

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15984

研究課題名（和文）野生動物の集団遺伝構造解析からアプローチする感染症生態学についての研究

研究課題名（英文）Study on "Ecology of infectious diseases" with an approach from analysis of population genetic structure of wildlife

研究代表者

兼子 千穂 (KANEKO, Chiho)

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・特別協力研究員

研究者番号：20811706

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）：本研究では、中型野生動物が生態系内で感染症伝播に果たす役割を明らかにするために、多様な環境に生息するタヌキおよびアナグマを対象に宮崎県内の対象地域における遺伝的交流と感染症保有状況について調査した。集団遺伝構造解析の結果、調査対象地域に生息するタヌキおよびアナグマについて、本研究では明らかな分集団は検出されなかった。このことから、調査地域内に生息するタヌキおよびアナグマは広く行き来があり遺伝的な交流があると考えられた。また、重症熱性血小板減少症候群の有病率が高いことが明らかとなり、調査対象地域では広範囲にタヌキ・アナグマの行き来があり、それに伴い病原体の移動も起こりうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人の感染症の多くは人獣共通感染症であり、野生動物と人との接触は伝播の機会となりうる。ゆえに、その制御のためには感染症のレゼルポア/ベクターとなる野生動物の分布や生態に関する知見を集積し、生態系内の感染症の動態を捉える必要がある。本研究では山間部から農村部、都市部まで広範囲に生息する中型野生動物に着目し、これらの動物の分布や移動が地域の人獣共通感染症の伝播に影響を及ぼす可能性について検証した。中型野生動物の生息域は人や伴侶動物・家畜の生活圏と重なる部分が多く、これらの野生動物が広範囲に移動することで人獣共通感染症の原因となる病原体が運ばれる可能性があることを示したことに学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, genetic exchange and prevalence of zoonotic infectious diseases in Japanese raccoon dogs and Japanese badgers, which are endemic species and widely inhabit in various environments in Japan, were investigated, eventually aiming at elucidation how the medium-sized wild mammals contribute to infectious disease transmission in the ecosystems. As a result of analysis of population genetic structures of these two species in the studied area, obvious subpopulation was not confirmed. Therefore, genetic exchange in these species would happen due to the frequent comings and goings around the studied area. Moreover, high prevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japanese badgers and raccoon dogs was confirmed in the studied area. This implies that zoonotic pathogens could be widely and frequently transferred by the medium-sized wild mammals in the studied area.

研究分野：獣医学

キーワード：野生動物 人獣共通感染症 タヌキ アナグマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症の伝播・流行の動態を理解するためには病原体を保有するレズルポアや病原体を運ぶベクターの分布や生態を理解することが必須である。例えば、長年狂犬病清浄地域であるとされてきた台湾で 2013 年に報告されたイタチアナグマにおける狂犬病の流行については、イタチアナグマの生息地を分断する山脈や河川などの自然の障壁が狂犬病の分布・発生状況に影響していることが報告されている (Lan et al., 2017; Tsai et al., 2016)。ヒトの感染症の大部分が人獣共通感染症であることや、野生動物とヒト・飼育動物の接点は新興感染症の発生の機会となりうることを鑑みると、感染症の迅速な発生探知と制御のためには身近な野生動物の生息状況やその生態について知見を収集しておくことが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、山地や農村部はじめ、都市部などにも広く生息しヒトの生活圏と近い環境に生息するタヌキやアナグマなどの中型野生動物が、こうした異なる環境を広く行き来することで感染症が運搬される可能性を探ることを目的として、宮崎県の山地、農村部、市街地に広く生息する中型野生動物が互いに遺伝的な交流があるか明らかにするために集団遺伝構造の解析 (分集団の推定) を行った。

3. 研究の方法

(1) 調査対象地域と中型野生動物検体の採取

本研究では、山間部から農村部、都市部まで広く生息する中型野生動物 (タヌキおよびアナグマ) が広く行き来があるのか (遺伝的に交流があるのか) 検証するために集団遺伝構造の解析を実施した。2018 年 12 月から 2021 年 12 月までに宮崎県内の異なる生息環境を含む地域 (またがる自治体の総面積としては約 960 平方キロメートルの範囲) において、自治体の有害鳥獣捕獲またはロードキルにより死亡したアナグマ 70 検体、タヌキ 60 検体を収集した。これらの検体の組織から DNA 抽出を行い、収集位置情報の明らかであったアナグマ 65 検体、タヌキ 55 検体についてマイクロサテライトを利用した集団遺伝構造解析を実施した。

