

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

S II-1-2 希少鳥類における鳥インフルエンザウイルス感染対策の確立 (JPMEERF18S20120)

平成30年度～令和2年度

Establishment of countermeasures against avian influenza virus infection in endangered birds

〈研究代表機関〉

国立大学法人 鳥取大学

〈研究分担機関〉

国立大学法人北海道大学

国立大学法人鹿児島大学

国立研究開発法人国立環境研究所

〈研究協力機関〉

猛禽類医学研究所

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和3年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価 （国立大学法人鳥取大学）	11
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 死亡個体等からの鳥インフルエンザウイルス抗原及び遺伝子検出手法の開発並びに希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価 （国立大学法人北海道大学）	22
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	

II-3 鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境清浄化技術の確立

. 33

(国立大学法人鹿児島大学)

要旨

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

II-4 培養細胞を用いた非侵襲的手法による希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染に対する感受性
評価法の確立

. 43

(国立環境研究所)

要旨

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

III. 研究成果の発表状況の詳細 59

IV. 英文 Abstract 64

I. 成果の概要

課題名 希少鳥類における鳥インフルエンザウイルス感染対策の確立

課題代表者名 山口 剛士 (国立大学法人鳥取大学農学部教授)

研究実施期間 平成30年度～令和2年度

研究経費

(千円)

	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
平成30年度	50,556	50,556
令和元年度	50,604	50,604
令和2年度	50,602	50,602
合計額	151,762	151,762

本研究のキーワード 高病原性鳥インフルエンザ、サーベイランス、抗インフルエンザウイルス薬、培養細胞、希少鳥類、感受性評価、リスク評価

研究体制

(サブテーマ1) 鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価 (国立大学法人鳥取大学) (体系的番号 JPMEERF18S20102)

(サブテーマ2) 死亡個体等からの鳥インフルエンザウイルス抗原及び遺伝子検出手法の開発並びに希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価 (国立大学法人北海道大学) (体系的番号 JPMEERF18S20103)

(サブテーマ3) 鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境浄化技術の確立 (国立大学法人鹿児島大学) (体系的番号 JPMEERF18S20104)

(サブテーマ4) 培養細胞を用いた非侵襲的手法による希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染に対する感受性評価法の確立 (国立環境研究所) (体系的番号 JPMEERF18S20105)

研究協力機関

猛禽類医学研究所

1. はじめに (研究背景等)

鳥類の減少要因としては、「森林伐採が最も多く、続いてその他、外来種による捕食者侵入・食害等が多い。」と評価(「我が国の絶滅のおそれのある野生生物の保全に関する点検とりまとめ報告書」平成24年3月)され、それらについては自然公園法、自然環境保全法等に基づく保護地域の指定や、外来種の防除事業などの対策が実施されてきた。その一方で、近年、感染症等による野鳥の大量死は、新たな絶滅リスクとして、特に希少鳥類への影響が懸念されている。

特に感染症のうち、高病原性鳥インフルエンザウイルスについては、すでに世界各地でガン類、ツル類、猛禽類などの希少鳥類の死亡が確認されている。平成17年、18年には中国の青海湖やモンゴルで希少種のインドガンが大量死した事例も発生する等、人獣共通感染症としての人の健康への影響、家禽農家等への経済的な影響だけでなく、生物多様性の影響も懸念されているところである。我が国でも高病原性鳥インフルエンザは、平成16年から断続的に確認されており、平成28年11月から翌年3月にかけては、野鳥等から高病原性鳥インフルエンザウイルスが過去最高の22都道府県、218例で確認され、鹿児島県出水市ではナベヅル及びマナヅルの死亡例も報告された。また、大学等が独自に実施した調査では糞便からもウイルスが検出されたが、環境省が実施している全国の糞便調査で高病原性のウイ

ルスの検出例は無く、調査手法の改善が期待されている。鳥インフルエンザウイルス感染は、平成 16 年から断続的に我が国の家禽や野鳥で確認されているが、平成 17 年、18 年には中国の青海湖やモンゴルで希少種のインドガンが大量死した事例も発生する等、人獣共通感染症としての人の健康への影響、家禽農家等への経済的な影響だけでなく、生物多様性への影響も懸念されている。また、鳥インフルエンザウイルスは変異しやすく、今後希少鳥類等に高い病原性を示す新たなウイルスが出現する可能性もあり、希少鳥類保全の新たな脅威となっている。

2. 研究開発目的

本テーマでは、希少鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の予防および感染確認後の適切な対応に不可欠な新技術の確立と対策立案に必要な科学的基盤構築を目的とし、これを達成するため迅速診断法と新たなサーベイランス技術の確立、希少鳥類への感染源としての水鳥のリスクと希少鳥類の感受性評価および培養細胞を用いた非侵襲的かつ効率的な病原性評価法の確立、さらには希少鳥類が感染した場合の治療法およびウイルスに汚染された希少鳥類棲息環境の清浄化技術について研究開発を行った。

3. 研究目標

全体目標	希少鳥類の高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）感染対策確立のため、効果的な新規迅速診断法、ウイルスの早期発見技術と環境の清浄化技術を確立しその社会実装を目指す。また、希少種および希少種と生息域を共有する一般種の HPAIV 感受性の解明および培養細胞を用いた希少鳥類の感受性評価法を確立し、希少鳥類におけるリスク評価と感染予防の基礎を構築する。
サブテーマ 1	鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価
サブテーマリーダー /所属機関	山口剛士／国立大学法人鳥取大学
目標	<ul style="list-style-type: none"> ・鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスの対象として環境水や見かけ上健康な個体を対象とする新たな監視体制を確立する。 ・見かけ上健康な個体から採取した血清を用いた抗体検出および野鳥分離株の遺伝子解析等により、HPAIV の国内侵入リスクを明らかにする。 ・希少鳥類における感染予防の基盤構築のため、希少鳥類と生息地を共有するマガモなどの水鳥(一般種)について、HPAIV 感染時の症状やウイルス排出状況を感染実験により解明する。

サブテーマ2	死亡個体等からの鳥インフルエンザウイルス抗原及び遺伝子検出手法の開発並びに希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価
サブテーマリーダー /所属機関	迫田義博／国立大学法人北海道大学
目標	<ul style="list-style-type: none"> ・家禽および野鳥で流行している HPAIV の遺伝子と抗原性を解明する。この成果を基に死亡野鳥から高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原および遺伝子を検出する方法を評価し、実用化する。 ・サブテーマ3と連携し、オジロワシなどの希少鳥類における鳥インフルエンザの診断に有用な診断材料を特定する。 ・オジロワシなどの希少鳥類における抗インフルエンザ薬の有効性を評価し、治療法の確立に役立てる。

サブテーマ3	鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境清浄化技術の確立
サブテーマリーダー /所属機関	小澤真／国立大学法人鹿児島大学
目標	<ul style="list-style-type: none"> ・絶滅危惧種オジロワシの HPAIV に対する感受性や伝播能力等を、猛禽類医学研究所で保護されている野生復帰が不可能な終生飼育個体3羽を用いたウイルス感染実験を通じて明らかにする。 ・環境水に含まれる鳥インフルエンザウイルスの効果的な消毒方法を確立するため、有機物が混入しても消毒効果が減弱しにくいアルデヒド系・フェノール系を中心とした7種類の動物用消毒薬と、高病原性株を含む5株の鳥インフルエンザウイルスを用いて、有機物存在下および低温下における消毒効果を検証する。 ・鹿児島県出水平野のツルねぐら水等から分離された鳥インフルエンザウイルス株（平成30年度39株・令和元年度23株）の遺伝的性状を解明する。

サブテーマ4	培養細胞を用いた非侵襲的手法による希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染に対する感受性評価法の確立
サブテーマリーダー /所属機関	大沼学／国立環境研究所
目標	<ul style="list-style-type: none"> ・生体感染実験の代替法として、培養細胞での感染実験による HPAIV の病原性評価法を確立する。 ・評価指標は、抗ウイルス作用のある遺伝子の発現パターンとし、死亡率が高い鳥類種の遺伝子発現パターンの特徴を持つ希少鳥類種が存在するのか確認する。この評価法を希少鳥類8種程度に適用する。

4. 研究開発内容

課題全体像：本研究は、サブテーマ1「鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価」、サブテーマ2「死亡個体等からの鳥インフルエンザウイルス抗原及び遺伝子検出手法の開発並びに希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評

価」、サブテーマ3「鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境清浄化技術の確立」およびサブテーマ4「培養細胞を用いた非侵襲的手法による希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染に対する感受性評価法の確立」以上4つのサブテーマから成る。

サブテーマ1では、全国規模で現在実施している野鳥糞便および死亡個体を対象とした高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）国内侵入早期発見のためのサーベイランスシステムを補完する新たな検査手法の確立と社会実装を目指し、野生水鳥生息地の環境水および見かけ上健康な水鳥に着目、これらを対象にしたHPAIV検出の有用性を検討した。また、希少種と生息域を共有する一般種を用いた感染実験を実施し、HPAIVの排出量やその期間、体内分布から希少鳥類への感染源としてのリスク評価を行った。具体的には、ウイルス分離のため2018年から2020年まで全国6道県で捕獲した見かけ上健康な水鳥280羽、2019年10月から2021年に北海道で狩猟捕獲されたカモ類92羽および野鳥でのHPAIV感染が認められた2020年冬から2021年春に回収された一部の野鳥死体から、気管、クロアカ、結膜および体表スワブを採取しウイルス分離を行った。期間中に分離された鳥インフルエンザウイルス（AIV）は全ゲノム解析を行い、分子疫学的解析に供した。見かけ上健康な280羽からは採血を行い、常法によりAIVに対する抗体保有状況調査を行った。環境水からのAIV検出には、AIVを吸着する合成糖鎖固定微粒子および鶏赤血球液を用い、様々な条件で環境水からのウイルス回収率を比較・検討した。また、研究期間に収集した全国13道府県25箇所の環境水を対象に、鶏赤血球を用いたAIVの回収と分離を行った。一般種を用いた感染実験では、希少種と生息域を共有する水鳥のヒドリガモ、マガモおよびオナガガモ各10羽を用い、鼻腔内にHPAIVを接種後3日間または10日間観察し、この間経時的にクロアカおよび気管からのウイルス検出と検出ウイルスの力価測定を行った。観察期間終了後には剖検し、各臓器からのウイルス検出を行った。

サブテーマ2では、現在流行しているHPAIVの性状を把握するために、北海道内の渡り鳥の飛来地で糞便を採取した。分離されたウイルスの遺伝子、抗原性、ニワトリに対する病原性を評価し、ウイルスが国内に持ち込まれたルートや国内での流行動態を推定した。これらの分離ウイルスの解析情報を踏まえ、イムノクロマト法による抗原検出（簡易キット）やウイルス遺伝子検出法（リアルタイムRT-PCR法）の性能の改善を行い、鳥インフルエンザ診断技術の高度化を図った。また、オジロワシに実験的にウイルスを感染させた試験により、希少鳥類における鳥インフルエンザの診断に適切な材料を特定した。さらに、HPAIVの感染が確認された希少鳥類に対する治療法を確立することを目的として、ヒト用抗インフルエンザウイルス薬の有効性をニワトリにウイルスを感染させる実験により評価した。この評価試験の一環として、抗インフルエンザウイルス薬をニワトリ、アヒル、オジロワシに投与し、その後の抗インフルエンザ薬活性体の血液中の濃度を測定することにより治療薬の有効投与量を鳥種毎に推定する方法を確立した。

サブテーマ3では、希少鳥類のHPAIVに対する感受性および伝播リスクを評価するため、野生復帰が不可能なオジロワシ終生飼育個体3羽を用いてウイルス感染実験を実施し、臨床観察や病理解剖、および定期的な採材検体のウイルス学的解析などを通じて、感染時の臨床経過や致死性、ウイルス排出状況を解明した。また、希少鳥類生息環境がHPAIVに汚染された場合を想定し、ウイルスの異鳥種間伝播に重要な役割を果たすと考えられる環境水の安全かつ効果的な消毒・清浄化技術を確立するため、畜産分野で使用が認められている消毒薬のうち、有機物存在下や低温条件下でも安定的な消毒効果が持続しやすいとされるアルデヒド系およびフェノール系薬剤を中心に、有機物存在下および低温条件下における鳥インフルエンザウイルス不活化効果の安定性を検証した。さらに、鹿児島県出水平野のツル渡来地の環境水を検体とする効率的な鳥インフルエンザサーベイランス体制を確立するため、事業期間中の3年間に渡り定期的に環境水を採取しウイルス分離を試みた。分離されたウイルス株については遺伝的性状解析を行った。

サブテーマ4では、希少鳥類のHPAIV感染に対する感受性について、培養細胞を用いた評価系を検討し、生体感染実験に依存しない評価法の確立を目指した。最初にHPAIV感染に対する感受性が明らかになっている鳥類（カララバト、マガモ、ハシブトガラス、オオハクチョウ、ニワトリ）（モデル鳥類）、過去に国内でHPAIV感染による死亡例が報告されている希少鳥類（クマタカ、オオタカ、ハヤブ

サ、マナヅル、ナベヅル)、飼育下で繁殖が実施されている感受性未知の希少鳥類(イヌワシ、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ)について、感染実験用細胞の培養を行った。次にA型インフルエンザウイルス感染に対しインターフェロン産生を介した感染抵抗性との関連が指摘されているMx遺伝子(ウイルス抵抗性に関連する遺伝子)に着目し解析を実施した。まず検索対象とした14鳥種について、すでに登録済みの配列に加え今回得られたゲノム情報を参考に各鳥種のMx遺伝子全長配列を決定し、これを元にMx遺伝子の発現量測定に必要な定量用プライマーを設計した。感染実験にはニワトリ個体における病原性が報告されている3株を用いた。各培養細胞は、ウイルス接種後、6時間および12時間で、無処置細胞(コントロール)は、0時間(ウイルス感作前)、6時間および12時間後に回収し、total RNAを回収後Real Time PCRによりMx遺伝子の発現量を定量し、過去に報告された感染実験による感受性成績と培養細胞におけるMx遺伝子発現量との関係から培養細胞による希少鳥類の感受性評価への応用について検討した(図4.3)。

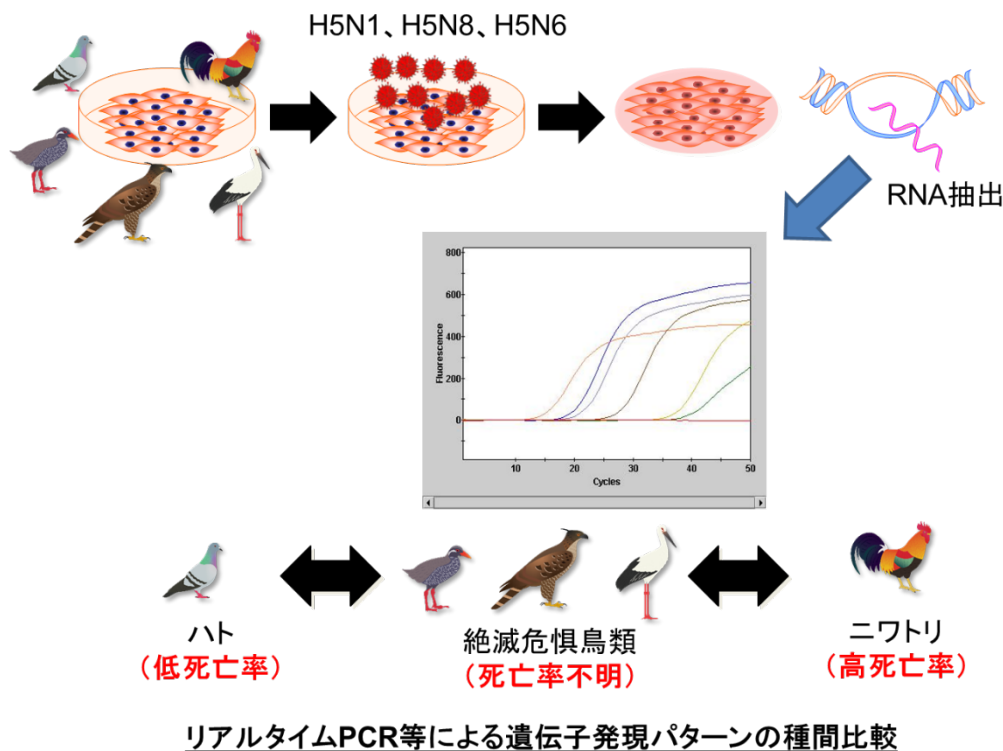


図 4.3 各種鳥類のMx遺伝子発現量を比較する際の概要

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

サブテーマ1では、環境水からのウイルス分離法を検討し、環境水1Lから鶏赤血球により効率的にAIVが分離できることを確認した。また、AIVを吸着する合成糖鎖固定微粒子により、感染性を維持したAIVを鶏赤血球と同程度の効率で回収できることを確認した。環境水を対象に実施したAIV調査では、国内でHPAIVが流行した2020年から2021年にかけて、11月、12月および2月に採水した3検体からHPAIVが分離され、環境水がHPAIVの早期発見に有用であることが示された。見かけ上健康な水鳥からのウイルス検出では、3年間で捕獲した水鳥280羽のうち、2019年1月に鳥取県で捕獲したマガモ1羽から低病原性H7N7亜型ウイルスが分離されたが、HPAIVは検出されず、HPAIV国内侵入の早期発見を目的とした検査対象としては適当で無いと考えられた。

一方、捕獲水鳥の抗体保有状況調査では、3年間の抗体陽性率が4%、6.25%、35%と多くの水鳥がHPAIVに感染していた可能性が考えられた。HPAIV感染歴のある野鳥の国内渡来状況の一端が示され、抗体調査のHPAIV感染発生リスク評価における有用性が示された。

また、HPAIV感染実験で用いたカモ科鳥類(ヒドリガモ、マガモ、オナガガモ)が、近年国内で分離されたHPAIVに感受性を示し、無症状であっても体外に長期間ウイルスを排出することで生息域を共有する希少鳥類への感染源となり得ることが示された。また、上記カモ科鳥類では全身の臓器でHPAIVが増殖している個体が認められ、野外ではこのような個体が捕食を介し希少猛禽類等への感染源となる可能性が示された。

サブテーマ2では、北海道内の糞便調査の結果、HPAIVのA/northern pintail/Hokkaido/M13/2020(H5N8)を2020年10月に検出した。これは2020～2021年冬季の国内における初めてのウイルス検出事例となり、診断法の正確性向上や農場への注意喚起に貢献した。またこの成績は、ウイルスが野鳥の間で定着することが危惧されている現状では、毎年渡り鳥の調査を継続することが必要であること示している。また、鳥インフルエンザの診断に利用されている簡易キットとリアルタイムRT-PCR法の感度と特異度を向上させることができた。この成績を踏まえて次年度以降の野鳥における鳥インフルエンザの診断高度化を進める予定である。さらにHPAIVに感染した希少鳥類を治療する方法を確立するために、抗インフルエンザ薬の鳥に対する有効性を評価した。ニワトリをモデルとして抗インフルエンザ薬の治療効果を評価したところ、経口薬であるバロキサビルマルボキシル(商品名:ゾフルーザ)を2.5 mg/kgで感染と同時に投与することで治療効果が認められた。また同量の抗インフルエンザ薬をアヒルとオジロワシに投与し、血液中の抗ウイルス薬活性体の濃度を測定したところ、鳥種によりその濃度が異なったことから、鳥種毎にその投与量を決める必要があることがわかった。

サブテーマ3では、オジロワシに経鼻感染したHPAIVが全身臓器で増殖して、約1週間に渡って口腔から排泄され続け、周囲の個体にも非接触的に伝播しうることを明らかにした。また、畜産分野で使用されている消毒薬を含め、環境水の清浄化対策に適用可能な薬剤はなく、薬剤使用に代わる新たなウイルス感染・蔓延防止対策の立案が喫緊の課題であることがわかった。さらに、定期的に採材した環境水を検体とする効率的な鳥インフルエンザサーベイランス体制が確立され、定点サーベイランスとしては世界的にも類を見ないほど数も種類も豊富なウイルス株が3シーズン続けて分離された。確立されたサーベイランス体制を維持・活用することで、国内侵入AIVの検知や遺伝的特性解明のこれまで以上の迅速化および効率化、HPAIVが侵入・流行しやすい時期やシーズンの特徴付け、自然界におけるHPAIVの流行抑制方法の開発やその検証など、新たなウイルス学的知見の蓄積が期待できる。

サブテーマ1、2および3で分離されたHPAIVの全ゲノム解析により、2020年10月から2021年3月には、国内に欧州を起源とするHPAIVが侵入していたことが明らかになった。

サブテーマ4では、本課題によって新たにゲノム解析を行ったクマタカ、オオタカ、ハヤブサ、マナヅル、ナベヅル、ハシブトガラスおよびオオハクチョウについて、そのゲノム情報をDDBJ(DNA Data Bank of Japan)に登録した。また、ゲノム解析の結果を公表するため専用のウェブサイトを開設した。

11種(カワラバト、ニワトリ、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシ、マナヅル、ナベヅル、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ)の培養細胞を対象にHPAIV3種の感染実験を行った。感染実験に使用した各鳥類細胞のMx遺伝子発現量を測定した結果、抵抗性の鳥類とされるカワラバトのMx遺伝子発現は、今回感染実験に使用した全てのウイルスに対して時間経過に伴って発現量が20倍以上に増加することが観察された。一方、死亡率が高いニワトリのMx遺伝子発現は、時間経過に伴って減少する、あるいは増加しても4倍程度あることが分かった。感染実験の対象としたその他の鳥類種の中で、カワラバトと同様の遺伝子発現パターンを示す種はナベヅルのみであった。また、生体において高い死

亡率を示すニワトリの Mx 遺伝子発現パターンと猛禽類 4 種（クマタカ、イヌワシ、オオタカ、ハヤブサ）およびヤンバルクイナの発現パターンが類似していることを確認した。他種の猛禽類の生体における感染実験では、個体の死亡あるいは重度の神経症状が確認されている。これらの結果から、高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する Mx 遺伝子の発現を含む自然免疫系の反応が、猛禽類の細胞で抑制されていることが示唆された。また、HPAIV に対する生体レベルでの反応を細胞レベルでの反応からある程度予測できる可能性が示された。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

2020 年 10 月に北海道紋別市のコムケ湖から H5N8 亜型の HPAIV が分離された。2020 年～2021 年冬季の国内における HPAIV の初めての検出例となった。そのため、分離されたウイルスのニワトリに対する病原性、診断やウイルスの起源予測するために有用な遺伝子情報は環境省および農林水産省に情報提供され、各省の鳥インフルエンザ対策に活用された。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

サブテーマ 1 で実施した環境水からのウイルス検出では、2020 年から 2021 年に 3 地点で採取した環境水から HPAIV が検出された。いずれの採水地点でも死亡個体は発見されておらず、1 地点からは同地点周辺で採取された糞便からも検出例が無く、環境水が HPAIV の早期発見に有用であることが示され、現在全国で実施されている野鳥の糞便および死亡個体を対象にしたモニタリング体制を補完する新たな検査対象としての活用が期待される。また、本研究で明らかになった環境水からのウイルス検出至適条件を基に「野鳥における高病原性鳥インフルエンザに係る対応技術マニュアル」の一部改正が検討されている。さらに、近年の HPAIV 分離株を用い上記マニュアルに示された検査優先種の各種水鳥を対象に実施した感染実験の成績は、今後の検査優先種評価への活用が見込まれる。

HPAIV の遺伝子診断法であるリアルタイム RT-PCR 法について、近年分離されたウイルスさらに野鳥の診断材料を用いた試験により感度と特異性を評価できた。これらの成績は、今後の野鳥における鳥インフルエンザ診断法の高度化の基盤となる。現在令和 3 年度以降の環境省の鳥インフルエンザ診断への活用を協議している。また抗インフルエンザ薬による希少鳥類の治療に関する科学的知見の集積は、希少鳥類保全のための基盤構築はもちろん、野生動物と感染症における問題解決のモデルケースとして、将来において環境政策の立案・遂行への貢献が期待される。現在環境省や希少鳥類の保全に関わる関係機関との交渉を進めている。

本研究で明らかにした希少鳥類オジロワシの HPAIV に対する感受性や排泄様式は、今後の保護対策において重要な知見となる。動物園のような排水の処理・管理が可能な閉鎖環境における環境水の清浄化対策には、フェノール系消毒薬 E の活用が推奨される。本研究で示された冬鳥越冬地の環境水を検体とする鳥インフルエンザサーベイランスの効率性は、適用条件が揃う新たな採材ポイントを探索しサーベイランス体制を構築する価値を明示する。

サブテーマ 4 で有効性が示唆された HPAIV 感受性に関する判定基準を、今回感染実験の対象としなかった鳥類種、特に種の保存法で国内希少野生動植物種に指定されている鳥類種に適用する。それによって、国内希少野生動植物種に指定されている鳥類種に対する高病原性鳥インフルエンザウイルスのリスク評価が可能となる。

以上より、行政による導入の検討が可能な事例として、環境水を対象とした新たな検査体制の構築および HPAIV に対する水鳥の感受性を基にした「野鳥における高病原性鳥インフルエンザに係る対応技術マニュアル」の改訂、飼育下繁殖が行われている希少鳥類に対する HPAIV 対策としての抗インフルエンザ薬の投与、および希少鳥類の飼育環境清浄化が挙げられる。

5-3. 研究目標の達成状況

サブテーマ1では、HPAIV早期発見における環境水の有用性とその効率的な手法を確立した(表1.3)。また、近年の国内分離株に感染したヒドリガモ、オナガガモおよびマガモが無症状のまま一定期間ウイルスを排出し、希少鳥類への感染源になることを明らかにした(図1.5)。このことは、捕獲個体から採取した血清を用いた抗体調査で対象個体の多くが抗体陽性で、特に国内でHPAIV感染が多数発生した2020年に捕獲した個体で陽性率が最も高かった(表1.7)ことから支持され、当初掲げていた研究目標を達成した。

サブテーマ2では、現在流行しているHPAIVの性状解析と感染動物を用いた評価試験の結果を踏まえて鳥インフルエンザの診断法を高度化できた(図2.3、表2.2)。さらにHPAIVの感染に対する希少鳥類の治療法確立の基盤となる知見を得ることができた(図2.8、図2.9、図2.10)。以上、当初掲げていた目標に沿って予定通り十分な成果を得ることができた。なお、希少鳥類のHPAIVの感染予防および治療を目的とした抗インフルエンザ薬の投与後の鳥の体内での動態を明らかにする試験の一つとして、オジロワシへの抗インフルエンザ薬の投与および薬剤投与後の血液の採取を実施した。この作業については、猛禽類医学研究所に委託して実施することにより適切に実施することができた。

サブテーマ3では、希少鳥類オジロワシに対するHPAIVの感染実験を実施し、同鳥種のウイルス感受性や排泄部位・期間等を明らかにして(図3.6、図3.7、図3.8)、今後のオジロワシ保護対策を立案する上で非常に貴重な実験データを提供した。また、環境水の清浄化対策における薬剤使用の限界(表3.4、図3.9)、ならびに薬剤使用に代わる新たなウイルス感染・蔓延防止対策の必要性を示した。さらに、冬鳥越冬地の環境水を検体とする効率的な鳥インフルエンザサーベイランス体制を確立し、定点サーベイランスとしては世界的にも類を見ないほど数も種類も豊富なウイルス株を、3シーズン続けて分離した(図3.10、表3.5、図3.11)ことで、国内侵入AIVの検知や遺伝的特性解明のこれまで以上の迅速化および効率化、HPAIVが侵入・流行しやすい時期やシーズンの特徴付け、自然界におけるHPAIVの流行抑制方法の開発やその検証など、新たなウイルス学的知見を蓄積する体制を整えた。以上の結果より、当初掲げていた研究目標を概ね達成した。

サブテーマ4では、抗ウイルス作用のある遺伝子としてMx遺伝子に注目し、HPAIVが感染した細胞のMx遺伝子発現パターンを鳥類11種で観察した。その結果、死亡率既知のモデル鳥類であるニワトリ(高死亡率)のMx遺伝子発現パターンと猛禽類4種(クマタカ、イヌワシ、オオタカ、ハヤブサ)およびヤンバルクイナの発現パターンが類似していることを確認した。対象とする鳥類種数の目標は8種程度であったことから、当初の研究目標を上回る成果をあげることが出来た。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

4件

<主な査読付き論文>

- 1) N. ISODA, A. T. TWABELA, E. BAZARRAGCHAA, K. OGASAWARA, H. HAYASHI, Z. J. WANG, D. KOBAYASHI, Y. WATANABE, K. SAITO, H. KIDA and Y. SAKODA: *Viruses*, 12(12), 1439 (2020) (IF:3.816), Re-invasion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus clade 2.3.4.4b in Hokkaido, Japan, 2020.
- 2) A. TWABELA, M. OKAMATSU, K. MATSUNO, N. ISODA and Y. SAKODA: *Viruses*, 12(12), 1407 (2020) (IF:3.816), Evaluation of baloxavir marboxil and peramivir for the treatment of high pathogenicity avian influenza in chickens.

