

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18172

研究課題名（和文）都市排水中の痕跡による潜在害獣・害虫の効率的検知技術の確立

研究課題名（英文）Method development for effective detection of hidden animals and pest by trace compounds in urban drainage

研究代表者

中島 典之（Nakajima, Fumi-yuki）

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） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：都市内に潜んでいる害獣・害虫を、効率的に検知する技術の確立が本研究の目的である。面的に自動的にこれらの生物の痕跡を収集する仕組みとして、都市排水を対象にネットによる固形物直接採取手法を開発した。さらに高感度化するべく回収固形物中の動物体毛を濃縮回収する手法として気流分画適用についても実現可能性を示した。2か月間の降雨計10回を本手法を適用し2か所で採取することに成功した。採取した固形物から定量PCR法によりネコのDNAが1～44 copies/ $\mu$ Lで検出された。また、ネズミ、ハクビシン、アライグマなどの隠れた害獣も低濃度（定量限界以下）で検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3年間の検討により、雨天時流出水中の比較的粗大な粒子を選択的かつ受動的に採取する方法が新たに開発され、これにより集水域に生息する動物のDNAが検出された。都市内の生物を検出する新たな方法として雨天時流出する粒子を捕捉するという方法が有効であることが示され、従来のカメラや罠等による「点」での監視手法ではなく、面的な手法による監視の可能性を示す重要な成果が得られた。今後の現場適用と長期データの取得・解析への重要な基盤が作られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to establish technology to efficiently detect animals and pest hidden in cities. As a system to automatically collect traces of these organisms over a wide area, we developed a method for directly collecting solid matter from urban runoff using a net. In order to further increase the sensitivity, we also demonstrated the feasibility of applying airflow fractionation as a method for concentrating and recovering animal hair in recovered solids. Using this method, we successfully collected the runoff samples in 10 rainfall events at two locations over a two-month period. Cat DNA was detected at 1 to 44 copies/ $\mu$ L from the collected solids by realtime PCR. Hidden animals such as rodents, masked palm civets, and raccoons were also detected at low concentrations (below the limit of quantification).

研究分野：都市環境工学

キーワード：環境DNA 衛生害獣 雨天時排水

## 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。西日本を中心としてマダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) が拡大しており、2020 年に過去最多の感染者を記録している県もある。蚊が媒介するデング熱については 2014 年夏季に 150 例以上の国内流行が発生したことが記憶に新しいが、熱帯地域では継続的に流行しておりシンガポールでは 2020 年に過去最多の死者を記録している。ネズミやアライグマ、ハクビシンといった動物も、感染症の懸念だけでなく、農作物被害、糞尿による建物の汚染や悪臭など都市域での問題が顕在化してきている。一般にこれらの(小)動物は、都市内の人目につかない場所に潜在して営巣・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。被害が明らかとなった時点では既に多くの個体が存在している可能性が高く、より早い時点での検知・場所の絞り込みに関する効率的な手法の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

都市内に潜んでいる害獣・害虫(以下潜在害獣・害虫)を、面的に自動的に収集される試料(都市排水中の痕跡)で検知する技術の確立が本研究の目的である。

この潜在害獣・害虫モニタリング手法を劇的に改善するために、面的に自動的に痕跡を収集する仕組みとして都市排水システムに着目した。世界的に見てもこのような試みはおそらく他にはなく、成功すれば被害が顕在化する前に検知して対策を行うことにつながるるとともに、既存の社会インフラに新しい価値が創出される点でも大きな意義がある。

## 3. 研究の方法

本課題では以下の 2 つの研究項目で検討を進めた。

### (1) 潜在害獣・害虫痕跡の検出手法の検討

研究開始当初は、潜在害獣・害虫由来の痕跡として DNA(いわゆる環境 DNA)と低分子化学物質マーカーを候補として想定した。研究対象として、より多くの痕跡が生じる害獣を、またより種特異性が高い環境 DNA を第一の候補として進めた。害虫についてはさらに高感度化または高効率での試料採取が必要であり今後の課題である。また、DNA による検出手法の開発が順調に進展し現場での観測にも成功した(後述)ことから、低分子化学物質マーカーについては情報収集と予備的な検討にとどめ、研究期間中は DNA による手法に注力した。

