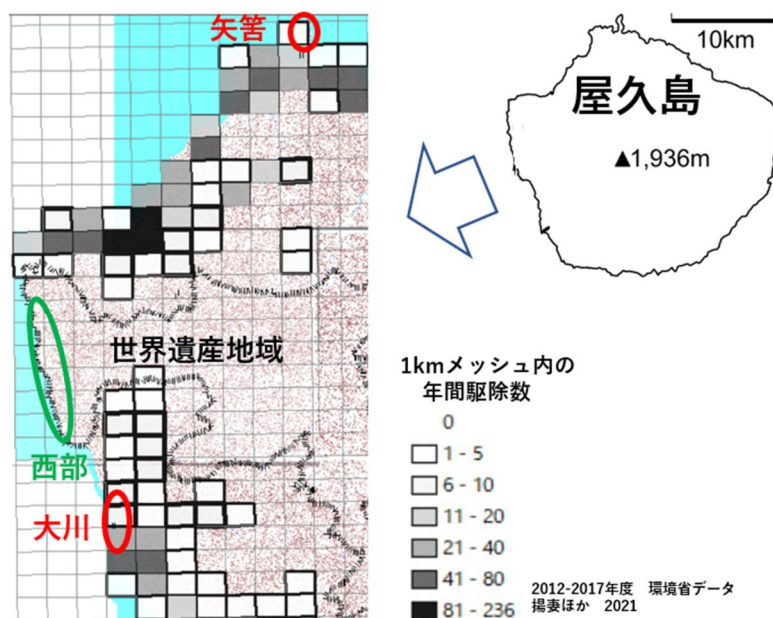
なお、人為的影響を調べる際に、動物を捕獲や拘束したり、捕殺する侵襲的な研究手法が使われることもある。しかし、そうした動物に影響を与える調査手法は研究目的からして適切ではない。さらに、動物福祉や野生生物保全の意識が国際的な高まりを見せる中、それらの侵襲的手法は可能な限り低減することが社会的に求められている (Agetsuma-Yanagihara et al 2017)。幸い、動物の体内の状態 (内的側面) を把握する非侵襲的手法 (例えば糞を試料とする) が急速に進展してきたことで、人為的攪乱の影響評価にも利用可能となってきた。本研究では主に非侵襲的な手法を用いることとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は野生動物に対する人為的影響を複数の側面から評価し、影響の出やすい側面の特定と、側面間の関係性・関連性を明らかにすることである。本研究では野生のシカに対する人為的影響について、Tarlow & Blumstein (2007) が影響評価する際に検討すべきと提案している側面を参考に、食物の質・ストレスレベル・消化管寄生虫罹患・消化管内細菌叢を分析する。それらをシカの駆除圧がかかり、交通量や人の入込量の多い高攪乱地と、駆除圧がなく、交通量や人の入込量の少ない低攪乱地を比較することで、こういった側面に人為的攪乱の影響が強く現れるのかを検討する。

### 3. 研究の方法

低攪乱地として、屋久島西部地域の世界遺産地域内の照葉樹天然林を設定した。この地域では、過去数十年間、シカの捕獲や森林伐採が行われておらず、1本だけ走る自動車道路も狭く、交通量も少ない。一方、高攪乱地として北部の矢筈地域と西南部の大川地域の2カ所を設定した。矢筈では毎年、銃器による大掛かりな駆除が行われており、近年、生息数が急激に減少した場所である。自然散策路や釣り場があり、人の入込数も多い。隣接して海水浴場があり、集落にも近く、二車線道路の交通量も多い。大川



ではほぼ周年にわたり数多くのワナが設置され、時期によっては銃器による駆除も行われている。シカの捕獲数も多い。大川の滝という観光名所や、路線バスの停留所もあり、観光バスやレンタカーで観光客が多く訪れている。