- 3) A. M. KHALIL, Y. FUJIMOTO, I. KOJIMA, M. ESAKI, K. RI, T. MASATANI, T. MATSUI and M. OZAWA: Pathogens, 10(2), 171 (2021) (IF:3.117), Genetic Characterization of H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated from Falcated Ducks and Environmental Water in Japan in November 2020.
- 4) K. HAGIWARA, T. NAKAYA and M. ONUMA: J. Vet. Med. Sci., 82, 619-625 (2020) (IF:1.049), Characterization of Myxovirus resistance protein in birds showing different susceptibilities to highly pathogenic influenza virus.

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0 件
その他誌上発表（査読なし）	5 件
口頭発表（学会等）	20 件
「国民との科学・技術対話」の実施	20 件
マスコミ等への公表・報道等	7 件
本研究に関連する受賞	0 件

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

研究代表者

山口 剛士

北海道大学獣医学部卒業、北海道大学大学院獣医学研究科修士課程修了、岐阜大学農学部助手、現在、鳥取大学農学部教授

研究分担者

- 1) 岡松 正敏（平成 30 年～令和元年のサブテーマ 2 を担当）

北海道大学獣医学部卒業、農研機構 動物衛生研究部門 研究員、北海道大学大学院獣医学研究院 准教授、令和 2 年 3 月自己都合により退職

- 2) 迫田 義博（令和 2 年度よりサブテーマ 2 を担当）

北海道大学獣医学部卒業、農研機構 動物衛生研究部門 研究員、現在、北海道大学大学院獣医学研究院 教授

3) 小澤 真

北海道大学獣医学部卒業、東京大学大学院医学系研究科修了、東京大学医科学研究所特任助教、現在、鹿児島大学共同獣医学部准教授

4) 大沼 学

酪農学園大学酪農学部卒業、北海道大学大学院獣医学研究科修了、現在、国立研究開発法人国立環境研究所生物多様性領域主幹研究員

II. 成果の詳細△

II-1 鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価

国立大学法人鳥取大学

農学部 附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター 山口 剛士・伊藤 壽啓・村瀬 敏之・
伊藤 啓史・尾崎 弘一・笛吹 達史・
曾田 公輔

[要旨]

国内への高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) 侵入の早期発見技術確立を目的に、冬期に複数の水鳥が共有する湖沼などの環境水と見かけ上健康な水鳥のサーベイランス対象としての有用性を検討した。環境水からのインフルエンザウイルス分離法の検討では、環境水 1L からの血球濃縮法と 80mL からの直接法で高い検出効率が認められ、環境水のサーベイランスでは 1L からの血球濃縮法を優先採用することとした。2018 年度から 2021 年度に全国 25 箇所の水鳥渡来地で採取した計 134 検体の環境水を対象にウイルス分離試験を実施した結果、2018 年度の 1 検体から低病原性ウイルス、2020 年度の 5 検体から高病原性 H5N8 亜型ウイルス 3 株と低病原性ウイルス 2 株が、いずれも 1L からの血球濃縮法により分離された。HPAIV を検出した 3 地点のうち 1 地点では糞便や死体からの分離報告が無く、水鳥渡来地の環境水が従来の糞便及び死体を対象とする HPAIV サーベイランス体制を補完する新たな検査対象として有用であることが示された。

2018 年度に実施した見かけ上健康な水鳥のサーベイランスでは、捕獲水鳥 100 羽のうちマガモ 1 羽から低病原性 H7N7 亜型ウイルスが分離された他、野鳥捕獲地周辺で採取した水鳥糞便 69 検体中 1 検体から低病原性 H3N2 亜型ウイルスが分離された。翌 2019 年度は捕獲水鳥 80 羽、狩猟捕獲カモ類 39 羽および水鳥糞便 120 検体のいずれからも AIV は分離されなかった。国内で HPAIV が流行した 2020 年度は捕獲水鳥 100 羽、狩猟捕獲カモ類 53 羽および水鳥糞便 198 検体を対象にウイルス分離検査を実施した。狩猟捕獲コガモおよびオオハクチョウ糞便からそれぞれ H4N1 亜型および H6N1 亜型の低病原性ウイルスが分離されたが、捕獲または狩猟個体から HPAIV は検出されず、HPAIV 国内侵入の早期発見を目的とした検査対象としては適当で無いと考えられた。一方で、3 年間で捕獲した水鳥 280 羽の血清を対象に行った抗体保有状況調査の結果、2018 および 2019 年度の抗 H5 抗体陽性率が 4% および 6.25% と H5 亜型 AIV に感染歴のある水禽が一定割合で国内に侵入していることが明らかになった。さらに 2020 年度は、抗体陽性率 35% と例年より多くの水鳥が HPAIV に感染していた可能性が示された。

希少鳥類と生息域を共有する一般種の水鳥を用いた HPAIV 感染実験では、ヒドリガモ、マガモおよびオナガガモが、近年国内で分離された HPAIV に感受性を示し、無症状であっても体外に長期にわたってウイルスを排出し、生息域を共有する希少鳥類への感染源となり得ることが明らかとなった。また、上記カモ科鳥類の全身臓器でウイルスが増殖している例が認められ、野外ではこのような個体が捕食されることで希少猛禽類等への感染源となる可能性が示された。

1. 研究開発目的

HPAIV および HPAIV 感染個体早期発見のための鳥インフルエンザウイルス (AIV) サーベイランスの対象として環境水や見かけ上健康な個体の有用性を評価し、これらを用いた新たなサーベイランス体制構築の可能性を検討する。また、見かけ上健康な個体から採取した血清を用いた抗体検出および野鳥分離株の遺伝子解析等により、HPAIV の国内侵入リスクを明らかにする。さらに、希少鳥類と生息地を共有するマガモなどの水鳥について、HPAIV 感染時の症状やウイルス排出状況を感染実験により解明することで、希少鳥類への感染源としてのリスクを評価し、希少鳥類における感染予防の基盤構築のための科学的知見を提供する。

2. 研究目標

(1) 鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発

- ・鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスの対象として環境水や見かけ上健康な個体を対象とする新たな監視体制を確立する。
- ・見かけ上健康な個体から採取した血清を用いた抗体検出および野鳥分離株の遺伝子解析等により、HPAIV の国内侵入リスクを明らかにする。

(2) 希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価

- ・希少鳥類における感染予防の基盤構築のため、希少鳥類と生息地を共有するマガモなどの水鳥(一般種)について、HPAIV 感染時の症状やウイルス排出状況を感染実験により解明する。

3. 研究開発内容

(1) 鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発

1) 環境水からの効率的インフルエンザウイルス分離方法の検討

環境水からの効率的な AIV 分離法を検討するため、A/water/Hokkaido/KC12C/2015 (H4N6) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 0.003、0.03 および 0.3 EID₅₀/mL に希釈したウイルス液を用い、血球濃縮法および直接法によるウイルス分離試験を行った。血球濃縮法では、1L または 100mL の各ウイルス液に 10% 鶏赤血球 2mL を添加し、1 時間氷上で静置した後、遠心して沈殿した血球を少量の PBS に再懸濁し、10 日齢発育鶏卵 3 個に接種した。直接法では、各ウイルス液を 1mL/卵ずつ発育鶏卵 20 個に接種する 20mL 直接法 (1mL/卵) と 2mL/卵ずつ 40 個に接種する 80mL 直接法 (2mL/卵) を行った。これらの分離試験を 4~16 回実施 (一部の条件については実施せず) し、接種卵のうち少なくとも 1 個が赤血球凝集 (HA) 反応で陽性を示した場合、分離成功と判定し、ウイルス分離率を比較した。

2) 合成糖鎖固定微粒子による鳥インフルエンザウイルス回収法の検討

環境水から AIV を回収するための吸着素材として、合成糖鎖固定微粒子の有用性を検討した。低病原性鳥インフルエンザウイルス (LPAIV) として A/water/Kagoshima/KGW5-20/2017 (H6N2)、HPAIV として A/duck/Tottori/E9/2016 (H5N6) を用い、合成糖鎖 (Neu5Ac α 2, 3LacNAc) 固定微粒子 (福島高専・尾形慎准教授より提供; 以下、糖鎖固定微粒子) によるウイルス回収を試みた。PBS で 10^{3.5} EID₅₀/mL に希釈したウイルス液 1mL (検体 A) に、糖鎖固定微粒子 1mg/10μL (最終濃度 1mg/mL) を添加し、氷上で 30 分間静置した。遠心して得られた上清 (検体 B) を回収するとともに、沈殿した糖鎖固定微粒子を 1mL の PBS で再懸濁した (検体 C)。吸着前の元ウイルス液 (A)、吸着後に回収した遠心上清 (B) および糖鎖固定微粒子再懸濁液 (C) の各 1mL 中のウイルス感染価 (EID₅₀/mL) を測定し、糖鎖固定微粒子によるウイルス回収率を決定した。試験は LPAIV および HPAIV についてそれぞれ 2 回実施した。

次に、糖鎖固定微粒子によるウイルス回収効率を鶏赤血球と比較した。A/water/Niigata/NG11/2018 (H6N6) を PBS で 200、20、2、0.2 EID₅₀/mL に希釈し、各希釈ウイルス液 1mL に 1mg/10μL 糖鎖固定微粒子 (最終濃度 1mg/mL) または 20% 鶏赤血球 10μL (最終濃度 0.2%) を添加した。何も添加しないウイルス液 1mL を陰性対照とした。氷上で 1 時間吸着させた後、遠心して得られた沈殿を 0.4mL の PBS で再懸濁し、全量を 10 日齢発育鶏卵 2 個に接種した。接種卵のうち少なくとも 1 個が HA 反応で陽性を示した場合、分離成功と判定し、5 回試行中のウイルス分離率を算出した。

3) 渡り鳥飛来地の環境水を対象とした鳥インフルエンザウイルス分離調査

2018 年度は 10 道府県 17 地点で採取した 68 検体の環境水を対象にウイルス分離検査を実施した (表 1.1)。環境水は低温下で鳥取大学に搬送し、水量が 100mL の検体については 2mL/卵ずつ 20 個の発育鶏卵に接種する 40mL 直接法 (2mL/卵)、1L の検体については 1L からの血球濃縮法および 40mL 直接法 (2mL/卵) によるウイルス分離検査を行った。2019 年度以降は採水量を 1L に統一し、12 道府県 18 地点

で採取した環境水 28 検体を対象に、2020 年度は 12 道府県 19 地点で採取した 38 検体を対象に、全て 1L からの血球濃縮法によるウイルス分離検査を実施した。

直接法では、環境水 40mL に抗生剤を添加した後、2mL/卵ずつ 10 日齢発育鶏卵 20 個に接種した。血球濃縮法では、環境水 1L を 100 μ m メッシュフィルターでろ過して大きな浮遊物を除いた後、検体が淡水の場合は 20 倍濃度の PBS 溶液 50mL を混和して浸透圧を調整した。浸透圧調整済みあるいは海水の環境水に 10%鶏赤血球 2mL を添加して 1 時間氷上で静置した後、遠心により沈殿した血球を 4mL の抗生剤添加済み PBS に再懸濁し、全量を発育鶏卵 4 個に接種した。鶏赤血球の代わりにホルマリン固定した鶏赤血球を用いてもウイルス回収量に差が無かったことから、2020 年度の調査では水検体の浸透圧調整は行わず、全てホルマリン固定鶏赤血球を用いて濃縮を行った¹⁾。接種後の発育鶏卵は 2 日間培養後、HA 試験により漿尿液中の HA 活性を調べ、HA 陽性の場合、漿尿液を全量回収し、市販の簡易検査キットでインフルエンザウイルスの同定を行った。HA 陰性の場合には各発育鶏卵から採取した漿尿液を発育鶏卵に接種する継代を 1 回行った。

表 1.1 2018 年 10 月から 2021 年 3 月までに採取した環境水検体

採水地	渡り鳥飛来地	水量	検体数(採取月)		
			2018-2019年	2019-2020年	2020-2021年
北海道	クッチャロ湖	1L	3 (10-11-12)	1 (11)	1 (11)
	トウフツ湖	1L	1 (10)	1 (10)	1 (10)
	野付湾	100mL	3 (10)	—	—
		1L	—	1 (10)	1 (10)
	ウトナイ湖	1L	1 (10)	1 (10)	1 (11)
	帯広川(帯広市)	100mL	5 (10)	—	—
	緑が丘公園(帯広市)	100mL	5 (10)	—	—
	別寒辺牛 厚岸湖	1L	—	1 (2)	—
	浜頓別町 原生花園	1L	—	—	1 (11)
	紋別市 コムケ湖	1L	—	—	3 (11)
宮城県	伊豆沼	1L	5 (10-11-12-1-2)	7 (10-11-12-1-2)	4 (11-12-1-2)
	大沼	1L	—	—	2 (12)
新潟県	瓢湖	1L	1 (11)	1 (11)	1 (11)
千葉県	印西市小倉	1L	—	2 (11)	—
	印西市白幡	1L	—	—	2 (11)
長野県	諏訪湖	1L	—	1 (3)	3 (10-2-3)
愛知県	藤前干潟	1L	1 (11)	1 (11)	1 (12)
石川県	片野鴨池	1L	—	2 (12-1)	—
京都府	地内山池	100mL	3 (10)	—	—
	1L	—	1 (11)	2 (11-21)	
兵庫県	昆陽池	100mL	10 (12)	2 (12)	2 (12)
岡山県	100mL	10 (12)	—	—	
	1L	—	2 (12)	2 (12)	
鳥取県	日光	1L	1 (11)	—	5 (12-2-3)
	湖山池	100mL	5 (12)、5 (1)	—	—
		1L	—	1 (12)	2 (12)
東郷池	100mL	5 (12)	—	—	
島根県	朝酌川	1L	—	1 (12)	—
鹿児島県	朝酌川	1L	1 (10)	1 (10)	1 (11)
	出水市内	100mL	3 (10)	—	—
1L		—	1 (10)	1 (10)	
合計		100mL	54	—	—
		1L	14	28	38

4) 渡り鳥飛来地における見かけ上健康な水鳥からの鳥インフルエンザウイルス分離調査

初年度は 2018 年 10 月から 2019 年 1 月に北海道、岡山県、兵庫県、鳥取県で捕獲した 100 羽の見かけ上健康な水鳥および野鳥捕獲地周辺で採取した水鳥糞便 69 個を対象にウイルス分離検査を行った(表 1.2)。次年度は 2019 年 11 月から 12 月に千葉県、岡山県、兵庫県、鳥取県で捕獲した水鳥 80 羽および 2019 年 10 月から 2020 年 1 月の間に北海道で狩猟捕獲されたカモ類 39 羽ならびに野鳥捕獲地周辺で採取した水鳥糞便 120 検体、最終年度は 2020 年 12 月に岡山県、兵庫県、鳥取県、千葉県および宮城県で捕獲した水鳥 100 羽および 2020 年 10 月から 2021 年 1 月の北海道の狩猟カモ類 53 羽ならびに野鳥捕獲地周辺で採取した水鳥糞便 198 検体を対象にウイルス分離検査を実施した。検査材料として、捕獲水鳥

からは気管、総排泄腔、結膜および体表スワブを、狩猟カモ類からは気管、総排泄腔および結膜スワブを採取した。

5) 渡り鳥飛来地で捕獲したカモ類の抗体保有状況調査

2018年10月から2020年12月までの3年間で捕獲した見かけ上健康な水鳥280羽から採取した血清を用い、国内に飛来する渡り鳥の抗体保有状況を調査した(表1.2)。A型インフルエンザウイルス(IAV)およびH5亜型AIVに対する抗体を、IDEXX社製AI Multi-S-Screen Ab TestによるELISAおよび赤血球凝集阻止(HI)試験によりそれぞれ検出した。HI試験では、HPAIVのA/mute swan/Shimane/3211A001/2017(H5N6)およびLPAIVのA/swan/Shimane/1120Y18/2015(H5N3)を抗原に用い、抗IAV陽性で抗H5N6のHI価が抗H5N3より高く、10倍以上を示した血清を抗HPAIV抗体陽性と判定した。

表1.2 2018年10月から2020年12月までに捕獲した水鳥

渡り鳥飛来地		検査羽数								
		2018-2019年		2019-2020年		2020-2021年				
北海道	帯広市内	10月下	マガモ カルガモ	13 7			—		—	
宮城県	大沼(仙台市)			—			—	12月中	オナガガモ オオバン	19 1
千葉県	印西市内			—	11月下	オナガガモ	20	12月上	オナガガモ	20
兵庫県	昆陽池公園(伊丹市)	12月上	オナガガモ	20	12月上	オナガガモ ヒドリガモ	10 10	12月中	オナガガモ ヒドリガモ	18 2
岡山県	深山公園(玉野市)	12月上	オナガガモ ヒドリガモ	10 10	12月上	オナガガモ	20	12月上	オナガガモ	20
鳥取県	日光(鳥取市)	12月中	コガモ	10			—			—
	湖山池(鳥取市)	1月中	ヒドリガモ マガモ	10 10	12月上	ヒドリガモ	6	12月上	ヒドリガモ	20
	東郷池(東伯)	12月中	オナガガモ オオバン	5 5	12月上	オナガガモ	14			—
		合計		100			80			100
		(内訳)	オナガガモ マガモ ヒドリガモ コガモ カルガモ オオバン	35 23 20 10 7 5			オナガガモ ヒドリガモ	64 16	オナガガモ ヒドリガモ オオバン	77 22 1

6) ウイルス検出に適した診断用検体採取部位の検討

現在、野鳥の死体からスワブを採取している気管および総排泄腔以外の新たな検査部位の有用性評価のため、HPAIV感染後に死亡したオナガガモ、マガモ(2羽)、オオタカ、ハヤブサ、フクロウ、ノスリの死体を入手し、これらの気管および総排泄腔に加え、結膜を対象に、市販の抗原検出キット(エスプラインインフルエンザA&B-N、富士レビオ)を用いた簡易検査を実施した。

(2) 希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価

希少種と生息域を共有する水鳥であるヒドリガモ、マガモ、およびオナガガモ各10羽を、山階鳥類研究所の協力の下で2019年1月および12月に鳥取県内で捕獲した。捕獲個体は速やかに鳥取大学構内の動物飼育施設に収容し、以降の実験に供するまで適宜飼養した。各鳥種について、採材群(3羽)および観察群(7羽)に分け、鳥取大学農学部内BSL3実験施設において、ウイルス接種実験を行った(図1.1)。接種ウイルスとして、国内で大規模な高病原性鳥インフルエンザの発生が認められた2016-17年に分離された、A/teal/Tottori/1/2016(H5N6)株(鳥取株)を用いた。採材群3羽に 10^6 EID₅₀/200 μ Lの鳥取株を

経鼻接種した。接種3日目に採血後に安楽殺し、図1.1に示す組織を採材してサンプル中のウイルスの有無を調べた。観察群7羽に対しては、 $10^{6\sim 2}$ EID₅₀/200 μ Lの鳥取株を接種し10日間臨床観察を行った。観察期間中、咽喉頭および総排泄腔のスワブを採取した。10日目に採血した後に安楽殺し、上述の臓器に加えて結膜スワブおよび羽軸を採取し、サンプル中のウイルスの有無を調べた。また得られた血液から血清を分離し、ウイルス接種による抗体応答の有無をHI試験により検討した。以上の実験は鳥取大学動物実験規則に則り、鳥取大学動物実験委員会で審査、承認された実験計画に基づき実施した。

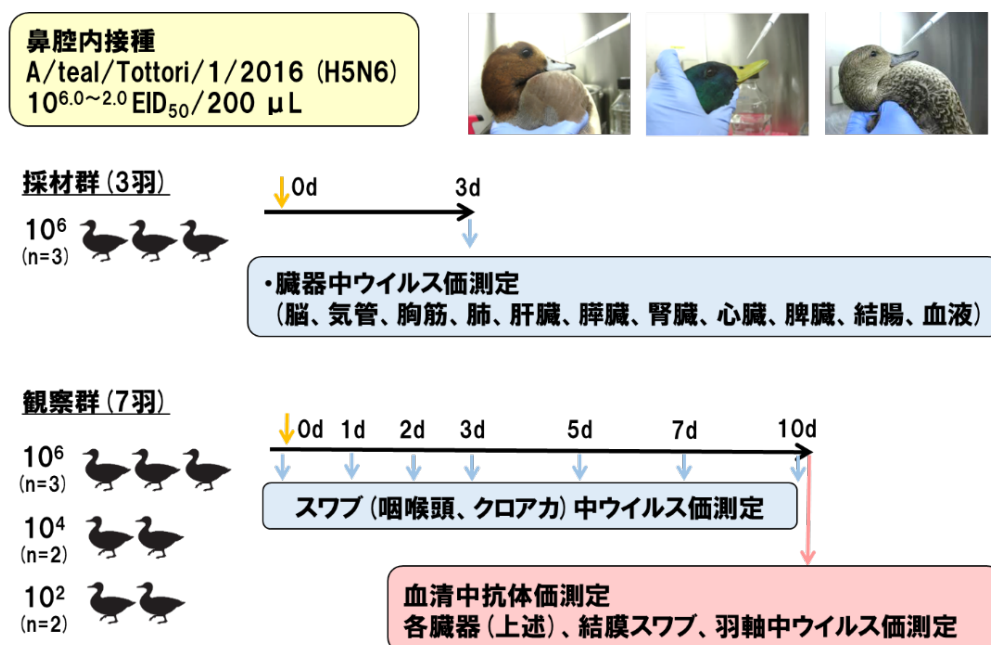


図 1.1 ウイルス接種実験の概要

4. 結果及び考察

(1) 鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発

1) 環境水からの効率的インフルエンザウイルス分離方法の検討

0.3 EID₅₀/mL ウイルス液からは、100mL または 1L からの血球濃縮法および 20mL 直接法 (1mL/卵) のいずれの方法によってもウイルスが分離された (表 1.3)。0.03 EID₅₀/mL ウイルス液では、1L からの血球濃縮法と 80mL 直接法 (2mL/卵) で 100%、20mL 直接法 (1mL/卵) で 31%のウイルス分離率が得られたが、100mL からの血球濃縮法では一度も分離されなかった。0.003 EID₅₀/mL ウイルス液では、100mL または 1L からの血球濃縮法および 20mL 直接法 (1mL/卵) のいずれの方法によってもウイルスは分離されなかった。今回検討したウイルス分離方法では、1L からの血球濃縮法と 80mL 直接法 (2mL/卵) の検出効率が最も高く、0.03 EID₅₀/mL ウイルス液からの分離が可能であった。実際に検査を行う場合は、検体の水量や検体数、検査実施場所の設備に応じたウイルス分離方法を採用し、実施するのが適当と考えられる。

表 1.3 血球濃縮法と直接法による水検体からのウイルス分離率

ウイルス分離方法	ウイルス分離率(成功数/試行数)			
	0.003 EID ₅₀ /mL	0.03 EID ₅₀ /mL	0.3 EID ₅₀ /mL	
血球濃縮法	100mL(血球0.2%)	0% (0/4)	0% (0/5)	100% (4/4)
	1L(血球0.02%)	0% (0/4)	100% (5/5)	100% (4/4)
直接法	20mL(1mL/卵×20個)	0% (0/4)	31% (5/16)	100% (4/4)
	80mL(2mL/卵×40個)	実施せず	100% (7/7)	実施せず

2) 合成糖鎖固定微粒子による鳥インフルエンザウイルス回収法の検討

糖鎖固定微粒子による 1mL ウイルス液からの LPAIV または HPAIV 回収率を検討した。吸着後の遠心上清中からは糖鎖固定微粒子に吸着しなかったと考えられるウイルスが一定量分離された。しかし、ウイルス液に添加した糖鎖固定微粒子により、計算上、H6N2 亜型 LPAIV では 100%および 47%、H5N6 亜型 HPAIV では 46%および 100%の効率でウイルスが回収された(表 1.4)。糖鎖固定微粒子により、LPAIV や HPAIV に関わらず感染性を維持したインフルエンザウイルスを回収できることが確認された。

表 1.4 血球濃縮法と直接法による水検体からのウイルス回収率

ウイルス	試行	ウイルス感染価 (EID ₅₀ /mL)			回収率 (C/A)
		A. 元ウイルス液	B. 遠心上清	C. 回収ウイルス	
H6N2(LPAIV)	1	1,000	170	1,000	100%
	2	1,000	170	467	47%
H5N6(HPAIV)	1	4,677	214	2,138	46%
	2	3,162	1,000	10,000	≥100%

次に、糖鎖固定微粒子 (1mg/mL) と鶏赤血球 (0.2%) による AIV 分離率 (分離成功数/試行数) を比較した。200 EID₅₀/mL ウイルス液 1mL からは、糖鎖固定微粒子 (1mg/mL) と鶏赤血球 (0.2%) とともに全 5 回の試行でウイルスが分離され、ウイルス感染価が低くなるに従って分離率はいずれも低下した(表 1.5)。ウイルス分離可能だった最少ウイルス感染価は 2 EID₅₀/mL で、5 回の試行中、糖鎖固定微粒子で 2 回、鶏赤血球で 1 回ウイルス分離に成功した。

表 1.5 合成糖鎖固定微粒子と鶏血球液による鳥インフルエンザウイルス分離率

ウイルス吸着素材	ウイルス分離率(成功数/試行数)			
	0.2 EID ₅₀	2 EID ₅₀	20 EID ₅₀	200 EID ₅₀
鶏赤血球(0.2%)	0% (0/5)	20% (1/5)	60% (3/5)	100% (5/5)
糖鎖固定微粒子(1mg/mL)	0% (0/5)	40% (2/5)	100% (5/5)	100% (5/5)

3) 環境水を対象に実施した鳥インフルエンザウイルス分離調査

2018 年度の調査では、11 月に採取した新潟県瓢湖の環境水検体から血球濃縮法により H6N6 亜型の LPAIV が分離されたが、2019 年度の調査で AIV は分離されなかった(表 1.6)。HPAIV の国内流行があった 2020 年度は、11 月に新潟県の瓢湖、12 月に鳥取県日光および 2 月に長野県の諏訪湖で採取した環境水から H5N8 亜型 HPAIV が分離された。さらに、12 月に千葉県と宮城県で水鳥を捕獲した際に採取した環境水 2 検体からそれぞれ H1N1 亜型および H6N8 亜型 LPAIV が分離された。HPAIV が分離された新潟県

瓢湖と鳥取県日光では、同日あるいは数日前に採取された水鳥糞便からの HPAIV 分離が報告されている。しかし、長野県諏訪湖では糞便や死亡野鳥からの分離例はなく、環境水が現在の糞便及び死体を対象とする HPAIV 早期発見のサーベイランス体制を補完する新たな検査対象として有用であることが示された。また、これら HPAIV が分離された採水地は、水の流れが少ない場所に多数の水鳥が密集している傾向が共通して認められた。環境水を対象とするサーベイランスでは、採水場所や採水する時期がウイルス分離効率に大きく影響する可能性が考えられ、環境水からのウイルス検出には、これら条件を十分に検討し最適な条件下での採水実施が重要と考えられた。

4) 渡り鳥飛来地における見かけ上健康な水鳥からの鳥インフルエンザウイルス分離調査

2018 年度の調査では、1 月 13 日に鳥取県東郷池で捕獲したマガモ 1 羽の総排泄腔スワブから H7N7 亜型 LPAIV が、10 月 26 日に北海道帯広市内の野鳥捕獲地周辺で採取した水鳥糞便 1 検体から H3N2 亜型 LPAIV が分離された（表 1.6）。2019 年度の調査では、捕獲水鳥に加え、新たに北海道で狩猟によって捕獲したカモ類も検査対象としたが、捕獲水鳥、狩猟カモおよび水鳥糞便のいずれから AIV は分離されなかった。2020 年度の調査では、10 月 17 日に北海道で狩猟捕獲されたコガモ 1 羽の総排泄腔スワブから H4N1 亜型 LPAIV が、11 月 21 日に宮城県伊豆沼で採取したオオハクチョウ糞便から H6N1 亜型 LPAIV が分離された。HPAIV が国内流行した 2020 年度に実施した調査では、捕獲または狩猟個体から HPAIV が検出されず、HPAIV 国内侵入の早期発見を目的とした検査対象としては効率的で無いと考えられた。

5) 渡り鳥飛来地で捕獲したカモ類の抗体保有状況調査

3 年間で捕獲した見かけ上健康な水鳥 280 羽から HPAIV は分離されなかったが、これらから採取した血清を対象に H5N6 亜型の AIV 抗原を用いて実施した HI 試験で、2018 年度は 100 羽中 4 羽（陽性率 4%）、2019 年度は 80 羽中 5 羽（陽性率 6.25%）から H5 亜型 HPAIV に対する HI 抗体が検出され、H5 亜型 HPAIV に感染歴のある水禽が一定割合で国内に侵入していることが示唆された（表 1.7）。さらに、HPAIV が国内流行した 2020 年度は、捕獲した水鳥 100 羽のうち 35 羽が HI 抗体陽性（10HI 以上）となり、HPAIV の国内流行の無かった過去 2 シーズンに比べ高い抗体陽性率（35%）を示し、平年に比べ多くの水鳥が HPAIV に感染していた可能性が示された。

