

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12328

研究課題名（和文）微量糞便DNAマーカーによる在来および外来野生動物の繁殖分布と感染生態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of reproductive distribution and infection ecology of native and alien wildlife using trace fecal DNA markers

研究代表者

笹井 和美（Sasai, Kazumi）

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授

研究者番号：70211935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、日本国内において、野生動物の生息数が急増し、生息エリアも拡大している。多くの感染症は、直接的、間接的な糞口経路で伝播する。本研究では、その糞口接触マーカーとして外界において長期間生存できる消化管寄生虫に着目した。約600検体の糞便を調査した結果、高率にこれら寄生虫に感染している事が分かった。ただし、鳥類では比較的低値であった。これらの結果は、特に陸上動物において、糞口感染が頻発している事を示唆する。また、ヌートリアの微量糞便から個体群を識別できる手法を構築した。これらの結果は、今後、個体群別の感染調査を実施するうえで、有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年問題となっているヌートリアを対象とした研究は、都市近郊における感染症対策に重要な知見を提供します。従来の動物捕獲とは異なり、糞便という非侵襲的な手法で病原体を検出することで、倫理的な問題を克服し、効率的なリスク評価を実現します。さらに、新たな病原体の発見にも繋がり、感染症対策の強化に貢献します。本研究は、寄生虫学、獣医学、公衆衛生学、生態学など、様々な学術分野に貢献します。得られた結果は、感染症対策のみならず、野生動物管理や生物多様性保全にも役立てることができます。

研究成果の概要（英文）：Recently, the number of wild animals increases, and their inhabiting areas are spreading in Japan. Most of pathogenic microorganisms can be directly or indirectly transmitted by fecal-oral routes. In the present study, we focused on the gastrointestinal parasites that can survive outside of hosts and in the environments, as the marker of fecal-oral transmission of the pathogenic agents. We surveyed approximately 600 fecal samples of wild mammals and birds and it found that they were highly infected with the parasites. Compared to those of birds, the prevalence of mammals was relatively high. Additionally, we could successfully construct high sensitive PCR method to detect the *Strongyloides* spp. from nutrias. Furthermore, we found the possibility to analyze the haplotypes of wild animals using a piece of feces. These findings can contribute to evaluate the risk for pathogenic transmission of wild animals.

研究分野：獣医内科学

キーワード：野生動物 外来種 在来種 寄生虫感染 糞便 ヌートリア

1. 研究開始当初の背景

【国内野生動物の生態解明に向けた計画的駆除の必要性】

- ① 国内においては、狩猟および鳥獣保護計画等により、害獣駆除が行われている。その頭数は2019年ではシカは60万頭、イノシシは64万頭、アライグマは3万頭を超えている。特に、アライグマは、その被害額と共に捕獲頭数も急増している。
- ② しかし、第一義的には棲息頭数を減らすという目的があるものの、やみくもに駆除するのみならず、生態解明に向けた科学的データを同時に取る必要がある。また、本来の野生環境から移動を強いられ、都市近郊の環境に適応し、繁殖している集団および個体に遺伝的特性はあるのかを同時に検証する必要がある。棲息環境の改善を含め、在来動物の計画的保全を実行するためには、これらの基盤情報の構築は不可欠である。
- ③ 我々が構築する糞便を用いたDNAマーカーによる個体識別法は、特に外来動物では全く情報が欠落していた個体の移動距離や繁殖集団の分布棲息範囲を明らかにすることができ、また国内外の他種の外来野生動物、また希少動物にも応用できる可能性がある。

【現行に替わる熟練を必要としない寄生原虫診断法の構築】

- ① ウイルスや細菌等の分子生物学的診断法とは異なり、消化管に寄生する原虫の検出は現在も、顕微鏡による形態観察が主体となっている。しかし、糞便の夾雑物の中から約10ミクロンの原虫を鑑別し、同定するのは医師や獣医師であっても困難な場合が多く、見逃しや誤診も頻発しており、その習熟は課題となっていた。
- ② 例えば、ウシの腸管に寄生するアイメリア原虫は全14種以上と報告されているが、種の同定には大きさがわずか数十 μm の差異を見分ける必要がある。また、家畜に寄生するものとは異なり、特に野生動物ではこれら原虫類の基盤情報が著しく欠如している。
- ③ 申請者らは、顕微鏡観察による検出そして原虫の形態に依存した分類はもはや限界であり、原虫遺伝子の検出による診断法の構築が急務であるとの結論に達した。近年は、PCR装置も一般に配備されており、申請者らが提案する微量糞便による高感度遺伝子診断は、これまでの世界的な概念を崩し先駆けて挑戦するものであり、いつどこで誰が実施しても同じ結果が得られる診断技術となり、その学術的意義、普及、社会的貢献は高い。