(2) 中型野生動物の集団遺伝構造

アナグマのマイクロサテライト解析には、*Mel-102*, *Mel-105*, *Mel-106*, *Mel-109*, *Mel-111* および *Mel-117* の 6 つのマーカを用いた (Carpenter et al., 2003; Frantz et al., 2003)。タヌキのマイクロサテライト解析には、*Nyct-1*, *Nyct-3*, *Nyct-4*, *Nyct-5*, *Nyct-6*, *Nyct-7*, *Nyct-8*, *Nyct-9*, *Nyct-10* および *Nyct-12* の 10 種のマーカを用いた (Hong et al., 2013)。Null allele の評価は Micro-Checker ソフトウェアを用いて行った。得られた遺伝子型データは地理的位置情報と併せて GENELAND ソフトウェアを用いて分集団の推定を行った。集団の Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) からの逸脱は GENEPOP ソフトウェアを用いて行った。

(3) 病原体保有状況調査

中型野生動物の病原体感染状況調査では、狂犬病ウイルス含むリッサウイルス属についての遺伝子検査、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスについての遺伝子検査および抗体検査、インフルエンザ A ウイルスについての抗体検査、ベータコロナウイルス属についての遺伝子検査を実施した。加えて、タヌキおよびアナグマの糞便中の細菌について、分離培養および次世代シーケンス技術を用いた網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 中型野生動物の集団遺伝構造

アナグマとタヌキのマイクロサテライト解析に用いたマーカについての評価
アナグマでは各遺伝子座の対立遺伝子数は 3 ~ 10 であった。タヌキでは 2 ~ 10 であった。アナグマおよびタヌキについて使用した遺伝子座の重複率 (Observed P_{ID} および P_{ID-sib}) はそれぞれ表 1 および 2 の通りであった。アナグマおよびタヌキの両方で Null allele の存在が疑われる遺伝子座はなかった。

表 1 . アナグマ 65 検体のマイクロサテライト解析に使用したマーカーについての統計量

遺伝子座	観察された対立遺伝子座の数	H_o	H_e	p -value	SE	Observed P_{ID}	P_{ID-sib}
<i>Mel-105</i>	9	0.892	0.843	0.6946	0.0074	0.039	0.339
<i>Mel-117</i>	10	0.877	0.824	0.5715	0.0110	0.055	0.351
<i>Mel-111</i>	7	0.815	0.819	0.2679	0.0057	0.055	0.355
<i>Mel-106</i>	6	0.769	0.748	0.5121	0.0069	0.103	0.404
<i>Mel-109</i>	4	0.723	0.685	0.7850	0.0026	0.147	0.446
<i>Mel-102</i>	3	0.062	0.060	1.0000	0.0000	0.883	0.942
累積						1.6×10^{-6}	0.007

H_o : 観察されたヘテロ接合度、 H_e : 期待されたヘテロ接合度、Observed P_{ID} : 任意の 2 個体で遺伝子型が偶然一致する確率 (観察値)、 P_{ID-sib} : 同腹子間で遺伝子型が一致する確率

表 2 . タヌキ 55 検体のマイクロサテライト解析に使用したマーカーについての統計量

遺伝子座	観察された対立遺伝子座の数	H_o	H_e	p -value	SE	Observed P_{ID}	P_{ID-sib}
<i>Nyct-3</i>	9	0.782	0.777	0.9655	0.0026	0.067	0.383
<i>Nyct-9</i>	6	0.618	0.720	0.1259	0.0043	0.115	0.423
<i>Nyct-5</i>	7	0.709	0.715	0.7979	0.0060	0.108	0.424
<i>Nyct-4</i>	6	0.673	0.688	0.7157	0.0054	0.138	0.444
<i>Nyct-8</i>	10	0.618	0.615	0.2119	0.0124	0.181	0.490
<i>Nyct-7</i>	6	0.473	0.541	0.3272	0.0085	0.264	0.548
<i>Nyct-1</i>	3	0.473	0.492	0.0458	0.0012	0.304	0.581
<i>Nyct-12</i>	4	0.345	0.316	1.0000	0.0000	0.466	0.714
<i>Nyct-6</i>	3	0.309	0.308	0.7991	0.0017	0.505	0.724
<i>Nyct-10</i>	2	0.018	0.018	No information		0.966	0.983
累積						3.7×10^{-7}	0.002

