

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21985

研究課題名（和文）雨水排除インフラを活用した都市内に潜在する衛生害虫・害獣監視システムの構築

研究課題名（英文）Detection of pest and vermin in urban area using urban drainage system

研究代表者

中島 典之（Nakajima, Fumiyuki）

東京大学・環境安全研究センター・教授

研究者番号：30292890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：都市に潜む衛生動物を効率的に検知することは被害が生じる前に適切な対策を取る上で重要である。本研究は都市雨天時排水に衛生動物の痕跡があると仮説を立て、効率的に検知する方法を確立しようとするものである。具体的には（1）衛生動物の痕跡の高感度検出手法の検討、（2）雨水排除過程での衛生動物の痕跡の流出の検証、についてそれぞれ研究を実施し、（1）についてはげっ歯類等の衛生動物に由来する痕跡試料に対してその重量当たりの遺伝子量を定量し、（2）においてそれらが雨天時排水過程でどの程度流出するかを実験的に検証し、げっ歯類の場合には糞よりも体毛の方が流出しやすいことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

げっ歯類（ラットおよびマウス）、蚊、住血吸虫中間宿主貝の痕跡を水中から検出する方法を検討し、環境調査に用いるために必須の重量当たりの遺伝子コピー数を定量した。げっ歯類については、糞および体毛の流出特性を実験的に明らかにし、体毛の回収の有効性が示唆される結果が得られた。また、住血吸虫中間宿主貝については水中に放出されるRNAにより、より時間解像度の高い解析ができることが示唆され、新たな研究課題に展開している。

研究成果の概要（英文）：Efficient methods of detecting the hidden animals in urban area are indispensable to take proactive measures before damage occurs. We hypothesized that urban runoff water may contain the traces of such hidden animals inhabiting in the urban catchment. The objective of this study is to test the hypothesis by determining the recovery rate of such hidden animal's DNA from the simulated urban runoff with the mixture of soil and the trace samples. DNA content in the trace samples from the test animals (rodents and mosquitos) were quantified. The rodent DNA was detected in the laboratory-simulated runoff water as we hypothesized, but the low recovery indicates that the rodent feces mostly settled with soils. The rodent hair had a higher recovery rate in the runoff water than the feces.