表 1.6 野鳥および渡り鳥飛来地で採取した環境水、水鳥糞便からのインフルエンザウイルス分離成績比較

調査年	ウイルス分離陽性数／検体数				
	環境水 (100mL)	環境水 (1L)	捕獲水鳥	狩猟カモ類	水鳥糞便
2018-2019	0/54	1/14 *H6N6	1/100 H7N7	—	1/69 H3N2
2019-2020	—	0/28	0/80	0/39	0/120
2020-2021	—	5/38 H5N8 H1N1 H5N8 H6N8 H5N8	0/100	1/53 H4N1	1/198 H6N1
	0/54	6/80	1/280	1/92	2/386

*分離ウイルス亜型（高病原性、低病原性）

表 1.7 渡り鳥飛来地における捕獲水鳥のインフルエンザウイルス抗体保有状況調査

渡り鳥飛来地		HI抗体陽性羽数/検査羽数					
		2018-2019年		2019-2020年		2020-2021年	
北海道	帯広市内	マガモ	0/13 (0%)			—	—
		カルガモ	0/7 (0%)				
宮城県	大沼(仙台市)		—			オナガガモ	6/19 (32%)
						オオバン	0/1 (0%)
千葉県	印西市内		—	オナガガモ	1/20 (5%)	オナガガモ	9/20 (45%)
兵庫県	昆陽池公園(伊丹市)	オナガガモ	2/20 (10%)	オナガガモ	2/10 (20%)	オナガガモ	3/18 (17%)
				ヒドリガモ	2/10 (20%)	ヒドリガモ	0/2 (0%)
岡山県	深山公園(玉野市)	オナガガモ	1/10 (10%)	オナガガモ	0/20 (0%)	オナガガモ	8/20 (40%)
		ヒドリガモ	1/10 (10%)				
鳥取県	日光(鳥取市)	コガモ	0/10 (0%)			—	—
	湖山池(鳥取市)	ヒドリガモ	0/10 (0%)	ヒドリガモ	0/6 (0%)	ヒドリガモ	9/20 (45%)
		マガモ	0/10 (0%)				
	東郷池(東伯郡)	オナガガモ	0/5 (0%)	オナガガモ	0/14 (0%)		—
		オオバン	0/5 (0%)				
合計			4/100 (4%)		5/80 (6.25%)		35/100 (35%)

2020年度には、3株の環境水由来 HPAIV に加え、主に西日本で回収された死亡野鳥や水鳥糞便から 11 株の H5N8 亜型 HPAIV を分離した。これら 14 株の HPAIV の全ゲノム解析で、欧州を起源とする 2 系統の H5N8 亜型 HPAIV の国内侵入が明らかになった (図 1.2)²⁾。さらに、2019-2020 年に欧州で流行した系統のウイルスから、NP 分節のみ、または PB2、PB1 および NP の 3 分節が交換された遺伝子再集合体が認められた。交換された NP 分節の由来が 2 系統あったことから (図 1.3)、欧州を起源とする 2 つの遺伝子型に加え、遺伝子再集合によって生まれた 3 つの遺伝子型の国内侵入が確認された。さらに、2018 年から 2021 年に分離した 6 株の LPAIV の全ゲノム解析を行った結果、H5N8 亜型 HPAIV の遺伝子と比較的近縁な NP 分節や PB2 分節を持つ株が、HPAIV と同時期に分離されており、欧州で流行した H5N8 亜型 HPAIV と遺伝子再集合を起こしたウイルスと共通の祖先をもつ可能性が考えられた (図 1.3)。また、国内で HPAI の発生が無かった 2018 年度および 2019 年度に分離した LPAIV 16 株について同様の解析を実施したところ、これら LPAIV の多くが HPAI の発生が多く報告されている欧州および中国に由来する可能性が示され、HPAIV がこれら地域から LPAIV と同様に国内へと侵入するリスクの存在が示唆された。

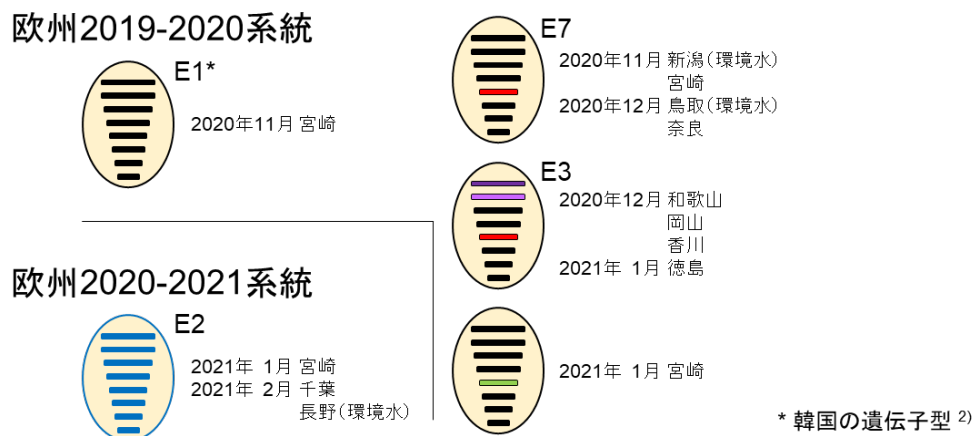


図 1.2 環境水、水鳥糞便および死亡野鳥から分離された H5N8 亜型 HPAIV の遺伝子型

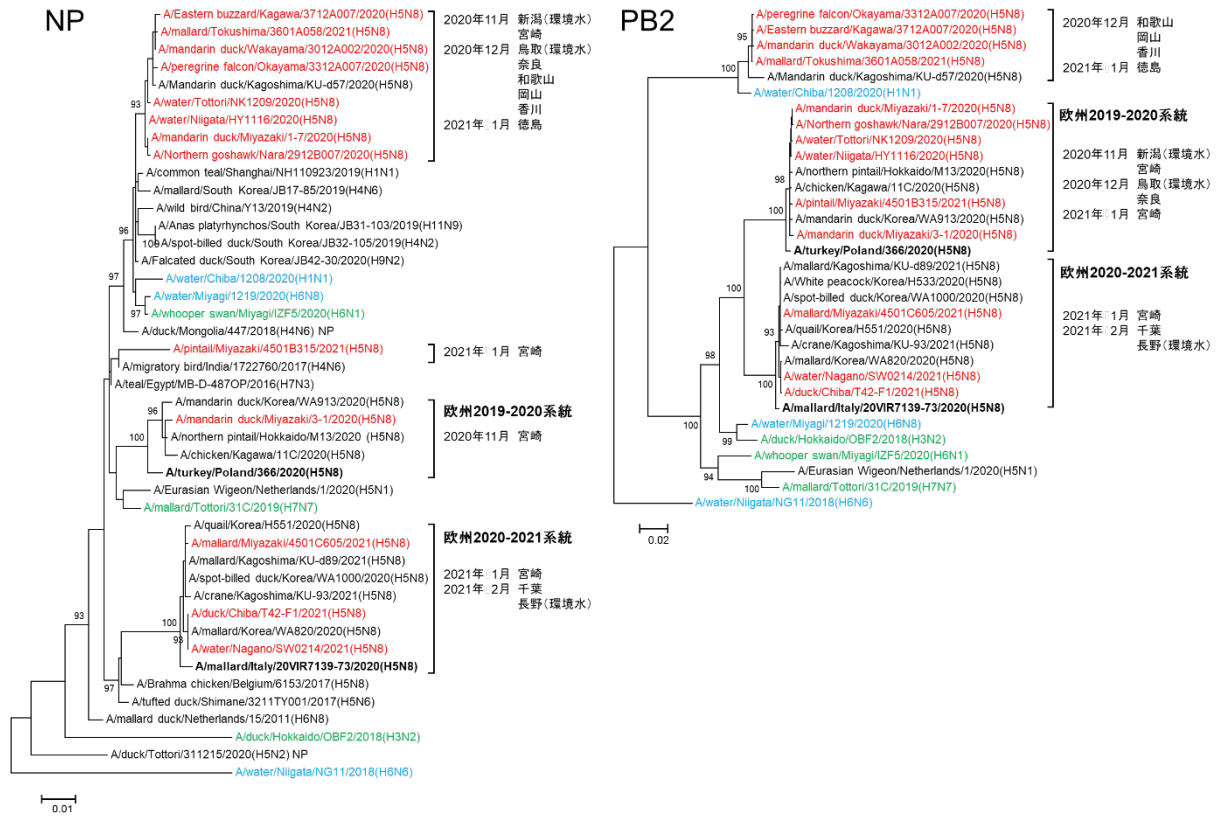


図 1.3 環境水、捕獲野鳥および水鳥糞便分離株の NP および PB2 分節の分子系統樹
 本研究で分離した高病原性ウイルスを赤色、低病原性ウイルス糞便分離株を緑色、
 低病原性ウイルス環境水分離株を水色で示した。

6) ウイルス検出に適した診断用検体採取部位の検討

気管および総排泄腔以外の新たな検査部位の有用性評価のため、野外死亡野鳥の結膜を対象に実施した簡易検査で、カモ類 3 羽中 2 羽、猛禽類 4 羽中 3 羽から A 型陽性の反応が得られた (表 1.8)。オナガガモおよびマガモの結膜で得られた陽性反応はいずれも微弱であったが、死体回収時に実施された気管および総排泄腔の簡易検査では陰性と報告されており、結膜スワブが補助的な診断用検体採取部位として有用である可能性が示された。

表 1.8 HPAI 感染死亡野鳥を用いて実施した診断用検体採取部位の検討

死亡野鳥	回収場所	回収日	死体回収時 簡易検査*	簡易検査 (鳥取大学で実施)			
				検査実施日	気管	総排泄腔	結膜
オナガガモ	宮崎県	2021年 1月 6日	-	1月18日	-	-	弱+
マガモ	宮崎県	2021年 1月24日	-	1月30日	-	-	弱+
マガモ	宮崎県	2021年 1月24日	+	2月 2日	-	-	-
オオタカ	奈良県	2020年12月20日	+	12月25日	実施せず	実施せず	+
ハヤブサ	栃木県	2021年 2月15日	+	3月 2日	+	弱+	弱+
フクロウ	栃木県	2021年 2月16日	+	3月 4日	+	+	+
ノスリ	栃木県	2021年 3月 3日	+	3月10日	+	-	-

* +: 陽性、 -: 陰性

(2) 希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価

感染実験を通して、採材群及び観察群で明らかな臨床症状を示した個体は認められなかった (図 1.4)。採材群では各カモ 1 羽 (ID:W102, M113, P121) でウイルス血症が認められ、そのうちヒドリガモ (W102)

およびオナガガモ (P121) の全身臓器からウイルスが回収された (図 1.4)。マガモでは 3 羽全羽 (W111-W113) について、腎臓または脾臓に限ってウイルスが回収された。観察群では主に 10^6 EID₅₀/200 μ L 以上のウイルスを接種した個体で、攻撃株に対する血清中抗体価の上昇が認められた (図 1.5)。ヒドリガモ 2 羽 (W106, W108)、マガモ 3 羽 (M115-M117)、オナガガモ 3 羽 (P124-P126) では、ウイルス接種後 1~10 日目にかけて主に咽喉頭スワブからウイルスが回収された。加えて、一部のマガモおよびオナガガモでは接種後 10 日目に採材した脾臓からウイルスが分離された。以上の結果から、実験に用いたカモ科鳥類は、近年流行している HPAIV に感受性を示し、無症状であっても体外に長期にわたってウイルスを排出して、水場を共有する他鳥種の感染源となり得ることが明らかとなった。また、一部の個体では全身臓器でウイルスが増殖していたことから、このような個体は野外環境下では死に至っていたものと考えられた。また、衰弱時に希少猛禽類等に捕食された場合、捕食者に経口的に感染し感染拡大に繋がる可能性が示された。

	 ヒドリガモ			 マガモ			 オナガガモ		
ID	W101	W102	W103	M111	M112	M113	P121	P122	P123
臨床症状	-	-	-	-	-	-	-	-	-
組織									
脳	-	+	-	-	-	-	+	-	-
気管	-	+	-	-	-	-	+	-	+
胸筋	-	+	-	-	-	-	+	-	-
肺	-	+	-	-	-	-	+	+	+
肝臓	-	+	-	-	-	-	+	-	-
脾臓	-	+	-	-	+	+	+	+	+
腎臓	-	+	-	+	-	-	+	-	+
心臓	-	+	-	-	-	-	+	+	-
脾臓	-	+	-	-	-	-	+	-	+
結腸	-	+	-	-	-	-	+	+	+
眼球	-	+	-	-	-	-	+	-	+
羽軸	-	-	-	-	-	-	-	-	-
血液	-	+	-	-	-	+	+	-	-
スワブ									
咽喉頭	-	+	-	-	-	-	+	+	+
クローアカ	-	+	-	-	-	-	+	-	-
結膜	-	+	-	-	-	-	+	-	+

図 1.4 採材群のウイルス分離結果 (接種後 3 日目)


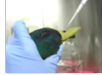

	 ヒドリガモ						 マガモ						 オナガガモ								
接種ウイルス量	10^6		10^4		10^2		10^6		10^4		10^2		10^6		10^4		10^2				
ID	W104	W105	W106	W107	W108	W109	W110	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	P124	P125	P126	P127	P128	P129	P130
臨床症状	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HI抗体価																					
Pre	<2	<2	<2	2	<2	4	<2	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2
Post	32	32	32	4	128	16	<2	64	64	16	256	4	<2	<2	128	128	64	<2	<2	<2	<2
ウイルス分離																					
咽喉頭/クローアカスワブ																					
0d	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
1d	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2d	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
3d	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
5d	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7d	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
10d	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
結膜スワブ										+							+				
脾臓	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
その他組織	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図 1.5 観察群の抗体価およびウイルス分離結果 (接種後 10 日目)

5. 研究目標の達成状況

HPAIV 早期発見のための新たなサーベイランス体制構築を目標に、環境水および見かけ上健康な水鳥のサーベイランス対象としての可能性を検証し、環境水の有用性とその効率的な手法を確立した。

見かけ上健康な個体の抗体保有状況から、HPAIV 感染歴のある野鳥の国内渡来状況の一端が示され、抗体調査の HPAIV 感染発生リスク評価における有用性が示された。野鳥分離株の分子疫学的解析により、2020 年度における欧州を起源とする HPAIV の国内侵入を明らかにした他、国内で分離された LPAIV の多くが HPAI の発生が多く報告されている欧州および中国に由来する可能性が示され、HPAIV がこれら地域から LPAIV と同様に国内へと侵入するリスクの存在が示唆された。

また、希少鳥類における感染予防の基盤構築のため、希少鳥類と生息地を共有する一般種について HPAIV 感染実験を実施し、近年の HPAIV 国内分離株に感染したヒドリガモ、オナガガモおよびマガモが無症状のまま一定期間ウイルスを排出し、希少鳥類への感染源になることを明らかにした。このことは、捕獲個体から採取した血清を用いた抗体調査で対象個体の多くが抗体陽性で、特に国内で多数の発生が認められた 2020 年に捕獲した個体で陽性率が最も高かったことから支持され、当初掲げていた研究目標を達成した。

6. 引用文献

- 1) A. Khalenkov, W.G. Laver, R.G. Webster: *J. Virol. Methods*, 149(1):180-3 (2008), Detection and isolation of H5N1 influenza virus from large volumes of natural water.
- 2) Y. Baek, Y. Lee, D. Lee, J. Shin, J. Lee, D.H. Chung, E. Lee, G Heo, M. Sagong, S. Kye, K. Lee, M. Lee, Y. Lee: *Viruses*, 13(3):490 (2021), Multiple Reassortants of H5N8 Clade 2.3.4.4b Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Detected in South Korea during the Winter of 2020-2021.

II-2 死亡個体等からの鳥インフルエンザウイルス抗原及び遺伝子検出手法の開発並びに希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価

国立大学法人北海道大学

大学院獣医学研究院 迫田 義博（令和2年度サブテーマリーダー）・岡松 正敏（平成30年～令和元年度サブテーマリーダー）・松野 啓太

〈研究協力者〉

猛禽類医学研究所 小笠原 浩平

〔要旨〕

希少鳥類における高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）の感染を早期に発見し、感染拡大の防止や感染個体の治療法を確立するために、まず近年流行しているウイルスの遺伝子や抗原性を明らかにした。また鳥インフルエンザの診断で活用が検討されているH5やH7亜型を検出できるイムノクロマト診断キット（簡易キット）や遺伝子診断法（リアルタイムRT-PCR法）の検査条件を改善し、感度と特異性を評価した。その結果、簡易キットとリアルタイムRT-PCRの両方法とも感染個体の臓器材料を用いた場合に高い感度と特異性が確認された。さらにリアルタイムRT-PCR法ではスワブ材料についても高い感度と特異性が確認された。また、オジロワシにH5N6亜型HPAIVを接種し、スワブからウイルス分離を試みた結果、生体を安楽死させることなく採取できる材料としては、口腔スワブが診断に適していることがわかった。これらの結果は、HPAIVの感染が疑われる生きた希少鳥類や死亡野鳥における診断法の改善に寄与する。また、HPAIVに感染した希少鳥類を治療する方法を確立するために、ヒトで使用されている抗インフルエンザ薬の鳥に対する有効性を評価した。まず、ニワトリをモデルとして抗インフルエンザ薬の治療効果の評価したところ、経口薬であるバロキサビルマルボキシル（商品名：ゾフルーザ）を2.5 mg/kgで感染と同時に投与することで治療効果が認められた。また同量の抗インフルエンザ薬をアヒルとオジロワシに投与し、血液中の抗ウイルス薬活性体の濃度を測定したところ、鳥種によりその濃度が異なった。以上より、鳥種毎の薬剤の代謝効率や血中動態を考慮しながら投与量を決める必要があることがわかった。これらの研究については、当初掲げていた目標に沿って、予定通り十分な成果を得ることができた。

1. 研究開発目的

本サブテーマの2つの大きな目的は、希少鳥類におけるHPAIVの感染を早期に発見し、感染拡大の防止を図るための実践的な研究開発と、HPAIVに感染した鳥を治療するという新しいコンセプトを具現化するための基礎的知見を得ることである。まず、近年流行している鳥インフルエンザウイルスの性状を把握するために、水鳥が越冬する期間に採取した糞便および野鳥の死体から鳥インフルエンザウイルスの分離を実施する。分離ウイルスはその遺伝子解析を実施し、その起源を明らかにすると共に、病原性および抗原性を解明する。また、これらの分離ウイルスは常に変異を繰り返しているので、H5およびH7亜型特異的な抗原検出簡易キットや遺伝子検出法の信頼性（感度と特異度）の確認と向上が望まれる。これらを実践的に実施し、高感度かつ迅速な診断法を確立する。さらに、通常死亡野鳥からウイルス抗原を検出するためには、気管およびクロアスワブを検査材料とするが、野鳥では鳥種や感染後の経過によりウイルス抗原の検出に適した部位が異なる可能性がある。また気管のスワブは生きた鳥からの採取は難しい。そこで、実験感染させた鳥を用いてウイルス検出に適した採取部位を検討する。また、希少鳥類への高病原性鳥インフルエンザウイルス感染に対する治療を目的とした抗インフルエンザ薬投与の有効性についてニワトリをモデルとして評価する。さらに希少鳥類の治療法確立に向けた基盤を構築するために、抗インフルエンザ薬を他の鳥種に投与し血中の抗ウイルス薬活性体の濃度を調べる非侵襲的実験を行う。

2. 研究目標

- (1) 現在流行しているウイルスの遺伝子と抗原性の解析と鳥インフルエンザウイルス抗原および遺伝子検出手法の開発
 - ・家禽および野鳥で流行しているHPAIVの遺伝子と抗原性を解明する。この成果を基に死亡野鳥から高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原および遺伝子を検出する方法を評価し、実用化する。
- (2) 鳥種に応じた診断に適切なサンプリング部位の検索
 - ・サブテーマ3と連携し、オジロワシなどの希少鳥類における鳥インフルエンザの診断に有用な診断材料を特定する。
- (3) 希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価
 - ・オジロワシなどの希少鳥類における抗インフルエンザ薬の有効性を評価し、治療法の確立に役立てる。

3. 研究開発内容

- (1) 現在流行しているウイルスの遺伝子と抗原性の解析と鳥インフルエンザウイルス抗原および遺伝子検出手法の開発

野生の水鳥が飛来および越冬する期間に、北海道内の稚内市、網走市周辺、厚岸町周辺、苫小牧市および札幌市で、野生水鳥の糞便を採取した。これらを発育鶏卵に接種し、鳥インフルエンザウイルスを分離した。分離されたウイルスのヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) の亜型を特定した。ウイルスの抗原性の解析には、近年国内外で分離されたH5亜型HPAIVおよびその抗血清を用いた赤血球凝集阻止 (HI) 試験を行った。HI試験の成績から抗原地図¹⁾を作成し、分離されたウイルスの抗原性を可視化した。また分離されたウイルスの8つ分節の遺伝子の分子系統樹解析をそれぞれ行い、国内にウイルスが持ち込まれたルートや国内での流行動態を推察した。また分離されたウイルスをニワトリに接種し、ウイルス感染後の臨床症状や死亡に至るまでの日数からウイルスの病原性を評価した。なお、分離されたウイルスは小課題 (2) で実施する簡易キットとリアルタイムRT-PCR法の2つの迅速診断法の改善にも活用した。

これまでに当研究室で開発したH5およびH7亜型のウイルスを特異的に検出する簡易キット^{2),3)}が現在流行しているHPAIVの検出に十分な感度と特異性を有しているか評価した。小課題 (1) およびその他の研究活動で近年分離されたH5およびH7亜型のHPAIV分離株に対する簡易キットの反応性を評価した。検出感度の向上を目的に、スワブを拭う綿棒および検体抽出液の改良を試みた。また検出感度および特異性の実証評価にあたっては、過去の死亡野鳥の検査で鳥インフルエンザウイルス陰性と診断された40本のスワブと、国立環境研究所より提供された64羽分の野鳥の臓器材料を用いた。さらに、陽性検体として、HPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を感染させたニワトリのスワブと臓器乳剤14検体を用いた。

また、リアルタイムRT-PCR法の改良を目的として、近年分離されているH5およびH7亜型HPAIVのHA遺伝子の解析を基に、論文で公表されているプライマーや各国の診断で使用されているプライマーの有効性を比較した。選抜された検査条件 (国内の家禽の診断で利用されている農研機構動物衛生研究部門が確立したプライマーおよび検査手法) を用いたリアルタイムRT-PCR法が現在流行しているHPAIVの検出に十分な感度と特異性を有しているか評価した。検出感度および特異性の実証評価にあたっては、過去の死亡野鳥の検査で鳥インフルエンザウイルス陰性と診断された40本のスワブと、国立環境研究所より提供された64羽分の野鳥の臓器材料を用いた。さらに、陽性検体として、HPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を感染させたニワトリのスワブと臓器乳剤14検体を用いた。

- (2) 鳥種に応じた診断に適切なサンプリング部位の検索

サブテーマ3「鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境清浄化技術の確立 (鹿児島大学)」の研究計画と連動して、事故などにより野生に戻すことのできないオジロワシ2羽について、HPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を接種し、経時的に口腔、クロアカおよび

眼球スワブを回収した。また、同様に経時的に羽毛を回収した。これらのサンプルから分離されるウイルスの感染価を比較し、希少鳥類における鳥インフルエンザの診断に適切な材料を特定した。

(3) 希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価

国内で入手可能な抗インフルエンザ薬の効能に関する既報を参考に、希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性を評価する候補を2つ選抜した。選抜されたヒト用抗インフルエンザ薬であるペラミビル（商品名：ラピアクタ、注射薬）とバロキサビルマルボキシル（商品名：ゾフルーザ、経口薬）をHPAIVに感染したニワトリに投与し、その有効性をニワトリの生死およびニワトリ体内でのウイルス増殖を指標に評価した。試験にあたっては、ウイルス感染と同時に抗ウイルス薬を投与する試験（同時投与）とウイルス接種24時間後にニワトリにおける発症を確認後に抗ウイルス薬を投与する試験（発症後投与）をそれぞれ実施した。ウイルス感染実験としてはHPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を10 CLD₅₀ (50%ニワトリ致死量)で経鼻接種した。また効果の高かったバロキサビルマルボキシルの同時投与試験については、発症防止に有効な最小薬剤投与量を感染実験により求めた。さらに、求めた発症防止に有効な最小薬剤投与量 (2.5 mg/kg) のバロキサビルマルボキシルをニワトリ、アヒルおよびオジロワシに投与し、経時的に血液中の抗ウイルス薬活性体の濃度を調べた。これらの成績から、鳥種毎に治療に有効な最小薬剤投与量を推定した。

4. 結果及び考察

(1) 現在流行しているウイルスの遺伝子と抗原性の解析と鳥インフルエンザウイルス抗原および遺伝子検出手法の開発

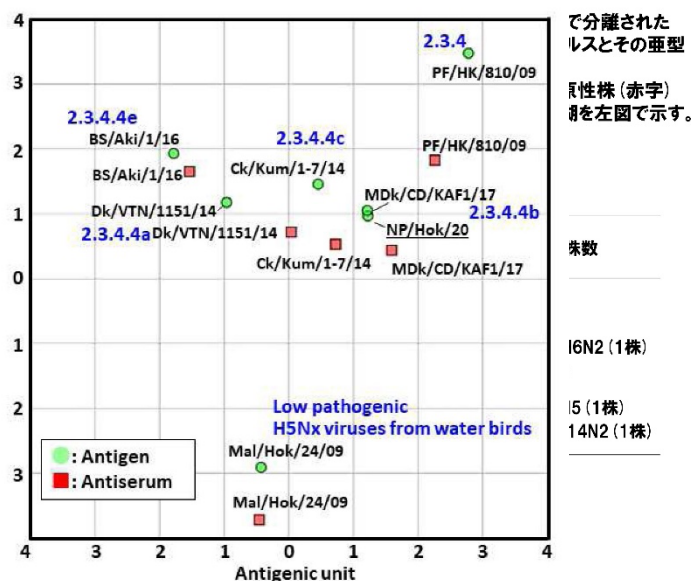
図2.2 糞便調査で分離されたH5N8高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原性解析

7株のH5鳥インフルエンザウイルスと6種の抗血清を用いて赤血球凝集阻止試験をそれぞれ実施した。その数値を抗原地図として視覚化したもの示す。緑で示されているウイルス株間の距離が2つのウイルスの抗原性の近さ(遠さ)を示している。

緑: HI試験に用いたウイルスに対する血清を示す

赤: HI試験に用いたウイルスに対する血清を示す A/northern pintail/Hokkaido/M13/2020 (H5N8)。

青: H5亜型 低病原性鳥インフルエンザウイルスとクレード2,3,4のグループに分類されるH5亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの位置



2018年10月から2021年3月までの糞便調査において、北海道内の稚内市、網走市周辺、厚岸町周辺、苫小牧市、および札幌市で、野生水鳥の糞便 計1,542検体を採取した。発育鶏卵を用いてウイルス分離を試みたところ、12株の鳥インフルエンザウイルスが分離された。これらのウイルスの亜型は、図2.1の通りである。このうちH5またはH7亜型のウイルスは2株で、うち1株 [A/northern pintail/Hokkaido/M13/2020 (H5N8)] は発育鶏卵を殺す病原性を持つ、高病原性タイプのウイルスであることがわかった。このA/northern pintail/Hokkaido/M13/2020 (H5N8)の抗原性をHI試験により数値化し、これらの成績からH5亜型ウイルスの抗原地図を作成した(図2.2)。その結果、分離されたウイルスの抗原性は本来のH5亜型ウイルスとは異なり、近年ユーラシア大陸やアフリカで分離されているHPAIVと同様に抗原変異株であることが分かった。高病原性株であるA/northern pintail/Hokkaido/M13/2020 (H5N8)のHA遺伝子の解析を行ったところ、本ウイルスのHA遺伝子は2019~2020年冬にヨーロッパの野鳥や家禽から検出されたウイルスと近縁であり、抗原性解析の結果と一致す

ることが分かった（図2.3）。本ウイルスをニワトリに経鼻接種したところ、72時間以内に臨床症状を呈して死亡し、静脈内接種試験の指数も2.92であったことからウイルスはニワトリに対して高い病原性を持つことが分かった。

2020～2021年の冬季には、東北、北海道地方で上記以外に4株のH5N8亜型HPAIVが分離された。これらの分離ウイルスも同様に遺伝子解析を行ったところ、ウイルスの8本の遺伝子分節のうちNP遺伝子が他のウイルスのそれと置き換わった遺伝子再集合ウイルスが2パターン検出された。なお他機関の成績を含めると、遺伝子再集合ウイルスは3パターン国内で検出されている。（図2.4）。