これら3カ所の調査地で新鮮なシカの糞を採集した。採集は2018年から2021年の糞の劣化が遅いと考えられる気温が低い晩秋(11月から12月)と初春(2月から3月)に行った。採集方法は数十m<sup>2</sup>のプロットを設置して、約24時間以内に新たに排泄された糞を採集する定点法、林内を歩きながら糞を探索し、Agetsuma-Yanagihara et al (2017)の基準に照らして新鮮とされる糞を採集する方法を用いた。なお、糞の見た目の新鮮さは降雨があると解らなくなるため、糞の採集は前日、降雨のない日に行った。また、シカが排泄するまで個体追跡して糞を採集したり、数は少ないが、駆除された直後の死体の直腸からも糞を採集した。採集した糞はすぐにジップ袋に入れ、保冷剤の入った保冷ビンに保管した。採集年月日時と採集場所の緯度経度を記録した。

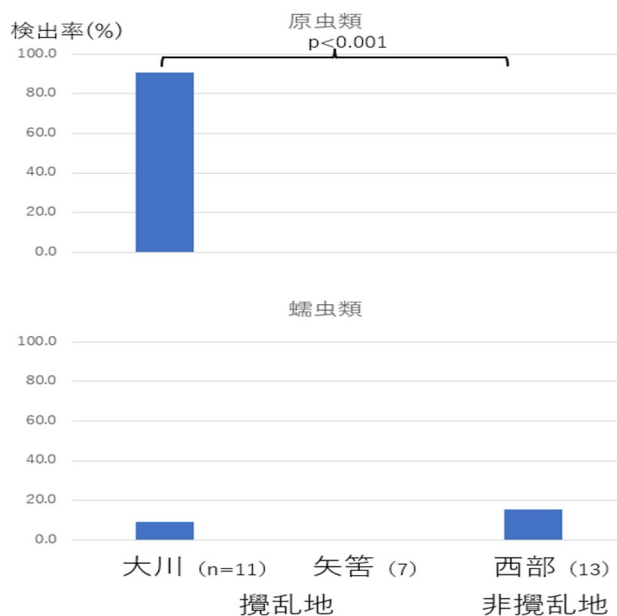
糞を実験室に持ち帰り、その日のうちに各分析用に処理して保管した。排泄した個体と性別を特定するための遺伝分析用に、糞の表面を綿棒でこすり、バッファー液に溶かした。後日、マイクロサテライト領域の遺伝子型を決定して、個体識別をすると共に(Agetsuma-Yanagihara et al 2017)、Amelogenin 遺伝子を分析して雌雄を判定した(Yamauchi et al 2000)。細菌叢分析用のサンプルとして採集した糞をRNALaterに溶かし、後日NucleoSpin DNA Stool kitにてDNAを抽出した。抽出DNAを用いて16S V3-V4領域をメタゲノム解析し、細菌種・属の構成比および多様性を調べた。解析には細菌叢解析プラットフォームであるNephela (Weber et al 2018)が提供するDADA2パイプラインを利用した。消化管寄生虫の分析用にはTotal Fix®に糞を良く溶かし、後日、顕微鏡で寄生虫および卵を観察した。ホルモン分析に用いる糞はそのままマイナス20~25度で冷凍保存した。その後、凍結乾燥、メタノール抽出をして、ストレスホルモンであるコルチゾール濃度を酵素免疫測定法で測定した。食物の質の指標となる糞中窒素分析に用いる糞についても凍結保存し、NCアナライザーで窒素量を計測した。

なお、寄生虫および糞中窒素量については2-3日経過した糞でも新鮮な糞とあまり変化がないと考えられる。遺伝解析についてはAgetsuma-Yanagihara et al (2017)により排泄から72時間まではマイクロサテライトの分析結果に影響が少ないことが示されている。一方、糞中の細菌叢については、排泄後の時間経過とともに変化する可能性があった。そこで、一連の糞採集を始めるにあたって、個体追跡により排泄直後に採集した新鮮糞を土の上に放置して、細菌叢の変化を確認した。その結果、排糞後72時間経過しても細菌叢の構成は大きくは変化しないことが分かった。従って、これらの分析項目に関しては多少、古い糞を試料にしても影響は少ないと考えられた。それに対し、コルチゾール濃度に関して、同様の糞経過実験を行ったところ、排糞後の10時間以上経つと、コルチゾール濃度が上昇していることが示された。時間経過とともに糞の水分量が低下することも解った。個体追跡による排泄直後の新鮮糞89サンプルについて水分量を計測したところ平均59.1% (95%区間48.9-69.3%)だったことから、コルチゾール濃度の分析については、糞の水分量49%以上のサンプルのみを対象とすることにした。