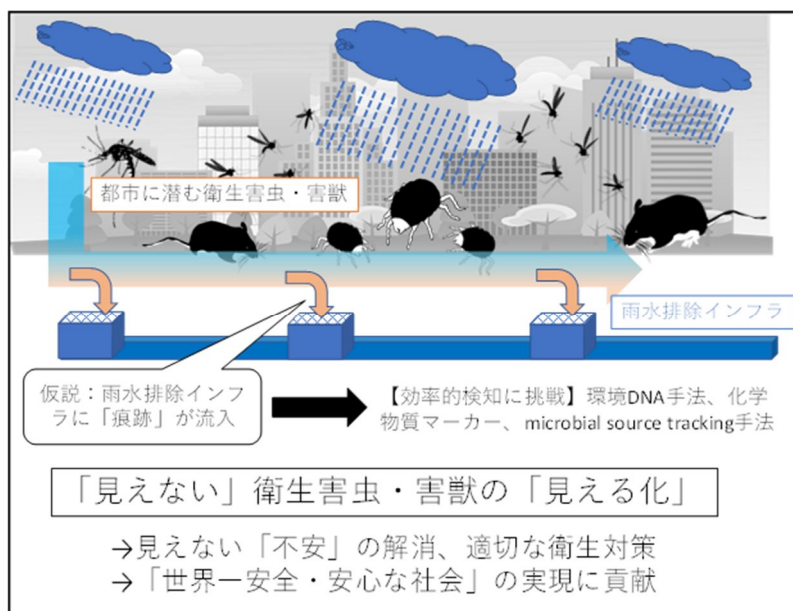
研究分野：都市環境工学

キーワード：衛生害虫 衛生害獣 雨水排除 環境DNA

1. 研究開始当初の背景

温暖化・人口減少の影響で、都市内に衛生上・安全上の懸念を有する動物が侵入・繁殖する可能性が高いとされている。近年、日本国内でも、衛生動物が媒介する新たな感染症の症例が報告されるようになってきた。2013年以降、西日本を中心として、死者も報告されるなど定着、拡大、深刻化しつつあるマダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群(SFTS)、2014年に東京都内を中心としてヒトスジシマ蚊が媒介したデング熱などは記憶に新しい。東京都福祉保健局の統計によるとねずみ・衛生害虫等の被害発生・相談件数は31,749件(H28年度)におよぶ。十分に衛生環境が整っていると考えられている東京であっても、被害・相談ベースでこれだけの件数があることは、現実にはより広く分布し、潜在的な不安要因となっていると考えるべきであろう。ヒアリ、セアカゴケグモやハクビシンなど、従来我々の生活環境にいなかった生物の侵入が近年数多く報道されるが、専門家が強い関心を有する市民でない限り存在を検知することは困難である。デング熱等の動物を介する感染症は四類感染症として患者が発生した場合には届け出がなされることになっているが、これもまた氷山の一角である可能性が高い。すなわちこれらの衛生動物は、被害が発生するまでその存在に気が付かない、という大きな潜在的危険要因となっていると言える。さらに、世界中の多くの先進国大都市が直面する温暖化と人口減少という全く異なる2つの変化は、上述の潜在的危険を加速させると考えられる。冬の温暖化は多くの生物の越冬を可能とし、人口減少は空き家の増加等、人との遭遇機会を低下させることで、各種の生物の生息域を拡大させることになる。

一般に衛生動物は、都市生態系において、比較的人目につかない場所に営巣、棲息しており、目視や捕獲調査などの従来法によるモニタリングは多大な労力を要することとなる。上述の都市内におけるデング熱発生の際には、保健所職員等による、捕虫網を用いたヒトスジシマ蚊捕獲の様子がメディア報道され、その労苦は一般市民にも広く知れ渡ることとなった。本研究では、この衛生動物モニタリング手法を劇的に改善するために、都市雨水排除インフラに着目した。都市雨水の排除に伴い集水域全体から面的に「生物の痕跡」を収集している可能性に着目し、雨天時排水および堆積物の組成の詳細を解析し、衛生害虫・害獣の検出を試みるのが本研究のコンセプトである。おそらく世界初の試みであり、成功すれば衛生動物モニタリングを効率化するだけでなく、既存の社会インフラに新しい価値が創出され、経済的にも大きな意義がある。



2. 研究の目的

本研究が目指すゴールは「都市内に潜んでいる衛生害虫・害獣を、雨水排除に伴って収集される試料で「見える化」することである。雨水は都市集水域全体から面的に「生物の痕跡(遺伝子や低分子物質等)」を収集している蓋然性があるが、そのような着眼点での活用はなされていない。集められた雨水中には多くの物質が共存するために「痕跡」がそもそも検出できるかどうかという基礎的な調査・検討が必要である。室内実験と現地調査により検討し、監視システム確立の端緒とする。

上記ゴールへ向けて本課題で実施した研究は、以下の2つの目的に分けられる。

- (1) 衛生動物の痕跡の高感度検出手法の検討
- (2) 雨水排除過程での衛生動物の痕跡の流出の検証

(1)については、衛生動物由来環境 DNA 検出・定量のための PCR プライマーを設計し、実際に他の動物実験用に飼育されている試料を用いて検証する。げっ歯類の糞や体毛、蚊の各成長段階の死骸等を試料とする。なお化学物質マーカーについても検討を試みたが、試料量の制約等から本研究課題においては遺伝子検出のみに注力した。

(2)については、実際の雨水流出プロセスを模擬し、げっ歯類由来試料がどの程度流出しうるか、また現地で検出するためには各操作工程でどのような技術改善が求められるかを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 衛生動物の痕跡の高感度検出手法の検討

異なる種類のモデル衛生動物として、げっ歯類 (マウス *Mus musculus* およびラット *Rattus norvegicus*)、ネッタイシマカ *Aedes aegypti*、住血吸虫中間宿主貝 *Biomphalaria glabrata* を選定し、それぞれに雨天時排水中に混入すると考えられる試料中の遺伝子量を定量し高感度化へ向けた検討を進めた。げっ歯類については糞および体毛を、ネッタイシマカは卵、ポウフラ、オニポウフラ、成虫 (雄・雌) の死骸を、住血吸虫中間宿主貝は水中に放出する浮遊成分 (ろ紙捕捉画分) をそれぞれ試料とした。種特異的配列として、げっ歯類およびネッタイシマカは COI 領域を、中間宿主貝については ITS2 領域を増幅・検出した。

