

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19868

研究課題名（和文）感染ネットワークの空間構造から評価する人獣共通感染症の生態リスク

研究課題名（英文）Ecological risk of zoonotic diseases evaluated from the spatial structure of the infection network

研究代表者

宮下 直（Miyashita, Tadashi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：50182019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：ノネコの捕食で固有種が危機的状況に曝されている徳之島において、ノネコとクマネズミのトキソプラズマのELISA抗体レベルを調査し、景観環境要因との関連を明らかにした。牛舎の密度が高い景観では、ノネコとクマネズミの両方で抗体保有率が高かった。このパターンは、この島の牛舎が多い景観でノネコが多いという報告、および牛舎周辺のクマネズミの密度が高いというトラッピング調査と一致していた。感染に影響を与える景観要因の空間スケールは、クマネズミよりもノネコの方が広がった。空間スケールのこの違いは、両種で報告された行動圏のサイズとほぼ一致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、世界自然遺産の候補地にもなっている南西諸島の徳之島において、トキソプラズマの終宿主と重要な中間宿主であるクマネズミの抗体保有状況と、それに与える環境要因を明らかにできた。特に、島の主要産業である肉牛生産の場である牛舎がトキソプラズマのホットスポットであることを解明した意義は大きい。牛舎ではネコは盛んに餌付けされているが、今後人間による餌やりをやめ、ネズミの個体数を制御するための管理が、人間の健康のリスクを減らし、島の絶滅危惧種を保護するために必要であるという提言ができた。外来種問題、希少種保全、人間の健康の維持を同時実現可能なインパクトある成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We investigated ELISA antibody levels of *Toxoplasma gondii* of feral cats and black rats (a definitive and a representative intermediate hosts) and relate them to landscape environmental factors on Tokunoshima Island, Japan, where endangered species are threatened by feral cat predation. We found a higher seroprevalence in both cats and black rats in landscapes where cattle barn density was high. This pattern was consistent with an earlier study that cats were more abundant in the landscape with more cattle barns on this island, and with our trapping survey that black rat density was higher around cattle barns. The spatial scale of landscape factors affecting infection was broader in cats than in black rats. This difference in spatial scale approximately agreed with the reported home range sizes in both animal species.

研究分野：生態学

キーワード：トキソプラズマ 環境リスク 景観生態学 捕食被食関係 牛舎 空間スケール 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では奄美群島に属する徳之島において、外来種であるネコとクマネズミのトキソプラズマの感染実態を、生息環境との関連性に注目して明らかにした。徳之島はアマミノクロウサギやトクノシマトゲネズミなど地域固有の希少生物が生息する、いわゆる生物多様性のホットスポットであり、政府によって世界自然遺産に推薦されている。しかし、野生化したネコによる希少種の捕食が多数確認されている(Maeda et al. 2019 など)。一方、徳之島では畜産業が盛んであり、クマネズミや、クマネズミを餌とするハブの防除を主な目的として、畜舎においてもしばしばネコが外で飼われている。島内の45%の畜舎で餌付けが行われており、ノラネコの密度は、畜舎が多い場所と緑地の多い場所で高くなることも分かった(Kazato et al. 2020)。徳之島の住民は第一次産業の従事者が3割弱と他地域に比べて多く、土壌に高頻度で接触する住民が多いと考えられる。また肉用牛の生産が盛んであることや、ヤギや野生のイノシシの生肉食文化があることから、環境中のトキソプラズマ原虫への暴露の機会が多いことが推測される。したがって、徳之島ではネコは希少種への脅威となる一方で、地域住民に対してもトキソを通して脅威になっている可能性がある。一般に中間宿主は、オーシストに汚染された土壌や水を介してトキソに感染すると考えられるため、汚染の指標として有用であると思われる。したがって、クマネズミの抗体保有状況を周辺環境と関連づけることで、環境リスクの推定ができると思われる(Afonso et al., 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では、終宿主であるネコと中間宿主であるクマネズミを対象に、まず徳之島におけるトキソプラズマへの感染率を定量化した。そのうえで、以下の3つの仮説を検証することを目的とした。ネコが高密度で生息する牛舎が多く緑地が多い環境で、ネコの抗体陽性率が高い、ネコの抗体陽性率が高い環境ではクマネズミの抗体陽性率も高い、クマネズミは農地と牛舎が多い環境で密度が高い、である。それらの結果をもとに、ネコの密度が周辺環境へのトキソプラズマ流出にどのように関与しているのかを考察する。