## 4. 研究成果

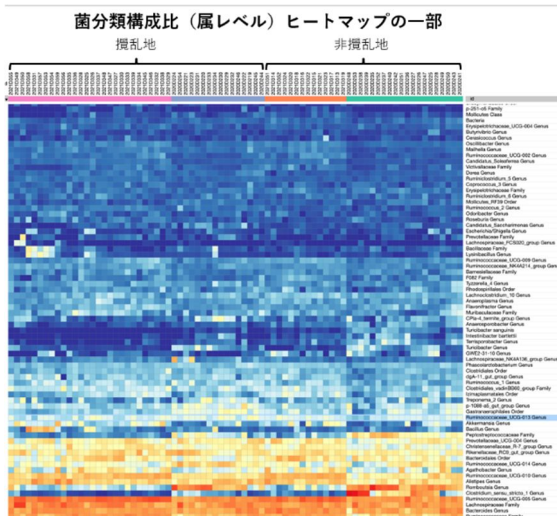
### 寄生虫検出率

2018年秋から2019年秋に採集した糞サンプルについて顕微鏡下で蠕虫類と原虫類の有無を確認した。なお、マイクロサテライトDNAの分析によって同一個体の糞とされたものについては、おなじサンプルとして扱った。メス19個体、オス12個体の糞について、顕微鏡下で蠕虫類と原虫類の有無を確認した。蠕虫類は全般的に検出率が低かった。一方、原虫類は大川で検出率が高く、矢筈と西部では検出できなかった。西部と大川の原虫類検出率は有意に異なっていた(フィッシャーの正確確率検定、 $p<0.001$ )。



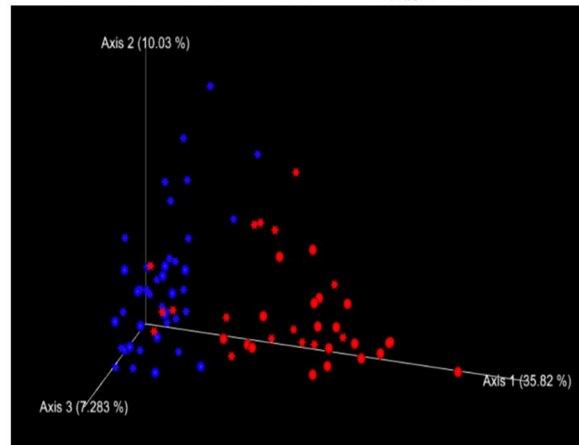
### 細菌叢構成

2020年と2021年の春に採集した78サンプルをメタゲノム解析した。検出したOUT数に基づく細菌叢の構成や種多様性は年によってやや違いが見られたものの、高攪乱地と低攪乱地を明瞭に分けることはできなかった。



菌分類の構成比を加味したUniFrac距離に基づく主成分分析

赤: 2020春 (n=36) 青: 2021春(42) ● 非攪乱 ★ 攪乱



### 糞中窒素量 (食物の質)

2018年から2021年に採集したサンプルのうち、0歳個体のものと考えられる小さな糞を除いた199サンプルについて、NCアナライザーで窒素量を計測した。マイクロサテライトDNA分析が終わっている2020年3月までのサンプルについては、同じ季節で採集した同一個体の糞については平均値を求めた。合計174サンプルについて糞の乾燥重量当たりの窒素量を対数変換し、一般化線形モデルで採集場所、季節、年の効果を検討した。その結果、年経過によって糞中窒素量が増加傾向にあったものの、採集場所による違いは見られなかった。つまり、糞中窒素量から推定されるエサの質は、低攪乱地の西部と高攪乱地の矢筈・大川で違いはなかった。

