

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

SⅡ-1-3 希少鳥類に免疫抑制を引き起こす鉛汚染の実態把握及び鳥インフルエンザ発生との関連性解明
(JPMEERF18S20130)
平成30年度～令和3年度

Understanding the present situation of lead contamination causing immunosuppression in endangered birds and elucidating the relationship with avian influenza outbreak

〈研究代表機関〉

国立研究開発法人国立環境研究所

〈研究分担機関〉

北海道大学

(株)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4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	20
II-1 生態ニッチモデリングを活用した希少鳥類鉛汚染リスク評価 （国立研究開発法人国立環境研究所）	20
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 希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な基盤技術開発 （北海道大学）	36
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 希少鳥類の鉛汚染実態把握を行うための効率的な全国サーベイランス技術の開発 （猛禽類医学研究所）	50
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 6 6

Ⅳ. 英文Abstract 7 1

I. 成果の概要

課題名 希少鳥類に免疫抑制を引き起こす鉛汚染の実態把握及び鳥インフルエンザ発生との関連解明

課題代表者名 大沼 学（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）

研究実施期間 平成30年度～令和3年度
但し、新型コロナウイルスの影響のため、令和3年度まで延長

研究経費

96,816千円（合計額）

（各年度の内訳：平成30年度：27,212千円、令和元年度：36,155千円、令和2年度：33,449千円、令和3年度：9,941千円）

研究体制

（サブテーマ1）生態ニッチモデリングを活用した希少鳥類鉛汚染リスク評価（国立環境研究所）（JPMEERF18S20106）

（サブテーマ2）希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な基盤技術開発（北海道大学）（JPMEERF18S20107）

（サブテーマ3）希少鳥類の鉛汚染実態把握を行うための効率的な全国サーベイランス技術の開発（猛禽類医学研究所）（JPMEERF18S20108）

研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 鉛、希少鳥類、猛禽類、免疫抑制、鳥インフルエンザ

1. はじめに（研究背景等）

中央環境審議会（平成28年）の、「鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律に基づく基本指針の改定に伴う答申」において「特に北海道を除く地域において鉛中毒の発生実態に関する科学的知見は十分蓄積されていない。国及び都道府県は、鳥獣の保護等に起因する鳥類の鉛の汚染の現状を科学的に把握するため、効果的なモニタリング体制を構築する。」という指摘があり、鳥類の鉛汚染の実態把握が早急に対処すべき重要な課題となった。特に、近年、高病原性鳥インフルエンザウイルス（以下、HPAIV）が断続的に確認されるような状況下にあっては、免疫抑制影響が知られる、低濃度の鉛汚染について、希少鳥類、特に猛禽類にどのようなリスクがあるのか、また、鉛汚染状況のモニタリングをいかに効率的に実施するのか、を研究的側面から明らかにする必要がある。

近年になってエジプトハゲワシやカリフォルニアコンドルなどの希少猛禽類で低濃度鉛汚染による免疫抑制などの影響が報告されるようになった。そのため、低濃度鉛汚染による免疫抑制と併せた感染症による大量死が、希少鳥類の絶滅リスクになると指摘されている。我が国の鉛汚染としては、平成9年頃から北海道においてオジロワシ等の猛禽類がシカ猟等で大量に使用されている鉛銃弾を摂取したことによる中毒症例が相次いで確認された。そのため、平成12年から北海道全域で鉛銃弾の規制が開始されている。しかし、本州以南については、水鳥の症例があった主要な水辺地域以外には鉛製銃弾の規制はされていない。そうした中、農林水産業、生態系及び生活環境に係る被害をもたらす鳥獣が増加しているため、環境省と農林水産省は「抜本的な鳥獣捕獲強化対策」（平成25年12月）として、ニホンジカとイノシシの個体数を平成35年度までに半減させる目標を設定した。現在、ニホンジカの捕獲頭

数だけでも約60万頭にのぼり、過去15年間で約4倍に増加しているが、さらなる捕獲強化が必要となっている。そのため、捕獲対策が強化されることによって、本州以南では鉛製銃弾の銃猟による捕獲は増加傾向にある。したがって、鉛は本州以南において、今後環境中への拡散が確実に増加する重金属であるといえる。

環境省の調査では、既に本州以南の猛禽類の傷病鳥獣個体の約1割から、鉛中毒症状は示さない低濃度の鉛が血液等から検出されている。また、クマタカ、オオタカ、ハヤブサ等の猛禽類から、2007年以降、断続的にHPAIVが分離されている。そのため、エジプトハゲワシやカリフォルニアコンドルなどで観察されている低濃度鉛汚染による免疫抑制が、国内に分布する猛禽類でも発生しているのか、鉛汚染とHPAIVの分離に関連性があるのかを検討する必要がある。

2. 研究開発目的

猛禽類及びその餌生物の鉛汚染を効率的に把握するサーベイランス体制の構築を行う。得られた情報を、生態ニッチモデリングや地理情報システムを活用して解析し、希少鳥類、特に猛禽類で鉛毒性が見られるリスクが高い地域を明確にする。また、猛禽類で鉛毒性、特に免疫毒性が発生するメカニズムを解明するとともに、猛禽類における鳥インフルエンザの発生と鉛暴露の高リスク地域との関連性を解析する。

3. 研究目標

全体目標	本州以南における猛禽類の鉛製銃弾等を介する鉛汚染状況の実態を把握するとともに、鉛製銃弾使用による猛禽類への直接的（特に鉛中毒の発症）および間接的なリスク（特に高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性の変化）を明らかにする。最終的には、鉛中毒や低濃度の鉛汚染が個体群に影響を与える可能性が高い地域を特定し、アウトカムとして鉛製銃弾等の使用規制を優先的に実施すべき地域について政策提言を行う。
サブテーマ1	生態ニッチモデリングを活用した希少鳥類鉛汚染リスク評価
サブテーマリーダー/所属機関	大沼学/国立研究開発法人国立環境研究所
目標	サブテーマ2とサブテーマ3の情報を統合し、鉛に対して高感受性の希少鳥類（特に猛禽類）の鉛中毒高リスク地域の可視化を行い、鉛製銃弾等の規制地域を具体的に政策提言する。また、鉛汚染高リスク地域と高病原性鳥インフルエンザ高リスク地域との関連性について評価、検討する。
サブテーマ2	希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な基盤技術開発
サブテーマリーダー/所属機関	石塚 真由美/北海道大学大学院獣医学研究院
目標	鉛の汚染源の同定方法を検討し、評価方法の妥当性を明らかにする。サブテーマ3と共同で、鳥類の鉛散弾投与試験を行い、鉛の動態や毒性の種差について評価する。猛禽類を中心とした5種の鳥類の培養細胞における鉛曝露実験を行い、鉛曝露への反応や鳥インフルエンザ抵抗因子の発現変動の種差について評価する。鉛曝露に対して高感受性と評価された種の情報をサブテーマ1へ提供する。

サブテーマ3	希少鳥類の鉛汚染実態把握を行うための効率的な全国サーベイランス技術の開発
サブテーマリーダー/所属機関	齊藤慶輔/株式会社 猛禽類医学研究所
目標	飼育下で野生鳥類の鉛散弾投与試験を実施し、鳥類において血液や糞便等が鉛汚染状況のモニタリングの指標となりうるのか評価する。希少鳥類への鉛汚染源となる狩猟動物の各種データ（狩猟数、血液や糞便などの鉛濃度）と希少鳥類の血中鉛濃度のデータを全国レベルで入手し、サブテーマ1へ情報を提供する。送信機を装着したクマタカの行動解析を進め、鉛汚染の経路と過程を推察する。

4. 研究開発内容

テーマ3全体の研究実施体制を図0.1に示した。サブテーマ①では、最初に、既存の分布情報を基にした生態ニッチモデリング法によって、希少な猛禽類の最適生息域を推定する。また、サブテーマ2, 3によって収集される、鉛汚染源に関連する各種情報（銃によるシカ、イノシシ、カモ類の捕獲数、カモ類の糞便の鉛濃度、野生鳥獣の筋肉の鉛濃度等）から、本州以南における猛禽類の鉛汚染源として重要な要因を検討する。その中で、もっとも鉛汚染源と重要な情報をGISによって可視化する。最後に、希少な猛禽類の最適生息域および鉛汚染源の分布図を統合し、希少鳥類、特に猛禽類で鉛汚染により免疫抑制等の生体影響が発生するリスクが高い地域を明確にする。さらに、その地域を高リスク地域として、鉛製銃弾等の規制地域として提案する。また、鉛汚染の高リスク地域と猛禽類における鳥インフルエンザの発生地点との関連性を評価・検討する。