【マクロ的な感染症疫学解析の必要性】

- ① 家畜や伴侶動物等において、節足動物等のベクターを必要としない感染症の多くは、直接および間接的接触による糞口感染である。そのため、感染症伝播は飼育密度も大きな要因となる。
- ② 環境中で長期間生存できる消化管寄生原虫は、動物間の接触マーカーとなり、個体識別による行動、棲息範囲と感染状況により、マクロ的な感染症疫学を考察でき、伝播経路やヒトへの感染リスクを科学データをもって論証できる。

【本研究の準備状況および研究環境】

所属する研究室では、実験機器類は既に配備されており、基本的手技も日常的に行っており、新たに習得する操作法はない。野生動物の糞便の採材では、3-(2)に記載している通り、行政機関含め既に研究協力体制は構築している。

学術的背景；農村地域および都市近郊で増加する野生動物による獣害

【急増するニホンジカによる農作物被害】

- ① 在来種であるニホンジカ(以下、シカと記載)は、現在、250万頭を超えている(過去20年間で約3倍)。棲息密度の上昇、さらに分布エリアが拡大した結果、大阪府や愛知県等の都市近郊の森林地帯で目撃が急増している。
- ② 食性は1,000種を超える植物の葉や芽、果実を餌資源としており、冬期には白菜やレタス、かんきつ類等の農作物が餌とされる。2018年のシカによる農作物被害は害獣の中で最も高額で54億円であり、野生鳥獣による総被害額の34%を占めている(農林水産省農村環境課資料, 2018)。

【国内 2 番目に多いイノシシによる農作物被害】

- ① 日本国内では、沖縄諸島以北でニホンイノシシが棲息している。その数は約 100 万頭と推定され、過去 20 年間で約 2 倍に増加している。食性は雑食であり、農作物被害は水稲やジャガイモ等である。2018 年の農作物の総被害額は 47 億円でありシカに次いで多い。
- ② シカと同様にイノシシも食肉としての利用価値があり、農林水産省は、10 年間で棲息数の半減を目標にジビエ倍増モデル整備事業等を進めている。

【外来野生動物による新たな課題】

- ① 在来動物以外で我が国で急増している野生鳥獣は、アライグマ、ハクビシンそしてヌートリアである。いずれも海外から移入された飼育個体が逃げ出し、野生化した外来種である。
- ② 3 種共に繁殖力および環境適応能力が高く、最近の調査研究では、3 種の分布は畑地、水田そして近隣の森林面積と正の相関が認められている(平成 29 年度要注意鳥獣分布調査報告, 2017)。特に大阪府、埼玉県や愛知県等で増加が著しい。
- ③ 従来は存在しなかった外来野生動物による農作物被害が増加し、例えば、アライグマでは 3.8 億円、ハクビシンで 4.0 億円となっている。環境省は、平成 27 年度に特に早急な対策が必要と考えられる鳥獣種 7 種を指定しており、上述の外来動物 3 種がこれに含まれている。

【野生動物による人獣共通感染症伝播のリスクアセスメント】

- ① 2019 年にシカとイノシシを対象とし、約 20 種の病原体に対する抗体検査が実施された。結果、シカでは住肉孢子虫(100%)等の人獣共通寄生虫、イノシシでは届出伝染病である豚丹毒(99.3%、ヒトの動物由来感染症)が高率に検出されている(家畜衛生推進協議会資料, 2020)。
- ② しかし、外来動物では感染症についての情報は極めて乏しく、レプトスピラ(ドブネズミ等が保菌する人獣共通感染症; Koizumi ら, 2009)やインフルエンザウイルス(Okumura ら, 2019)、また犬由来と考えられるジステンパーウイルス等(Aoki ら, 2017)の感染が報告されているのみである。
- ③ これらの報告は、野生動物が感染源となり、ヒトの生活環境圏内や農業地域で直接または間接的接触により、病原体がヒトに伝播する可能性があることを示唆する。
- ④ 現在、これら野生動物のスプレッダーとしてのリスク、またマクロ的に野生動物の感染症疫学を考察できる基盤情報はなく、生態系の変化に伴う各種病原体の分布疫学を考察する調査が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的;

- ① 野生動物による農作物被害および生活環境圏内におけるヒトとの接触を制御するためには、これら野生動物の移動や繁殖を含むライフサイクルを俯瞰的に把握する必要がある。本研究では、DNA マーカーを新規活用し、都市近郊と農業地域を嗜好し適応した棲息集団の存在を証明し、遺伝的特性を明らかにする。
- ② 野生動物の棲息圏内での直接的、間接的な感染症伝播を評価するため、環境抵抗性を有する消化管寄生原虫を接触指標として、個体識別によるミクロ解析からマクロ的な感染症生態分布のドラフトマップを構築する。