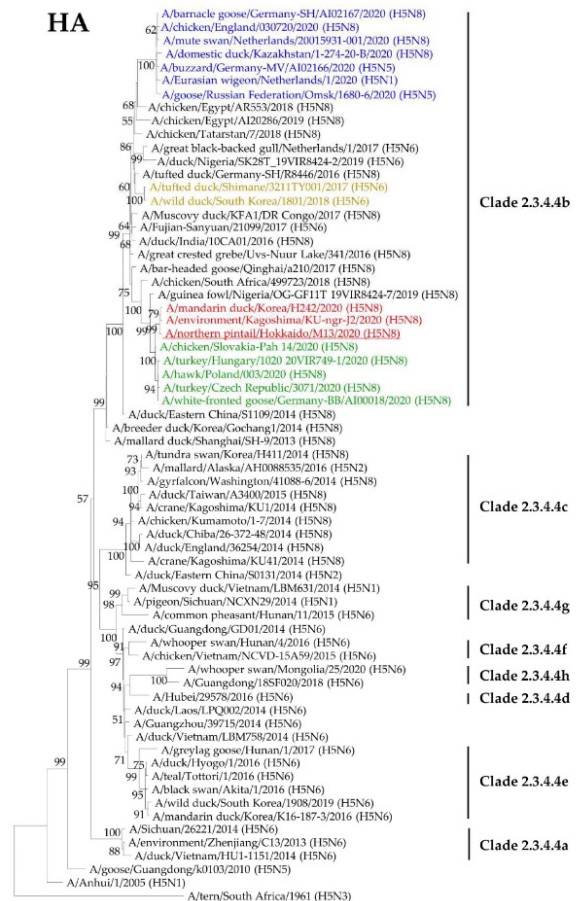
図2.3
糞便調査で分離されたH5N8高病原性鳥インフルエンザウイルスのHA遺伝子の分子系統樹

赤:2020～2021年冬季に日本及び韓国で分離されたウイルス。うち下線は、今回糞便調査で分離された A/northern pintail/Hokkaido/M13/2020 (H5N8)。

緑:2019～2020年冬季にヨーロッパで分離されたウイルス

青:2020～2021年冬季にヨーロッパで分離されたウイルス

茶:2017～2018年冬季に日本及び韓国で分離されたウイルス



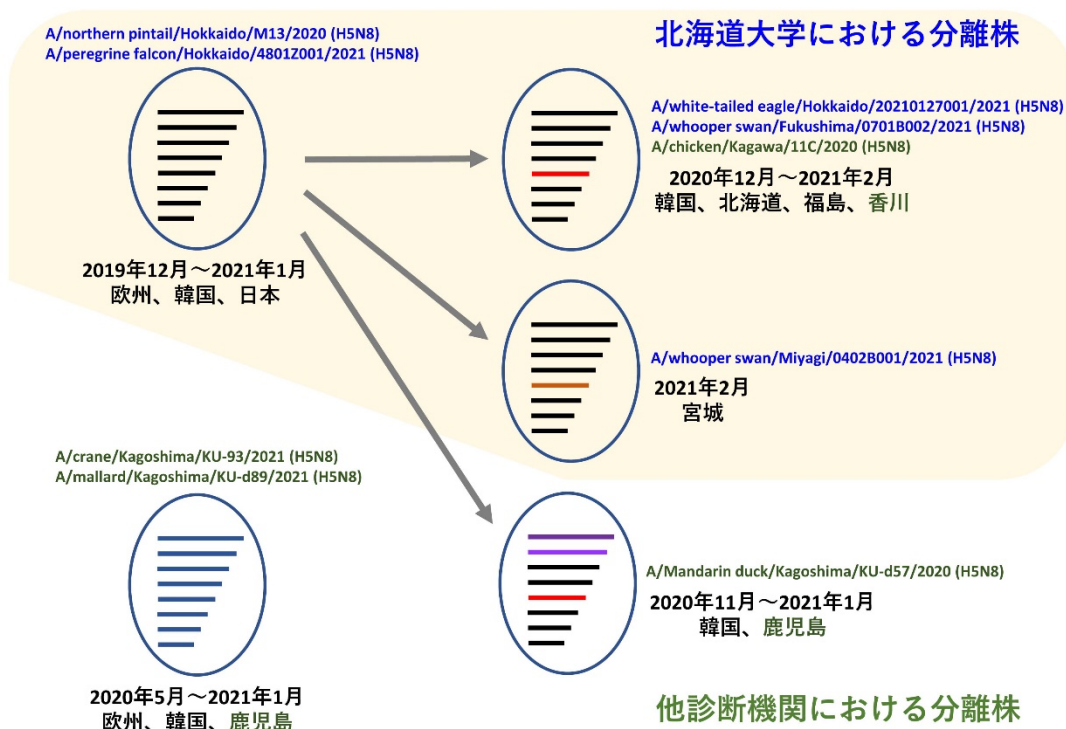


図2. 4 日本で分離されたH5N8亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子の多様性

当初野外ウイルスの調査は、2018年度と2019年度に限って実施する予定であった。しかし、2019年の冬にヨーロッパで野鳥からのH5N8亜型HPAIVの検出が多数報告されたので、2020年度も継続して実施した。その結果、ウイルスはユーラシア大陸を横断し、ヨーロッパから極東アジア地域まで野鳥を介して運ばれたことが分かった(図2.5)。また、A/northern pintail/Hokkaido/M13/2020 (H5N8)のウイルスの検出は、2020～2021年冬季のH5N8HPAIVの国内初の検出となり、診断法の正確性向上や農場への注意喚起に大きく貢献した。以上より、ウイルスが野鳥の間で定着することが危惧されている現状では、毎年渡り鳥の調査を継続する必要性が再確認された。

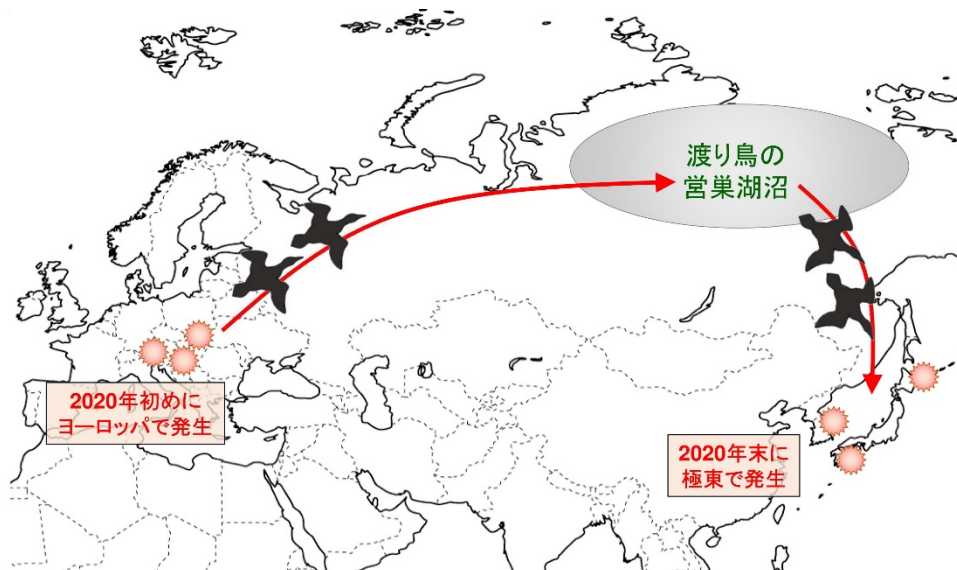


図2. 5 糞便調査で分離されたH5N8高病原性鳥インフルエンザウイルスの起源に関する考察

鳥インフルエンザウイルス抗原を高感度で検出するために、これまでに当研究室で開発したH5およびH7亜型の鳥インフルエンザウイルスを検出するイムノクロマトキットの検体抽出液およびスワブを拭う

綿棒の改良を試みた。その結果、4倍程度の感度の向上に成功し、検出感度はA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)に対し、 $10^{5.4}$ EID₅₀から $10^{4.6}$ EID₅₀に下げることができた(表2.1)。診断の特異性の実証評価にあたっては、過去の死亡野鳥の検査で鳥インフルエンザウイルス陰性と診断された40本のスワブと、国立環境研究所より提供された64羽分の野鳥の臓器材料を用いた。H5およびH7亜型の簡易キットは共にこれら104検体に対して陰性となり、非特異反応がないことを確認した(表2.1)。さらに、陽性検体として、HPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を感染させたニワトリのスワブと臓器乳剤を用いた。その結果、気管スワブおよび乳剤から共にウイルス抗原を検出できたが、スワブ材料では弱陽性にとどまった。イムノクロマト法を用いた簡易キットは、特別な機器や試薬を必要とせず、簡単に診断ができる。しかし、インフルエンザウイルスの共通抗原であるNP蛋白を検出する方法と比較してHA蛋白を検出する今回試験に用いた簡易キットは検出感度が劣ることが知られている²⁾。今回、簡易キットの高感度化には成功したが、検出限界が $10^{4.6}$ EID₅₀であることから、簡易キットは現場での簡易診断に用いるのに十分な感度はなく、確定検査機関で臓器乳剤や分離ウイルスなどに対して補助的に利用することが適切であると考えられる。

表2.1 改良型H5イムノクロマトキットを用いたウイルス抗原の検出

用いた検体	ウイルス感染価(EID ₅₀)	簡易キットでの抗原検出
【陽性材料】		
ウイルス液 (発育鶏卵漿尿液)	$10^{4.6}$	陽性
感染ニワトリ 気管スワブ	$10^{6.7}$	弱陽性
感染ニワトリ 気管乳剤	$10^{7.5}$	陽性
【陰性材料】		
死亡野鳥スワブ 40検体	全て検出限界以下	全て陰性
死亡野鳥臓器 64検体	全て検出限界以下	全て陰性

野鳥における鳥インフルエンザの遺伝子診断技術を向上させるために、リアルタイムRT-PCR法を用いた遺伝子検出系の有用性を評価した。近年分離されているH5およびH7亜型HPAIVのHA遺伝子の解析を基に、論文で公表されているプライマーや各国の診断で使用されているプライマーの同一性を比較した。その結果、国内の家禽の診断で利用されている農研機構動物衛生研究部門が確立したプライマーおよび検査手法と他の複数の国で家禽の診断に使用されている検査手法は、共に高い感度と特異性を有していることが確認された。また、検出感度および特異性の実証評価にあたっては、過去の死亡野鳥の検査で鳥インフルエンザウイルス陰性と診断された40本のスワブと、国立環境研究所より提供された64羽分の野鳥の臓器材料を用いた。さらに、陽性検体として、HPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を感染させたニワトリのスワブと臓器乳剤を用いた。その結果、臨床症状が無く、また従来のウイルス分離法では陰性と判定されたウイルス接種1日後の口腔スワブもリアルタイムRT-PCR法でH5遺伝子陽性となった。さらに鳥インフルエンザウイルス陰性と診断された40本のスワブと、64羽分の野鳥の臓器材料を用いた。リアルタイムRT-PCR法は共にこれら104検体に対して陰性となり、非特異反応が出ないことを確認した(表2.2)。リアルタイムRT-PCR法は、特別な機器やおよび遺伝子操作技術を必要とするが、感度と特異性は高いことが今回確認された。ウイルスの変異に伴って、プライマーの改良は必要である

が、今後野鳥における鳥インフルエンザの診断においても確定検査機関で有用な診断技術となることが確認された。

表2.2 リアルタイムRT-PCRを用いたH5亜型ウイルス遺伝子の検出

用いた検体	ウイルス感染価 (EID ₅₀)	リアルタイムRT-PCRでの検出
【陽性材料】		
感染ニワトリ 口腔スワブ (接種1日後)	検出限界以下	陽性 (Ct値: 31.7)
感染ニワトリ 気管スワブ (死亡時)	10 ^{6.7}	陽性 (Ct値: 21.5)
感染ニワトリ 気管乳剤 (死亡時)	10 ^{7.5}	陽性 (Ct値: 18.9)
【陰性材料】		
死亡野鳥スワブ 40検体	全て検出限界以下	全て陰性
死亡野鳥臓器 64検体	全て検出限界以下	全て陰性

(2) 鳥種に応じた診断に適切なサンプリング部位の検索

オジロワシ2羽にHPAIVのA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を10^{7.3} EID₅₀ 鼻接種し、スワブと羽毛からのウイルス分離を試みた。その結果、生体を安楽死させることなく採取できる材料としては、口腔スワブが診断に適していることがわかった (表2.3)。また羽毛からはウイルスは検出できなかった。

口腔スワブから分離されたウイルスの感染価は、従来のウイルス分離法でも、また今後活用が期待されるリアルタイムRT-PCR法でも検出が可能と考えられるウイルス量である。今後、生体を安楽死させることなく鳥インフルエンザの診断を実施するためには口腔スワブが適切であることが分かった。

表2.3 実験的にウイルスを感染させたオジロワシのスワブからのウイルス回収

個体A	1dpi	2dpi	3dpi
口腔	5.5	4.24	4.75
クローアカ	0.75	1.24	—
眼球	—	—	—
個体B	1dpi	2dpi	3dpi
口腔	4.75	2.5	3.5
クローアカ	0.75	—	—
眼球	—	—	—

数字は全て log EID₅₀/ml、—:検出限界以下

(3) 希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価

希少鳥類のモデルとして、HPAIVに感染したニワトリを用いて、抗インフルエンザ薬の治療効果を評価した。鳥類と哺乳動物では肝臓での薬物の代謝効率が異なることが予想され、プロドラッグ（投与後体内で活性体に代謝され効力を発揮する薬）は鳥での治療効果は哺乳動物よりも低くなる懸念がある。実際にノイラミニダーゼ活性を抑制する抗インフルエンザ薬オセルタミビル（商品名：タミフル）は、ニワトリにおける活性体への代謝が低いことが分かっている（製薬メーカーの内部データより）。このことから、タミフルと同じ作用点で効果を示すノイラミニダーゼ阻害薬としては、活性体を直接投与するペラミビル（商品名：ラピアクタ、注射薬）を選択した。また、インフルエンザウイルスのキャップ依存性エンドヌクレアーゼ活性を阻害するバロキサビルマルボキシル（商品名：ゾフルーザ、経口薬）は、ノイラミニダーゼ阻害薬に比べて薬効が高いことが既に報告されている⁴⁾。ただし、バロキサビルマルボキシルはプロドラッグであり、鳥での活性体への代謝効率は不明である。そこで、本試験では、ペラミビルとバロキサビルマルボキシルを用いてニワトリにおける治療効果を調べることにした。

ニワトリにHPAIVのA/black

swan/Akita/1/2016 (H5N6) を経鼻接種し、同時に抗ウイルス薬を投与する群（同時投与群、20 mg/kg/回で1日2回 5日間、図2.6）と、感染後1日目に発症してから投与する群（発症後投与、20 mg/kg/回で1日2回 発症後5日間、図2.7）について、臨床観察および感染後3日後の体内のウイルス価を調べた。その結果、同時投与群についてはペラミビル投与については、4羽中3羽が、バロキサビル投与については、4羽全羽が生残し（図2.8）、ニワトリ体内でのウイルス増殖を抑えた。一方、発症後投与群については、ウイルスの体内増殖を抑えたものの、致死抑制効果は限定的であった（図2.8）。

上記の試験では、高用量（20 mg/kg/回で1日2回）の抗ウイルス薬を5日間連続投与し、その治療効果を評価した。その結果、バロキサビルマルボキシルの方がペラミビルよりも治療効果が高いことが明らかとなった。またウイルス感染と同時に抗ウイルス薬を投与する方が発症後に投与するよりも効果が高いことがわかった。そこで、

バロキサビルマルボキシルを1回だけ感染と同時に投与した時に治療効果が認められる最小投与量を求めた。ニワトリに0.1 mg/kg～62.5 mg/kgの5用量でバロキサビルマルボキシルを投与し、A/black swan/Akita/1/2016 (H5N6) の攻撃に対する効果を感染実験により評価した。その結果、2.5 mg/kgが最小有効量であることがわかった（図2.9）。

図2.6 抗インフルエンザ薬のニワトリを用いた評価試験【同時投与】

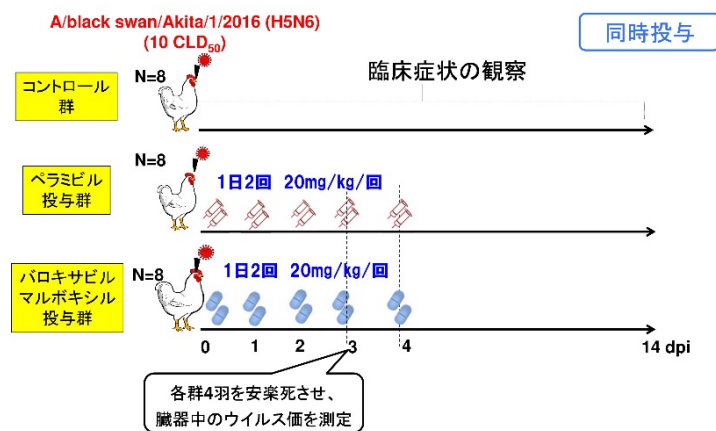


図2.7 抗インフルエンザ薬のニワトリを用いた評価試験【発症後投与】

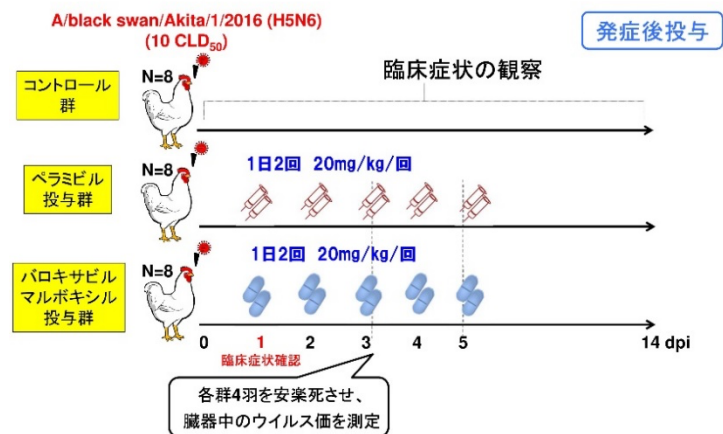


図2.8 抗インフルエンザ薬の効果判定
—ニワトリの生死とウイルス増殖—

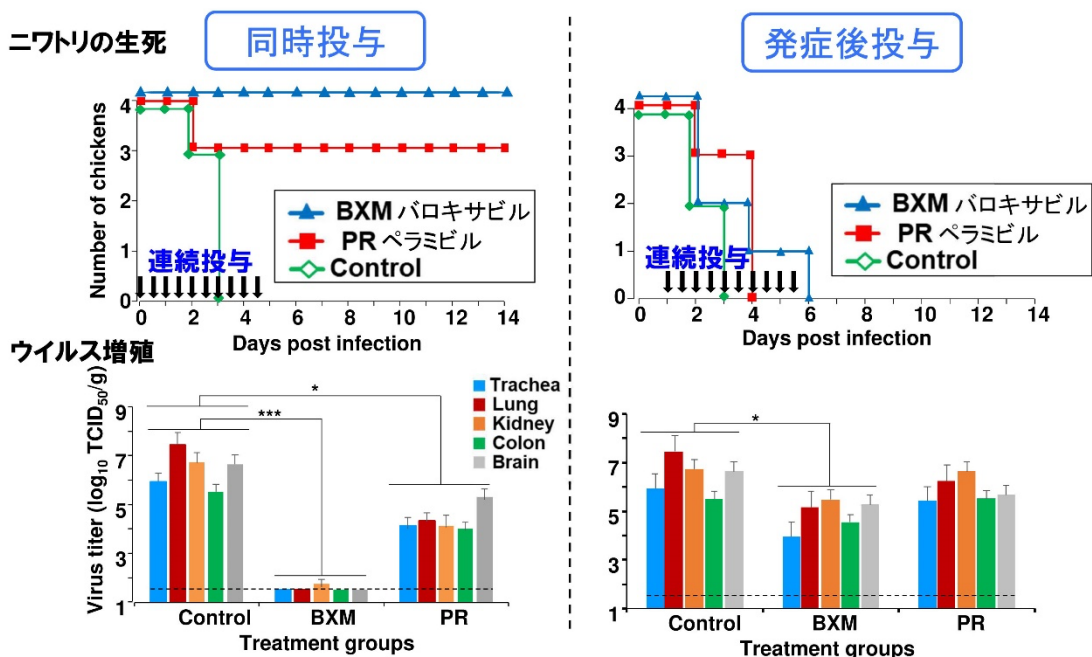
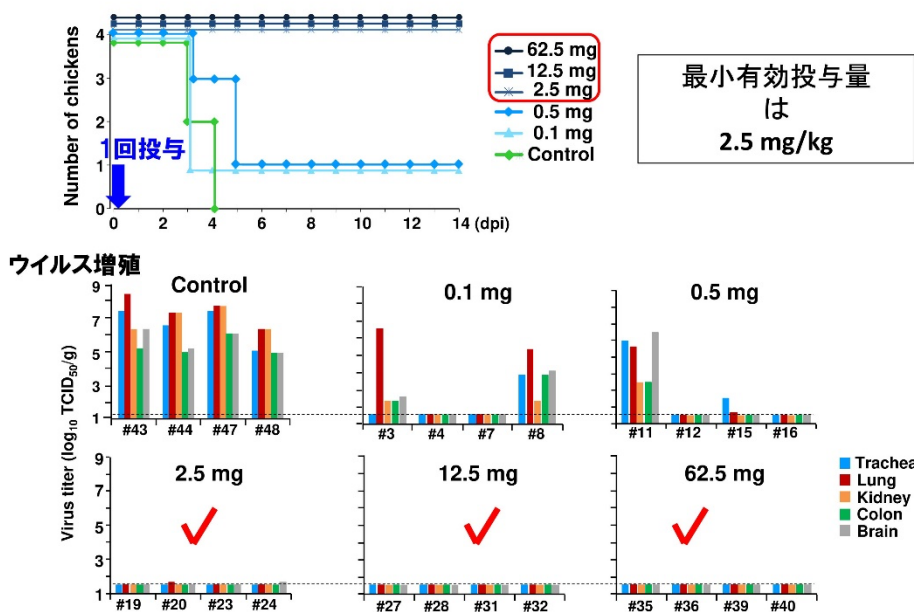
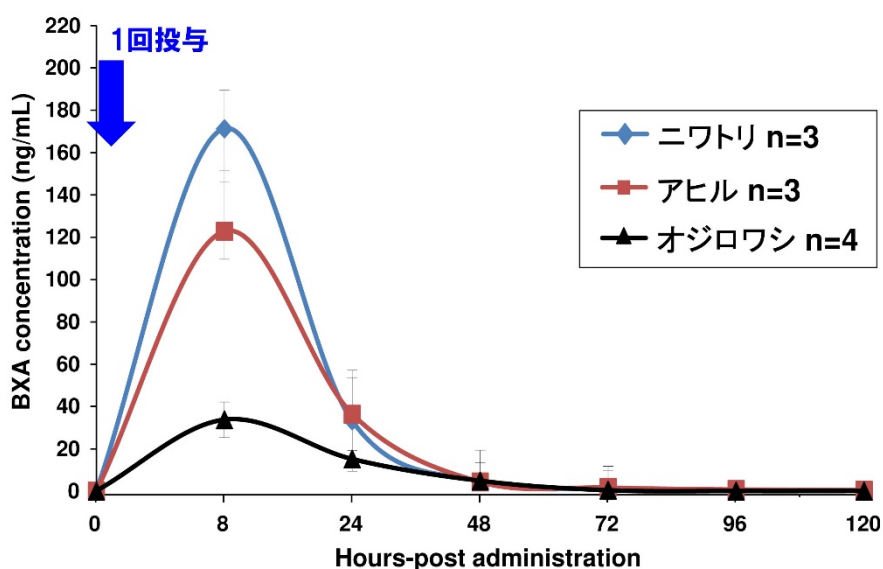


図2.9 同時投与試験でのバロキサビルマルボキシルの最小有効投与量
ニワトリの生死



前述の通り、バロキサビルマルボキシシルはプロドラッグであり、鳥種により活性体への代謝効率が異なる可能性がある。そこで、これまで試験に用いたニワトリに加え、野生カモのモデルとしてアヒル、また希少鳥類の例としてオジロワシに2.5 mg/kgのバロキサビルマルボキシシルを投与し、血液中のバロキサビルマルボキシシル活性体 (BXA) の濃度を経時的に測定した。その結果、活性体の最大血中濃度はニワトリ (170 ng/ml) に比べ、アヒルではその70%程度 (120 ng/ml)、またオジロワシではニワトリの20%程度 (34 ng/ml) と低かった (図2.10)。

図2.10 2.5 mg/kgのバロキサビルマルボキシシルを投与した各鳥群の血液中の抗ウイルス薬活性体 (BXA) の濃度



以上より、抗インフルエンザ薬の投与により希少鳥類を治療するための基盤的知見が得られた。そもそも感染症の治療は、ウイルスのその動物種における増殖力と、投与された抗ウイルス薬のウイルス増殖阻止能力のバランスで決まる。今回、モデル動物として使用したニワトリは、HPAIVが最も良く増殖する鳥種である。本来治療は、発症後に薬剤を投与し治癒を期待するものであるが、薬効の高いバロキサビルマルボキシシルを投与してもニワトリでは発症後投与では治療効果が認められなかった。しかし、カモやカラスなどの他の鳥種ではウイルスの増殖はニワトリのそれに比べ低いことがわかっている⁵⁾。このことは発症後の投与であっても抗インフルエンザ薬の治療効果が希少鳥類に対して期待できることを示唆している。今後、希少鳥類を用いた発症後投与の実験や現場での投薬による効果実証が求められる。また、同時投与の条件では、2.5 mg/kgの単回投与で完全な発病防止効果をニワトリに対して示した。このことは、飼育環境下で1羽の感染が確認された場合には、速やかに他の鳥に対しバロキサビルマルボキシシルの予防投与を行うことで感染による重症化防止を期待できることを示している。ただし成績の通り、バロキサビルマルボキシシル活性体の血液中濃度は鳥種や薬剤の投与方法（直接飲ませるか、餌の中に混ぜて食べさせるか）によって変わることが予想される。今後、薬剤の投与と血液中の抗ウイルス薬活性体の動態を調べる侵襲性の低い実験を様々な鳥種で継続し、治療法のマニュアル化を進める必要がある。

5. 研究目標の達成状況

当初掲げていた目標に沿って、分離ウイルスの遺伝子と抗原性の解析、これらの情報も含めた診断法の高度化、さらに希少鳥類の治療に関するコンセプトの確立など、予定通り十分な成果を得ることが

できた。なお、希少鳥類のHPAIVの感染予防および治療を目的とした抗インフルエンザ薬の投与後の鳥の体内での動態を明らかにする試験の一つとして、オジロワシへの抗インフルエンザ薬の投与および薬剤投与後の血液の採取を実施した。この作業については、猛禽類医学研究所に委託して実施することにより適切に実施することができた。

6. 引用文献

- 1) Antigenic Cartography, The Antigenic Cartography Group at the University of Cambridge, <http://www.antigenic-cartography.org/>, Webサイトアクセス日:2021年5月6日
- 2) L.T. Nguyen, K. Nakaishi, K. Motojima, A. Ohkawara, E. Minato, J. Maruyama, T. Hiono, K. Matsuno, M. Okamatsu, T. Kimura, A. Takada, H. Kida, Y. Sakoda: PLoS One, 12:e0182228 (2017), Rapid and broad detection of H5 hemagglutinin by an immunochromatographic kit using novel monoclonal antibody against highly pathogenic avian influenza virus belonging to the genetic clade 2.3.4.4.
- 3) R. Manzoor, Y. Sakoda, S. Sakabe, T. Mochizuki, Y. Namba, Y. Tsuda, H. Kida H: J. Vet. Med. Sci., 70:557-62 (2008), Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza.
- 4) T. Noshi, M. Kitano, K. Taniguchi, A. Yamamoto, S. Omoto, K. Baba, T. Hashimoto, K. Ishida, Y. Kushima, K. Hattori, M. Kawai, R. Yoshida, M. Kobayashi, T. Yoshinaga, A. Sato, M. Okamatsu, Y. Sakoda, H. Kida, T. Shishido, A. Naito: Antiviral Res., 160:109-117 (2018), In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit.
- 5) T. Hiono, M. Okamatsu, N. Yamamoto, K. Ogasawara, M. Endo, S. Kuribayashi, S. Shichinohe, Y. Motohashi, D.H. Chu, M. Suzuki, T. Ichikawa, T. Nishi, Y. Abe, K. Matsuno, K. Tanaka, T. Tanigawa, H. Kida, Y. Sakoda: Vet. Microbiol., 182:108-15 (2016), Experimental infection of highly and low pathogenic avian influenza viruses to chickens, ducks, tree sparrows, jungle crows, and black rats for the evaluation of their roles in virus transmission.