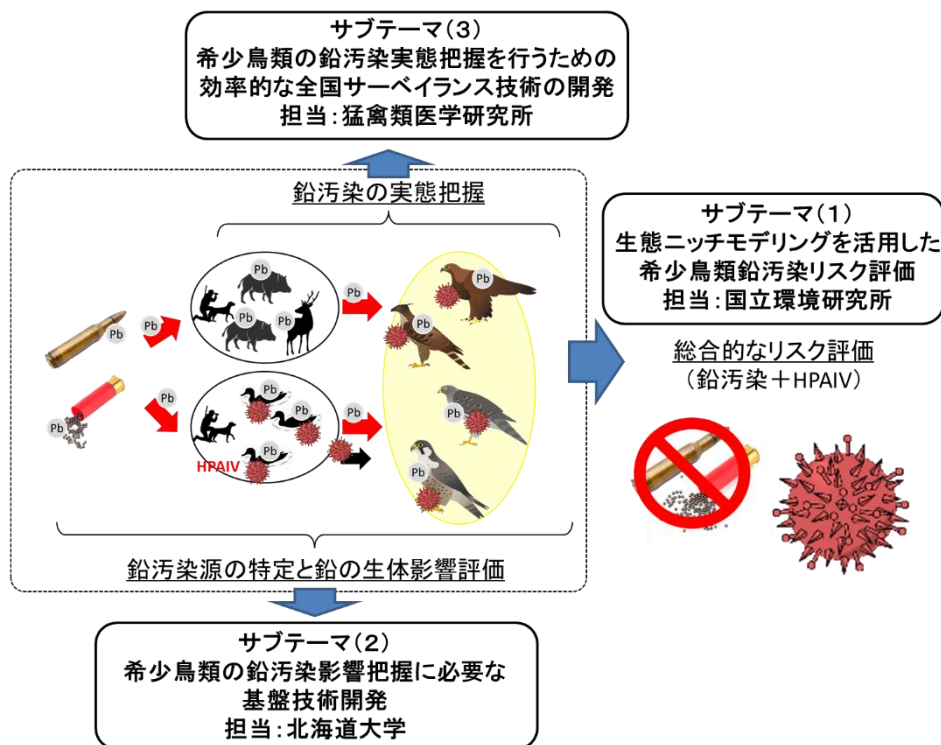


図0.1 テーマ3全体の研究実施体制

サブテーマ②では、鉛同位体や多元素解析により、鉛の汚染源の同定方法について検討する。また、モデル鳥類（カモ、トビ）に鉛散弾を投与し、体内の動態や毒性について明らかにする。さらに複数種の鳥類の培養細胞を用いて、鉛に暴露することで、免疫にどのような影響が出るのか、抗インフルエンザ遺伝子である Mx 遺伝子の発現変化について明らかにする。飼育実験及び細胞実験から得られた鉛のハイリスク鳥類種の情報をサブテーマ①に提供する。さらに、サブテーマ①および②により全国か

ら採集された鳥類種の血液、臓器、糞便の鉛濃度を分析するとともに、高濃度個体においては鉛の同位体解析により、鉛の汚染源について明らかにする。これらのデータについてはサブテーマ①および③と共有し、全国における鳥類の鉛汚染状況についての基礎データを提供する。

サブテーマ3では、希少鳥類（特に猛禽類）における鉛中毒の防止策を講じるための効率的な全国サーベイランス技術の開発に向けて、猛禽類の餌資源となる野生動物（カモ類、狩猟獣）の鉛汚染状況の把握方法について検討を行った。まず、生体捕獲したカモ類の血中鉛濃度データを効率的に収集する体制の構築を試みた。また、カモ類の糞便サンプルが鉛汚染状況の把握に利用可能であるか否かを検証した。加えて、他の狩猟対象獣の潜在的な鉛汚染状況を把握するため、ニホンジカの被弾していない臓器等を対象に鉛の定量分析を行った。その他に、実際の鉛汚染状況の把握と鉛汚染ルートの検討を行った。実際の鉛汚染状況を把握するためには、本州以南で傷病収容された猛禽類や水鳥の血液および拾得された死体を収集し、血中もしくは肝臓中の鉛濃度を定量分析した。鉛汚染ルートの解明するためには、GPS送信機をクマタカに装着し行動追跡を行い、狩猟残滓への依存度などを明らかにした。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

サブテーマ1 生態ニッチモデリングを活用した希少鳥類鉛汚染リスク評価（国立環境研究所）

1) 猛禽類の種分布予測

サブテーマ1において解析対象とする猛禽類は、①～③の理由により、イヌワシ (*Aquila chrysaetos*)、オオタカ (*Accipiter gentilis*)、クマタカ (*Nisaetus nipalensis*)、ハヤブサ (*Falco peregrinus*) とした。

- ① 本州においてイヌワシの鉛汚染事例がすでに報告されている。
- ② サブテーマ2で実施した培養細胞を活用した鉛の免疫系への影響評価の結果、ハヤブサとクマタカにおいて自然免疫に関連する遺伝子 (Mx遺伝子) の発現に鉛添加による影響が見られた。また、クマタカ、ハヤブサ、オオタカで高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染例が確認されている。
- ③ サブテーマ3で収集した猛禽類の鉛汚染状況に関する情報によると、鉛曝露あるいは鉛中毒レベルの汚染が確認されたのは、クマタカ、オオタカ、ハヤブサである。

最初に、これらの種について生態ニッチモデリング法で分布地域推定を行うため、GBIF (<https://www.gbif.org/> アクセス：2019年2月) や国土交通省の水辺の国勢調査データから分布情報を入手した。解析に供試する各種生物気候パラメーターは、WorldClim2.1 (<http://www.worldclim.org/>) よりダウンロードしたデータ (アクセス：2020年3月) をもとに計算した。土地利用データは国土交通省の平成26年度に整備された国土数値情報土地利用細分メッシュデータを利用した。各種の分布地域推定をおこなったところ、予測精度が高い分布予測図を作成することに成功した (AUC値は0.88以上) (図1.4)。

2) 狩猟統計データを活用した猛禽類の鉛汚染リスク評価

猛禽類の鉛汚染リスク評価には、銃によって実施された狩猟数のデータ (狩猟統計データ) を活用した。海外や北海道における猛禽類の鉛中毒の発生状況から、猛禽類における鉛汚染源としては鉛製銃弾が最も重要であることが判明しており、また、今回の課題で以下の①～③の結果が得られていることから、本州以南に分布する猛禽類の鉛汚染源も、狩猟残滓に残った鉛弾の破片やカモ類が保持する鉛散弾といった鉛製銃弾である可能性が高いと考えられた (図1.2)。

- ① 本州においても、北海道と同様に、狩猟残滓に猛禽類が集まっていることが確認されている。また、本州以南でも猛禽類によるカモ類の捕食が確認されている (サブテーマ3より)。
- ② 狩猟獣の鉛濃度は検出限界以下であった (サブテーマ3より)。

③ カモ類の血中鉛濃度を測定した結果、高濃度の鉛汚染が複数例確認された（サブテーマ2、3より）。また、カモ類の糞便中に含まれる鉛の由来は、主に鉛製銃弾であることを示すデータも得られた（サブテーマ2、3より）。従って、国内においても、他の地域で報告されているように、カモ類が誤って小石の代わりに鉛散弾を筋胃に取り込んでいると考えられる。