#### 試料採取手法の開発

試料採取手法の開発を行った。予備的検討により、環境 DNA 手法において一般的な環境水を採取し濾過する方法では十分な感度が得られないことと、試料を降雨時に採取するタイミング的な困難さと安全性の問題があることから、都市流出水中の 250  $\mu\text{m}$  以上の固形物を捕捉できるパッシブサンプリング方式を設計した。2 種類の方式を考案し、それぞれに現場に設置し、回収された DNA 量の観点から有効性を確認した。

#### 高感度化の検討(試料の分画回収)

将来的な高感度化のために、追加の技術開発を実施した。回収された固形物試料中には対象生物由来の物質以外の多様な固形物が含まれていることから、より高感度に検出するために固形物自体の選別手法についても検討した。雨水 SS(公共施設敷地内の雨水ますで採取)と動物体毛(ネコおよびマウス)を混合し実験試料を調製した。これらの混合試料を気流分画装置により blown 画分と settled 画分に分離した。この装置は、流路中のフィルター上に載せた試料を上向き気流により浮上させ、浮力と重力との関係により低密度・小粒子が blown 画分として飛散・回収され、それ以外はフィルター上に残存(settled 画分)することを原理としており、動物体毛は密度が小さいことから blown 画分に含まれることを期待した。上向き気流の流量は 15, 20, 25 [air L/min] (断面平均流速として 0.31, 0.41, 0.52 [m/s]に相当)の 3 段階を設定し、体毛の回収量および濃縮率を比較した。濃縮率は分画前後の試料中の体毛量の変化と定義し、体毛が選択的に回収されれば濃縮率が 1 倍以上となり、仮に体毛自体の回収総量が少なくとも検出可能性が上がり期待される。ネコ体毛は本数ベースで評価した。一方、マウス体毛は細く短いことから本数ではなく抽出 DNA 量により評価した。マウス DNA はリアルタイム PCR 法により定量した。

## (2) 都市排水試料の入手と潜在害獣・害虫痕跡の検出、効率的モニタリング手法の検討

本研究の特徴は降雨により面的に自動的に収集される試料を用いることにある。一方で、現場で既に対象生物の生息が確認されていない限り、手法の適切さを確認することができない。本研究において、まず動物園の飼育施設内の清掃排水から検出できることを予備的に確認したのち、都市内で害獣が確認されている地域でかつ雨天時排水が採取できる場所を探索し、管理者の協力のもと調査を実施した。(1)で開発した採取装置を異なるタイプの2か所の雨天時排水施設(側溝および雨水流入桝)に設置し、2か月間、10回の降雨採取に成功した。なお、当初は雨天時排水採取の困難さから、適切な場所が選定できない場合を考えて雨天時の下水処理場流入水(汚水込み)や雨水枡内堆積物などを使うことも次善の策として考えていたが、(1)で開発した手法が成功したことからこれらの試料を採取する必要がなく、所期の着想通りに都市表面流出雨水を用いた研究開発が実施できた。

採取装置は次項に記載するが、金属製のフレームに取り外し可能なナイロンネット(250 $\mu$ mメッシュ)を組み合わせたものである。降雨終了後にネットのみ回収し、次の降雨のために新たなネットを取り付けた。回収した固形物は、2mmメッシュのふるいで大きな破片を取り除き、分析用に250~2000 $\mu$ mの画分を集めた。回収した画分を凍結乾燥し、磁性乳鉢と乳棒でホモジナイズした。抽出DNAの総量をQubitで、また種特異的配列はリアルタイムPCR法により定量した。陽性となったサンプルは、ゲル電気泳動に供し、標的動物のPCR産物の存在を確認した。対象動物として現地で観察事例のあるネコ、ネズミ、ハクビシン、アライグマを選んだ。ネコは害獣としてではなく、対象地域内に複数生息していることが確認されておりpositive controlとして対象に加えた。

## 4. 研究成果

### (1) 潜在害獣・害虫痕跡の検出手法の検討

#### 試料採取手法の開発

サンプリング装置は試行錯誤の末に最終的に図1に示すように設計され、各サイトの形状に合わせた金属フレームと、固形物捕捉用の取り外し可能なナイロン製ネット(250 $\mu$ mメッシュ)で構成されている。Site 1は周辺道路からの表面流出水を受ける雨水流入桝であり、Site 2は幅30cmの側溝である。これらの新たに設計した採取装置は、どちらも流出固形物を捕捉することに成功した(図1)。激しい暴風雨でもSite 1では目詰まりは観察されなかった。Site 2では、大量の落ち葉がネットに詰まるため、粗い金属スクリーンを上流側に追加した。捕捉固形物重量は、1降雨あたり0.3~16.7g-dryであり、安全性が懸念される夜間の降雨イベントも含め、十分量の捕捉ができた。

