

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20064

研究課題名(和文) iDNAによる哺乳類調査法の確立と実践

研究課題名(英文) Developing and applying an invertebrate-derived DNA (iDNA) for a mammal survey tool

研究代表者

唐澤 重考 (KARASAWA, Shigenori)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30448592

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)：本研究は、吸血動物に保持されている哺乳類の血液DNA(iDNA)を解析することで哺乳類相を調べる方法の開発・実践を目的とした。延べ110地点で合計34,091個体の吸血動物の採集を行った結果、採集効率の観点からはマダニ類が本手法に適した吸血動物であることが分かった。また、オオトゲチマダニは、シカの糞塊数と正の相関関係が認められ、マダニ類の個体数から哺乳類の個体数を推定できる可能性が示唆された。iDNAの実践においては、ニホンジカ、ニホンノウサギ、コウベモグラなどが検出される一方で、ヒトが数多く検出された。これは実際にヒトが吸血されていることに加え、実験中のコンタミネーションが疑われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、世界中で数多くの哺乳類が絶滅の危機に瀕しており、それらを効果的に保全するためには、より簡便に分布を調べる方法の開発が不可欠である。そこで、本研究では、哺乳類そのものを調べるのではなく、哺乳類の血液を吸血する吸血動物の体内に保持されているDNAを解析する方法の開発と実践を目的とした。その結果、マダニから得られたDNAを調べることで、ニホンジカ、ニホンノウサギ、コウベモグラの分布を特定することに成功した。また、ある種のマダニの個体数を数えることでシカの個体数密度を推定できる可能性も示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a new monitoring method of mammals, which can survey mammals based on blood meal deposited in hematophagies. A total of 34,091 specimens was collected from 110 sites. From the aspect of sampling effort, hard tick (Ixodidae) was a suitable animal for this method. In addition, population density of a hard tick species (*Haemaphysalis megaspinosus*) showed a close relationship with number of fecal pellet of sika deer (*Cervus nippon*), suggesting that population density of hard tick is used as an index of mammal's density. We analyzed DNA of blood meal in 216 specimens and can identify *Cervus nippon*, *Lepus brachyurus*, and *Mogera wogura*. On the other hand, human (*Homo sapiens*) was identified in most specimens. This result suggests two possibilities: one is that many people were actually bitten in wild; the other is that human's DNA was mix during experiment.

研究分野：土壤動物学

キーワード：iDNA マダニ 哺乳類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、世界中で数多くの哺乳類が絶滅の危機に瀕しており、その保全は緊急の課題である。しかし、絶滅の危機に瀕する動物は個体数が少なく、また、致命的なトラップが使用できないため、その実態解明が難しく保護策が立てにくい、という悪循環に陥っている。したがって、哺乳類を適切に保全するためには、既存の調査法とは異なる効率的な哺乳類調査法の確立が求められている。

そこで、本研究では新しい哺乳類の調査法として、吸血性無脊椎動物体内に保持されている血液 DNA (iDNA: Invertebrate-derived DNA) に着目した。なぜならば、種特異性の高い一部の種を除き、吸血動物は一般的に個体数が多く、適切に採集すれば絶滅の危険性が低いためである。しかし、日本において iDNA を用いた研究例は数が少なく、どのような動物を用いれば効率的なのか、また、在・不在だけでなく吸血動物から哺乳類の個体数密度を評価することはできるのか、など検討すべき課題が残されていた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では iDNA による哺乳類調査法を確立し、iDNA に適した吸血動物、および、好適な遺伝子実験の条件を検討し、希少な固有種が多い沖縄島 (沖縄県) のヤンバル地域にて iDNA による哺乳類調査を実践することを目的とした。また、吸血動物と哺乳類の個体数密度の関係を調べ、吸血動物による哺乳類の個体数推定の可能性についても検討を行った。

3. 研究の方法

本研究は、応募者の所在地である鳥取県、ならびに希少な固有種が多い沖縄島 (沖縄県) で行なった。具体的には、鳥取県と沖縄県で吸血性無脊椎動物の群集構造を明らかにし、季節変化や個体数密度を踏まえた上で、iDNA に有用な吸血動物の選定を行った。また、哺乳類の個体数密度と吸血動物の個体数密度の関係性から、哺乳類の個体数推定の可能性についても検討した。次いで、哺乳類の種同定が可能となる DNA プライマーを決定した。iDNA による哺乳類調査法を稀少哺乳類が多く生息する沖縄県の沖縄島にて実践的利用を行った。

4. 研究成果

(1) 採集効率からみた iDNA に適した吸血動物

本研究では、延べ 110 地点で吸血動物の採集を行い、合計 34,091 個体の吸血動物を採集した (表 1)。この結果、本研究の調査地域においては、1 地点につき平均 10-1000 個体が採集できるマダニ類が、蚊・ブユ類よりも iDNA に適していると考えられた。

表1. 本研究における野外調査の概要.