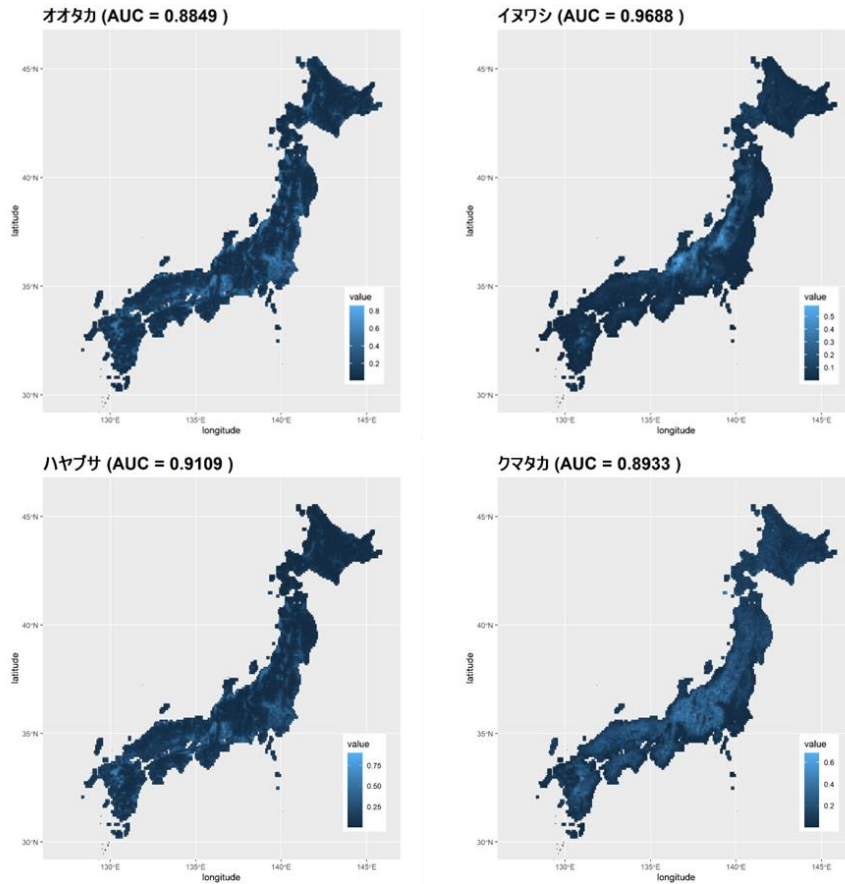


図1. 4 種分布モデル（MaxEnt）による猛禽類主要4種の国内分布推定図

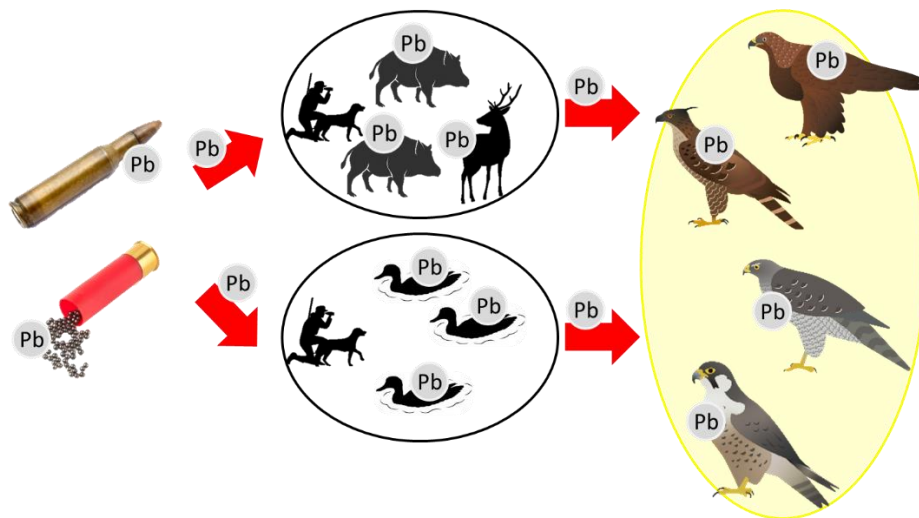


図1. 2 想定される猛禽類の鉛汚染経路

狩猟統計データは、環境省より2013年から2018年までのものを入手した。しかし、環境省より得られた狩猟統計データは、報告漏れや狩猟方法などの詳細が記載されていない都道府県が存在する。そこでまず各都道府県で狩猟方法の報告が存在するかを評価し、銃による狩猟が確認されている都道府県とそれ以外の都道府県を別けた上で、5倍メッシュ（約25km²）ごとに総狩猟数の年平均値と銃による狩猟数の年平均値を算出し、それぞれを図示した（図0. 2）。

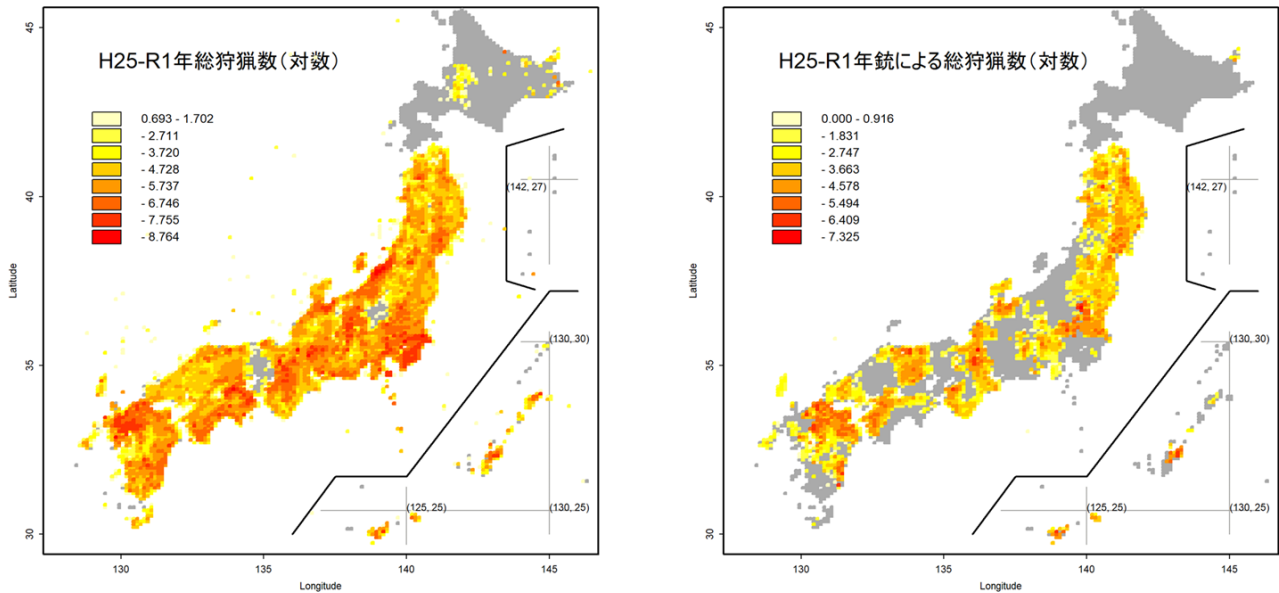


図0. 2 2013年から2018年までの全国各地の5倍メッシュ（約25km²）における年平均総狩猟数（左図）。2013年から2018年までの全国各地の5倍メッシュ（約25km²）における、銃による年平均総狩猟数（右図）。

猛禽類の鉛汚染リスクを評価するため、猛禽類4種の分布地域推定結果と銃による狩猟数の年平均値のデータを統合し、鉛汚染の「ホットスポット」を特定した（図1. 7）。それぞれの種が分布している地域で、銃による狩猟が多い地点を「ホットスポット高（赤）」、少ない地点を「ホットスポット中（オレンジ）」、銃による狩猟が無い地点を「ホットスポット低（青）」として図示した。また、猛禽類4種の分布地域推定結果と総狩猟数の年平均値のデータを統合し、「それぞれ種が分布している地域内で狩猟が行われているが、銃によるものか不明な地点」を「情報不足（黄）」として図示した。「情報不足（黄）」とされた地域でもリスクの程度は評価できないが、鉛に曝露されるリスクはある。その他に、対象となる猛禽類の分布が予測されなかった地点や狩猟データが存在しなかった地点を「鳥ナシ」もしくは「NA」として表示した。

種類別に推定分布域の中に占めるホットスポットの占める比率を計算したところ（表1. 2）、オオタカ、ハヤブサは高リスクホットスポットに分布する比率が高いことが分かった。クマタカは中〜低リスクに分布する比率が高く、イヌワシは4種の中では一番高リスクスポットに分布する比率が低かった。今回、サブテーマ3で収集した試料について鉛の濃度を定量したところ、鉛汚染のリスクが高いとされた、オオタカで鉛汚染個体1個体、ハヤブサで鉛中毒個体1個体と鉛汚染個体1個体、クマタカでも同様に鉛中毒個体1個体と鉛汚染個体1個体が実際に確認された（図3. 7）。