## 3. 研究の方法

### 3.1 調査地

徳之島は南西諸島の奄美群島に所属する離島である。人口は約2万4000人であり、面積は247.85 km<sup>2</sup>である。島の約43%は森林で覆われ、島の中央部と北部には500 - 600mのピークをもつ山塊がある。

### 3.2 サンプル収集

ネコ及びネズミのトキソプラズマ感染状況を把握するにあたり、それぞれの血液サンプルを収集した。

#### 3.2.1 ネコ

2017年に徳之島の自治体の事業によって捕獲されたノラネコおよびノネコの血液サンプルを収集した。各ネコ個体については、捕獲地点・捕獲日・体重が記録された。

#### 3.2.2 クマネズミ

2019年及び2020年にクマネズミの捕獲と血液採集を行った。金製のカゴ罠を徳之島全域の農地、緑地、宅地に設置した。各罠は毎日見廻り、延べの設置日数とネズミの捕獲数を記録した。捕獲したネズミは体重を測定したのち、血液を採集した。

### 3.3 抗体検査

捕獲されたクマネズミの血清について、抗原に対し特異的な抗体を検出する手法の一つであるELISA法を行い、抗トキソプラズマ抗体を確認した。抗原にはT. gondii PLK株のタキゾイト溶解液を用い、近交系ラットの血清13検体を陰性コントロールとして使用した。96穴プレートに1.0 µg/ウェルとなるよう抗原を貼り付け、1%牛血清アルブミン(BSA) PBS-T溶液によってブロッキングを行った。100倍に希釈した血清を加え1時間静置したのち、20,000倍希釈したヤギ抗ラットIgGペルオキシダーゼ標識抗体を1時間反応させた。発色はTMB基質液によって行い、反応を停止後にプレートリーダーを用いて450 nmにおける吸光度を測定した。全てのサンプルはduplicateで検査を行い、全てのサンプル、陰性コントロールおよび陽性コントロールについて光学濃度(OD値)を算出した。

### 3.4 環境要因及び空間自己相関

ネコ及びネズミの捕獲地点の周辺の景観指標としては、捕獲地点を中心としたバッファー内の緑地率、農地率、住宅地率、牛舎密度を用いた。各土地利用の情報は国土数値情報から、また畜舎の情報は自治体から提供された。QGIS3.10.0を用いてバッファーごとの景

観要因を算出した。緑地率、農地率、住宅地率は主成分分析を行い2つの因子に統合した。捕獲地点の空間的な非独立性を考慮するため、空間自己相関を算出した。捕獲地点間の距離から Moran's Eigenvector Map (MEM) を作成し、MEM軸のベクトル値を算出した。

### 3.5 統計解析

ネコとネズミの抗体保有状況と、景観要因及び牛舎密度の関係を調べるため、GLM 構築した。各種について、OD 値を目的変数にしたモデルと、抗体陽性の有無を目的変数としたモデルの2パターンの解析を行った。説明変数は、景観変数の第1主成分、第2主成分、牛舎密度、体重、MEM 軸とした。MEM 軸については、ネコは5軸を、またサンプル数の多いクマネズミは10軸を用いた。

OD 値を目的変数とした解析では、ネコでは対数リンクとガンマ分布、ネズミは identity リンクと正規分布を用いた。抗体保有率の解析では、ロジットリンクと二項分布を用いた。抗体保有に影響する景観要因の空間スケールは探索的に推定した。ネコについては捕獲地点から半径 500m と 1km の2段階のバッファ、ネズミでは半径 100m、200m、500m の3段階のバッファを発生させ、その中に含まれる土地利用及び牛舎戸数を算出した。最適な空間スケールを推定するため、各バッファごとに変数の組み合わせを変えたモデルを作成し、AIC を算出した。バッファごとに最小の AIC を抽出し、その中で最小の AIC をもつバッファを最適な空間スケールと判断した。さらに、最適なバッファースケールにおいて、AIC が2未満のモデルを用いて、モデル平均した係数値を求めた。

クマネズミの環境による相対密度の違いを調べるため、捕獲率(捕獲数÷罠設置日数)を算出した。フィッシャーの正確確率検定を用いて、土地利用による捕獲率の違いを検定した。