(2) 雨水排除過程での衛生動物の痕跡の流出の検証

雨水排除 (雨天時流出) を模擬した実験室操作による回収の検討を行った。ふるいにより 2mm 以上の粒径を除いた湿土壌試料と Milli-Q 水、げっ歯類試料 (糞または体毛) を 50mL チューブに入れ 1 時間 130rpm で攪拌したのちボルテックスでよく混合し、10 分静置し、上澄みを模擬都市雨天時排水試料とした。上澄み 10mL をガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ろ紙上に捕捉されたものが散逸しないよう留意しながらろ紙をピンセットで小さく千切り、ビーズ破砕 DNA 抽出を行った。

4. 研究成果

(1) 衛生動物の痕跡の高感度検出手法の検討

げっ歯類の既存の遺伝子情報よりマウスおよびラットの種特異プライマーを設計し、体毛および糞中の DNA を qPCR により定量した結果、マウス体毛 3.52×10^9 copies/g、マウス糞 2.33×10^8 copies/g、ラット体毛 9.02×10^8 copies/g、ラット糞 1.49×10^9 copies/g であった。これらの結果は環境試料分析時の原単位として利用できる。

ネッタイシマカの卵、ポウフラ、オニポウフラ、成虫 (雄・雌) から DNA 抽出を行い、種特異プライマーを用いて qPCR により定量した。オニポウフラや成虫が $1.4 \sim 2.5 \times 10^7$ copies/個だったのに対し、ポウフラは 2~3 オーダー低く、卵はさらに 1 オーダー低い結果となった。雨天時流出時に、蚊がどのような形態で存在しているかは季節に依存し、また成長段階ごとに生息域が異なり雨天時流出の効率も変わることから、DNA だけではなく成長段階に特異的な物質の探索などの研究が今後必要である。

住血吸虫の中間宿主貝については、飼育水槽水から環境 DNA のろ過濃縮、抽出方法を検討した。ろ紙素材、ろ紙孔径、ろ過水量、ろ過圧をそれぞれ 3 条件で比較検討し、回収された環境 DNA の濃度と PCR による中間宿主貝の検出結果を基に、孔径 $0.8 \mu\text{m}$ のセルロースアセテート製ろ紙を用い、100 mL の試料水を 20 kPa で吸引ろ過する方法を確立した。また、この方法で環境 RNA も濃縮、抽出できることを確認した。次いで、中間宿主貝の存否に係る時間的検出感度を評価したところ、中間宿主貝の出現に対しては環境 DNA、環境 RNA とともに 1 日後には検出され、同等であったのに対し、中間宿主貝の消失に対しては環境 RNA の方が高感度であることを明らかにした。衛生動物存否の時間的検出感度を上げる技術として環境 RNA の活用が有望であることが示唆され、さらなる詳細の検討が必要と認識し、この技術確立に対しては別個の研究課題として更なる検討を進めている。

(2) 雨水排除過程での衛生動物の痕跡の流出の検証

雨天時流出を模擬した実験室操作による回収の検討を行った。

マウスおよびラットの糞を添加した土壌に水を入れて攪拌、静置後の上澄みを模擬流出水とし、DNA を定量したところ、添加量に対する回収率はマウス 0.64%、ラットは 0.05% であった。

ラットの体毛について同様の実験を実施した。DNA の抽出効率による問題を回避するため体毛の本数ベースでの回収率を計算したところ 6.0~22% となった。ラットの糞の回収率およびラット体毛および糞の重量当たり DNA コピー数の値を用い、PCR 阻害がないと仮定して計算すると、環境中に同じ重量存在していれば、体毛の方が 109 倍検出しやすいことになる。実際には個体あたりの排糞・脱毛量の比と、降雨による流出が発生する場所にそれぞれがどれだけ分布するかによって、検出のしやすさが変わってくるが、これらについては今後の更なる調査が必要である。

本研究により、げっ歯類および蚊の雨天時流出に伴う検出に関する基礎的知見が得られた。本手法を適用し、降雨後の都市公園内の池 (水源は雨水のみで通常は空) の水を採取し、げっ歯類及び蚊の DNA 検出を試みたが今回は検出されなかった。今後はより広範な地域での試料分析を行い採取場所・季節の最適化手法を確立する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayane ITAKURA
2. 発表標題 Evaluation of Recovery Rate of Rodent Excrement-derived DNA from Simulated Urban Runoff Water
3. 学会等名 WET2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須江渚
2. 発表標題 環境RNA解析による衛生動物の高感度検出手法の開発および時間的感度の評価
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会（紙上開催）
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
研究分担者	飛野 智宏 (Tobino Tomohiro) (90624916)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601)	
研究分担者	清 和成 (Sei Kazunari) (80324177)	北里大学・医療衛生学部・教授 (32607)	

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