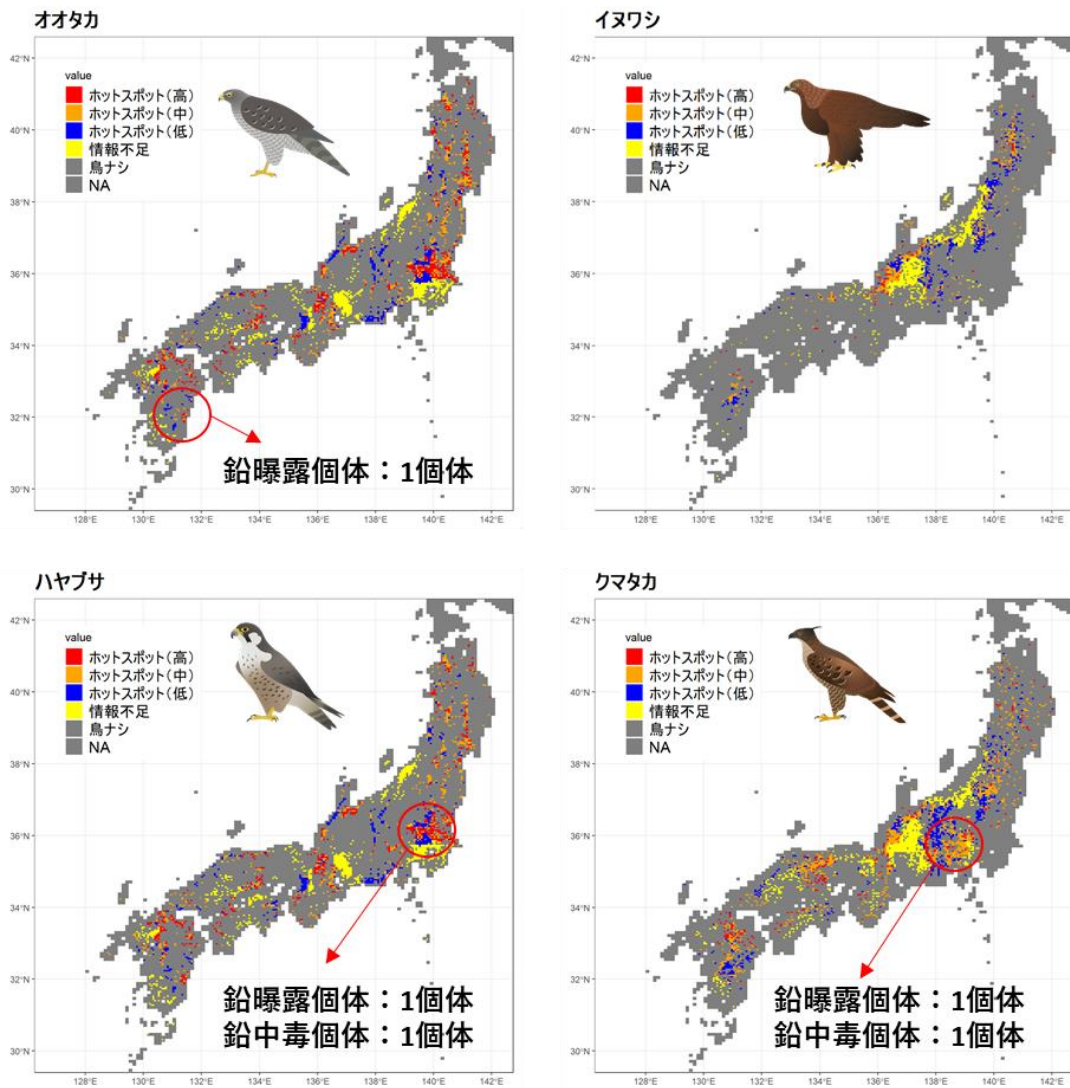
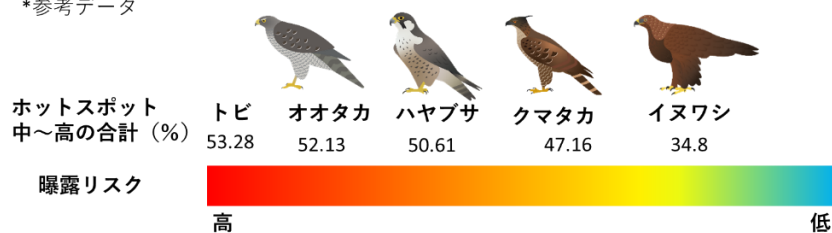


図1. 7 猛禽類4種の鉛リスク地図。表1. 2に各ホットスポットが占める比率を表記。

表1. 2 鉛リスクホットスポットが猛禽類各種分布地点に占める比率
(参考データとしてトビを追加した)

種名	ホットスポット 高(%)	ホットスポット中 (%)	ホットスポット低 (%)	情報不足 (%)
イヌワシ	4.79	30.01	27.58	37.62
クマタカ	9.34	37.82	21.34	31.50
ハヤブサ	23.74	26.87	18.58	30.82
オオタカ	23.56	28.57	17.90	29.97
トビ*	23.79	29.49	16.81	29.90

*参考データ



また、狩猟が盛んで、かつ猛禽類種数が多い地域を特定するため、4種のデータ（図1. 7）を統合した（図1. 8）。その結果、猛禽類が鉛製銃弾を介して、鉛に曝露されるリスクが特に高い地域（ホットスポット（高）～（中）が集中している地域）は、青森県西部、秋田県、岩手県西部、宮城県北部、関東北部（栃木県、茨城県、埼玉県）、富山県、滋賀県・福井県南部、岡山県南部、九州北部（福岡県、大分県）、愛媛県であることが分かった。本州以南においては、これらの地域から優先的に鉛製銃弾の使用規制を開始することで、希少な猛禽類の鉛汚染リスクを低減できると考えられた。