H_o : 観察されたヘテロ接合度、 H_e : 期待されたヘテロ接合度、Observed P_{ID} : 任意の 2 個体で遺伝子型が偶然一致する確率 (観察値)、 P_{ID-sib} : 同腹子間で遺伝子型が一致する確率

調査地域のアナグマおよびタヌキの分集団の推定

過去の研究では、交通量の多い道路などの人工物によって隔たれた近接した異なる二つのエリアのタヌキは遺伝的に隔絶されていることや、狭いエリアに生息するキツネ集団でも線路などの人工物や大きな河川によって活発な移動は妨げられていることが報告されている (Kato et al., 2017; Saito et al., 2016)。しかしながら、本研究の調査対象地域に生息するタヌキおよびアナグマについて、今回の研究では明らかな分集団は検出されなかった。このことから、本調査地域は大きな河川や交通量の多い道路を含むものの、域内に生息するタヌキおよびアナグマは広く行き来があり遺伝的な交流があると考えられた。

(2) 病原体保有状況調査

狂犬病ウイルス含むリッサウイルス属の保有状況は遺伝子検査を実施した 34 検体 (アナグマ 17 検体、タヌキ 17 検体) すべて陰性であった。ベータコロナウイルス属の遺伝子検査は検査した 46 検体 (タヌキ 21 検体、アナグマ 25 検体) 全て陰性であった。インフルエンザ A ウイルスについての抗体検査は 86 検体 (アナグマ 48 検体、タヌキ 38 検体) すべて陰性であった。SFTS ウイルスについてはアナグマでは 68% (43/63) が抗体陽性、3% (2/63) がウイルス遺伝子陽性であった。一方タヌキにつ

いては、23% (12/53) が抗体陽性であり、ウイルス遺伝子は全て陰性であった。SFTS 流行地である宮崎県のタヌキとアナグマでは SFTS の有病率が高かった。一方、タヌキとアナグマ間で有病率には有意な差があったため、種特異的な要因の関連も示唆された。

加えて、タヌキとアナグマでは人獣共通感染症の原因菌でもあるカンピロバクター属菌の糞便からの分離率に違いがあることが分かった。次世代シーケンス技術を用いて腸内細菌叢の解析を行った結果、アナグマでは Firmicutes 門および Proteobacteria 門の細菌が優勢であり Bacteroidota 門の細菌の存在割合は低いのに対し、タヌキの腸内細菌叢は主に Firmicutes 門および Bacteroidota 門の細菌から構成されており、アナグマとタヌキでは腸内細菌叢が顕著に異なることが明らかとなった。これは、カンピロバクター属菌以外のヒトの感染症の原因となる病原体の保有状況の違いにも示唆を与えるものである。加えて、タヌキとアナグマはともに日和見的雑食性で生息環境も似ているにもかかわらず利用する腸内細菌は大きく異なっており、動物の腸内細菌叢を形成する主な要因は食餌であるというこれまでの通説に新たな知見を与える結果となった。本研究を通して、感染症学についてのみならず動物学・進化的にも興味深い知見が得られた。

本研究で実施した中型野生動物の集団遺伝構造の解析では、対象地域のタヌキとアナグマは大きな一つの集団であり、遺伝的に異なる分集団には分かれられないという結果であった。故に、本研究結果からは、対象地域の山際に近いエリアから市街地に近いエリアまで中型野生動物の行き来がありそれに伴い感染症(の原因となる病原体)の移動も起こりうることが示唆された。特に SFTS に関しては、研究対象としたエリアの中型野生動物は広く感染の機会があることが示唆された。一方、原因病原体の種類により有病期間や伝播経路に関する特徴はさまざまであり、環境中の感染症の動態をより詳細に捉えるためには、それぞれの感染症ごとの特徴と動物種の生態を踏まえたさらなる研究と知見の蓄積が期待される。