地域	対象動物	地点数	方法	採集個体数	調査年月
沖縄島	マダニ類	31地点	旗ずり法	329	2017年9月、2018年3、8月、2019年3月
沖縄島	蚊・ブユ類	26地点	人囮法	49	2017年9月、2018年3、8月、2019年3月
沖縄島	蚊・ブユ類	17地点	CDCトラップ法	55	2017年9月、2018年3、8月、2019年3月
鳥取県	マダニ類	36地点	旗ずり法	33,658	2017年3月-2018年2月、2019年6、10月

また、経時的にマダニ類を採集した鳥取県のデータから、マダニ類は種ごとに生活様式が大きく異なり、初夏に成虫、秋に幼虫が多く採集される傾向があるが、年間を通して何らかの種が採集できることからマダニ類は iDNA に適した動物であると言える (図 1; 柴田ほか, 2020)。

ただし、沖縄県における地点あたりの採集個体数は、おおよそ鳥取県の 1/100 であることから、本地域においては、様々な動物群を併用するのが良いと考えられた。

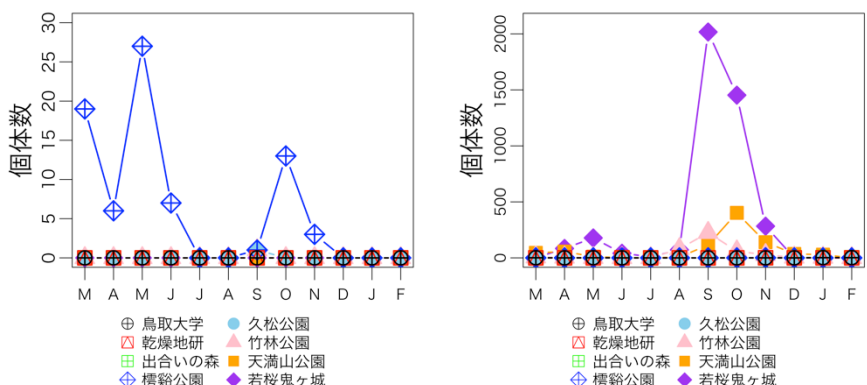


図 1. タイワンカクマダニ (左) およびオオトゲチマダニの季節消長.

## (2) シカ密度とマダニ類の個体群密度の関係

吸血動物の個体群密度が哺乳類の個体群密度の指標になるのか検討するため、鳥取県 (28 地点) においてシカの糞塊数とマダニ類の個体数密度の関係を調べた。その結果、シカの糞塊数とオオトゲチマダニの成体数の間には正の相関関係が認められ、本マダニの個体数からシカの個体数を推定できる可能性が示唆された (図 2)。ただし、より個体数密度が低い希少哺乳類について同様の傾向が認められるかについては検討できておらず今後の課題となった。

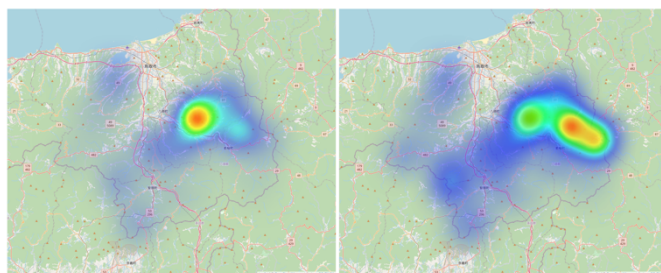


図 2. シカの糞塊数 (左) とオオトゲチマダニ (右) の採集個体数の Heatmap.

## (3) 哺乳類の種同定用プライマーの検討

当初は、本研究で哺乳類から DNA を抽出して新たなプライマーを設計する予定であったが、哺乳類の採集に想像以上に時間がかかったことに加え、すでに数多くのプライマーが報告されていたため、新しいプライマーの設計は行わず、既発表のプライマーを整理し、それらの中から効果的なプライマーを選ぶことにした。文献整理した結果、広範囲の哺乳類を種同定できるプライマーとして 9 種類 (COI、12S rRNA、16S rRNA、CytB) が確認できた。このうち 3 種類 (COI、12S rRNA、16S rRNA) を対象に PCR 増幅ならびに塩基配列の決定の成功率を調べた。さらに、DNA 抽出方法と市販の DNA 抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit: QIAGEN) と Chelex 法による成功率の比較も行った。その結果、MiMammal-U (Ushio et al., 2017) が成功率が高く、また、抽出法については、市販のキットの方がやや成功率が高かった。これらのことから、プライマーは MiMammal-U、抽出方法はサンプル数が少ない場合には実験成功率の高い市販キット、多数のサンプルで実験を行う場合は安価な Chelex 法を用いるのが良いと考えられた。

## (4) 鳥取県および沖縄島における iDNA の実践

鳥取県の 8 地点で採集したマダニ類 136 個体を対象に、上記の方法で体内の保持されている哺乳類 DNA の解析を行った。具体的には、PCR 産物をサンガー法にて塩基配列の決定を行ったのち、BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、対象配列の種名を検索した。その結果、ニホンジカ、ニホンノウサギ、コウベモグラを特定することができた (図 3)。旗ざり法で採集されるマダニ類は吸血・脱皮を終え、再びの吸血を待つ個体である。つまり、本研究の結果から、脱皮前に吸血した哺乳類の同定も可能であることが分かった。一方で、実験した個体の大半でヒトが検出された。本研究の採集地点が森林公園など人間活動の活発な場所であったため、この結果は、実際に多くのマダニ類がヒトを吸血している可能性を示唆する。ただし、実験中に実験者の DNA が混入した可能性は排除できず、iDNA を実践する上でヒト DNA の取り扱いには大きな問題であると言える (下記も参照)。