学術的独自性と創造性

【DNA マーカーによる微量糞便を用いた個体識別法の構築】

- ① 過去、家畜や野生動物の個体識別には、屠殺後の肉や血液等が材料として利用されてきた。しかし、特に野生動物では採取方法が安全であり、簡便かつ非侵襲的であることが望ましい。本研究では個体識別材料として、糞便を用いることを提案する。
- ② 糞便は宿主動物由来の多量の DNA を含んでおり、排泄後、一定期間環境下で存在するため時間的な間隔をもって採材が可能である。また、対象動物を捕獲する必要がなく、安全かつ大規模な調査が可能である。
- ③ 糞便を用いた個体識別は、ウシのマイクロサテライト遺伝子座を活用したシカで報告(Sonoda ら, 2014)があるのみで、他種野生動物で実用的な応用展開は実施されておらず、本研究が初めての試みとなる。

【都市に適応し増加した非野生型の野生動物生態学】

- ① 現在、害獣となるアライグマ等の捕獲個体に発信機等を取り付け、リリースすることは認められておらず、日本国内で適応し増殖した外来動物の行動や生態は全く不明である。申

請者らは、在来動物のみならず、外来野生動物の微量糞便によるマイクロサテライト解析法を確立し、棲息する遺伝的集団をデータベース化し、採材エリアの被害情報と居住区目撃情報等をアノテーション化する。

- ② これにより、繁殖および交雑した遺伝的集団の分布や移動・行動範囲を明らかにし、さらには獣害起因集団を特定できることとなる。これら学術的論拠をもって、外来種では対策に向けたライフサイクルを把握でき、増加する在来種では共生保全に向けた計画的駆除が可能となる。

【環境抵抗性を有する消化管寄生原虫の接触マーカーとしての有用性】

- ① 環境中における感染症の主な伝播経路は糞口感染である。つまり、病原体が糞便と共に排泄され、直接的にそれが口に入る、または動物の体表、土壌や植物等の環境物を經由し、間接的に摂取されることにより伝播する。
- ② 消化管に寄生して増殖する原虫は、糞便中に排泄される際には、オーシストやシストと呼ばれる硬い殻に覆われた状態で排泄される。これにより生体外で数カ月間生存することが可能であり、この間に次の感染機会を待つ。これらの原虫は、動物やヒトの消化管以外では増殖できず、したがって、消化管寄生原虫の感染は、過去に個体間の糞便接触があったことを示す指標となりうる。
- ③ 対象とする原虫は、クリプトスポリジウム、ジアルジアそしてエントアメーバである。幅広い動物種に交差感染が可能であり、シカ、イノシシ、アライグマ等にも寄生し、ヒトにも感染することから人獣共通感染症としても知られ、遺伝子型解析から感染源となる動物の特定およびヒトへの感染リスクも評価できる。

3. 研究の方法

1. 微量糞便を用いた個体識別法の確立 [2021 年度]

目標；微量糞便からの DNA マーカーによる在来および外来動物の個体識別法を確立する

- ① 解析対象は、在来種のシカとイノシシ、外来種はアライグマ、ヌートリアそしてハクビシンとする。DNA マーカーとして、マイクロサテライト領域およびミトコンドリアゲノム DNA の D-loop 領域の遺伝子座を用いる。これらの遺伝子座領域の増幅は、家畜や近縁他種動物、海外の同動物種で報告されている増幅プライマーを活用する。
- ② 既報プライマーで国内の野生動物では増幅できなかった場合には、対象動物のゲノム DNA からマイクロサテライトエンリッチ DNA ライブラリーを作製し、塩基配列を比較して新規領域を決定する。
- ③ 糞便約 100-200mg からゲノム DNA を抽出する。解析材料としての有用性を評価するため、糞便の形態から新鮮および乾燥、また採取時期(季節や天候等)や状況(落下便または消化管から直接採取)等の情報を記録する。比較対象として、捕獲屠殺個体では、骨格筋や血液等も採取する。

2. 実験動物モデルにおける微量糞便中の原虫 DNA の実証実験[2021-2022 年度]

目標；申請者らが構築した感染実験モデルにより、糞便中の原虫 DNA の存在を証明する

- ① 申請者らは、消化管寄生原虫であるクリプトスポリジウム(*Cryptosporidium* sp.)およびエントアメーバ(*Entamoeba* sp.)原虫株を保有し、マウスでの実験感染モデルを構築している。これらの原虫はヒトに加えて、シカやイノシシ、アライグマ等の多種の野生動物からも感染が報告されている。
- ② マウスに原虫株を投与し経日的に採糞を行い、微量糞便から原虫ゲノム DNA を抽出する。それぞれの原虫遺伝子を増幅できる種特異プライマーを用いて、感染後の経日的、糞便の量的さらに質的に異なる条件での検出感度を評価し、基盤となる裏付けデータをもって、本手法を野生動物の糞便検査に適応展開する。