<引用文献>

- Carpenter et al. (2003). Isolation of 39 polymorphic microsatellite loci and the development of a fluorescently labelled marker set for the Eurasian badger (*Meles meles*) (Carnivora: Mustelidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 610-615.
- Frantz et al. (2003). Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology*, 12, 1649-1661.
- Hong et al. (2013). Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers. *Genes & Genetic Systems*, 88, 69-76.
- Kato et al. (2017). Population genetic structure of the urban fox in Sapporo, northern Japan. *Journal of Zoology*, 301, 118-124.
- Lan et al. (2017). Indigenous wildlife rabies in Taiwan: Ferret badgers, a long term terrestrial reservoir. *BioMed Research International*, 2017, 5491640.
- Saito et al. (2016). Population structure of the raccoon dog on the grounds of the Imperial Palace, Tokyo, revealed by microsatellite analysis of fecal DNA. *Zoological Science*, 33, 485-490.
- Tsai et al. (2016). Emergence of a sylvatic enzootic formosan ferret badger-associated rabies in Taiwan and the geographical separation of two phylogenetic groups of rabies viruses. *Veterinary Microbiology*, 182, 28-34.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kaneko, C., Shinohara, A., Kikuchi, T., Tokuda, A., Irie, T., Yamada, K., Misawa, N., Yoshida, A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinctly different gut microbiota in Japanese badgers and Japanese raccoon dogs despite sharing similar food habits and environments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mammalian Biology	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） 10.1007/s42991-023-00362-7	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 Kaneko, C., Mekata, H., Umeki, K., Sudaryatma, P.E., Irie, T., Yamada, K., Misawa, N., Umekita, K., Okabayashi, T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in medium-sized wild mammals in Miyazaki, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 102115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ttbdis.2022.102115	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 Kaneko, C., Saito, A., Inagaki, H., Sugiyama, H., Mazimpaka, E., Fujimoto, S., Okabayashi, T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Rapid inactivation of Dabie bandavirus (SFTSV) by irradiation with deep-ultraviolet light-emitting diode.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 3438-3441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.27698	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 Ishida, M., Kaneko, C., Irie, T., Maruyama, Y., Tokuda, A., Yoshida, A.	4. 巻 84
2. 論文標題 Sporadic endemicity of zoonotic Paragonimus in raccoon dogs and Japanese badgers from Miyazaki Prefecture, Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 454-456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0573	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 Taniguchi, T., Tarigan, E., Sato, H., Kaneko, C., Misawa, N.	4. 巻 18
2. 論文標題 Prevalence of <i>Campylobacter</i> spp. in Raccoon Dogs and Badgers in Miyazaki Prefecture, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EcoHealth	6. 最初と最後の頁 241-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10393-021-01527-x	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 Inagaki, H., Saito, A., Kaneko, C., Sugiyama, H., Okabayashi, T., Fujimoto, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid Inactivation of SARS-CoV-2 Variants by Continuous and Intermittent Irradiation with a Deep-Ultraviolet Light-Emitting Diode (DUV-LED) Device.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10060754	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 入江 隆夫, 兼子 千穂, 丸山 由乃, 徳田 麻実, 吉田 彩子
2. 発表標題 アナグマに寄生する <i>Tetragomphus melis</i> の分類学的位置づけについて
3. 学会等名 第74回 日本寄生虫学会 南日本支部大会・第71回 日本衛生動物学会 南日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 まり, 兼子 千穂, 入江 隆夫, 丸山 由乃, 徳田 麻実, 吉田 彩子
2. 発表標題 Endemicity of zoonotic <i>Paragonimus</i> in wild animals from Miyazaki Prefecture, Japan.
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兼子 千穂, 齊藤 暁, 稲垣 浩子, 杉山 博信, 藤元 昭一, 岡林 環樹
2. 発表標題 深紫外線LED (DUV-LED) 照射によるSFTSウイルスの不活化効果
3. 学会等名 第3回 SFTS研究会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼子 千穂, Sudaryatma, P.E., 岡林 環樹
2. 発表標題 宮崎県の中型野生動物における重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス感染状況調査
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口 篤子, Tarigan E., 兼子 千穂, 三澤 尚明
2. 発表標題 宮崎県内の野生動物におけるカンピロバクター保菌状況と分離株の性状
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 粟津原 優美, 兼子 千穂, 志和 希, 君付 和範, 井上 智, 朴 天鎬
2. 発表標題 タヌキの鼻口部洞毛および肉球におけるメルケル細胞の局在
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 兼子 千穂, 有川 玄樹, 目堅 博久, 坊菌 慶信, 山田 健太郎, 伊藤(高山) 睦代, 堀田 明豊, 井上 智, 三澤 尚明
2. 発表標題 官学が連携した狂犬病対策の取り組みと野生動物モニタリングの展開
3. 学会等名 令和元年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口 喬子, Tarigan E, 兼子 千穂, 三澤 尚明
2. 発表標題 宮崎県における野生動物から分離されたCampylobacter upsaliensisの性状
3. 学会等名 第12回 日本カンピロバクター研究会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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