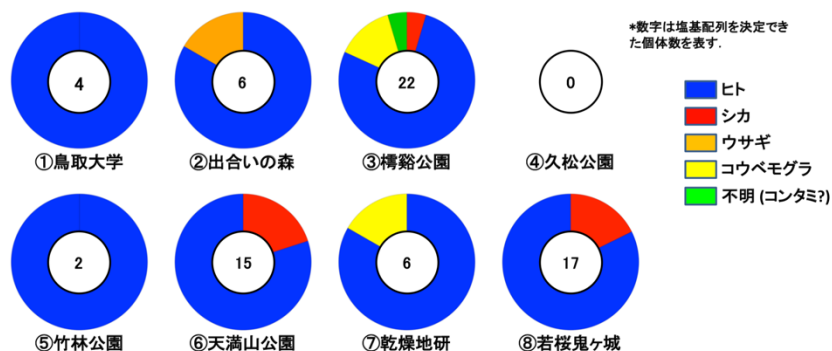


図 3. 鳥取県で採集されたマダニ類の吸血源.

沖縄県においては、合計 80 個体のマダニ類および蚊・ブユ類を対象に実験を行った。その結果、65 個体で塩基配列が決定できたが、63 個体は一致率 90%以上でヒトが BLAST 検索された。多くの吸血動物からヒトの DNA が検出された結果は、鳥取県での実験結果と同じである。沖縄島の研究では、森林公園などに加えて、細い登山道などで採集した個体も実験していることから、全てではないにしても実験中のコンタミネーションが疑われる。また、ヒトが検索されなかった 2 個体は、一致率 97.9%と 92.7%でニホンジカが BLAST 検索された。沖縄島には、ニホンジカが生息していないため、やはり、実験中のコンタミネーションの可能性が高い。

本実験を行うにあたり、次亜塩素酸ナトリウムによる定期的な実験器具の消毒、ならびに実験者はマスクと手袋を着用することでコンタミネーションの防止を行った。一方で、実験室のスペースの関係上、DNA 抽出と PCR 実験を同じ部屋・実験器具を使わざるを得なかった。吸血動物、特に旗ずり法で採集されるマダニ類の体内にはごく微量の血液しか保持されていないため、iDNA を行うためには、実験中の僅かな混入も防止するような仕組みを構築することが不可欠である。また、本研究では、少数のサンプルであるが、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスも試したが、ヒト以外の哺乳類は検出されなかった。

#### 引用文献

- ①三浦 (2010) 植物防疫, 64: 52–57.
- ②柴田ほか (2020) 鳥取県立博物館研究報告, 57: 1–18.
- ③Ushio et al. (2017) *Molecular Ecology Resources*, 17.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 山内健生・横川忠司	4. 巻 8
2. 論文標題 地表の枝の下から得られたオオトゲチマダニ飽血雌成虫.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 都市有害生物管理	6. 最初と最後の頁 5-6
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 -
1. 著者名 Nakano, T., Prozorova, L.	4. 巻 53
2. 論文標題 A new species of Orobdella (Hirudinida: Arhynchobdellida: Orobdellidae) from Primorye Territory, Russian Far East	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural History	6. 最初と最後の頁 351-364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00222933.2019.1593539	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 該当する
1. 著者名 Morishima, K., Nakano, T., and Aizawa, M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sika deer presence affects the host-parasite interface of a Japanese land leech	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.6344	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 該当する
1. 著者名 柴田祥明・山内健生・唐沢重考	4. 巻 57
2. 論文標題 鳥取県東部におけるマダニ科の季節消長	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 鳥取県立博物館研究報告	6. 最初と最後の頁 1 - 18
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田祥明・山内健生・唐沢重考
2. 発表標題 鳥取県東部の森林公園におけるマダニ類の発生消長および吸血源
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田祥明・山内健生・唐沢重考
2. 発表標題 鳥取県東部の森林環境におけるマダニ相および宿主に関する知見について
3. 学会等名 鳥取県生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森嶋佳織・半谷吾郎・中野隆文・逢沢峰昭
2. 発表標題 ニホンヤマビルの宿主動物の同定
3. 学会等名 第129回日本森林学会大会
4. 発表年 2018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	山内 健生  (YAMAUCHI Takeo)  (00363036)	兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・准教授   (24506)	マダニの採集と分類

## 6. 研究組織 (つづき)

	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	中野 隆文 (NAKANO Takafumi)  (50723665)	京都大学・理学研究科・准教授  (14301)	ヒルの採集と分類
研究 協力者	城ヶ原 貴通 (JOGAHARA Takamichi)		沖縄島における野外調査協力