## 4. 研究成果

### 4.1 トキソプラズマの感染状況

ネコからは43匹、クマネズミからは129匹の血液サンプルを得た。陰性コントロールから決めた OD 値の閾値は、それぞれ 0.438 と 0.056 だった。この閾値をもとに陽性率を算出した結果、ネコは 49.0%、クマネズミは 69.5% だった。

#### 4.1 空間スケールと景観の PCA

ネコでは2つの空間スケールで、各スケールでのベストモデルを抽出した。その結果、陽性率では 1km スケールで AIC 値が低くこのスケールの景観要素が陽性率に効いていることが分かった。OD 値でも 1km が同様に最適スケールであることが分かった。このスケールでのモデルの AIC は、500m よりも明らかに小さく、陽性率以上にモデルのパフォーマンスが高かった。

クマネズミでは、3つの空間スケールでモデルを比較した。陽性率では 100m で最も予測力が高かった。OD 値でも 100m がベストモデルだった。

ネコの最適スケールである 1km 内の土地利用の主成分は、第一軸は緑地の多さと住宅地の少なさを表す指標であり、第二主成分は農地の多さを表す指標であると考えられた。クマネズミの最適スケールである 100m 内の土地利用の主成分は、第一主成分は農地の少なさ、第二主成分は住宅地の多さ及び緑地の少なさを表す指標であった。

#### 4.2 感染に影響する要因

ネコではモデル平均の結果、陽性率では畜舎密度と MEM1 だけが明確な影響力があり、体重は弱い影響があった。畜舎と体重はともに正の影響があった。OD 値では、畜舎密度、体重、PC、そして2つの MEM 軸が影響していた。畜舎と体重の係数は正、PC1 の係数は負だった。負の PC1 は、緑地が少なく宅地が多い景観で OD 値が高いことを意味している。

クマネズミではモデル平均の結果、陽性率では、体重は正に効き、3つの MEM 軸も効いていた。また畜舎数も弱く正に効いていた。OD 値では、体重と畜舎数が正に効き、3つの MEM も効いていた。

#### 4.3 クマネズミの捕獲率

合計 158 匹のクマネズミを捕獲した。2020 年度の調査における環境ごとのワナ日と捕獲数、捕獲成功率について表 3 に記した。ネズミの捕獲成功率は住宅に比べ牛舎で有意に高く ( $P < 0.02$ )、また緑地と比較しても牛舎において高い傾向が見られた ( $P < 0.06$ )。

#### 4.4. 考察

本研究では奄美群島の徳之島においてトキソプラズマの終宿主であるネコと重要な中間宿主であるクマネズミそれぞれの抗体保有状況と環境要因の関係を調べ、以下の4つの主な結果を得た。牛舎密度の高いところでネコとクマネズミの双方で抗体保有状況が高かった。ネコでは、畜舎が影響する空間スケールがクマネズミよりも広がった。土地利用は二種の抗体保有状況につよく影響していなかったが、ネコの OD 値は緑地で低く宅地周辺で高い傾向があった、クマネズミの密度は畜舎周辺で農地や緑地、宅地よりも比較的高い。本研究はネコから中間宿主へのトキソプラズマ伝播の可能性を景観レベルで調べた数少ない研究である。

牛舎の多いところでネコもネズミも抗体保有状況が高いという結果から、畜舎の存在が徳之島におけるネコの高いトキソプラズマ抗体陽性率の一つのキーとなっていることが示

唆された。直接的には、終宿主であるネコが多いことにより、オーシストの排出源が多いことが挙げられる。さらに、今回の結果より、クマネズミの密度が牛舎高いことが分かったため、捕食被食関係を通して原虫の有性生殖のライフサイクルが回りやすく、原虫のアバンドランスが局所的に高いことも一因かも知れない。クマネズミが高頻度で抗体を保持していることは、原虫がネコから土壌や水といった環境を介し、中間宿主へスピルオーバーしていることの間接証拠である。このような環境下で土壌（あるいは水）と高頻度で接触する家畜や農業従事者も、原虫への暴露が多いことが推測され、クマネズミの抗体保有状況は、ヒトや家畜への感染リスクの指標にもなると考えられる。