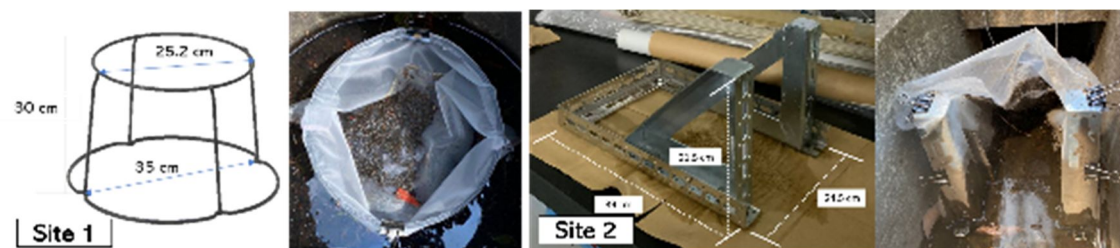


図1 都市雨天時流出水からの粗大粒子捕捉のためのサンプリング装置の設計

#### 高感度化の検討(試料の分画回収)

雨天時排水中浮遊物質にネコおよびマウスの体毛を添加した混合試料から、気流分画により体毛を選択的に濃縮することを試みた。上向き気流流量15 [airL/min]の場合、ネコ体毛は3.6~8.1倍、マウス体毛は2.3~81倍濃縮することができた。雨天時排水試料に集水域内生息動物体毛が含まれている場合には、DNA抽出前の試料前処理に気流分画を適用することでDNA検出感度を向上できることが示された。

### (2) 都市排水試料の入手と潜在害獣・害虫痕跡の検出、効率的モニタリング手法の検討

測定された試料中の総DNA濃度は、抽出法により多少の差異が認められたが、市販の抽出・精製キットを用いた方法で8.0~58 $\mu$ g/gであった。

ネコの種特異的配列の増幅は、回収した19サンプルのうち4つ(Site 1で3つ(1~6コピー/ $\mu$ L)、Site 2で1つ(44コピー/ $\mu$ L))で確認された。都市の雨天時排水から排水区に生息する動物のDNAを検出報告した例はこれが初めてではないかと思われる。なおSite 1付近では日中にネコが観察されているのに対し、Site 2では通常は観察されていなかった。そのような生物の検出がなされたことはこの手法の有効性を示唆するものと言える。

ネズミ、ハクビシン、アライグマの DNA はリアルタイム PCR 法の検量線の下限值以下ではあったものの、ネズミは Site1,2 両方の計 6 試料で、ハクビシンとアライグマは Site2 のみでそれぞれ 5 試料、2 試料で検出された。調査期間中に Site 2 周辺でネズミの死骸を確認した。Site 1 ではネズミの目撃報告はなかったがものの DNA が検出されたことから、その付近にネズミがいることが示唆された。アライグマは Site 2 周辺の監視カメラにより存在が確認された事例があり、DNA 検出との整合性が確認できた。ハクビシンは Site 1 で過去に目撃情報があったものの DNA は検出されず、一方で目撃情報のない Site 2 で DNA が検出され、その存在が示唆された。本研究の結果は、都市流出水から eDNA を収集することが可能であり、陸生動物の検出が可能であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mark Edward Jolejole
2. 発表標題 Proposal of eDNA sampling methodology from urban runoff for detection of nuisance animals hidden in the catchment
3. 学会等名 IWA 20th International Conference on Diffuse Pollution & Eutrophication (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田 茉唯
2. 発表標題 雨天時排水からの集水域内生息動物DNA検出へ向けた選択的試料採取方法の検討
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Mark Edward Jolejole
2. 発表標題 Detection of terrestrial animals in urban runoff using environmental DNA
3. 学会等名 IWA 16th International Conference on Urban Drainage (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 内田 茉唯
2. 発表標題 生息環境周辺試料からのハクビシン由来DNAの検出
3. 学会等名 第59回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2022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)・准教授   (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)	
研究分担者	加藤 裕之  (Kato Hiroyuki)  (20897912)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授   (12601)	
研究分担者	Pham Dung  (Pham Viet Dung)  (30809215)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任助教   (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
---------	---------