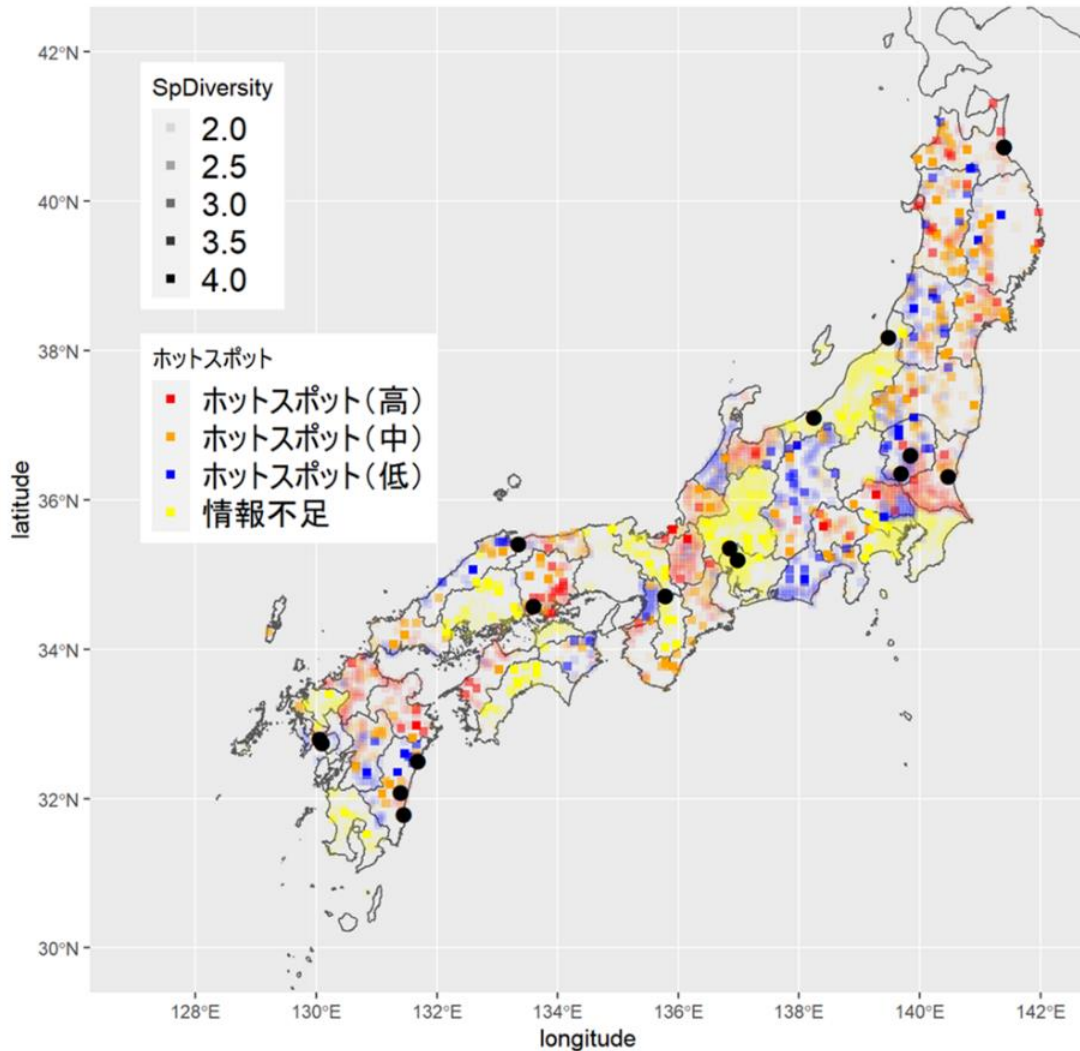


図1. 8 猛禽類鉛リスク地図、猛禽類種数が多い地点を濃い色で表示。黒丸は猛禽類でHPAI陽性が確認された地点

3) 鉛汚染高リスク地域と高病原性鳥インフルエンザ発生の関連性評価

鉛曝露量と高病原性鳥インフルエンザ（以下、HPAI）発生に関係があるかを検討するため、死亡した猛禽類からHPAIVが分離された地点における狩猟数並びに銃による狩猟数の平均が、母集団の平均より高いかを検証した。その結果、猛禽類よりHPAIVが分離された地点は16地点あり、そのうち11地点で銃による狩猟が確認された。銃による狩猟が確認された都府県での解析、北海道を除いた全都府県すべてを含んだ解析いずれの比較においても、HPAI発生地点とその周辺メッシュにおける銃による狩猟も総狩猟数も、それ以外の地点（母集団）より多いことが明らかになった。この結果から、HPAIVが死亡した猛禽類から分離された地点の周辺では、他地域と比較して、狩猟数が多く、結果として、猛禽類は鉛に曝露される機会が多かった可能性が示唆された。また、鉛曝露リスク評価結果とHPAI発生リスク評価

の結果を統合し、鉛曝露リスクを考慮した猛禽類のHPAIリスクマップを作成した。サブテーマ2において鉛曝露により免疫系の遺伝子発現が抑制されることが明らかになっているため、鉛曝露リスクを考慮したHPAIリスクマップにおいてHPAIの発生リスクが高いとされた地域（青森県太平洋側、茨城県、富山県、福井県、滋賀県、福岡県、宮崎県の平野部）では、冬季間中、特に猛禽類の死亡事例の発生の監視を強化する必要がある。

4) 野鳥細胞を用いた鉛曝露による鳥インフルエンザ感受性への影響評価

鉛曝露量と猛禽類のHPAI発生に関係があるのか検討するため、ニワトリ、ハヤブサ、クマタカの皮膚組織から樹立した培養細胞に鉛を暴露してからHPAIVに感染させた群と、HPAIVのみに感染させた群を設定し、二群間でトランスクリプトーム解析による遺伝子発現パターンの比較を行った。トランスクリプトーム解析の結果、全ての培養細胞において、鉛を添加した場合には多くの遺伝子とその機能に関係なく発現量が半減した2倍以上減少した。この中から、免疫に関連する遺伝子に着目したところ、全体の遺伝子発現量の増減と同様の傾向を示した。このことから、鉛添加によって、免疫系の遺伝子を含む遺伝子発現が全体的に抑制されることが分かった。この結果から、鉛に曝露された猛禽類は、免疫抑制状態である可能性があり、結果的にHPAIVに感染する可能性が高まる可能性が示唆された。

サブテーマ2 希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な基盤技術開発（北海道大学）

サブテーマ2では、1) 鉛の汚染源の同定方法を検討し、評価方法の妥当性を明らかにする、2) サブテーマ3と共同で、鳥類の鉛散弾投与試験を行い、鉛の動態や毒性の種差について評価する、3) 猛禽類を中心とした5種の鳥類の培養細胞における鉛曝露実験を行い、鉛曝露への反応や鳥インフルエンザ抵抗因子の発現変動の種差について評価する、4) 鉛曝露に対して高感受性と評価された種の情報をサブテーマ1へ提供する、ことを目標とした、

1) 鉛の汚染源の同定方法を検討し、評価方法の妥当性を明らかにする

①金属片への多元素解析

金属片を用いて、多元素解析による微量な含有元素の分析を行い、ライフル弾、散弾、釣り錘の判別ができるかどうかについて研究を行った（図2. 16）。Mg、Al、Ni、Cu、Zn、As、Cd、Sn、Sb、Cs、Ba、Wについて、相対標準偏差（RSD, relative standard deviation） < 10 を示した。散弾ではCs（セシウム）、ライフル・スラッグ弾ではW（タングステン）、釣り錘ではCu（銅）の含有量が比較的高い傾向を示した。従って、ライフル弾、散弾、釣り錘に含まれるセシウムやタングステンなどの微量な元素の違いにより、胃内破片の場合は、由来を同定することが可能であることが分かった。しかし、野生個体の肝臓試料においては、各曝露原因に認められた傾向は確認できず、食餌由来等による金属蓄積の個体差が、曝露原因物質の元素構成比の違いを上回っていることが推測された。

②鉛同位体比による鉛汚染源の同定

野生動物の鉛中毒の主な原因となっているのは、鉛ライフル弾、散弾、釣り錘などである。これらの鉛製品にはそれぞれ特有の鉛同位体比があることが報告されている。そこで、この同位体分析を用いて、より詳細な汚染源の特定を試みた。入手可能な鉛弾（ライフル弾、スラッグ、散弾：n=17）および釣り鉛（ナス型、ガン玉：n=14）、ICP-MSにより、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb 、 ^{208}Pb の比率を用いて鉛の由来を同定したところ、それぞれの比率により一定程度の同定は可能であった。

③フィールドにおける糞便試料への応用

全国のカモの糞便を採集し、同位体解析を行った。釣り錘、散弾、ライフル弾ではクラスターを形成し、安定同位体による糞便サンプルに含まれる鉛について、一定程度の判定が可能であることを示した。