さらに注目すべき点は、抗体保有に影響する環境要因の空間スケールが、予想通りネコとクマネズミで異なっていたことである。つまり、説明力の高いモデルのバッファサイズは、ネコは半径 1km、ネズミは半径 100m であった。この違いは 2 種の行動圏の大きさからすれば妥当である。したがって、畜舎の影響は生物学的プロセスからも支持され、単なる偶然で検出されたとは考えにくい。

宿主の体重と抗体保有状況については、ネズミとネコで全体的に有意に正の相関が見られた。これには 2 つの解釈ができる。まず、年齢と体重に相関があり、結果として体重が重い個体は、原虫との暴露機会も多くなるということである (Opsteegh et al., 2012)。二つ目は栄養条件が良い個体ほど原虫との接触頻度も高いということである。特にネコは数年の寿命 (屋外生活個体) に対し 1 年ほどで体重が飽和するため (Campigotto et al., 2019)、年齢に加えて栄養条件の個体差によって大きく体重が異なると推測される。栄養条件は餌付けされた個体で高い可能性があるため、局所的に高密度になって感染率が高まった可能性は十分考えられる。注目すべきは、体重と OD 値が強い正の相関がみられたことである。これは感染機会が増えると OD 値が上昇することを示唆している。繰り返しの暴露により OD 値が比例して上昇するか、あるいは感染後の時間経過で感受性に戻った個体の再感染が暴露機会と OD 値に正の相関をもたらしているかもしれない。今後は、繰り返し感染による濃度の上昇や、感染から感受性への逆戻りが本当に起こるかを実験的に実証する必要がある。今後、OD 値と原虫への暴露頻度の関係が実証されれば、OD 値自体を指標にしたリスク評価が推奨されるに違いない。

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 Yuki SHOSHI, Kazuaki KAZATO, Tamao MAEDA, Yasuhiro TAKASHIMA, Yuya WATARI, Yoshitsugu MATSUMOTO, Tadashi MIYASHITA, Chizu SANJOBA	4. 巻 83
2. 論文標題 Prevalence of serum antibodies to Toxoplasma gondii in free-ranging cats on Tokunoshima Island, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 333-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0512	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 三條場 千寿, 巨 悠哉, 松本 芳嗣, 宮下 直	4. 巻 72
2. 論文標題 トキソプラズマ症：身近な人獣共通感染症の伝播サイクルとワンヘルスに基づいた対策の道筋	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 衛生動物	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7601/mez.72.1	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田その, 風戸一亮, 巨悠哉, 三條場千寿, 所司悠希, 松本芳嗣, 宮下直
2. 発表標題 人獣共通のトキソプラズマに感染した外来種2種（ネコとクマネズミ）の空間分布
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 風戸一亮, 岡田その, 巨悠哉, 宮下直
2. 発表標題 徳之島の希少種を脅かす野ネコの個体群ソースを探る
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三條場千寿、所司悠希、風戸 一 亮、宮下直、松本芳嗣
2. 発表標題 外来種による新たな人獣共通感染症伝播サイクルー徳之島におけるトキソプラズマを例として
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会（企画シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳吉美国、岡奈理子、亘 悠哉、中下留美子、安積紗羅々、宮下 直
2. 発表標題 時空間的に変化するネコ-ネズミ-ミズナギドリの捕食被食関係からHyperpredationを探る
3. 学会等名 第66回 日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風戸一 亮（東京大学）、沢登良馬（環境省）、城ヶ原貴通（宮崎大学）、前田玉青（京都大学）、中下留美子（森林総合研究所）、亘悠哉（森林総合研究所）、宮下直（東京大学）
2. 発表標題 ノネコから解放されたアマミノクロウサギー駆除による回復評価
3. 学会等名 第66回 日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 所司 悠希、風戸 一 亮、前田 玉青、高島 康弘、亘 悠哉、松本 芳嗣、宮下 直、三條場 千寿
2. 発表標題 徳之島の外ネコにおける抗トキソプラズマ抗体陽性率
3. 学会等名 第32回日本臨床寄生虫学会・合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田その(東京大学), 巨悠哉(森林総合研究所), 三條場千寿(東京大学), 所司悠希(東京大学), 宮下直(東京大学)
2. 発表標題 外来種2種(ネコとクマネズミ)におけるトキソプラズマの抗体保有状況と生息環境の関連
3. 学会等名 日本生態学会第68回全国大会
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	三條場 千寿  (Sanjoba Chizu)  (70549667)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教   (12601)	

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