II-3 鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境清浄化技術の確立

国立大学法人鹿児島大学

共同獣医学部 獣医学科 病態予防獣医学講座 小澤 真・畑井 仁・正谷 達磨

<研究協力者>

国立大学法人鹿児島大学

共同獣医学部 獣医学科 病態予防獣医学講座 藤本 佳万

[要旨]

希少鳥類オジロワシの高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）に対する感受性や伝播リスクを評価するため、野生復帰が不可能な終生飼育個体3羽を用いてウイルス感染実験を実施した。オジロワシに経鼻感染させたHPAIVは、全身臓器で増殖し、口腔からは約1週間に渡って排泄され続けて、周囲の個体にも非接触的に伝播することが示唆された。今回の希少鳥類を用いた感染実験は、国内外を問わず前例のない貴重な実験データを提供しただけでなく、令和2年度に国内で初めて発見されたオジロワシ自然感染例の検査成績との比較・考察も可能となったことで、今後のオジロワシ保護対策を立案する上で非常に有益だった。

ウイルスの異鳥種間伝播に重要な役割を果たすと考えられる環境水の、安全かつ効果的な消毒・清浄化技術を検討した。先行研究で実験室環境における有効性が示されていた塩素消毒は、屋外環境試料を用いた検証実験では十分なウイルス不活化効果が確認できなかった。また畜産分野で使用されている消毒薬の多くも、有機物や低温によりウイルス不活化効果が容易に減弱した。一方、有機物存在下や低温条件下でも安定的な効果が確認できた消毒薬は、他の動植物に対する影響も強く、自然環境下での使用は現実的ではないことがわかった。本研究結果は、環境水の清浄化対策における薬剤使用の限界を示唆しており、薬剤使用に代わる新たなウイルス感染・蔓延防止対策の立案が喫緊の課題であることがわかった。

鹿児島県出水平野・ツル渡来地の環境水を検体として、効率的な鳥インフルエンザサーベイランス体制を確立し、多くのウイルス分離株の遺伝的性状を明らかにした。定点サーベイランスとしては世界的にも類を見ないほど数も種類も豊富なウイルス株を、3シーズン続けて分離することができた。確立されたサーベイランス体制を維持・活用することで、今後も新たなウイルス学的知見の蓄積が期待できる。

1. 研究開発目的

希少鳥類を対象としてHPAIVの接種試験を行い、その病態変化や各種スワブなどへのウイルス排泄量、ならびに全身臓器のウイルス学的・病理学的検査を行うことで、当該鳥種のウイルスに対する感受性や伝播能力等を解析する。また、希少鳥類へのウイルスの感染源となりうる環境水を検体として、人為的にウイルスを混入し、検体中のウイルスを不活化する安全かつ効果的な消毒方法を検討する。さらに、3年間の研究期間全体を通じて出水平野における鳥インフルエンザサーベイランスを実施し、ウイルス分離株の遺伝的性状を解析する。

2. 研究目標

(1) 希少鳥類の減少リスク評価

- ・絶滅危惧種オジロワシのHPAIVに対する感受性や伝播能力等を、猛禽類医学研究所で保護されている野生復帰が不可能な終生飼育個体3羽を用いたウイルス感染実験を通じて明らかにする。

(2) 生息環境清浄化技術の確立

- ・環境水に含まれる鳥インフルエンザウイルスの効果的な消毒方法を確立するため、有機物が混入しても消毒効果が減弱しにくいアルデヒド系・フェノール系を中心とした7種類の動物用消毒薬と、高病原性株を含む5株の鳥インフルエンザウイルスを用いて、有機物存在下および低温下における消毒効果を検証する。

(3) 鳥インフルエンザサーベイランス

- ・鹿児島県出水平野のツルねぐら水等から分離された鳥インフルエンザウイルス株（平成30年度39株・令和元年度23株）の遺伝的性状を解明する。

3. 研究開発内容

(1) 希少鳥類の減少リスク評価

申請当初の研究計画に沿って、HPAIVの感染実験に用いる希少鳥類の評価・選定を進め、最終的に絶滅危惧Ⅱ類（環境省第4次レッドリスト）に分類されるオジロワシ (*Haliaeetus albicilla*) を選出した。ウイルス接種実験に先立ち、環境省への『大学における教育又は学術研究のための希少野生動植物種譲受け等届出（通知）書』の提出や、文化庁への『天然記念物「オジロワシ」の現状変更許可申請書』の提出ならびに同庁からの許可証（令和2年7月17日・2受文庁第4号の601）の発行、札幌市からの『特定動物飼養・保管許可証』（令和2年9月8日・札幌動セ許可第392号）の発行等の書類手続きを完了した。

感染実験には、猛禽類医学研究所（釧路市）において保護・飼育されていたオジロワシのうち、野生復帰が不可能な終生飼育個体3羽を用いた。これら3羽は、令和2年9月14日に猛禽類医学研究所から北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター（札幌市）へ陸路で搬送し、同センター内にあるバイオセーフティーレベル3対応の動物実験施設において、大型犬用の飼育ケージで飼育した（図3.1）。

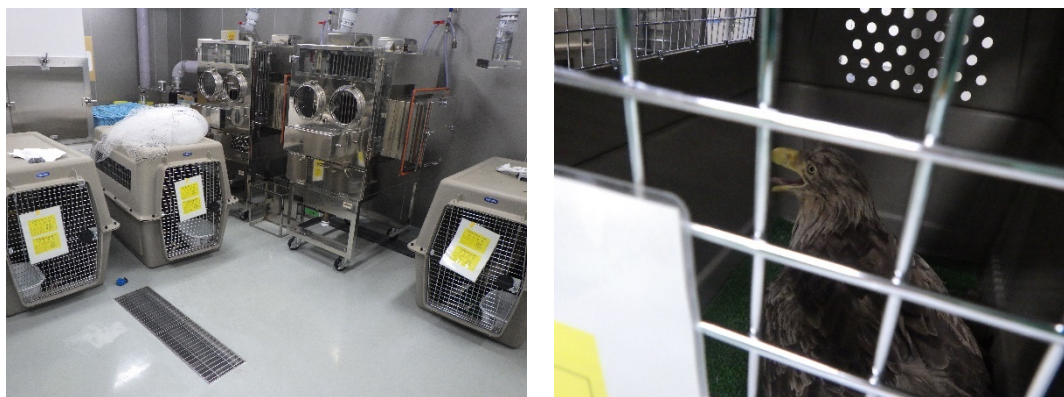


図3.1 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・動物実験施設におけるオジロワシの飼育

感染実験の開始前に同施設内で3日間飼育することで飼育環境に馴化させた後、3羽のうち2羽（個体AおよびB）に高力価（ $10^{7.3}$ EID₅₀、鶏致死量の1,000倍に相当）のHPAIVであるA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)株を経鼻接種した（図3.2）。残り1羽（個体C）は、ウイルス接種個体からの非接触的なウイルス伝播の有無を検証するため、ウイルス非接種のままウイルス接種個体Bの飼育ケージと隣り合わせで飼育した（図3.3）。

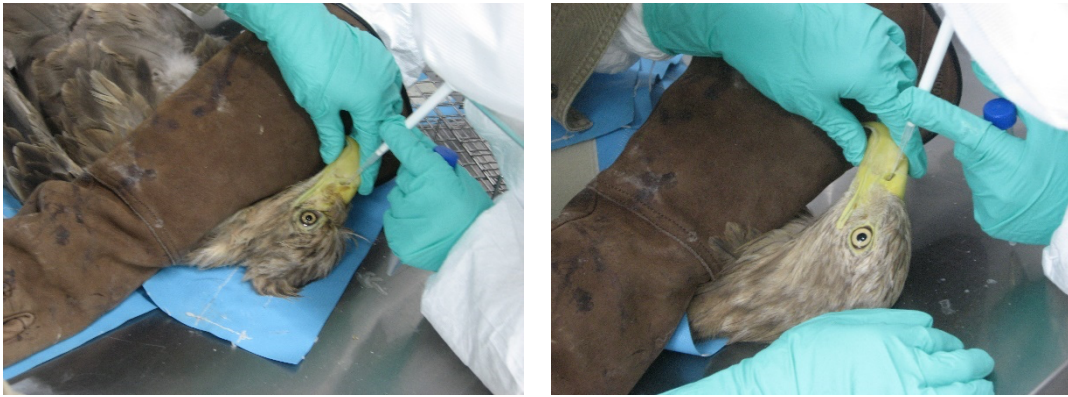


図3.2 オジロワシ2個体に対するウイルス経鼻接種の様子



図3.3 ウイルス接種個体Bと非接種個体Cの飼育状況
ケージ下部側面は格子状(赤丸)で飛沫は往来可能

接種個体におけるウイルスの体内動態を調べるため、個体AおよびBは接種後3日目と8日目にそれぞれ安楽死させ、ウイルス力価測定ならびに病理学的検索のために全身臓器を採材・保存した(図3.4)。接種後7日目時点で3個体のいずれにも症状は認められず、経鼻接種によるウイルス感染の成立に疑義が生じたことから、ウイルス非接種個体Cには同居7日目に高力価 ($10^{7.3}$ EID₅₀、鶏致死量の1,000倍に相当) のA/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)株を静脈内接種し、接種後3日目に安楽死させて全身臓器を採材・保存した(図3.4)。また各個体の生存期間を通じて、結膜・口咽頭・クロアカの各スワブ、ならびに羽毛を毎日採取・保存したほか、体重と体温も日々記録し、ウイルス接種直前、および接種後3日目と6日目には採血も行った。

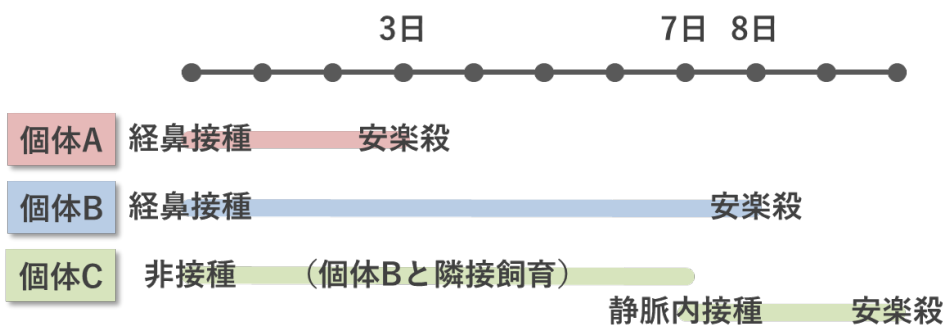


図3.4 ウイルス感染実験スケジュールの概要

(2) 生息環境浄化技術の確立

①塩素消毒試験

鹿児島県出水平野のツル渡来地に整備・設置された「ツルのねぐら」から環境水検体を採取し、生息環境浄化技術を検討するためのモデル試料とした。この水検体（および対照試料となる蒸留水）へ、これまでに環境水から分離されてきた4種類のAIV（表3.1）をそれぞれ混入して、AIVに汚染された環境水試料を調整した。

表3.1 塩素消毒試験に用いたウイルス株

ウイルス株名	法令上の分類
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)	鳥インフルエンザウイルス
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-C/2018 (H4N6)	
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-I/2016 (H5N6)	高病原性鳥インフルエンザウイルス
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-H/2014 (H5N8)	

これらのウイルス汚染環境水試料を、先行研究¹⁾においてHPAIVに対する高い消毒効果が示された条件（濃度、反応時間等）の塩素で処理し、試料中に生残した感染性ウイルスの力価を測定した。なお、これまでの国内野鳥における高病原性鳥インフルエンザの発生は冬季に集中していることから、冬季の野外環境における実践を想定し、ウイルスの塩素消毒は4℃条件下で実施した。

②消毒効果安定性試験

冬季の野外における効果的な生息環境浄化技術を検討するため、畜産分野で使用が認められている消毒薬のうち、有機物存在下や低温条件下でも高い消毒効果を発揮するとされるアルデヒド系およびフェノール系薬剤を中心に試験消毒薬を選定し（表3.2）、種々の鳥インフルエンザウイルス分離株（表3.3）に対する不活化効果を、有機物存在下および低温条件下における安定性を評価指標として検証した。

表3.2 消毒効果安定性試験に用いた消毒薬

分類	商品名 (メーカー名)	有効成分
塩素系	A	ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム
	B	ペルオキソ一硫化水素カリウム/塩化ナトリウム
アルデヒド系	C	グルタルアルデヒド
フェノール系	D	オルトジクロロベンゼン/キノメチオネート
	E	オルトジクロロベンゼン/クレゾール
	F	オルトジクロロベンゼン/ 塩化ジデシルジメチルアモニウム/クロルクレゾール
	G	オルトジクロロベンゼン/ クロルオルトフェニルフェノール/クレゾール

表3.3 消毒効果安定性試験に用いたウイルス株

ウイルス株名	法令上の分類
--------	--------

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)	鳥インフルエンザウイルス
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-C/2018 (H4N6)	
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-I/2014 (H6N2)	
A/duck/Kagoshima/KU-57/2015 (H11N9)	
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-H4/2018 (H7N9)	低病原性鳥インフルエンザウイルス
A/environment/Kagoshima/KU-ngr-B1/2020 (H5N8)	高病原性鳥インフルエンザウイルス

あらかじめ、各消毒薬が培養細胞（A型インフルエンザ研究で汎用されるイヌ腎臓由来MDCK細胞）に対して毒性を示さなくなる限界希釈濃度を求めた。各消毒薬について、求めた限界希釈濃度のちょうど100倍濃いものから順に2倍階段希釈列を作成し、一定力価（10,000TCID₅₀）の各ウイルス株と混和して1時間静置することで、消毒薬によるウイルスの不活化作用を促した。この際、ウイルス液を調整する培地（有機物を含まない基礎培地vs. 有機物として10%ウシ血清を含む培地）および静置時の温度（室温vs. 4℃）によって、4つの異なる作用条件を設定した。作用後の消毒薬-ウイルス混合液を100倍に希釈し、これを培養細胞へ接種してウイルス感染による細胞変性効果の有無を観察することで、各消毒薬が異なる作用条件下で示すウイルス不活化効果の強さを、希釈倍率の高さで評価・比較した。

（3）鳥インフルエンザサーベイランス

鹿児島県出水平野の「ツルのねぐら」から環境水検体を定期的に採取し、発育鶏卵を用いてウイルス分離を実施することで、同地における鳥インフルエンザサーベイランスを3年間（平成30年度～令和2年度）実施した。鹿児島県ツル保護会の協力のもと、荒崎地区および東干拓地区（図3.5）に設置された2カ所の「ツルのねぐら」の計14地点より、環境水検体（1つの採水地点あたり約50ml程度）を11月上旬から2月中旬まで毎週採取して、冷蔵便で鹿児島大学へ搬送した。

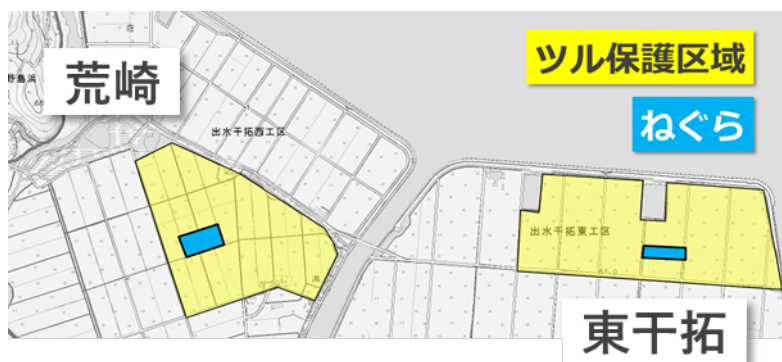


図3.5 環境水検体を採材した2カ所の「ツルのねぐら」の位置関係

採取翌日に鹿児島大学へ届けられた環境水検体は、以下の手順で処理してウイルス分離に供した。

1. 環境水検体を100μmメッシュフィルターでろ過し、大きな砂等を取り除いた。
2. 10倍濃度のPBS溶液5mlと環境水検体45mlを混和して、浸透圧を調整した。
3. PBSで洗浄した鶏赤血球100μlを浸透圧調整済み水検体へ加えて懸濁し、氷上で1時間静置した。
4. 遠心分離により鶏赤血球を集め、約10日齢の発育鶏卵（1つの水検体あたり2～4個）へ接種した。
5. 接種した発育鶏卵を37℃で2日間培養し、漿尿液を回収した。
6. 0.5%鶏赤血球を用いた赤血球凝集試験により、漿尿液の赤血球凝集活性を調べた。
7. 赤血球凝集活性陽性漿尿液からRNAを抽出し、A型インフルエンザウイルス遺伝子を検査した。
8. 同ウイルス遺伝子陽性RNAは、さらなる遺伝子解析を行ってHAおよびNA亜型を決定した。

4. 結果及び考察

（1）希少鳥類の減少リスク評価

ウイルス感染実験の期間を通じて、発熱や体重低下（図3.6）を含め、3羽のオジロワシに明らかな健康異常は見られなかった。

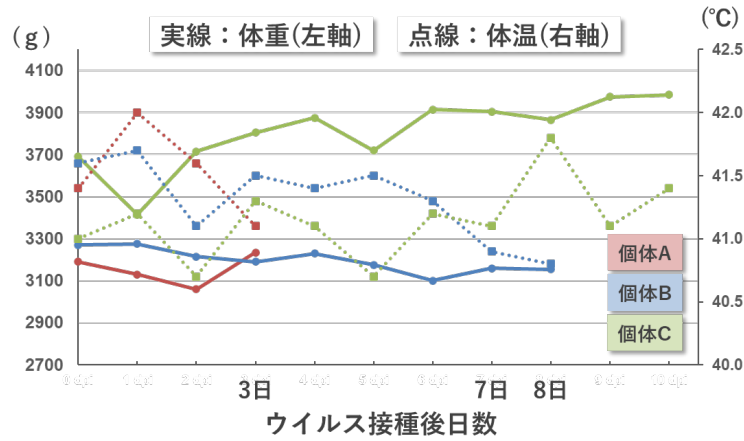


図3.6 オジロワシ3羽の体重および体温の推移

ウイルスを経鼻接種した個体AおよびBの口咽頭スワブからは、高力価の感染性ウイルスが比較的長期間に渡って検出された（図3.7）。一方、クロアカスワブへのウイルス排泄は量も期間も限定的で、結膜スワブからはウイルスが検出されなかった。また、ウイルス非接種個体Cの口咽頭スワブからも、同居後6日目と7日目に高力価の感染性ウイルスが検出された。一方、各個体から採取した羽毛や血液からは、感染性ウイルスが検出されなかった。

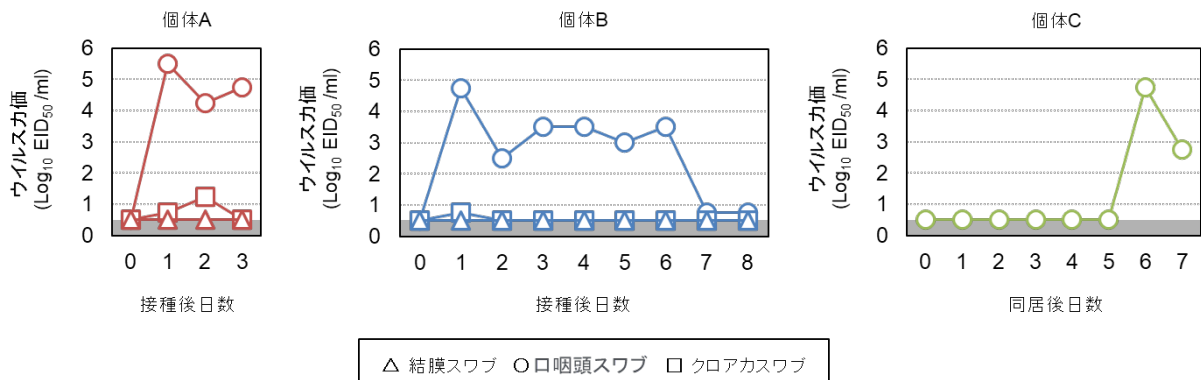


図3.7 オジロワシ3羽の体重および体温の推移

ウイルスを経鼻接種した個体AおよびBの様々な臓器から、感染性ウイルスが検出された（図3.8）。ウイルス接種後8日目に安楽死させた個体Bにおいて、心臓や肝臓、膵臓等、呼吸器や消化器に隣接していない臓器から比較的高力価（ 10^4 EID₅₀程度）のウイルスが検出されたことから、経鼻接種したウイルスがオジロワシ体内全体で増殖し、1週間以上排除されることなく残存したことがわかった。ウイルスを静脈内接種した個体Cにおいても、接種後3日目の全身臓器からウイルスが検出されたが、個体AならびにBと同様、小脳や大脳からはウイルスが検出されなかった。一方、全3羽の病理学的検索において、肉眼あるいは細胞レベルの病変は観察されず、3羽のオジロワシの臨床症状一明らかな健康異常なしと一致した。

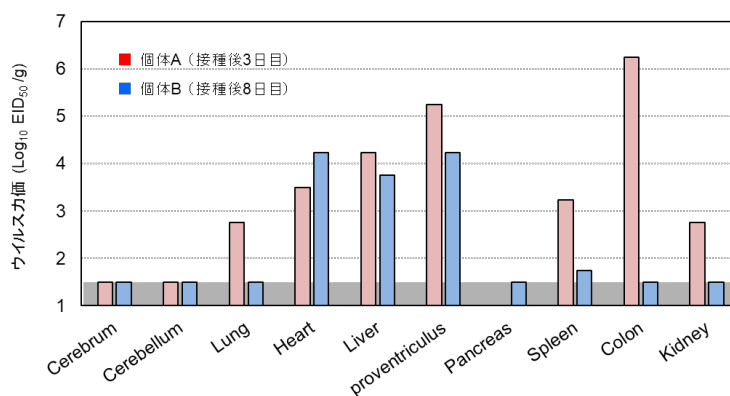


図3.8 オジロワシ個体AおよびBの各臓器におけるウイルス力価

これらの実験結果から、オジロワシに経鼻感染したHPAIVは中枢神経系を除く全身臓器で増殖して、約1週間に渡って口腔から排泄され続け、周囲の個体にも非接触的に伝播することが示唆された。今回の感染実験に使用したオジロワシ個体3羽は、いずれもウイルス感染実験の期間を通じて明らかな健康異常を示さなかったが、平成28年度にはドイツで集団感染・死亡事例が報告され²⁾、さらに令和2年度には旭川市でもウイルス感染衰弱個体（その後死亡）が発見されている。これら実験感染例と自然感染例の結果の不一致には、以下のような要因が影響している可能性があり、今後の検討が必要である。

- ①ウイルス株ごとのオジロワシに対する病原性の差異が大きい。
- ②オジロワシ個体ごとのウイルスに対する感受性や抵抗性の差異（個体差）が大きい。
- ③自然感染例の発症には、ウイルス以外の副次的な要因が作用する。
- ④感染ルート（経鼻感染vs. 経口感染）による病原性の差異が大きい。

（2）生息環境浄化技術の確立

①塩素消毒試験

鳥インフルエンザウイルスA/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)株を混入した蒸留水ならびに環境水試料を用いて、塩素処理時間が試料中の遊離塩素濃度ならびにウイルス力価に与える影響を検討した。試料中の遊離塩素濃度が、先行研究¹⁾で有効性が確認されている濃度（0.52～1.08 mg/L）と同程度となるように次亜塩素酸カルシウムを加え、遊離塩素濃度ならびに感染性ウイルス力価の測定を実施した（表3.4）。

表3.4 A/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)株を用いた塩素消毒試験の結果

塩素処理時間	蒸留水試料の：		環境水試料の：	
	遊離塩素濃度 (mg/L)	ウイルス力価 (TCID ₅₀ /mL)	遊離塩素濃度 (mg/L)	ウイルス力価 (TCID ₅₀ /mL)
無処理	0	1.08×10^6	0	1.58×10^6
1分	0.65	2.94×10^5	0.19	1.08×10^6
10分	0.65	1.08×10^5	0.15	5.00×10^5
60分	0.64	2.94×10^4	0.14	2.94×10^5

有機物の混入がない蒸留水試料において、遊離塩素濃度は60分間高値を維持したが、ウイルス力価は1/50程度までしか減弱しなかった。また、泥等の環境中の有機物が混入した環境水試料では、遊離塩素濃度が素早く減弱し、感染性ウイルス力価の変動もわずか（1/5程度まで減弱）だった。残り3種類の試験ウイルス株の塩素処理についても同様の結果で、環境水試料中の感染性ウイルス力価が1/10以下に減弱することはなかった。以上の結果から、環境中の鳥インフルエンザウイルスに対する塩素消毒の不活化効果は限定的と考えられた。

②消毒効果安定性試験

7種類の試験消毒薬について、A/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)株に対する不活化効果を評価した結果、フェノール系消毒薬Eのみが、有機物存在下および低温条件下において安定したウイルス不活化効果を示した(図3.9)。低病原性およびHPAIVを含む他の6株の試験ウイルスに対して、当該消毒薬は「安定的なウイルス不活化効果」を示した。以上の結果から、消毒薬Eは環境中のウイルスに対して高い消毒効果が期待できると結論付けた。

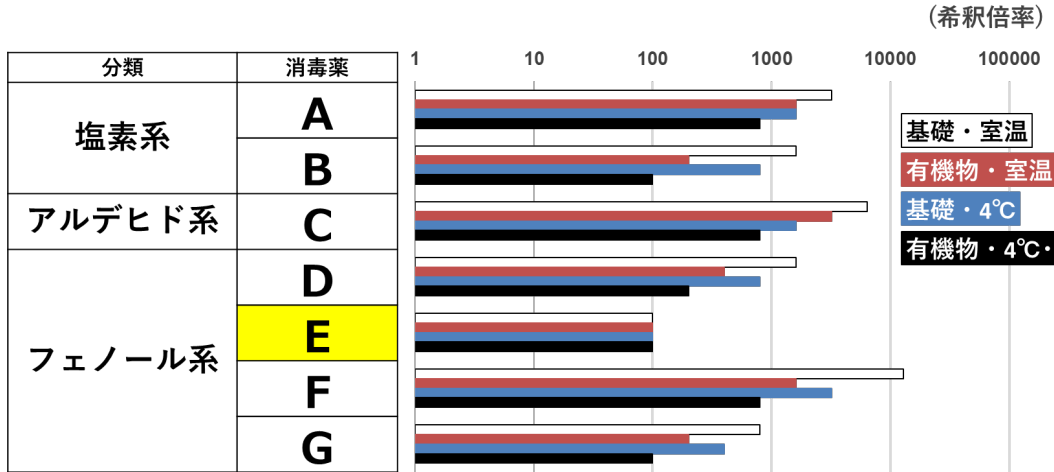


図3.9 各条件下において試験消毒薬がウイルス不活化効果を示した最大希釈倍率

そこで消毒薬Eを製造・販売しているメーカーへ環境に対する影響等について問い合わせたところ、「動物園のような排水の処理・管理が可能な閉鎖環境であれば問題ないが、野鳥渡来地のような開放環境では他の動植物に対する影響を制御できないため、科学的にも法律的にも使用は難しい。」との回答を受けた。したがって、野鳥生息環境におけるウイルスの清浄化については、畜産用消毒薬の代わる別の方法を検討する必要があることがわかった。

(3) 鳥インフルエンザサーベイランス

鹿児島県出水平野の「ツルのねぐら」の環境水検体は、本事業の開始前から同地における鳥インフルエンザサーベイランスの検査対象としていたが、1シーズンに10株以上のウイルスが分離されたことはなかった(図3.10)。ところが、平成30年度の本事業のサブテーマ1「鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価」の取り組みの中で、環境水からの効率的インフルエンザウイルス分離法の検討が進められ、その成果の一部を応用してウイルス分離方法を改良した結果、翌シーズン以降のウイルス分離株数は飛躍的に増加した。とりわけ、全国的に高病原性鳥インフルエンザの発生報告が相次いだ令和2年度には、176株もの鳥インフルエンザウイルスが分離された(図3.10)。

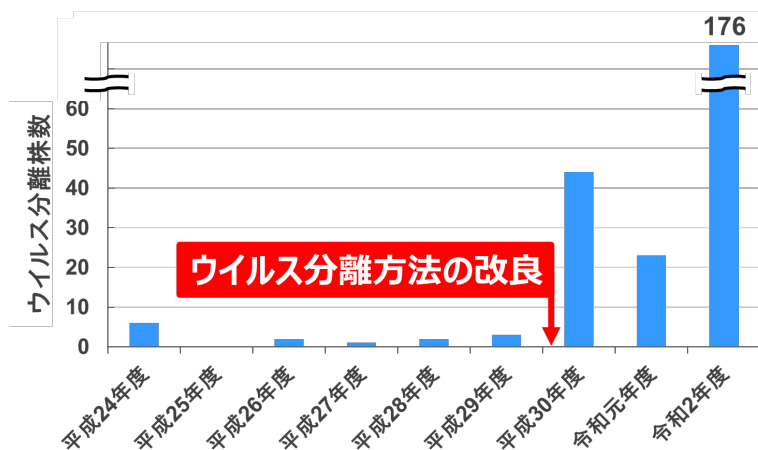


図3.10 「ツルのねぐら」ウイルス分離株数のシーズンごとの推移

平成30年度は、1つの水検体あたり2個の発育鶏卵を使ってウイルス分離を試みていたが、複数の亜型ウイルスが混ざった「混合」状態で分離されるウイルス株数が全体の25%（11/44株）を占めた（表3.5）。この結果は、単一亜型のウイルスが分離されやすい糞便検体や感染鳥スワブ検体と異なり、環境水検体には亜型の異なる複数のウイルス株が混在しやすいことを反映している。「混合」状態で分離されたウイルスは遺伝的特性の解明が困難なため、可能な限り回避する必要がある。そこで令和元年度は、ウイルス分離に用いる発育鶏卵の数を倍増させた。その結果、すべての分離ウイルスが単一亜型を示した。しかし、引き続き1つの水検体あたり4個の発育鶏卵を使ってウイルス分離を試みた令和2年度は、約61.9%（109/176株）のウイルスが「混合」状態で分離されてしまった。令和2年度は、国内外で多数の高病原性鳥インフルエンザの発生が報告され、環境中に多数のH5N8亜型ウイルスが流行していたものと推察されている。今回の結果は、H5N8亜型ウイルスだけでなく、他の亜型のウイルスも例年以上に大流行していたことを示唆している。なお、来シーズン以降のウイルス分離に用いる発育鶏卵の個数については、あらためて検討が必要と考えられた。