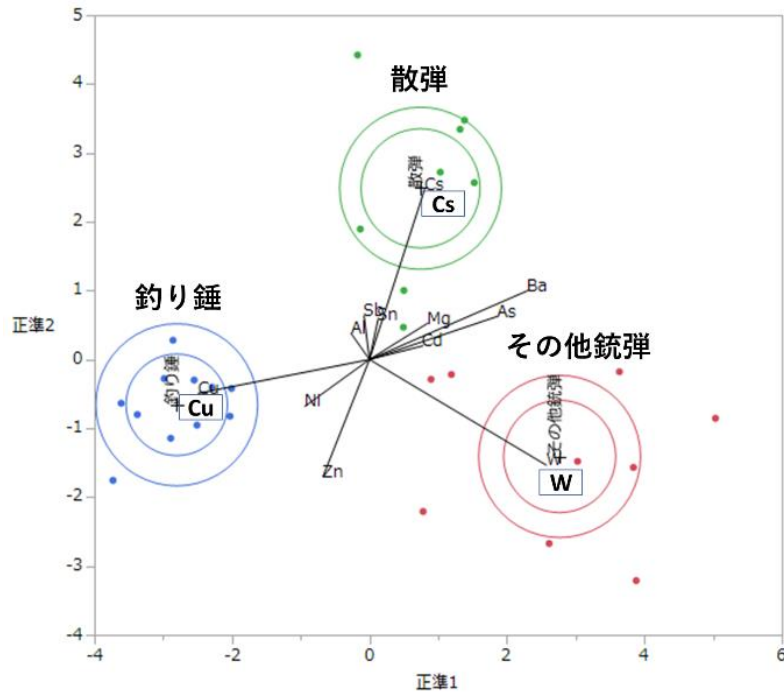


図2. 16 鉛ライフル弾、散弾、釣り錘におけるICP-MSを利用した多元素分析結果

2) 鳥類の鉛散弾投与試験を行い、鉛の動態や毒性の種差について評価

①水鳥、猛禽類の飼育実験と鉛投与による一般毒性の種差

鳥類の飼育実験として、水鳥に関してはアイガモに対する鉛投与実験を実施した。予備試験として鉛散弾3粒をアイガモ1羽に投与し、動態などの予備的データを得たのち、本実験を実施した。アイガモ8個体を対照群と鉛曝露群に分け、鉛投与実験を行った。曝露濃度に関しては、予備実験の結果を参考として決定した。曝露は鉛散弾の経口投与（単回）によりおこない、投与後1か月間、経時的に翼下静脈より採血を実施した（24, 48, 72時間後および1, 2, 3, 4週間後）。血液は鉛濃度の測定その他、鉛により活性が低下すると報告されているALAD酵素の測定や、新たな鉛曝露マーカーの探索に用いるために保存した。また、鉛は神経毒性など全身症状を引き起こすため、投与前日から最終日まで毎日行動観察および体重測定を行った。安楽死後、各臓器を採取する。採取した臓器は、マイナス80度、マイナス20度、ホルマリンなど用途に応じて保存し、遺伝子発現解析やイメージング解析、病理組織学検査などに用いるために保存した。また、北海道において特に鉛の被害が顕在化している猛禽類のモデルとして、トビに鉛散弾の投与試験を行った。猛禽類学研究所の協力を得て、トビは4個体を対照群と鉛曝露群に分け、鉛散弾1粒を投与した。いずれも環境下で実際に摂食し得る低濃度での鉛の曝露実験を行った。試料の採集についてはアイガモと同様とした。

鉛投与後、速やかに血中濃度が上昇し、その後、腎臓をはじめ、臓器への蓄積が認められた（図2. 3）。トビではカモに比べて1/3の鉛散弾を投与したにもかかわらず、血中濃度はトビの方が高い値を示した。また鉛は糞便より主に排泄されるが、トビではピーク状の輩出を示し、カモとの間に種差が認められた（図2. 4）。トビ及びカモの鉛の臓器分布には種差が認められた。血中のALAD活性に関しては、鉛投与後の速やかな低下が認められた。

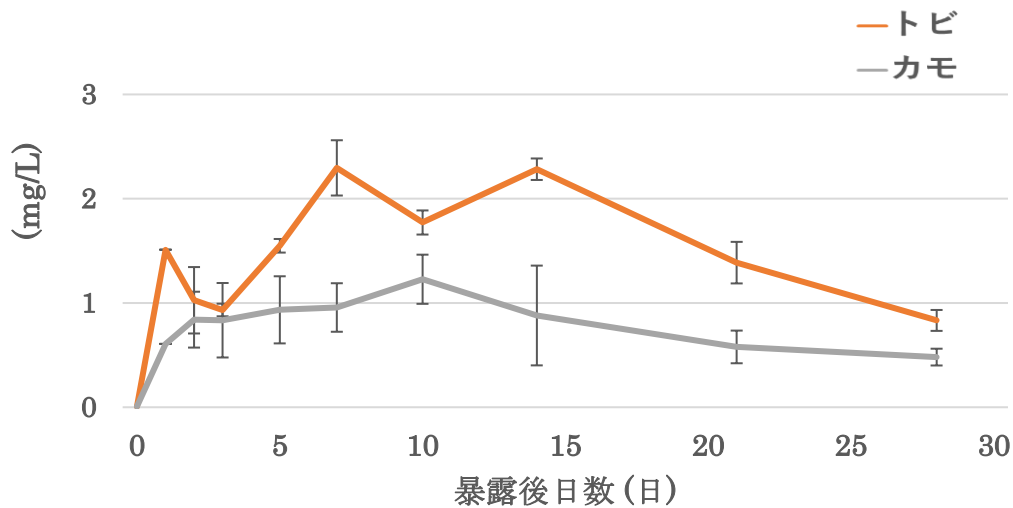


図 2. 3 鉛の血中濃度の経時的変化

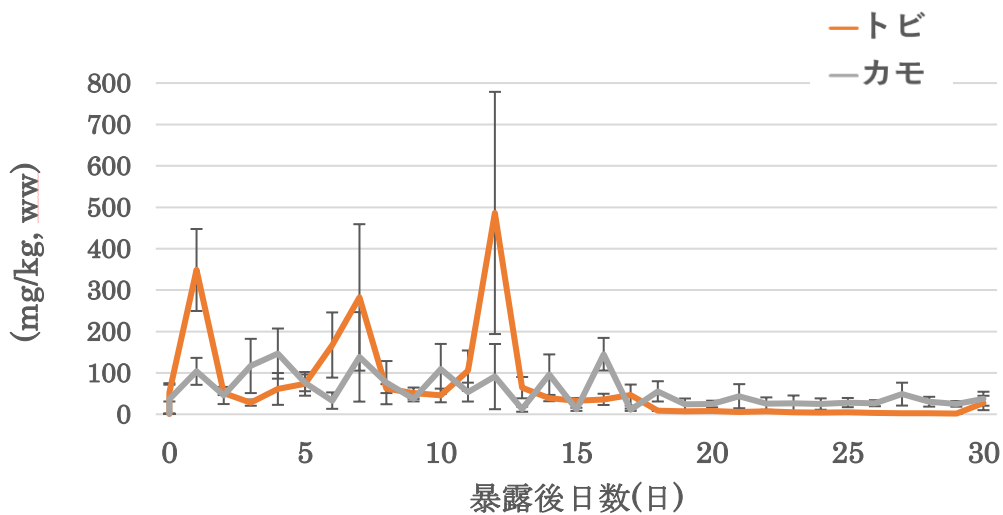


図 2. 4 鉛の糞中濃度の経時的変化

②鉛動態や局在の鳥類種差

ICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析法）、LA-ICP-MS（レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法）により、鳥類における鉛の性体内動態や局在について明らかにした。また、その種差について、水鳥と猛禽類のモデルとして、カモとトビの比較を行った。LA-ICP-MSにより、実験的に鉛に暴露されたカモとトビの臓器における鉛の局在を調べたところ、肝臓、腎臓、大腦にびまん性に蓄積した。鉛の蓄積は脾臓の赤脾髄に限定されていた。特にトビでは、肝臓と脾臓の血管壁、および大腦の過皮質、海馬、視床などの限られた部位に集中的に鉛が蓄積していることが観察された。本研究では、鉛に曝露した鳥類の臓器における鉛の局在とその鳥類間の差異を初めて明らかにした。

3) 猛禽類の培養細胞における鉛曝露実験

種々の鳥類の線維芽細胞の初代培養細胞を用いて、鉛曝露によるMx遺伝子の発現変動を調べた（図2.9）。鉛を暴露したハヤブサ、イヌワシ、クマタカ、オオタカ、ニワトリに鳥インフルエンザウイルスに感染させ、12時間後にMx遺伝子の発現量を測定した。この中で、ニワトリ、ハヤブサ、クマタカで有意なMx遺伝子の発現抑制が認められた。