#### 一般化線形モデルにおける糞中窒素量に関する各要因の係数

要因	係数	標準誤差	t値	p値
切片	-187.675	37.100	-5.059	<0.001
大川*1	0.047	0.031	1.524	0.129
矢筈*1	0.063	0.035	1.809	0.072
年	0.094	0.018	5.141	<0.001
春*2	-0.045	0.029	-1.550	0.123

\*1: 低攪乱地・西部を基準とする \*2: 秋を基準とする

### コルチゾール濃度 (ストレスホルモン)

2018年から2021年に採集したサンプルのコルチゾール量を測定した。サンプルのうち、0歳個体のものと考えられる小さな糞および水分量が49%未満の糞を除き、さらに2020年3月までのサンプルについては、同じ季節で採集した同一個体の糞について平均値を求めた。合計123サンプルについて糞の乾燥重量当たりのコルチゾール量を対数変換し、一般化線形モデルで採集場所、季節、年の効果を検討した。高攪乱地の大川のコルチゾール量は低攪乱地の西部と違いがなかったが、矢筈では有意にコルチゾール量が多いことが分かった。また、コルチゾール量は春に比べ秋に高くなること、また年々増加傾向にあることが示された。

#### 一般化線形モデルにおけるコルチゾール量に関する各要因の係数

要因	係数	標準誤差	t値	p値
切片	-491.733	123.124	-3.994	<0.001
大川*1	0.049	0.103	0.478	0.634
矢筈*1	0.404	0.109	3.704	<0.001
年	0.247	0.061	4.053	<0.001
春*2	-0.292	0.101	-2.880	<0.01

\*1: 低攪乱地・西部を基準とする \*2: 秋を基準とする

## まとめ

野生動物を対象に、人為的攪乱の影響について複数の観点から評価する初めての試みを行った。屋久島のニホンジカでは、低攪乱地の西部と比べて、高攪乱地の大川では消化管寄生虫である原虫類の検出率が高く、矢筈ではストレスホルモンであるコルチゾールが高いことが示された。高攪乱地であっても、人の入込が多い矢筈と、周年でワナが設置されている大川では影響の出方が異なっている可能性が示唆された。一方、蠕虫類の検出率や食物の質、腸内細菌叢など、高攪乱地と低攪乱地では明瞭な差が見られなかった。低攪乱地である西部地域では自然環境要因と考えられる個体数の急速な減少が起きており(揚妻ほか 2021)、ストレスレベルが高まっていた可能性もある。高攪乱地との違いが明瞭でなかったのは、そのためなのかもしれない。まだ、未分析のサンプルがあるため、今後はそれらの分析を進めた上で、側面(ストレス・寄生虫・腸内細菌叢・食物の質)間の関連性について検討したい。