表3.5 「ツルのねぐら」ウイルス分離株の亜型の推移

平成30年度		令和元年度		令和2年度	
亜型	株数	亜型	株数	亜型	株数
H4N6	19	H6N6	9	H5N8	43
H4N1	6	H3N8	7	H3N8	6
H4N2	3	H4N6	4	H3N2	5
H6N2	2	H1N1	1	H6N6	5
H1N6	1	H3N2	1	H3N6	4
H3N2	1	H11N2	1	H1N1	2
H7N9	1			H1N2	1
混合	11			H4N6	1
				混合	109
合計	44	合計	23	合計	176

定期的な定点サーベイランスポイントで採取される環境水検体から、多数のウイルスを効率的に分離できるようになったことで、ウイルスの流行状況の変遷も可視化された。毎週のウイルス分離株数をシーズンごとに並べて比較した結果、平成30年度および令和元年度が年末までに流行のピークを迎えた一方で、令和2年度は流行が長期化しただけでなく、年明けに2つ目のピークが見られた（図3.11）。今後も同地でサーベイランスを継続することにより、自然界における鳥インフルエンザウイルスの流行動態に関して、新たなウイルス学的知見の蓄積も期待できる。同地のような条件が揃う冬鳥越冬地は、野鳥における鳥インフルエンザの流行状況を監視する上で非常に有用なため、国内外で候補地の探索を進め、新たなサーベイランス体制を構築すべきと考えられる。

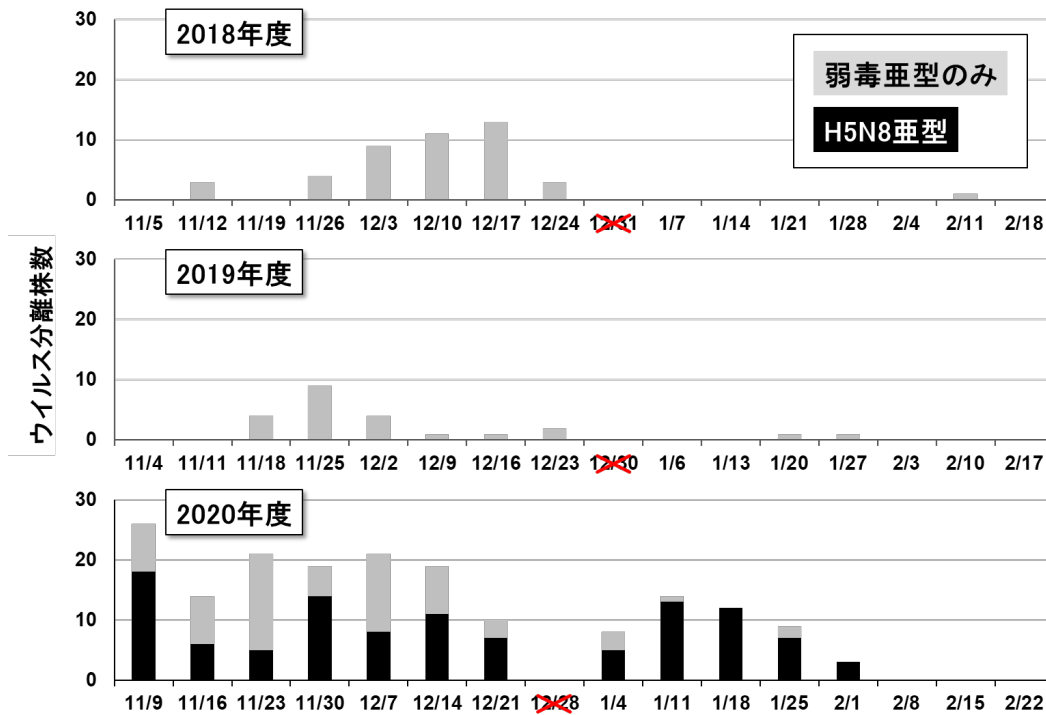


図3.11 「ツルのねぐら」ウイルス分離株数の週ごとの推移

(赤字の週は採材を実施していない。H5N8亜型は弱毒亜型と混合して検出された株も含む。)

5. 研究目標の達成状況

希少鳥類オジロワシの野生復帰が不可能な終生飼育個体3羽に対するHPAIVの感染実験を実施し、同鳥種のウイルス感受性や排泄部位・期間等を明らかにした。国内外を問わず前例のない貴重な実験データを提供しただけでなく、令和2年度に国内で初めて発見されたオジロワシ自然感染例の検査成績との比較・考察も可能となったことで、今後のオジロワシ保護対策を立案する上で非常に有益だった。

環境中のウイルスを清浄化するには強力な消毒薬が必要となり、他の動植物に対する影響も勘案すると、薬剤を用いた対策は現実的ではないことがわかった。本研究結果は、環境水の清浄化対策における薬剤使用の限界を示唆しており、薬剤使用に代わる新たなウイルス感染・蔓延防止対策の立案が喫緊の課題であることがわかった。

冬鳥越冬地の環境水を検体とする効率的な鳥インフルエンザサーベイランス体制を確立し、多くのウイルス分離株の遺伝的性状が明らかにした。定点サーベイランスとしては世界的にも類を見ないほど数も種類も豊富なウイルス株を、3シーズン続けて分離することができた。確立されたサーベイランス体制を維持・活用することで、国内侵入AIVの検知や遺伝的特性解明のこれまで以上の迅速化および効率化、HPAIVが侵入・流行しやすい時期やシーズンの特徴付け、自然界におけるHPAIVの流行抑制方法の開発やその検証など、新たなウイルス学的知見の蓄積が期待できる。

6. 引用文献

- 1) E. W. Rice, N. J. Adcock, M. Sivaganesan, J. D. Brown, D. E. Stallknecht, D. E. Swayne: *Emerg. Infect. Dis.*, 13(10):1568-70 (2007), Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1).
- 2) O. Krone, A. Globig, R. Ulrich, T. Harder, J. Schinköthe, C. Herrmann, S. Gerst, F. J. Conraths, M. Beer: *Viruses* 10(9):478 (2019), White-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) die-off due to infection with highly pathogenic avian influenza virus, subtype H5N8, in Germany.

II-4 培養細胞を用いた非侵襲的手法による希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染に対する感受性評価法の確立

国立研究開発法人国立環境研究所

生物多様性領域 生態リスク評価・対策研究室

大沼 学

[要旨]

11種（カワラバト、ニワトリ、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシ、マナヅル、ナベヅル、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ）の培養細胞を用いて高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）の感染実験を実施した。ウイルス株は NA 亜型のバリエーションおよびニワトリ個体における病原性の報告がある点を考慮し、A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1)、A/black swan Akita/1/2016 (H5N6) および A/chicken/Kumamoto/1-7/2014 (H5N8) の3株を用いた。感染実験はウイルスを1h感作させた後にPBSで洗浄、血清添加 KAV-1 培地で培養し、6h、12h で細胞を回収した。回収した細胞から RNA を抽出し、その RNA から cDNA を合成した。この cDNA を用いて Mx 遺伝子の発現量を経時的に測定した。遺伝子の発現量を測定した結果、抵抗性の鳥類とされるカワラバトの Mx 遺伝子発現は、時間経過に伴って発現量が20倍以上に増加することが観察された。一方、死亡率が高いニワトリの Mx 遺伝子発現は、時間経過に伴って減少する、あるいは増加しても4倍程度あることが分かった。また、死亡率既知のモデル鳥類であるニワトリ（高死亡率）の Mx 遺伝子発現パターンと猛禽類4種（クマタカ、イヌワシ、オオタカ、ハヤブサ）およびヤンバルクイナの発現パターンが類似していることを確認した。他種の猛禽類の生体における感染実験では、個体の死亡あるいは重度の神経症状が確認されている。これらの結果から、猛禽類の細胞では、Mx 遺伝子の発現を含む自然免疫系の反応が、HPAIV 感染時に抑制されることが示唆された。また、HPAIV に対する生体レベルでの反応を細胞レベルでの反応からある程度予測できる可能性が示された。今後は、この鳥類種差のメカニズムを、網羅的な遺伝子発現解析等によって解明する必要がある。

1. 研究開発目的

本サブテーマでは希少鳥類の培養細胞を活用して、HPAIV の病原性を評価する方法を開発する。特に、抗ウイルス作用のある Mx 遺伝子の発現パターンに注目する。各種鳥類に対する HPAIV の病原性を評価するためには、基本的に生体感染実験を実施する必要がある。しかし、国内に分布する鳥類を対象とする生体感染実験結果の情報は限られており、特に希少鳥類を使用した生体感染実験は全く行われていない。そのため、HPAIV が希少鳥類の個体数に与える影響を評価することは不可能である。

2. 研究目標

- ・生体感染実験の代替法として、培養細胞での感染実験による HPAIV の病原性評価法を確立する。
- ・評価指標は、抗ウイルス作用のある遺伝子の発現パターンとし、死亡率が高い鳥類種の遺伝子発現パターンの特徴を持つ希少鳥類種が存在するのかわかる。この評価法を希少鳥類8種程度に適用する。

3. 研究開発内容

(1) 感染実験対象鳥類の選定

生体感染実験に関する情報の有無、これまでの感染事例および保全上の重要度を考慮し、14種を実験対象種とした。対象とした鳥類種は以下のとおりである（図4.1）。

「感染実験によって死亡率が既知の鳥類（モデル鳥類）」

カワラバト、マガモ、ハシブトガラス、オオハクチョウ、ニワトリ

「国内で死亡個体から HPAIV が分離された希少鳥類」

クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、マナヅル、ナベヅル

「飼育下繁殖が実施されている希少鳥類」

イヌワシ、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ

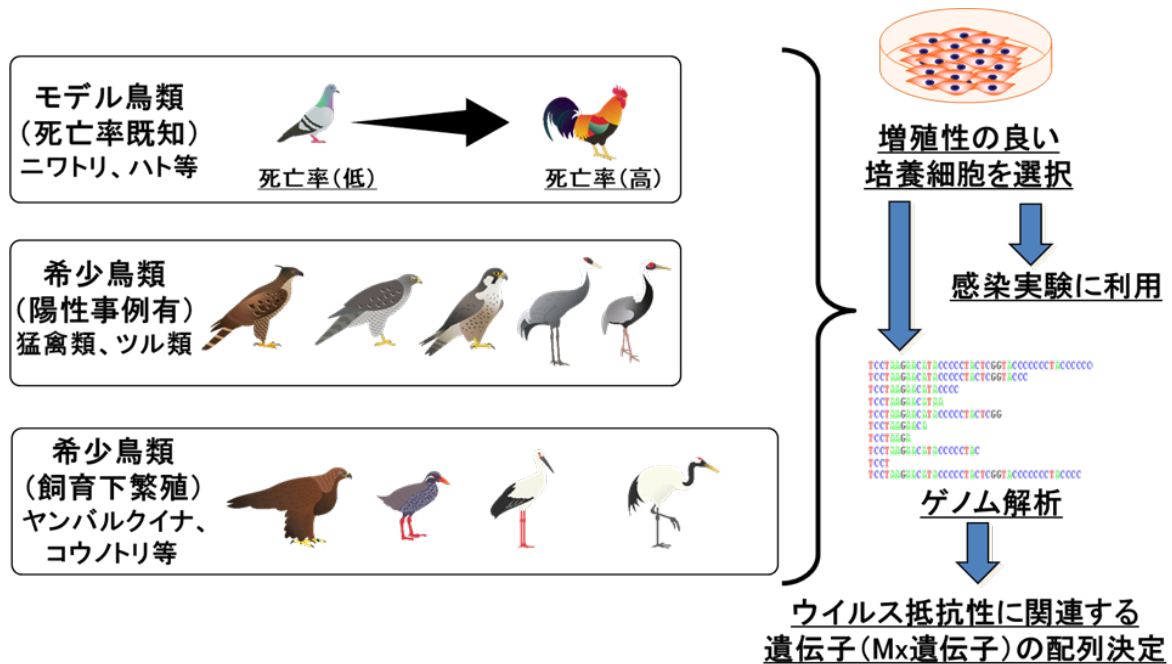


図 4.1 感染実験の対象となる鳥類種と選定基準となった背景情報

(2) 感染実験用培養細胞の選定

感染実験用の培養細胞は、国立環境研究所・環境試料タイムカプセル棟で凍結保存中のものより選定を行った。上記14種について、凍結保存前の培養記録を見直し、継代回数、細胞形態、細胞数、マイコプラズマ検査結果等を確認し、候補となる凍結培養細胞を選定した。次に、候補とした凍結培養細胞を再融解し、培養を行った。培養は、38℃、大気分圧下で、培養液に KAV-1¹⁾ を使用して行った。

(3) ゲノム解析

対象種の14種についてゲノム情報の登録状況を確認したところ、14種中7種(カワラバト、マガモ、ニワトリ、イヌワシ、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ)についてはゲノム情報が登録されていることを確認した。そのため、登録情報のない7種(ハシブトガラス、オオハクチョウ、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、マナヅル、ナベヅル)について、ゲノム解析を実施した。ゲノム解析用のDNAは(2)で培養した細胞の一部から抽出した。トリプシン処理によって回収した培養細胞を Proteinase K solution 20μl、BufferG2 (QIAGEN) 500μl を 1.5ml チューブ内で混合し、56℃ で一昼夜インキュベートした。細胞の溶解を確認後、500μl の PCI (フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールの混合液) を細胞溶解液に加え転倒混和した。転倒混和後、11,000 x g、15 分間、4℃ で遠心し上層の水層を回収した(この作業を2回行った)。次に水層と等量のクロロホルムを加え転倒混和後、11,000 x g、5 分間、4℃ で遠心した。上層の水層回収し、等量のイソプロパノールを加え、DNA を沈殿させた。沈殿した DNA を回収し 70% エタノール 1 ml で 2 回洗浄した。DNA を室温中で 30 分乾燥させたあと 20 ml の TE に溶解した。この DNA から、HiSeq X (Illumina) を利用して配列情報を取得した。取得した配列を、Genomic Workbench ver11.02 (CLC bio) でアセンブル(配列の結合作業)を行った。

(4) Mx 遺伝子の全長配列決定、リアルタイム PCR 用プライマーの設計およびコントロール用プラスミドの作製

対象 14 種の細胞を培養する際、培地に Poly(I:C) を $50 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、Mx 遺伝子を強制的に発現させた。Poly(I:C) 処理後の細胞から total RNA を抽出し、SMARTer® RACE 5' /3' Kit (Clontech) による 5' RACE および 3' RACE によって Mx 遺伝子の 5' 末端および 3' 末端の配列を決定した。コウノトリ、イヌワシ、ヤンバルクイナについては、ゲノム配列から、Mx 遺伝子の 5' 末端および 3' 末端の配列を決定した。RACE あるいはゲノム情報によって得られた Mx 遺伝子の 5' 末端および 3' 末端の配列をもとに、それぞれの種について Mx 遺伝子の全長増幅用プライマーを設計した。

各鳥類の Mx 遺伝子の全長配列を決定するため、Poly(I:C) 処理後の細胞から抽出した total RNA と設計した各種特異的プライマーを利用して 2Step RT-PCR を実施した。cDNA の合成には PrimeScript RT Master Mix (TAKARA) を使用した。PCR 反応液は KOD-Plus-Ver. 2 (東洋紡) を使用した。また、シーケンスは、BigDye Terminator Ver. 3 と 3130 シリーズジェネティックアナライザー (ThermoFisher Scientific) を使用した。決定した配列をもとにして、各鳥類のリアルタイム PCR 用のプライマーを設計した。また、TOPO Cloning Kit (Thermo Fisher) あるいは pGEM®-T Easy Vector Systems

(Promega) を用いて各鳥類の Mx 遺伝子をクローニングし、このプラスミドをリアルタイム PCR 用のコントロールに使用した。

(5) GAPDH 遺伝子のリアルタイム PCR 用プライマーの設計およびコントロール用プラスミドの作製

内在性コントロールとして使用するために各鳥類の GAPDH 遺伝子のクローニングを行った。Poly(I:C) 処理を実施した培養細胞から total RNA を抽出し cDNA を合成した。cDNA の合成には PrimeScript RT Master Mix (TAKARA) を使用した。GAPDH 遺伝子の各種特異的 primer (ゲノム配列をもとに設計) を用いて EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa) で対象領域を増幅した。その後、TOPO Cloning Kit (Thermo Fisher) を用いて各鳥類の GAPDH 遺伝子のクローニングを行い、このプラスミドをリアルタイム PCR 用のコントロールに使用した。

(6) 感染実験用ウイルス株の選定

ウイルス株は NA 亜型のバリエーションおよびニワトリ個体における病原性の報告がある点を考慮し以下の 3 種を感染実験に使用した。

A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1)

A/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)

A/chicken/Kumamoto/1-7/2014 (H5N8)

(7) 培養細胞を用いた in vitro 感染実験

培養細胞を用いた in vitro 感染実験の概要を図 4.2 に示した。培養細胞を 6 穴プレートにまき、細胞が増殖しプレートの 8 割以上を占めた状態で試験を開始した。開始時点を 0h として細胞数をカウントし、そのカウントした細胞数をもとに感染ウイルス量を決定した。感染ウイルス量は 3 種類とも multiplicity of infection (MOI) 0.1 とした。ウイルス液を希釈するさいには、血清無添加 KAV-1 培地を用いた。血清無添加 KAV-1 培地で希釈した MOI 0.1 のウイルスを各鳥類の培養細胞に 1 時間感作させた。ウイルス感作中の培養は 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で実施した。その後、ウイルス液を除去し、PBS で培養細胞を洗浄した。次に、血清添加 KAV-1 培地を添加し細胞の培養を再開した。培養条件は 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ とした。血清添加 KAV-1 培地で培養を再開してから、6 時間後、12 時間後に細胞を回収した。また、無処置細胞 (コントロール) は、0 時間 (ウイルス感作前)、ウイルス感作 6 時間後、12 時間後で回収した。6 時間後、12 時間後に回収した無処置細胞も最初の 1 時間は血清無添加 KAV-1 培地、以降は血清添加 KAV-1 培地で培養した。培養条件は 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下とした。細胞の回収には、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いた。回収後の細胞は、RNA を抽出するまで、TRIzol Reagent を添加した状態で、 -80°C に保存した。なお、感染実験は北海道大学獣医学部微生物学教室内の BSL3 実験施設にて実施した (サブテーマ 2 との連携)。

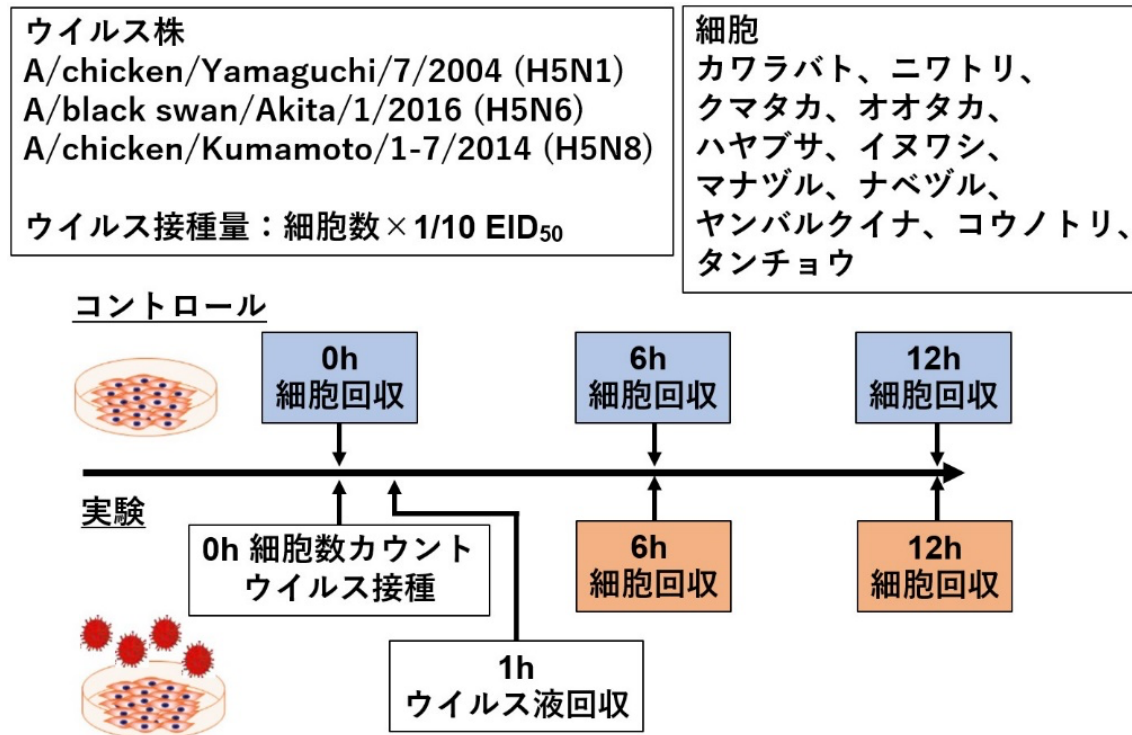


図 4.2 培養細胞を用いた in vitro 感染実験の概要

(8) Mx 遺伝子発現量の測定

上記で回収した細胞から NucleoSpin RNA (タカラバイオ) を用いて totalRNA を回収し、回収した RNA と ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。(4)、(5) で設計した各鳥類用のプライマーと Fast SYBR Green (Thermo Fisher) を用いた Real Time PCR により、Mx 遺伝子の発現量を Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystem) で測定した。Real Time PCR は各遺伝子を含む plasmid を用いて検量線法で行った。Mx 遺伝子の発現量はコピー数から計算した。

Real Time PCR 反応液の調整方法

Fast SYBER Green	5 ul
5μM Forward primer	0.5 ul
5μM Reverse primer	0.5 ul
cDNA	2 ul
DW	2 ul
(total 10 ul)	

PCR 条件

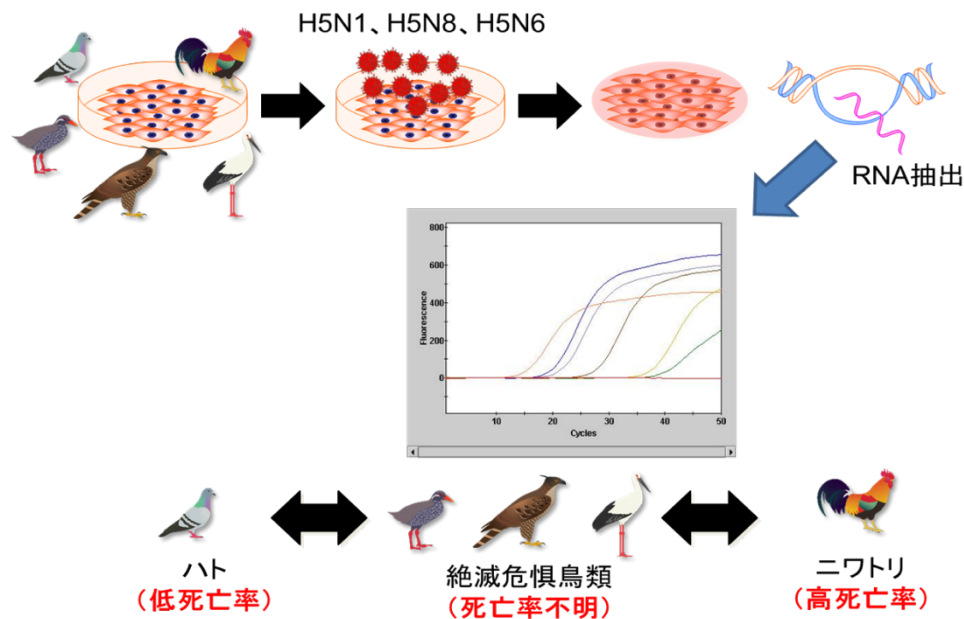
95°C	0' 20' '	}	40 cycle
95°C	0' 01' '		
60°C	0' 20' '		

<Melt Curve Stage>

95°C	0' 15' '
60°C	1' 00' '
95°C	0' 15' '

(9) モデル鳥類の Mx 遺伝子発現パターンと希少鳥類の発現パターンの比較

モデル鳥類の Mx 遺伝子の発現が経時的どの程度増加するのか、あるいは抑制されるのかに注目して、他の鳥類の発現パターンとの類似性を評価する基準を設定することとした (図 4.3)。



リアルタイムPCR等による遺伝子発現パターンの種間比較

図 4.3 各種鳥類の Mx 遺伝子発現量を比較する際の概要

4. 結果及び考察

(1) 感染実験用培養細胞の選定

対象とする 14 種すべてについて感染実験用として 1 種あたり 2×10^7 個の細胞を確保し、感染実験直前まで凍結保存した (図 4.4)。

その後、感染実験のため再度細胞を融解したところ、マガモ、ハシブトガラス、オオハクチョウについては融解後の増殖性が著しく低いことが判明した。そのため、最終的に 11 種 (カワラバト、ニワトリ、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシ、マナヅル、ナベヅル、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ) の培養細胞を用いて、選定した 3 種の HPAIV を用いて感染実験を実施した。

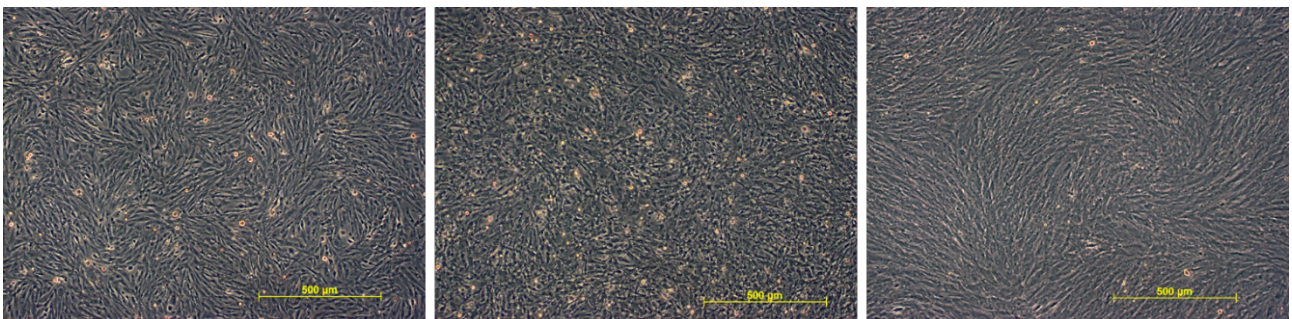


図 4.4 感染実験用に培養した細胞の例。左よりニワトリ (モデル鳥類)、クマタカ (希少鳥類。陽性事例有)、ヤンバルクイナ (希少鳥類。飼育下繁殖)。主に繊維芽細胞が増殖した。

(2) ゲノム解析

登録情報のない7種、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、マナヅル、ナベヅル、ハシブトガラスおよびオオハクチョウについてゲノム解析を実施した。今回解析した鳥類のゲノムサイズは約1.02~1.22Gで、これまでに報告されていた鳥類と同等のゲノムサイズであった。これらの解析結果をDDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した。それぞれの種の登録番号は以下のとおりである。

クマタカ : BJES01000001-BJES01038768
 オオタカ : BJER01000001-BJER01025797
 ハヤブサ : BJEV01000001-BJEV01026817
 ナベヅル : BJET01000001-BJET01045731
 マナヅル : BJEU01000001-BJEU01051019
 ハシブトガラス : BMBD01000001-BMBD01016523
 オオハクチョウ : BMBB01000001-BMBB01025888

また、ゲノム解析の結果を公表するため専用のウェブサイトを開設した (図 4.5)。

<http://www.nies.go.jp/genome/index.html>

ゲノムデータベース

HOME | ダウンロード

国立環境研究所の環境ゲノム科学研究推進事業の成果として絶滅危惧種を中心に全ゲノムのドラフト配列 (FASTA形式) を公開しています。
 本データは国立環境研究所 生物多様性領域が作成しました。
 解析の一部は環境研究総合推進費「S II-1: 希少鳥類保全のためのサーベイランスシステムの開発及び鳥インフルエンザ等による希少鳥類の減少リスクの評価並びにその対策に関する研究」により実施されました。

CACCGCATCGAAATTAACCTTCCAAGTTAAGCTTGG

■ ゲノムデータのダウンロードはこちら
 ■ 利用規約はこちら

お知らせ

2021年4月6日	ミソゴイ、イリオモテヤマネコ、インドサイのゲノムデータを公開しました
2020年9月2日	アカガシラカラスバト、アホウドリ、ウミガラス、エトビリカ、オオハクチョウ、オオワシ、カムリシロムク、ハシブトガラス、オガサワラオオコウモリ、ジュゴン、ツキノワグマのゲノムデータを公開しました
2020年4月6日	オオタカ、クマタカ、ナベヅル、ハヤブサ、マナヅルのゲノムデータを公開しました
2019年4月17日	ツシマヤマネコのゲノムデータを公開しました
2019年3月25日	アマミヤマシギ、ハイタカ、ノグチゲラ、オジロワシ、ニホンライチョウ、シマフクロウのゲノムデータを公開しました
2018年12月5日	ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウのゲノムデータを公開しました
2018年12月5日	ウェブサイトを開設しました