3. 繁殖分布マップによる感染個体のマクロ的な感染症疫学解析への展開[2021-2023 年度]

目標；大阪府近郊の野生動物の遺伝子型分布および原虫保有状況を明らかにする

- ① 大阪府近郊の目撃情報および農作物被害のあった農業エリアおよび森林・河川地域で、対象動物の糞便を採取する。採取時期は一年を 4 期に分け、1 期あたり 4 回、のべ 20 カ所のフィールドでの採材を計画する。採材は初年度から実施し、年間あたり 500 検体を予定する。採取した糞便からゲノム DNA を抽出し、個体識別を行うと共に、消化管寄生原虫の感染状況およびこれら原虫の遺伝子型を決定する。
- ② 原虫保有状況を説明変数とし、GIS ソフトを用いて、各調査地周辺における面積等定量化する。目撃および被害状況をメタデータとしてタグ付けし、感染生態状況を付与してドラフトマップを作成する。

4. 研究成果

近年、日本国内において、野生動物の生息数が急増し、生息エリアも拡大している。多くの感染症は、直接的、間接的な糞口経路で伝播する。本研究では、その糞口接触マーカーとして外界

において長期間生存できる消化管寄生虫に着目した。約 600 検体の糞便を調査した結果、高率にこれら寄生虫に感染している事が分かった。ただし、鳥類では比較的低値であった。これらの結果は、特に陸上動物において、糞口感染が頻発している事を示唆する。また、ヌートリアの微量糞便から個体群を識別できる手法を構築した。これらの結果は、今後、個体群別の感染調査を実施するうえで、有用であると考えられた。

人で問題となる新興および再興感染症は野生動物由来であることが多い。しかし、これら野生動物が保有する各種病原体について、我々が把握しきれている微生物は極めて限られる。我が国では、都市近郊および農村地域において、在来および外来野生動物が激増しており、生態系への深刻な影響のみならず、多額の農作物被害が発生している。特に都市近郊に適応し繁殖する個体は、本来の生息地での野生型とは異なる生態を保持し、進化させていると考えられる。本研究では、これらの野生動物が保有する微生物および伝播状況を把握するため、個体を捕獲する必要性無く非侵襲的に採材できる糞便により、環境中で長期間生存可能である寄生虫を接触マーカーとして、ヒトを含む動物の感染症伝播のリスクアセスメントをマクロ的に実施する。2023 年度は、西日本の都市近郊で捕獲されたヌートリアを含む哺乳動物の糞便 300 検体を調査し、解析した。その結果、特にヌートリアにおいて、原虫類としてアイメリアが 34%で検出された。形態学的な解析を行ったところ、検出されたオーシストは丸型および楕円型の 2 つのタイプに大別できた。既報 10 種の *Eimeria* のデータと比較すると、それぞれ諸外国で報告されている 2 種と一致した。現在、複数の遺伝子領域において、PCR を実施して系統樹解析を行っているところである。アイメリア原虫は宿主特異性が高い事で知られている。日本国内には元来、ヌートリアは存在しなかったことから、ヌートリア移入と共に本原虫も国内に入ってきたと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 井上春奈、森 悠芽、畑中律敏、芝原友幸、笹井和美、松林 誠	4. 巻 28
2. 論文標題 高知県内で保護された野生鳥類の糞便検体による消化管寄生虫保有調査	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本野生動物医学会誌	6. 最初と最後の頁 103-106
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 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 -

〔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 大内宙、仲敦史、幸田良介、石塚謙、日根野谷淳、芝原友幸、笹井和美、松林誠。
2. 発表標題 日本国内のヌートリアから検出された Eimeria 属原虫の形態観察および分子系統解析。
3. 学会等名 第29回日本野生動物医学会大会（鹿児島大学）要旨集P57（P-112）。
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuga Mori, Atsushi Naka, Ryosuke Koda, Yuzuru Ishizuka, Atsushi Hinenoya, Tomoyuki Shibahara, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi.
2. 発表標題 Detection of intestinal parasites in nutrias (<i>Myocastor coypus</i>) and molecular identification of <i>Strongyloides myopotami</i> from the eggs.
3. 学会等名 第14回アジア保全医学会 / 第27回日本野生動物医学会2021合同大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし

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	松林 誠 (Matsubayashi Makoto) (00321076)	大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授 (24405)	
研究分担者	石塚 譲 (Isizuka Yuzuru) (00333435)	地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所（環境研究部、食と農の研究部及び水産研究部）・その他部局等・主任研究員 (84410)	
研究分担者	幸田 良介 (Kouda ryousuke) (60625953)	地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所（環境研究部、食と農の研究部及び水産研究部）・その他部局等・主任研究員 (84410)	

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