## 引用文献

- 揚妻直樹・揚妻-柳原芳美・杉浦秀樹 (2021) 捕獲圧のない地域におけるヤクシカ密度指標の18年間の増減：屋久島世界遺産地域・照葉樹林の事例。保全生態学研究 26: 87-100.
- Agetsuma N, Koda R, Tsujino R, Agetsuma-Yanagihara Y (2015) Effective spatial scales for evaluating environmental determinants of population density in Yakushima macaques. *American Journal of Primatology* 77:152-161.
- Agetsuma N, Koda R, Tsujino R, Agetsuma-Yanagihara Y (2016) Impact of anthropogenic disturbance on the density and activity pattern of deer evaluated with respect to spatial scale-dependency. *Mammalian Biology* 81:130-137.
- Agetsuma-Yanagihara Y, Inoue E, Agetsuma N (2017) Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest. *Mammal Research* 62:201-207.
- Enari H, Sakamaki-Enari H (2014) Impact assessment of dam construction and forest management for Japanese macaque habitats in snowy areas. *American Journal of Primatology* 76:271-280.
- Giraudeau M, Mousel M, Earl S, McGraw K (2014) Parasites in the city: degree of urbanization predicts poxvirus and coccidian infections in house finches (*Haemorrhous mexicanus*). *PLoS One*: 9(2) e86747.
- Hill DA, Agetsuma N, Suzuki S (1994) Preliminary survey of group density of *Macaca fuscata yakui* in relation to logging history at seven sites in Yakushima Japan. *Primate Research* 10:85-93.
- Kamei T, Takeda K, Izumiyama S, Ohshima K (2010) The effect of hunting on the behavior and habitat utilization of sika deer (*Cervus nippon*). *Mammal Study* 35:235-241.
- Navarro-Castilla A, Barja I, Olea PP, Pineiro A, Mateo-Tomas P, Silvan G, Illera JC (2014) Are degraded habitats from agricultural crops associated with elevated faecal glucocorticoids in a wild population of common vole (*Microtus arvalis*)? *Mammalian Biology* 79:36-43.
- Tarlow EM, Blumstein DT (2007) Evaluating methods to quantify anthropogenic stressors on wild animals. *Applied Animal Behaviour Sciences* 102:429-451.
- Weber N, Liou D, Dommer J, MacMenamin P, Quiñones M, Misner I, Oler AJ, Wan J, Kim L, McCarthy MC, Ezeji S, Noble K, Hurtet DE (2018) Nephel: a cloud platform for simplified, standardized and reproducible microbiome data analysis. *Bioinformatics* 34:1411-1413.
- Wells K, Smales LR, Kalko EKV, Pfeiffer M (2007) Impact of rain-forest logging on helminth assemblages in small mammals (Muridae, Tupaiidae) from Borneo. *Journal of Tropical Ecology* 23:35-43.
- Yamauchi K, Hamasaki SI, Miyazaki K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2000) Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*). *Journal of Veterinary Medical Science* 62:669-671.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 揚妻直樹・揚妻-柳原芳美・杉浦秀樹	4. 巻 26
2. 論文標題 捕獲圧のない地域におけるヤクシカ密度指標の18年間の増減：屋久島世界遺産地域・照葉樹林の事例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 保全生態学研究	6. 最初と最後の頁 87 - 100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18960/hozen.1923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 揚妻直樹・揚妻-柳原芳美・MacIntosh Andrew・木下こづえ・井上英治・和田崇之	4. 巻 12
2. 論文標題 ヤクシカ個体群動態把握のための長期観察および性ホルモン等の分析試料の収集、人為的攪乱が野生動物に及ぼす影響の総合評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 2019年度京都大学野生動物研究センター年報	6. 最初と最後の頁 19-20
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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 揚妻直樹・揚妻-柳原芳美・杉浦秀樹
2. 発表標題 屋久島西部・世界遺産地域で起きたヤクシカの減少：自然生態系による制御の可能性
3. 学会等名 屋久島学ソサエティ 第8回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 揚妻直樹・揚妻-柳原芳美・杉浦秀樹
2. 発表標題 屋久島世界遺産地域におけるヤクシカの減少過程-Natural process regulationの可能性
3. 学会等名 第68回日本生態学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	Macintosh Andrew (MacIntosh Andrew) (30623136)	京都大学・霊長類研究所・准教授  (14301)	
研究分担者	木下 こづえ (Kinoshita Kodzue) (50724233)	京都大学・野生動物研究センター・助教  (14301)	
研究分担者	和田 崇之 (Wada Takayuki) (70332450)	大阪市立大学・大学院生活科学研究科・教授  (24402)	
研究分担者	井上 英治 (Inoue Eiji) (70527895)	東邦大学・理学部・准教授  (32661)	

	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
研究協力者	揚妻 - 柳原 芳美 (Agetsuma-Yanagihara Yoshimi)		

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
---------	---------

ベルギー	Liege University			
------	------------------	--	--	--