お問い合わせ

国立研究開発法人国立環境研究所
 生物多様性領域
 〒305-8506
 茨城県つくば市小野川16-2
 ✉ biodiv.data@nies.go.jp

図 4.5 国立環境研究所で開設したゲノム情報公開用ウェブサイト

(3) Mx 遺伝子の全長配列決定、リアルタイム PCR 用プライマーの設計

設計した各種特異的 Mx 遺伝子用プライマーによる PCR 結果を図 4.6 に示した。それぞれの鳥類種の Mx 遺伝子長は以下のとおりであった。カワラバト (2103 bp)、マガモ (2109 bp)、ハシブトガラス (2106 bp)、オオハクチョウ (2106 bp)、ニワトリ (2115 bp)、クマタカ (2109 bp)、オオタカ (2112 bp)、ハヤブサ (2100 bp)、イヌワシ (2115 bp)、マナヅル (2151 bp)、ナベヅル (2130 bp)、ヤンバルクイナ (2112 bp)、コウノトリ (2151 bp)、タンチョウ (2151 bp)。配列をアミノ酸に変換したとこ

る、すべての配列で途中で停止コドンが含まれていなかった。これにより、14 種全てで Mx 遺伝子のクローニングに成功したことが確認された。確定した各種鳥類の Mx 遺伝子の配列をもとに感染実験の対象となった 11 種についてリアルタイム PCR 用のプライマーを設計した (表 4.1)。

(4) GAPDH 遺伝子のリアルタイム PCR 用プライマーの設計

各鳥類のリアルタイム PCR 用プライマーの配列を表 4.1 に示した。これらのプライマーセットを用いて、GAPDH 遺伝子の発現量を定量した。

表 4.1 リアルタイム PCR による Mx 遺伝子発現量の定量に使用した各鳥類種のプライマー配列

	Mx primer name	primer sequence	GAPDH primer name	primer sequence
カワラバト	Mx_Cl_241F_a	ACAGTGTGGGGAAAGCGT	GAPDH2_768F_a	TCTGTTGTGGACCTGACCTG
	Mx_Cl_334R_a	TACAAGGTATGCTCTGCTGC	GAPDH2_886R_b	TGGTCCTCTGTGTATGCCA
ニワトリ	Mx_Gg_86F	ACGGTCCAACCTCAGCTCAG	Gg_GAPDH_225F	ACTGTCAAGGCTGAGAACGG
	Mx_Gg_213R	GATTGCTGCAGCCTAATGGC	Gg_GAPDH_324R	ACCTGCATCTGCCATTGTA
クマタカ	MxAv5-1011F	TGCTGCAATCCAGCAGGAGAG	Nn_GAPDH2_1190F	GGCACAGACAAGTGACAGACT
	MxAv5-1104R	TGCCAGATGAGGGATAGTAGC	Nn_GAPDH2_1284R	GTTAGAGCCACCTACTCAGC
オオタカ	MxAv7-1517F	TCATAGAAGTGGAGGAGCCAG	Ag1_GAPDH5-1228F	GGTGCCTGGGATGCTTTTTTC
	MxAv7-1611R	AGCAAATGCCTTTTAGTGAG	Ag1_GAPDH5-1331R	TGATGGCATGGACAGTGGTC
ハヤブサ	Mx_Fp_1474F	CAGTATCGTGGACGCGAGTT	Fp_GAPDH_1112F	GCTGGTTTCTGGTAGGCAT
	Mx_Fp_1579R	TCAGTATCCCAACAGCCAGC	Fp_GAPDH_1229R	TGACTGTCACATGGAGCCAC
ナベヅル	Mx_Cl_459F_a	AGCTCTGCTCCTAGAAGCCCT	GAPDH2_768F_b	TCCGTTGTGGACCTGACCTG
	Mx_Cl_579R_d	TTCCCTTTCCACACCTGAGT	GAPDH2_886R_a	TGGTCCTCTGTGTACGCCA
マナヅル	Mx_Cl_241F_d	ACATGACTGAGACACAGCCT	Gv_GAPDH_496F	AGCAATGCCTCTTGCCTACT
	Mx_Cl_335R_c	TACAAGGTATGTTCTGCTGC	Gv_GAPDH_578R	ATGAGACCTTCCACGATGCC
イヌワシ	MxAv5-1011F	TGCTGCAATCCAGCAGGAGAG	Ac_GAPDH_1008F	CTGGCATTGCACTGAACGAC
	MxAv5-1104R	TGCCAGATGAGGGATAGTAGC	Ac_GAPDH_1116R	TCCTTGGATGCCATGTGGAC
ヤンバルクイナ	Mx_Cl_459F_a	AGCTCTGCTCCTAGAAGCCCT	GAPDH2_768F_a	TCTGTTGTGGACCTGACCTG
	Mx_Go_577R_f	TTCCCTTTCCATGCCTGGGT	GAPDH2_886R_b	TGGTCCTCTGTGTATGCCA
コウノトリ	Mx_Cl_459F_b	AGCTCCGCTCCTAGAAGCCCT	GAPDH2_733F	CTGGAATGGCTTTCCGTGTG
	Mx_Cl_578R_b	TTCCCTTTCCATGCTTGGGT	GAPDH2_887R_b	CTGGTCCTCTGTGTATGCC
タンチョウ	Mx_Cl_459F_a	AGCTCTGCTCCTAGAAGCCCT	GAPDH2_733F	CTGGAATGGCTTTCCGTGTG
	Mx_Cl_578R_c	TTCCCTTTCCACACCTGAGT	GAPDH2_887R_a	CTGGTCCTCTGTGTACGCC

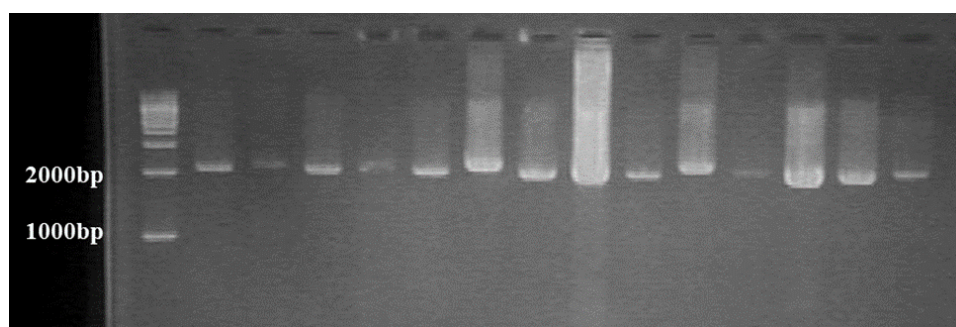


図 4.6 種特異的 Mx 遺伝子用プライマーによる PCR 結果。左より、1kbp マーカー、カワラバト、マガモ、ハシブトガラス、オオハクチョウ、ニワトリ、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシ、マナヅル、ナベヅル、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ。

(5) Mx 遺伝子発現量の定量

(5) - 1 モデル鳥類 (カワラバト、ニワトリ) における Mx 遺伝子発現量の経時的变化

モデル鳥類 (カワラバト、ニワトリ) における Mx 遺伝子発現量の経時的变化を図 4.7、4.8 に示した。カワラバトの培養細胞において、H5N1、H5N8、H5N6 亜型の感染に対して経時的に Mx 遺伝子の発現量が

増加した。また、感染後 12 時間を経過した時点で、Mx 遺伝子の発現量が 20 倍以上に増加していることが確認された（H5N1 亜型：26.9 倍、H5N8 亜型：58.0 倍、H5N6 亜型：23.3 倍）。

ニワトリの培養細胞における Mx 遺伝子の発現量を定量した結果、H5N1 亜型感染に対しては遺伝子発現量が経時的に減少していた。H5N8 亜型および H5N6 亜型感染に対しては、Mx 遺伝子の発現量が経時的に増加していた。しかし、感染 12 時間後においても無処置細胞の発現量と比較して 10 倍以上の発現量にはならなかった。

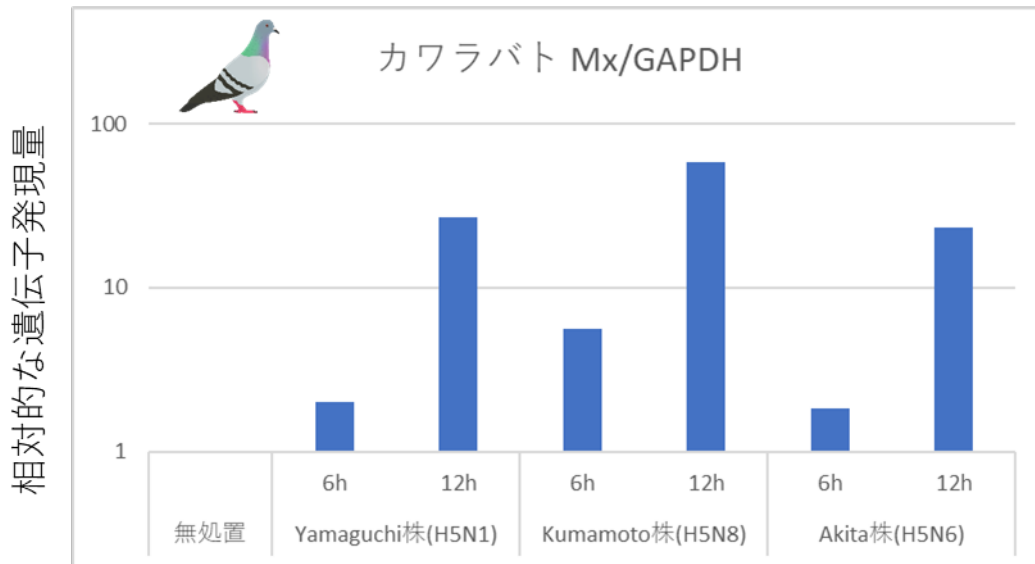


図 4.7 カワラバト Mx 遺伝子発現量の経時的変化

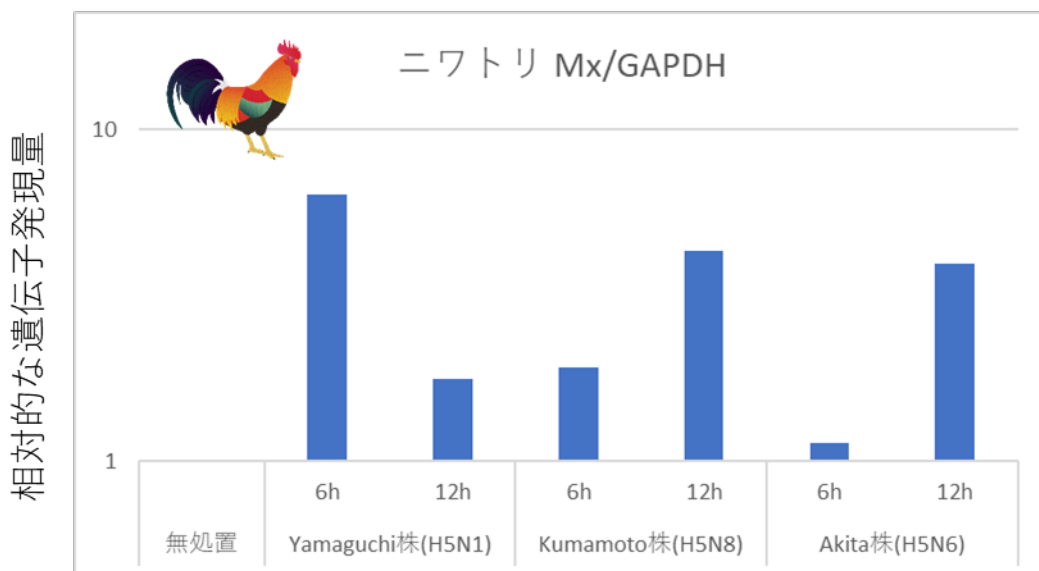


図 4.8 ニワトリ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

(5) - 2 希少鳥類で且つ過去に感染事例がある鳥類種（クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、ナベヅル、マナヅル）における Mx 遺伝子発現量の経時的変化

クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、ナベヅル、マナヅルにおける Mx 遺伝子発現量の経時的変化を図 4.9、4.10、4.11、4.12、4.13 に示した。クマタカの細胞では、全ての亜型において、感染 6 時間後に Mx 遺伝子の発現が無処置の細胞の発現量と比較して減少した。感染 12 時間後には Mx 遺伝子の発現の増加は観察されるものの無処置細胞の発現量と比較して 10 倍以上に増加することはなかった。

オオタカの細胞では、H5N1 亜型および H5N8 亜型において、感染 6 時間後に Mx 遺伝子の発現が減少した。感染 12 時間後に Mx 遺伝子の発現は増加するものの、無処置細胞の発現量と比較して 10 倍以上に増加することはなかった。H5N6 亜型においては、Mx 遺伝子の発現が無処置の細胞の発現量と比較して減少することはなかった。しかし、感染 12 時間においても Mx 遺伝子の発現量が増加することはなかった。

ハヤブサの細胞では、H5N8 亜型および H5N6 亜型において、感染 6 時間後に Mx 遺伝子の発現が減少した。H5N6 亜型においては、感染 12 時間後も Mx 遺伝子の発現の抑制は継続した。H5N1 亜型においては、Mx 遺伝子の発現が無処置の細胞の発現量と比較して減少することはなかった。しかし、感染 12 時間においても Mx 遺伝子の発現量が無処置の細胞の発現量と比較して 10 倍以上に増加することはなかった。

ナベヅルの細胞では、H5N6 亜型において、感染 6 時間後に Mx 遺伝子の発現が無処置細胞の発現量と比較して低下した。しかし、感染 12 時間後には遺伝子の発現量が 10 倍以上に増加した。H5N1 亜型および H5N8 亜型においては、感染後に Mx 遺伝子の発現の低下は認められず、また、感染 12 時間において Mx 遺伝子の発現量が 10 倍以上に増加した。

マナヅルの細胞では、H5N1、H5N8、H5N6 亜型のすべての感染に対して経時的に Mx 遺伝子の発現量が増加した。しかし、H5N8 および H5N6 亜型においては、感染後 12 時間を経過した時点で、Mx 遺伝子の発現量が 10 倍を超過することはなかった。

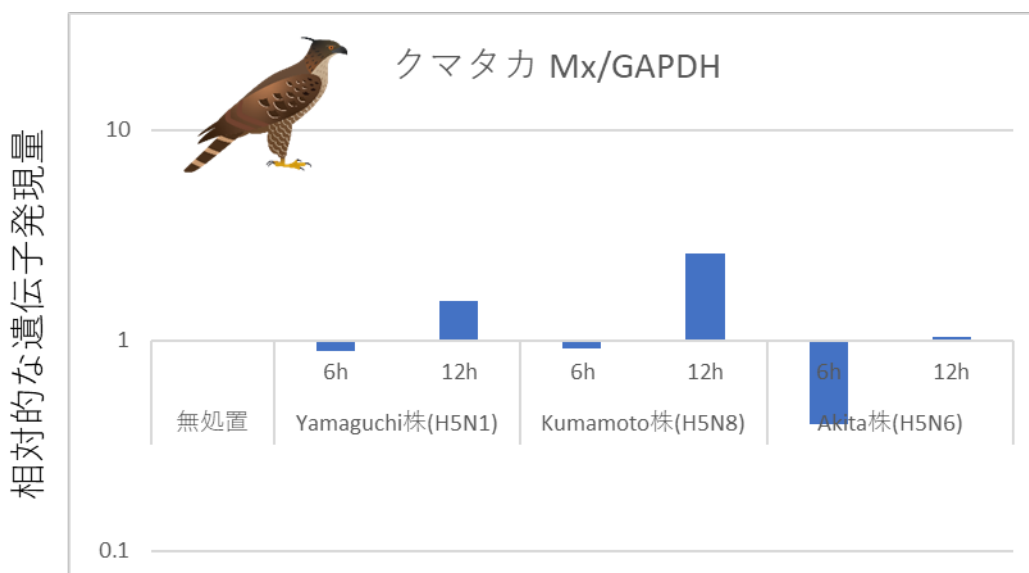


図 4.9 クマタカ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

相対的な遺伝子発現量

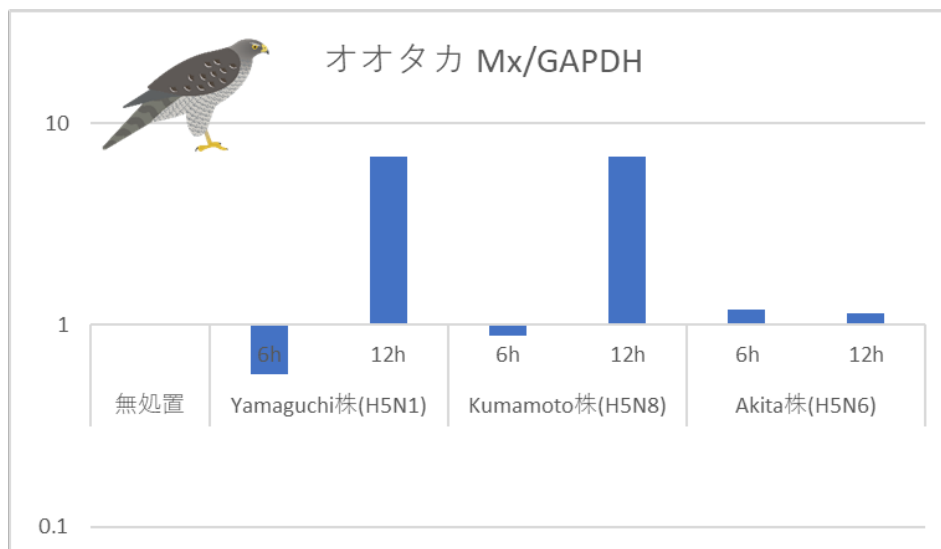


図 4.10 オオタカ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

相対的な遺伝子発現量

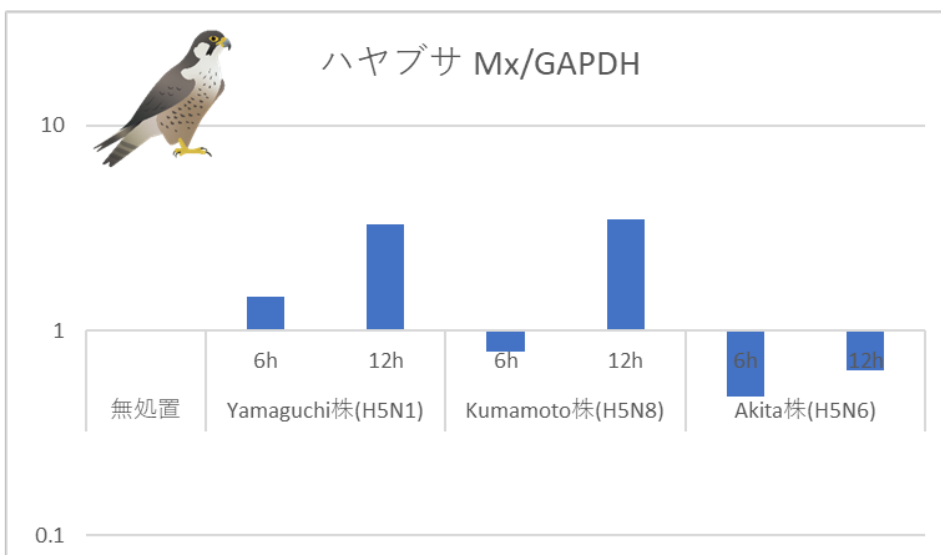


図 4.11 ハヤブサ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

相対的な遺伝子発現量

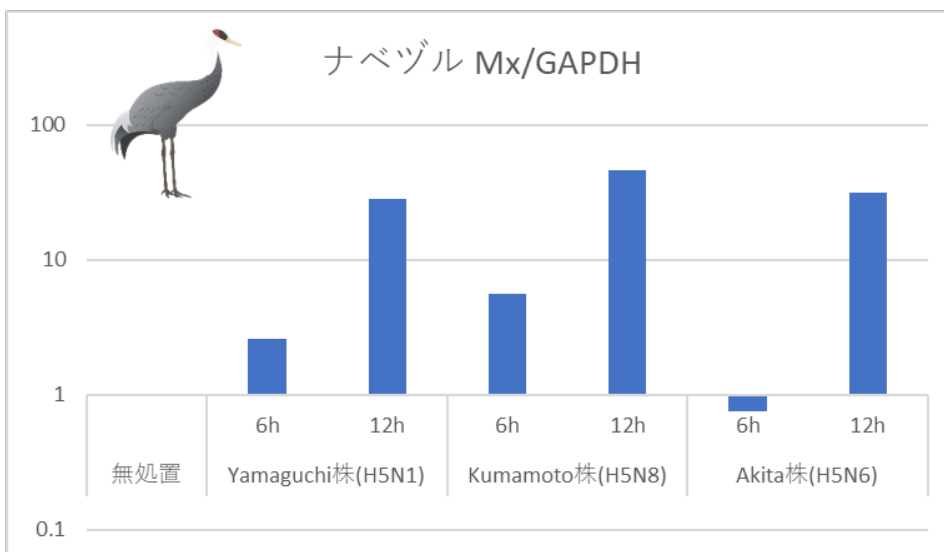


図 4.12 ナベヅル Mx 遺伝子発現量の経時的変化

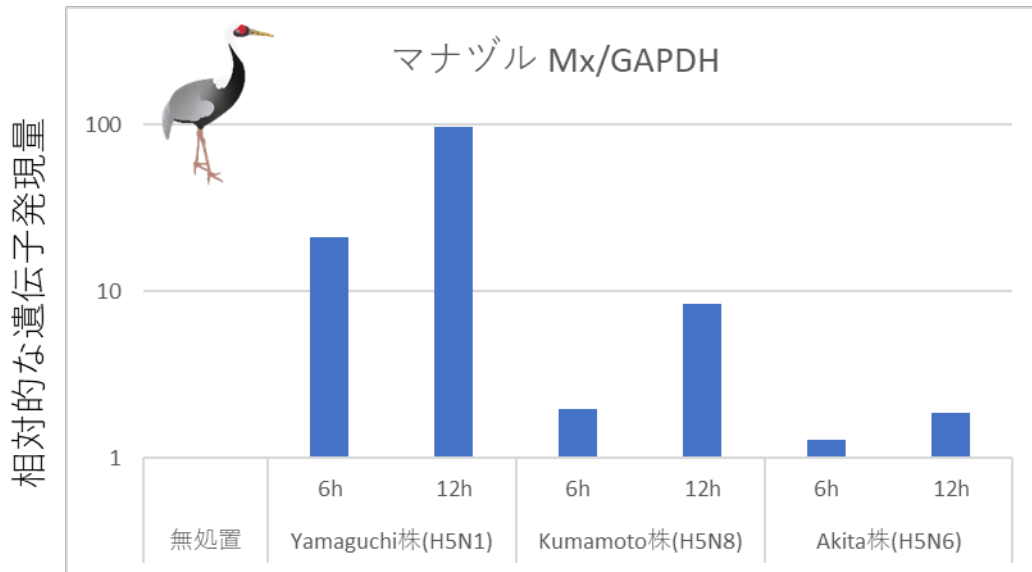


図 4.13 マナヅル Mx 遺伝子発現量の経時的変化

(5) - 3 希少鳥類で且つ飼育下繁殖が行われている鳥類種（イヌワシ、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウ）における Mx 遺伝子発現量の経時的変化

イヌワシ、ヤンバルクイナ、コウノトリ、タンチョウにおける Mx 遺伝子発現量の経時的変化を図 4.14、4.15、4.16、4.17 に示した。イヌワシの細胞では、H5N1 亜型および H5N8 亜型において、感染 6 時間後（H5N1 亜型）あるいは感染 12 時間後（H5N8 亜型）に無処置細胞の発現量と比較して Mx 遺伝子の発現が減少した。H5N6 亜型においては、Mx 遺伝子の発現が無処置の細胞の発現量と比較して減少することはなかった。しかし、感染 12 時間においても Mx 遺伝子の発現量が増加することはなかった。

ヤンバルクイナの細胞では、H5N1 亜型において、感染 12 時間後に無処置細胞の発現量と比較して Mx 遺伝子の発現が減少した。H5N8 亜型および H5N6 亜型においては、Mx 遺伝子の発現が無処置の細胞の発現量と比較して減少することはなかった。しかし、感染 12 時間においても Mx 遺伝子の発現量が無処置の細胞の発現量の 10 倍を超えることはなかった。

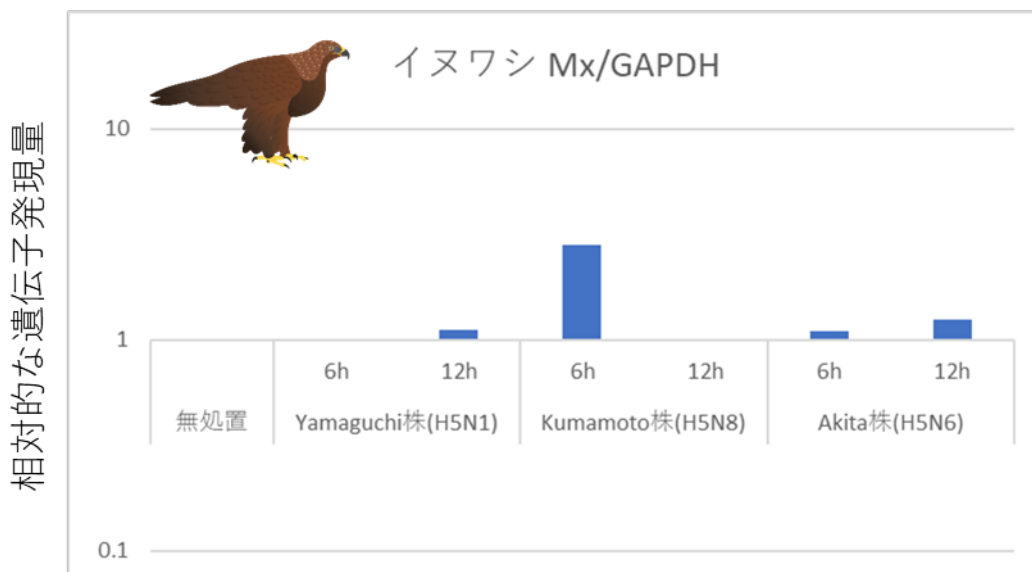


図 4.14 イヌワシ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

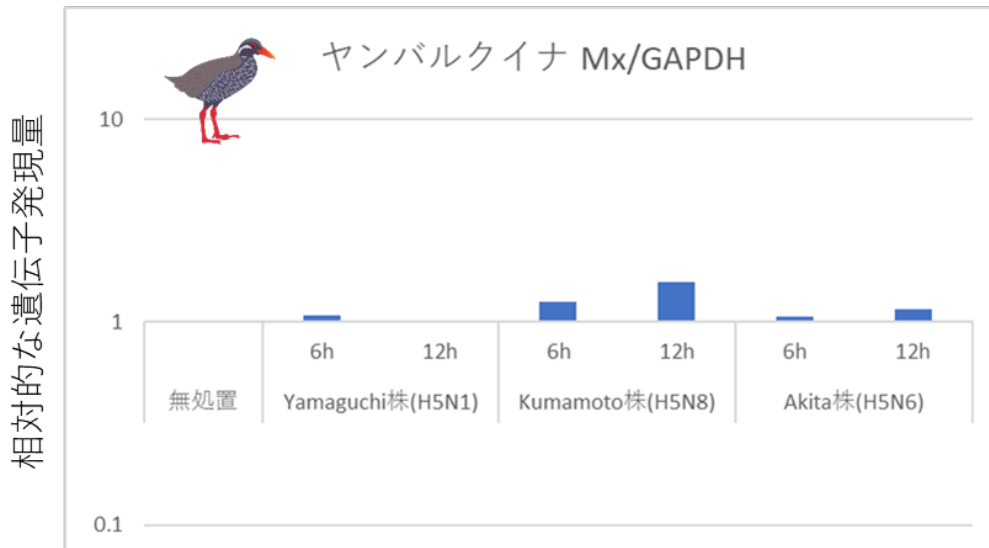


図 4.15 ヤンバルクイナ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

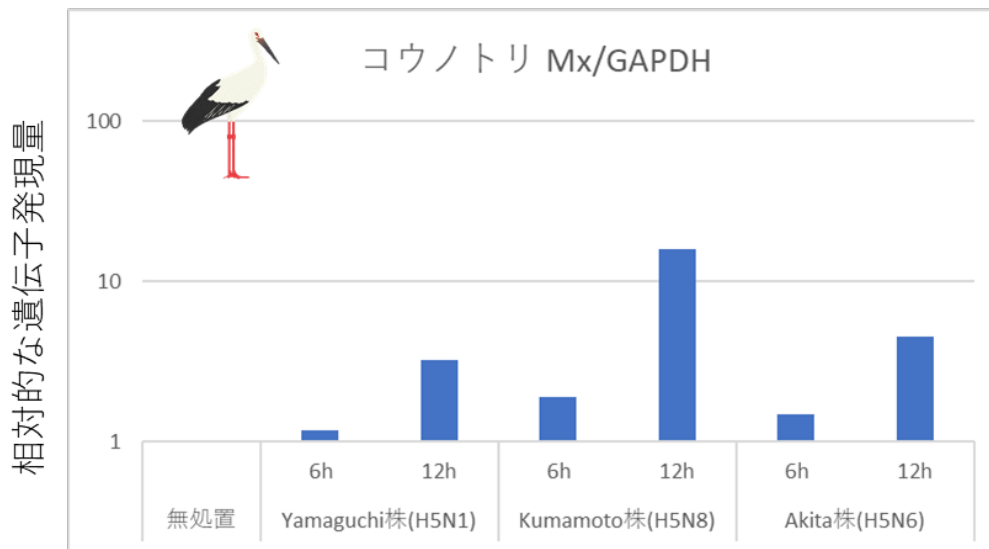


図 4.16 コウノトリ Mx 遺伝子発現量の経時的変化

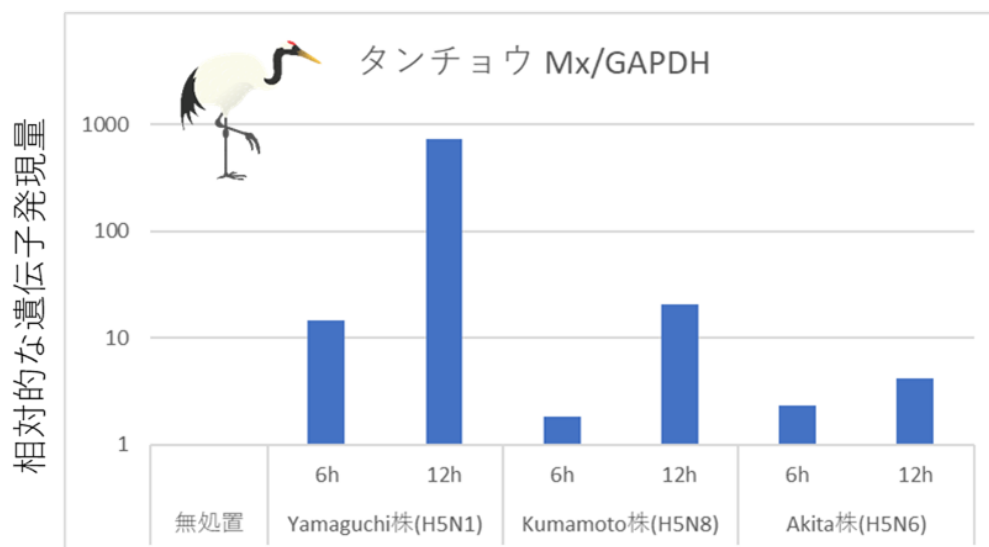


図4.17 タンチョウMx遺伝子発現量の経時的変化

コウノトリとタンチョウの培養細胞においては、すべての亜型で経時的に Mx 遺伝子の発現量が増加した。感染後 12 時間を経過した時点で、無処置細胞の発現量と比較して Mx 遺伝子の発現量が 10 倍以上に増加していることが確認されたのは、タンチョウの細胞に H5N1 亜型あるいは H5N8 亜型を感染させた場合であった。