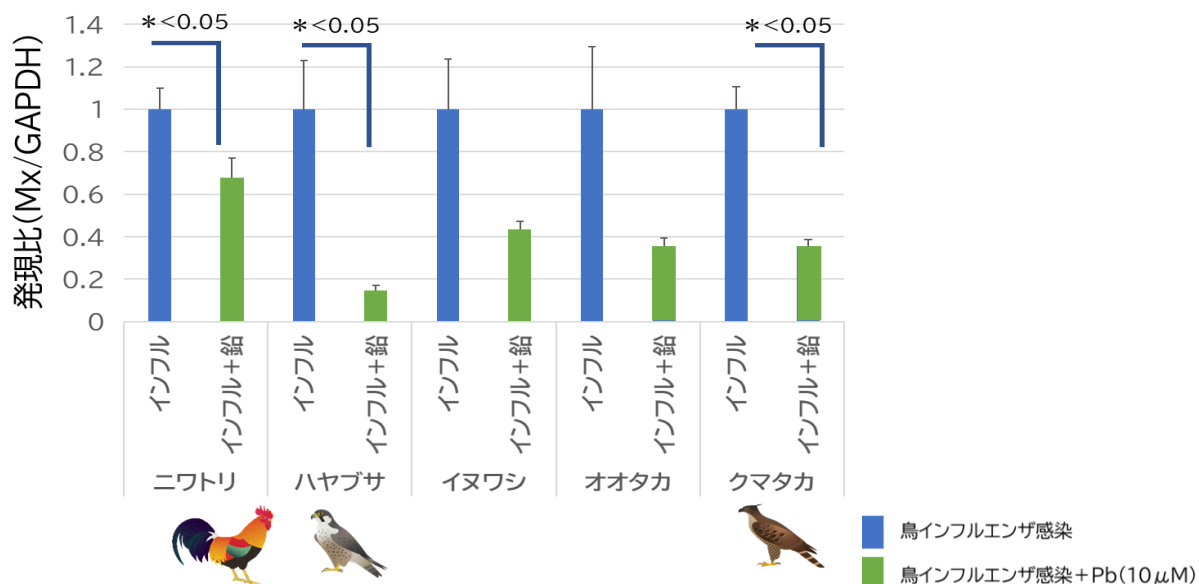


図2.9 細胞への鉛曝露によるMx遺伝子発現実験

4) 曝露に対して高感受性と評価された種の情報をサブテーマ1へ提供

猛禽類について、鳥インフルエンザウイルス感染において上昇するMx遺伝子の発現レベルが、鉛の曝露により抑制される結果について、サブテーマ1と共有した。サブテーマ1ではこのデータに基づき、鉛のハイリスク種について、フィールド情報との融合を行った。詳細はサブテーマ1で記載する。

サブテーマ3 希少鳥類の鉛汚染実態把握を行うための効率的な全国サーベイランス技術の開発 (猛禽類医学研究所)

サブテーマ3では、希少鳥類（特に猛禽類）における鉛中毒の防止策を講じるために、全国を視野に入れた効率的なサーベイランス技術の開発を、1) 餌資源となる野生動物の鉛汚染状況の把握、2) 猛禽類および水鳥における鉛中毒発生事例の把握（本州以南）、3) カモ類の糞便サンプルの鉛汚染状況調査への利用、4) 生体捕獲調査による猛禽類の鉛汚染状況および鉛汚染ルートの解明、により構成される項目別を実施した。

1) 餌資源となる野生動物の鉛汚染状況の把握

猛禽類における鉛中毒の防止策を検討する上で、自然餌資源の鉛汚染状況を把握することは重要である。猛禽類の鉛中毒の発生機序には2通りあり、ひとつは鉛散弾を誤食した水鳥などを捕食することによる食物連鎖を介したもので、もう一つは狩猟において鉛弾に被弾した獲物を採食することによるものである。

水鳥用の鉛散弾を筋胃内に蓄積する小石と誤認して飲み込み、鉛中毒になることが以前より知られているカモ類は、生態系における高次消費者の餌資源となっていることから、その鉛汚染状況の把握が不可欠である。本研究において、埼玉県と千葉県にある宮内庁鴨場において網によって捕獲されたカモ類の血中鉛濃度を測定した結果、高濃度の鉛汚染が複数例確認された。2018年と2019年は2月に調査を実施したが、鉛汚染率はそれぞれ14.6% (n=89)、17.8%(n=135)であった(表3. 2)。また、2020年11月に同様の調査を行ったところ、鉛汚染率は7.0%(n=85)に過ぎず、当地を利用する個体群の入れ替わりや越冬中に周辺環境で鉛を摂取していることが示唆された。後者については同地で捕獲したカモ類(n=6)のGPS追跡によって、捕獲地を一時的に離れて広域を移動する個体の存在が明らかになったが(図3. 5)、猛禽類などの高次消費者によって捕食されている実態も判明した(図3. 6)。カモ類を生体捕獲して血中鉛濃度を測定することにより、これまで死体や傷病個体の調査では明らかになっていなかった個体群の鉛汚染状況や季節的な汚染率の差違、鉛弾を誤食する可能性がある場所などが判明したことから、全国各地でカモ類の生体捕獲調査を行うことで、鉛中毒の発生状況や潜在的なリスク(カモを捕食する猛禽類における鉛中毒の発生リスクを含む)を把握できると思われる。

表3. 2 捕獲されたカモ類の鉛汚染状況

年.月	捕獲羽数		鉛汚染確認数		鉛汚染率
	埼玉県	千葉県	埼玉県	千葉県	
2018. 2	47	42	7	6	14.6%
2019. 2	92	43	16	8	17.8%
2020.11	26	59	0	6	7.0%
計	165	144	23	20	
	総数	309	総数	43	13.9%

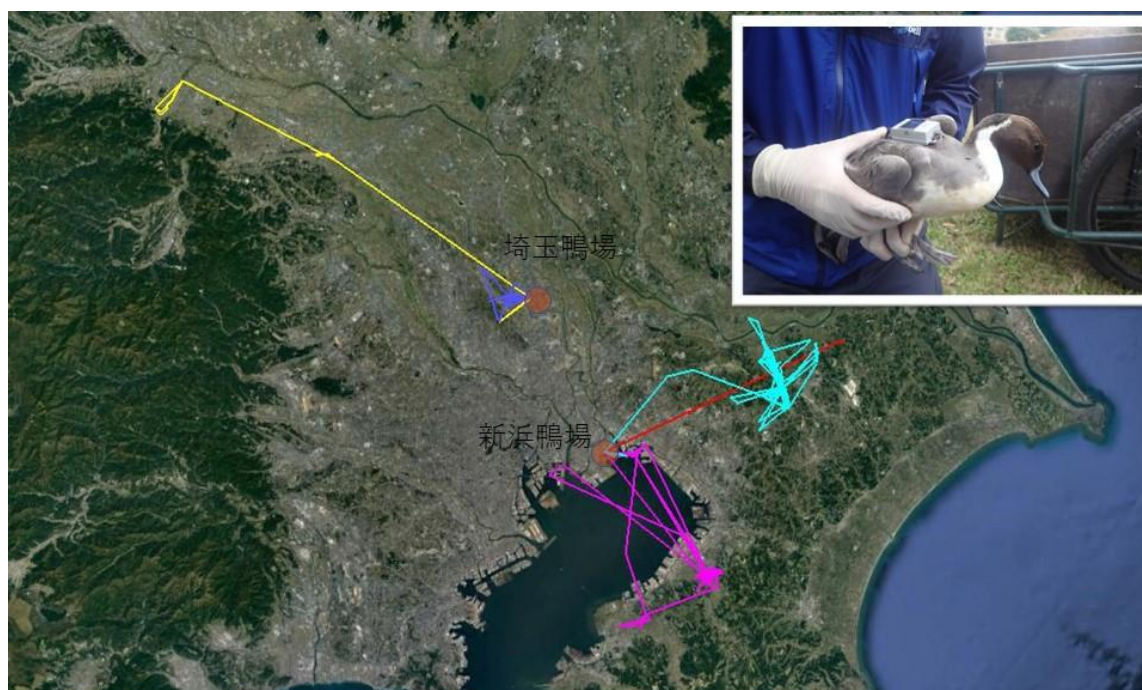


図3. 5 GPS送信機を装着したオナガガモ (*Anas acuta*) 6羽の行動軌跡



図3. 6 食痕から猛禽類に捕食されたと推察される標識鳥（円内：送信機、右下：測位位置の集中）

狩猟の対象となっているニホンジカ (*Cervus nippon*) などの大型獣が鉛弾に被弾した場合、その死体（とくに狩猟残滓）を採食することにより猛禽類が肉や内臓に混入した鉛弾を摂取し鉛中毒になる。一方、自然環境中に存在する鉛によってこれらの動物が汚染されていないかを検証することも、猛禽類の鉛中毒原因を明らかにする上で必要である。本研究では狩猟統計から狩猟実績が多数存在し、希少鳥類であるイヌワシやクマタカの生息が確認されている山梨県を対象に、食肉用に捕獲されたニホンジカについて鉛汚染状況を調査した。地元のジビエ業者からニホンジカ25頭分の肝臓サンプルを入手し鉛濃度を定量分析した結果、極めて低濃度の鉛が検出されたに過ぎず、鉛弾に被弾していない個体を採食することによって猛禽類が鉛中毒になることは否定された。また、調査の過程で全国の狩猟統計データを収集し、テーマ1に提供した。