(6) モデル鳥類の Mx 遺伝子発現パターンと希少鳥類の発現パターンの比較

生体感染実験によって低い死亡率を示すカワラバトと高い死亡率を示すニワトリの Mx 遺伝子の発現パターンには以下のような特徴が観察された。

カワラバト：Mx 遺伝子の発現が抑制されることはない。また、経時的に発現量が増加し、感染 12 時間後には無処置細胞の発現量と比較して発現量が 20 倍以上に増加する。

ニワトリ：Mx 遺伝子の発現が抑制される場合がある。また、経時的に発現量が増加する場合でも、感染 12 時間後の発現量は無処置細胞の発現量と比較して 10 倍を超えることは無い。

以上の観察結果を踏まえ、感染 12 時間後に Mx 遺伝子の発現量が無処置細胞の発現量と比較して 10 倍を超えるか否かについて、超える場合を「1」、超えない場合を「0」と点数を設定し、各鳥類種について 3 つの亜型に対する Mx 遺伝子の発現パターンを評価した。この基準を適用すると、三種類の亜型に対して常に Mx 遺伝子の発現量が感染 12 時間後に 10 倍以上に増加する鳥類種の点数は 3、発現量が常に 10 倍を超えることが無い鳥類種の点数は 0 となる。この基準による判定結果を表 4.2 に示した。カワラバトと同様に合計の点数が 3 点となったのはナベヅルであった。タンチョウについては合計点数が 2 点、マナヅルとコウノトリは 1 点、その他の鳥類（クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシ、ヤンバルクイナ）はニワトリと同様に合計点が 0 点となった。

今回実験に使用した全ての HPAIV に感染してから 12 時間後に Mx 遺伝子の発現量が 10 倍以上に増加していた鳥類種は、ナベヅルの培養細胞のみであった。これは、HPAIV に感染した場合の死亡率が低いカワラバトと同じ発現パターンである。ナベヅルの野外における HPAIV 感染事例数は、2010-2011 に 7 事例、2014-2015 に 4 事例、2016-2017 に 23 事例、2020-2021 に 5 事例、となっている（表 4.2）。主な渡来地である鹿児島県出水市における 2010 年～2019 年のナベヅルの渡来数は、11,953 羽～14,967 羽と報告されている²⁾。渡来数に対する感染事例数の割合は、23 事例が確認された 2016-2017 においても約 0.2%である。また、渡来地の環境水から複数回にわたって HPAIV が検出された 2020-2021 においても感染事例数は 5 事例にとどまっている。細胞における反応や野外における感染事例の状況を考慮すると、ナベヅルは HPAIV に対して、抵抗性を有する可能性が高いと考えられる。

今回感染実験の対象とした猛禽類（クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシ）すべてで、ニワトリの発現パターンと同様、感染 12 時間後に Mx 遺伝子の発現量が 10 倍を超える種は無かった。クマタカ、オオタカ、ハヤブサでは、Mx 遺伝子発現量の大きな減少が観察された（図 4.7、4.8、4.9）。イヌワシでは、Mx 遺伝子発現量にほとんど変化が認められなかった（図 4.12）。インフルエンザウイルス NS1 タンパク質は Mx 遺伝子の発現を誘導するインターフェロンの産生を阻害することが知られている³⁾。クマタカ、オオタカ、ハヤブサ、イヌワシで観察された反応は、一般的に猛禽類の細胞は NS1 タンパク質の作用を受けやすく、HPAIV に対する自然免疫系の反応が抑制されやすい傾向があることを示唆するものである。国内に分布する猛禽類の生体を対象に HPAIV の感染実験を実施した例は報告されていない。実施例としては、北米に分布する猛禽類の生体に H5N1 亜型を感染させた例が報告されている。結果として感染後に死亡あるいは重度の神経症状が発症している⁴⁾。このよう経過を辿るのは、HPAIV に対する自然免疫系の反応が、猛禽類の細胞では抑制されやすい傾向があることと関連性があるのかもしれない。今後は、HPAIV の感染が確認されたクマタカ、オオタカ、ハヤブサについて、詳細なウイルス学的、病理学的調査・研究を行い、生体レベルでのウイルス感染に対する反応について情報を蓄積する必要がある。

表 4.2 モデル鳥類（ニワトリ、カワラバト）の Mx 遺伝子発現量変化の類似性を基準にした各種鳥類の評価結果

鳥類種	亜型	判定結果	合計	野外における感染事例数							
モデル鳥類											
カワラバト	H 5N 1	1	3								
	H 5N 8	1									
	H 5N 6	1									
ニワトリ	H 5N 1	0	0								
	H 5N 8	0									
	H 5N 6	0									
希少鳥類で且つ過去に感染事例がある鳥類種				~2009 (H 5N 1)	2010-2011 (H 5N 1)	2014-2015 (H 5N 8)	2016-2017 (H 5N 6)	2017-2018 (H 5N 6)	2020-2021 (H 5N 8)		
クマタカ	H 5N 1	0	0								
	H 5N 8	0		1							
	H 5N 6	0									
オオタカ	H 5N 1	0	0								
	H 5N 8	0		1	4	1	1				
	H 5N 6	0									
ハヤブサ	H 5N 1	0	0								
	H 5N 8	0		9	6	3					
	H 5N 6	0									
ナベヅル	H 5N 1	1	3								
	H 5N 8	1		7	4	23	5				
	H 5N 6	1									
マナヅル	H 5N 1	1	1								
	H 5N 8	0		1	1	1					
	H 5N 6	0									
希少鳥類で且つ飼育下繁殖が行われている鳥類種											
イヌワシ	H 5N 1	0	0								
	H 5N 8	0									
	H 5N 6	0									
ヤンバルクイナ	H 5N 1	0	0								
	H 5N 8	0									
	H 5N 6	0									
コウノトリ	H 5N 1	0	1								
	H 5N 8	1									
	H 5N 6	0									
タンチョウ	H 5N 1	1	2								
	H 5N 8	1									
	H 5N 6	0									

猛禽類以外で、全ての亜型に対して Mx 遺伝子の発現の増加が 10 倍以下となって種はヤンバルクイナであった。ヤンバルクイナの細胞も猛禽類の細胞と同様に NS1 タンパク質の作用を受けやすく、HPAIV

に対する自然免疫系の反応が抑制されやすい傾向があるのかもしれない。野外においてヤンバルクイナがHPAIVに感染した事例は報告されていない。また、近縁種での感染実験結果に関する情報も少ないため、ウイルス感染に対するヤンバルクイナの生体レベルでの反応を推測するのは困難である。しかし、細胞レベルでは猛禽類と同様の反応が観察されたことから、自然免疫系の反応がヤンバルクイナの生体でもウイルス感染によって抑制されやすい傾向がある可能性は高いと考えられる。これまでのところ、沖縄県では野鳥や家禽からHPAIVが分離された事例が無いため、ヤンバルクイナの感染リスクは低いと予想される。しかしながら、鳥インフルエンザのリスク分析⁴⁾によると、沖縄県のリスク指数は中程度を示しているため、特に、ヤンバルクイナの飼育下繁殖での衛生管理は徹底する必要がある。

マナヅル、コウノトリ、タンチョウについては、ウイルスの亜型によって反応が異なる結果となった。マナヅルについては野外での感染事例が、2014-2015に1事例、2016-2017に1事例、2020-2021に1事例と報告されている。主な渡来地である鹿児島県出水市における2014年～2019年のマナヅルの渡来数は、244羽～886羽であるため²⁾、渡来数に対する感染事例数の割合は、最高でも2014年における約0.4%となる。また、タンチョウとコウノトリが分布している地域は、これまでに野鳥や家禽からHPAIVが分離された地域と重複している。鳥インフルエンザのリスク分析⁵⁾でも両種が分布している地域の感染リスクは中程度以上となっている。しかしながら、両種では野外で高病原性鳥インフル鳥インフルエンザウイルスに感染した事例が報告されていない。これらの状況から、マナヅル、コウノトリ、タンチョウはHPAIVに対して、猛禽類よりも抵抗性を有する可能性があることが示唆され、細胞レベルでの反応もそれを反映したものと考えられる。

今回の結果から、HPAIVに対する生体レベルでの反応を細胞レベルでの反応からある程度予測できる可能性が示された。インターフェロンの産生およびインターフェロンによって誘導される抗ウイルス作用のあるタンパク質の産生は、ウイルス感染に対する宿主側反応の最も初期のものである。この反応がウイルス感染によって抑制される鳥類種は、体内でウイルスが増殖しやすく、それが高い死亡率と関連している可能性がある。今回は、指標としてMx遺伝子のみに着目したが、その他にもOAS、PKRといった抗ウイルス作用のある遺伝子が知られている。今後は、感染前後で細胞の遺伝子の発現がどのように変化するかをRNA-seq等で網羅的解析するとともに、発現の鳥類種差を明らかにし、生体レベルの反応を精度よく推定する細胞レベルの指標の探索を実施する必要がある。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ4の研究目標は、以下のとおりに設定していた。

- ・生体感染実験の代替法として、培養細胞での感染実験によるHPAIVの病原性評価法を確立する。
- ・評価指標は、抗ウイルス作用のある遺伝子の発現パターンとし、死亡率が高い鳥類種の遺伝子発現パターンの特徴を持つ希少鳥類種が存在するか確認する。この評価法を希少鳥類8種程度に適用する。

本サブテーマでは、抗ウイルス作用のある遺伝子としてMx遺伝子に注目し、HPAIVが感染した細胞のMx遺伝子発現パターンを鳥類11種で観察した。その結果、死亡率既知のモデル鳥類であるニワトリ（高死亡率）のMx遺伝子発現パターンと猛禽類4種（クマタカ、イヌワシ、オオタカ、ハヤブサ）およびヤンバルクイナの発現パターンが類似していることを確認した。対象とする鳥類種数は8種程度を目標としていたため、当初の研究目標を上回る成果をあげることが出来た。

6. 引用文献

- 1) T. Kuwana, K. Hashimoto, A. Nakanishi, Y. Yasuda, A. Tajima, M. Naito: *Int. J. Dev. Biol.*, 40:1061-1064 (1996), Long-term culture of avian embryonic cells in vitro.
- 2) 出水市ツル博物館クレインパークいずみ (2021年4月29日閲覧) https://www.city.kagoshima-izumi.lg.jp/page/page_80092.html
- 3) J. Talon, C.M. Horvath, R. Polley, C.F. Basler, T. Muster, P. Palese, A. García-Sastre: *J. Virol.*, 74:7989-7996 (2000), Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein.

- 4) J.S. Hall, H.S. Ip, J.C. Franson, C. Meteyer, S. Nashold, J.L. TeSlaa, J. French, P. Redig, C. Brand: PLoS One, 22;4(10):e7555 (2009), Experimental infection of a North American raptor, American Kestrel (*Falco sparverius*), with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1).
- 5) S. Moriguchi, M. Onuma, K. Goka: J. Vet. Med. Sci., 78(7):1107-1115 (2016), Spatial assessment of the potential risk of avian influenza A virus infection in three raptor species in Japan.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ2】

- 1) N. ISODA, A.T. TWABELA, E. BAZARRAGCHAA, K. OGASAWARA, H. HAYASHI, Z.J. WANG, D. KOBAYASHI, Y. WATANABE, K. SAITO, H. KIDA and Y. SAKODA: *Viruses*, 12(12), 1439 (2020) (IF:3.816) , Re-invasion of H5N8 high pathogenicity avian influenza virus clade 2.3.4.4b in Hokkaido, Japan, 2020.
- 2) A. TWABELA, M. OKAMATSU, K. MATSUNO, N. ISODA and Y. SAKODA: *Viruses*, 12(12), 1407 (2020) (IF:3.816) , Evaluation of baloxavir marboxil and peramivir for the treatment of high pathogenicity avian influenza in chickens.

【サブテーマ3】

- 1) A.M. KHALIL, Y. FUJIMOTO, I. KOJIMA, M. ESAKI, K. RI, T. MASATANI, T. MATSUI and M. OZAWA: *Pathogens*, 10(2), 171 (2021) (IF:3.117), Genetic Characterization of H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Isolated from Falcated Ducks and Environmental Water in Japan in November 2020.

【サブテーマ4】

- 1) K. HAGIWARA, T. NAKAYA and M. ONUMA: *J. Vet. Med. Sci.*, 82, 619-625 (2020) (IF:1.049), Characterization of Myxovirus resistance protein in birds showing different susceptibilities to highly pathogenic influenza virus.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ3】

- 1) 鶏の研究 第93巻第9号、40-42 (2018)
「鹿児島県における鳥インフルエンザ防疫の官学連携体制（上）（小澤真）」
- 2) 鶏の研究 第93巻第10号、18-22 (2018)
「鹿児島県における鳥インフルエンザ防疫の官学連携体制（下）（小澤真）」
- 3) 鶏の研究 第96巻第4号、23-26 (2021)

「高病原性鳥インフルエンザ —いま家禽農場で取り組むべきこと— (小澤真)」

4) 鶏の研究 第96巻第5号、26-29 (2021)

「高病原性鳥インフルエンザ —2020年度の発生の特徴— (小澤真)」

5) Japan Poultry Research, 13, 15-17 (2021)

“Highly Pathogenic Avian Influenza: What We Should Do on Poultry Farms Right Now. (M. OZAWA)”

【サブテーマ4】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

【サブテーマ1】

1) 勝間健人、岡田遥江、亀田美帆、小山美佳、佐藤有里子、笛吹達史、山口剛士：第33回中国四国ウイルス研究会 (2018)

「環境水からの鳥インフルエンザウイルス分離方法の比較検討」

2) 山口剛士：第25回日本野生動物医学会学術集会シンポジウム (2019)

「渡り鳥による高病原性鳥インフルエンザウイルスの移動」

3) 曾田公輔：第162回日本獣医学会学術集会シンポジウム (2019)

「近年国内で分離された H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのカモ類に対する病原性」

4) K. SODA, C. HIDAKA, T. USUI, T. YAMAGUCHI: The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, 2019

“Pathogenicity of the recent clade 2.3.4.4 H5N6 highly pathogenic avian influenza virus to major Anseriformes in Japan.”

5) 松下万祐、笛吹達史、小笠原浩平、渡辺有希子、齊藤慶輔、山口剛士：第164回日本獣医学会学術集会 (2021)

「国内野生カモ類の H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する抗体保有状況」

6) 笛吹達史：第164回日本獣医学会学術集会シンポジウム (2021)

「渡り鳥飛来地における環境水と野鳥の鳥インフルエンザウイルス調査」

【サブテーマ2】

1) A. TWABELA, 岡松正敏、松野啓太、迫田義博：2019年度鶏病研究会北海道支部技術検討会 (2019)

「Effect of antiviral drugs against highly pathogenic avian influenza virus infection.」

2) A. TWABELA, 岡松正敏、松野啓太、迫田 義博：第162回日本獣医学会学術集会 (2019)

「Effect of antiviral drugs against highly pathogenic avian influenza virus infection in birds.」

3) 岡松正敏：第162回日本獣医学会学術集会 (2019)

「希少鳥種への応用を目指した抗ウイルス薬による高病原性鳥インフルエンザの治療および予防」

4) Y. SAKODA, M. OKAMATSU: NIES_NIER_USGS International workshop 2019 (2019)

「How to implement cooperation among Asian countries for the control of highly pathogenic avian influenza (HPAI)?」

5) Y. SAKODA, N. ISODA: International Conference: “The impact of climate change on the spreading of new viral infections during birds’ seasonal migrations in Northern and Eastern Eurasia”(2020)

「H5N8 HPAI virus infections for wild birds and chickens in Japan」

- 6) 磯田典和、日尾野隆大、A. TWABELA、 E. BAZARRAGCHAA、 K. T. LE、 H. L. TAN、 小笠原浩平、 林裕貴、 渡辺有希子、 齊藤慶輔、 喜田宏、 迫田義博：第 164 回日本獣医学会学術集会（2021）

「2020 年度冬季に東日本の野鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」

- 7) 迫田義博：日本野生動物医学会 高病原性鳥インフルエンザシンポジウム（2021）

「ヒト用抗インフルエンザ薬の鳥類における有効性」

<ポスター発表>

- 1) A. TWABELA, M. OKAMATSU, K. MATSUNO, Y. SAKODA : 7th Sapporo Summer Seminar for One Health (2019)

「Effect of antiviral drugs against highly pathogenic avian influenza virus infection in birds.」

【サブテーマ 3】

- 1) M. OZAWA : 2018 Suncheonman International Crane Symposium (2018) 招待講演

Avian influenza outbreaks in migratory waterfowl at the Izumi plain

- 2) 小澤真：第 91 回日本産業衛生学会（2018） 招待講演

ウイルス性人獣共通感染症：ウイルスから見た人と動物の共通性

- 3) A. M. KHALIL, N. NISHI, I. KOJIMA, W. FUKUNAGA, T. MATSUI, and M. OZAWA : 第 66 回日本ウイルス学会学術集会（2018）

Transition of genetic composition of H3N8 and H4N6 low pathogenic avian influenza viruses from the Izumi plain over different seasons.

- 4) 奥谷公亮、藤本佳万、児島一州、江寄真南、李京河、西奈津子、正谷達膳、松井勉、小澤真：第 164 回日本獣医学会学術集会（2021）

「野鳥渡来地の環境水から紐解く鳥インフルエンザウイルスの流行動態」

- 5) 小澤真：第 164 回日本獣医学会学術集会シンポジウム（2021）

「鹿児島県における鳥インフルエンザ検査体制」

【サブテーマ 4】

- 1) Onuma M., Kakogawa M., Asakawa M. (2018)

Retrospective study on the introduction of avian influenza virus by shorebirds in Hokkaido, Japan. 11TH International Conference of Asian Society of Conservation Medicine, Bali, Indonesia

（3）「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ 1】

- 1) 一般公開シンポジウム「希少な鳥を守るにはー野鳥の鳥インフルエンザと鉛汚染対策に向けてー」（2019 年 6 月、東京、聴講者約 200 名）にて講演「鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの手法の開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価（山口剛士）」

- 2) 鶏病研究会近畿地区鶏病技術研修会（主催：鶏病研究会和歌山支部、2019 年 8 月 21 日、和歌山市）にて講演「高病原性鳥インフルエンザウイルスの野生動物による伝播（山口剛士）、聴講者約 30 名」

- 3) 山口県西部家畜保健衛生推進協議会（主催：山口県西部家畜保健衛生推進協議会、2019 年 9 月 18 日、長門市、聴講者約 50 名）にて講演「野生動物等の鶏舎内侵入と鳥インフルエンザウイルス伝播の可能性（山口剛士）」

- 4) 動物園等における高病原性鳥インフルエンザへの対応に係る講習会（主催：環境省、2019年12月24日、東京上野、聴講者約50名）にて講演「高病原性鳥インフルエンザの現状と課題（山口剛士）」
- 5) 鶏病研究会岐阜支部会研修会（主催：鶏病研究会岐阜支部、2020年11月16日、岐阜市、聴講者約50名）にて講演「高病原性鳥インフルエンザウイルスの野生動物による伝播（山口剛士）」
- 6) 一般公開オンラインセミナー「保全医学の視点と野生動物における感染症の現状」（日本獣医師会・日本野生動物医学会合同企画、2021年3月6日、オンライン、聴講者351名）にて講演「野鳥における高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)発生の現状（山口剛士）」

【サブテーマ2】

- 1) 一般公開シンポジウム「希少な鳥を守るには－野鳥の鳥インフルエンザと鉛汚染対策に向けて－」（2019年6月、東京、聴講者約200名）にて講演「高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した希少鳥に対する抗ウイルス薬による治療効果（岡松正敏）」
- 2) 高病原性鳥インフルエンザ防疫研修会（2020年12月、三重、聴講者約100名）にて講演「高病原性鳥インフルエンザの現状と課題（迫田義博）」
- 3) 高病原性鳥インフルエンザ予防緊急対策会議（2020年12月、岐阜、聴講者約50名）にて講演「国内における鳥インフルエンザ対策の留意点－野鳥によるウイルスの伝播と養鶏場へのリスク－（迫田義博）」
- 4) 鶏病講習会（2021年2月、北海道、聴講者約200名）にて講演「今シーズンの鳥インフルエンザの情報と侵入防止対策の要点（迫田義博）」

【サブテーマ3】

- 1) 放送大学鹿児島学習センターにおける公開講演会（2018年9月9日、聴講者約50名）にて講演「動物に感染するウイルス（小澤真）」
- 2) 平成30年度日本学術会議九州・沖縄地区会議学術講演会（2018年9月10日、聴講者約50名）にて講演「南九州におけるウイルス感染症とその制御に向けた挑戦（小澤真）」
- 3) 全農畜産技術講習会（養鶏専門コース）における特別授業「鳥インフルエンザのウイルス伝播様式および出水平野における調査について（小澤真）」（2018年10月18日、聴講者約30名）
- 4) 一般公開シンポジウム「希少な鳥を守るには－野鳥の鳥インフルエンザと鉛汚染対策に向けて－」（2019年6月23日、東京、聴講者約200名）にて講演「鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境浄化技術の確立（小澤真）」
- 5) 令和元年度九州地方環境事務所第2回管内会議（2019年11月6日、聴講者約30名）における講演「鳥インフルエンザについて（小澤真）」
- 6) 令和2年度九州地方環境事務所・高病原性鳥インフルエンザオンライン研修会（2020年10月19日、聴講者約30名）における講演「鳥インフルエンザについて（小澤真）」
- 7) 日本野生動物医学会オンライン緊急シンポジウム「2020年に発生した国内におけるHPAIの現状」（2020年12月19日、聴講者約50名）にて講演「鹿児島県出水市における発生状況について（小澤真）」
- 8) 日本野生動物医学会高病原性鳥インフルエンザフォローアップシンポジウム「2020年に発生したHPAIの総括」（2021年5月29日、オンライン、聴講者約100名）にて講演「HPAIVの希少鳥類への感染状況について（小澤真）」

【サブテーマ4】

- 1) 一般公開シンポジウム「希少な鳥を守るには－野鳥の鳥インフルエンザと鉛汚染対策に向けて－」（2019年6月、東京、聴講者約200名）にて講演「鳥インフルエンザで野鳥は死ぬの死なないの？－野鳥の細胞を使った研究で分かること－（大沼学）」
- 2) 希少鳥類のゲノム解析の結果を公表するため、専用のウェブサイトを開設した。
<http://www.nies.go.jp/genome/index.html>

（4）マスコミ等への公表・報道等

【サブテーマ1】

- 1) 成果の記者発表（2021年3月10日、於環境省ホームページ、「今季（2020年10月～2021年2月）における国内の野鳥サーベイランスにおける高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝的多様性について」）

【サブテーマ2】

- 1) 朝日新聞（2018年9月29日、「週間「be」の「ののちゃんのDO科学」～鳥インフルエンザに効くワクチンや薬はないの？～」）
- 2) 北海道新聞（2020年10月31日、31頁、「鳥インフル紋別で検出 国内は2018年以来」
- 3) 北海道新聞（2020年12月28日、18頁、「インフル薬 鳥にも効果 希少鳥種保護に期待」
- 4) 成果の記者発表（2021年3月10日、於環境省ホームページ、「今季（2020年10月～2021年2月）における国内の野鳥サーベイランスにおける高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝的多様性について」）

【サブテーマ3】

- 1) 成果の記者発表（2021年3月10日、於環境省ホームページ、「今季（2020年10月～2021年2月）における国内の野鳥サーベイランスにおける高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝的多様性について」）
- 2) NHKおはよう日本（令和3年2月9日、今季の高病原性鳥インフルエンザウイルス流行株の遺伝的背景について5分ほど紹介）

【サブテーマ4】

特に記載すべき事項はない。

（5）本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文 Abstract

Establishment of countermeasures against avian influenza virus infection in endangered birds

Principal Investigator: Tsuyoshi YAMAGUCHI

Institution: Koyama-cho Minami 4-101, 680-8553, Tottori, JAPAN

Tel: +81-857-31-5487 / Fax: +81-857-31-5487

E-mail: yamaguti@tottori-u.ac.jp

Cooperated by: Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University

Biodiversity division, National Institute for Environmental Studies

[Abstract]

Key Words: Highly pathogenic avian influenza, Surveillance system, Anti-influenza virus drug, Cultured cell, Endangered bird species, Evaluation of susceptibility, Risk evaluation

This project consisted of four subthemes. In subtheme 1, we established an efficient isolation technique for highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs) from environmental water. In addition, we experimentally infected three species of wild ducks that share the habitat of endangered bird species. We found that the ducks shed the virus without any symptoms after HPAIV infection, and had the virus in multiple organs. This indicates that the ducks could be a natural source of infection for endangered species. In subtheme 2, we evaluated detection procedures for HPAIV genes and antigens, and showed that they were effective. We also evaluated the therapeutic potential of the anti-influenza drug Baloxavir marboxil using HPAIV-infected chickens and found that it had therapeutic effects. The concentration of antiviral active substance after administration of the drug was different between ducks and white-tailed eagles, indicating the need to determine the appropriate dosage for each bird species. In subtheme 3, we experimentally infected white-tailed sea eagles, an endangered species. HPAIV intranasally infected was detected systemically, and was continued to be detected in oral swabs for about a week. This indicates that infected eagles have a high potential for non-contact transmission of the virus to other individuals. We also examined whether disinfectants used in livestock farms could be used to decontaminate water but these efforts were unsuccessful. Other methods of disinfection need to be developed. In subthemes 1 and 3, many HPAIVs were isolated from environmental water samples, indicating that water could be used to monitor viruses in the environment. In subtheme 2, we isolated the first HPAIV detected in Japan in the winter of 2020-2021 in a fecal survey in Hokkaido. Our ability to isolate the virus prior to the domestic epidemic made it possible to alert poultry farms to HPAIV. In subtheme 4, we established a method to evaluate the susceptibility of endangered bird species to HPAIV infection without the need to experimentally infect live birds. The method was based on comparing the expression level of the Mx gene in cultured cells after HPAIV infection. Mx expression was found to increase significantly in avian species that are relatively

resistant to HPAIV infection, while it did not increase significantly in susceptible avian species. These results indicate that the expression of Mx may be a useful indicator of the susceptibility of each bird species to HPAIV infection.