2) 猛禽類および水鳥における鉛中毒発生事例の把握（本州以南）

本州以南において傷病収容された猛禽類や水鳥の血液、拾得された死体を収集し、血中もしくは肝臓中の鉛濃度を定量した。猛禽類65羽の血液や肝臓を分析した結果、6羽（9.2%）から高濃度の鉛が確認された。また、水鳥については28羽を調査したが、12羽（42.8%）で高濃度の鉛汚染が確認されたが（図3. 7）、分析に供したサンプルの種、採取地、季節、検体数などが結果に大きく影響している可能性もあり、今後さらに充実したサンプル収集体制を構築できるように、より多くの組織や機関との協力を築く事が重要である。とくに死体については、環境省が地方公共団体の協力を得て実施している全国を対象としたHPAIのモニタリング調査において、極めて多数が拾得されていることが明らかになっているものの、都道府県の担当部局に冷蔵・冷凍庫などの一時的な保管場所が無いことなどから本来目的以外の調査にも有効活用されているとはいいたい。今後、検体の一時保管場所を提供・整備するなど、全国からのサンプル収集体制の充実化を図ることで、効率の良い鉛中毒の実態把握に繋がれると期待される。

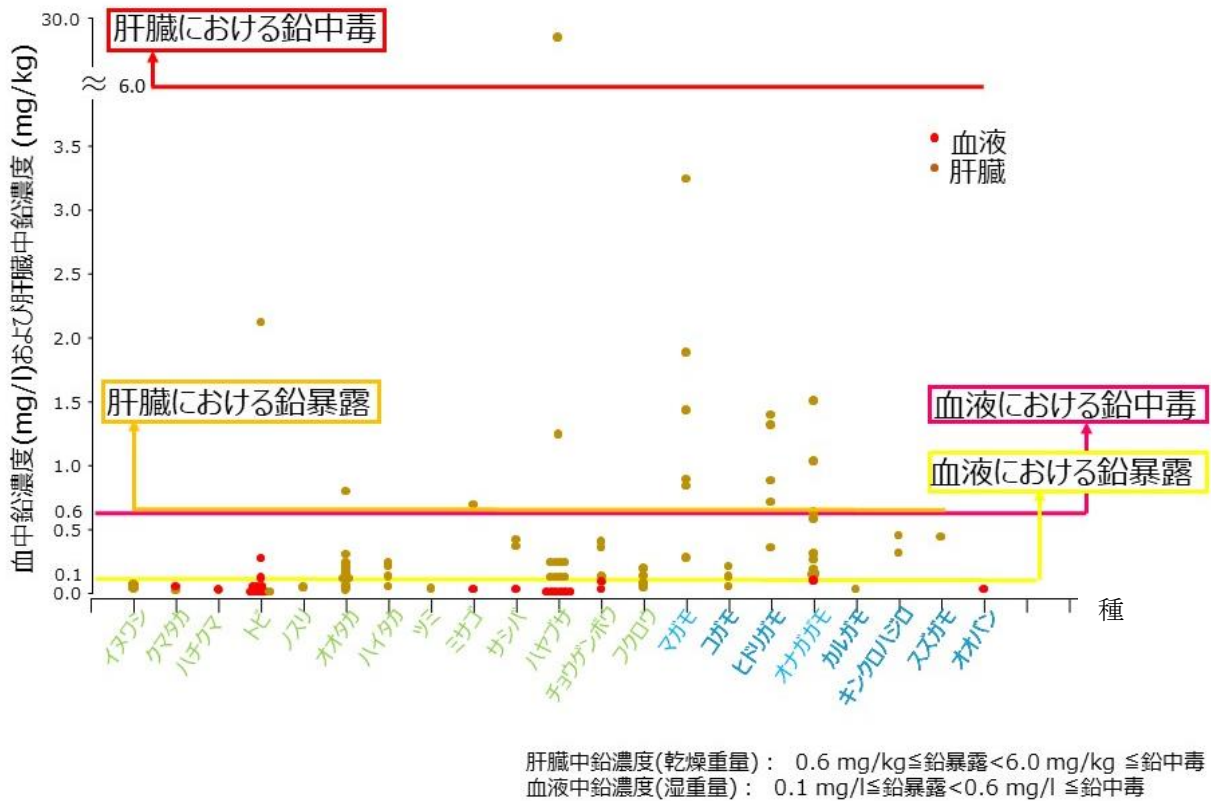


図3. 7 全国から収集した猛禽類および水鳥の血中および肝臓中鉛濃度（血液：湿重量、肝臓：乾燥重量）

3) カモ類の糞便サンプルの鉛汚染状況調査への利用

HPAI発生状況のモニタリングのため、環境省により全国で収集されている水鳥の糞便サンプルを、鉛汚染状況の把握に利用することが可能であるか否かを検証した。全47都道府県のサンプルを各所10～20程度を抽出し、2017年度500検体（参考として北海道の東西部で採取されたもの各5検体を含む）、2018年度523検体、2019年度531検体を用いて鉛濃度を測定した。サブテーマ2で実施した鉛投与実験の結果、投与後30日後に採取した糞便中に含まれる鉛の濃度の平均値が38mg/kgであること、測定した糞便を採取した時期が猟期開始から1ヶ月以上経過した1～2月であることを考慮し、30mg/kgを正常値と異常値を隔てるカットオフ値に設定した。この値以上となる検体は3年度の合計で43サンプル、26地点となった（図3. 8）。高濃度の鉛を排泄していた個体は、鉛に汚染されていたと推察された。そのため、特に高濃度の鉛が検出された13検体をサブテーマ2に提供し、今回開発した同位体比による鉛の由来判定を実施した（濃度27.69～856.08mg/kg）。その結果、13検体中11検体が鉛製銃弾による鉛が糞便中に含まれていることが明らかとなった。また、高濃度の鉛が検出されたサンプルの採取地点を見ると、日本列島の南北に渡って広く分布しており、複数年度において高い鉛濃度の糞便が確認された地域も複数存在した（図3. 9）。カモ類の多くは渡り鳥であり、複数の都道府県を經由して行き来している。このため、高濃度の鉛が検出された糞便の採取地が必ずしも鉛を摂食した地域とは限らず、他の場所で鉛に汚染された個体が別の場所で鉛中毒死する可能性もある。このため、カモ類における鉛中毒を根絶するためには、渡りのルート上に位置すると思われる地域をすべて鉛散弾の規制対象地域とする必要があることが裏付けられた。本調査で得られた各種の情報はテーマ1に提供した。

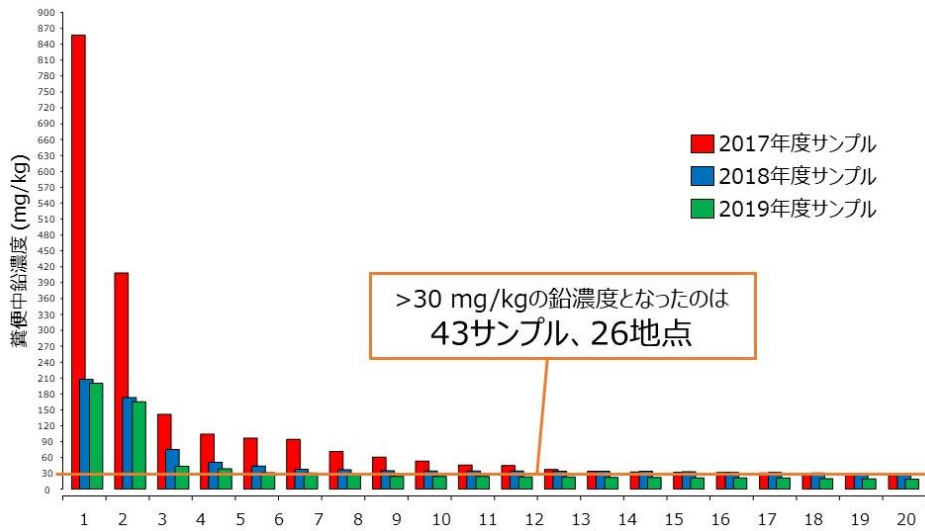


図 3. 8 高濃度の鉛が検出された糞便サンプル（上位20検体） 濃度順位

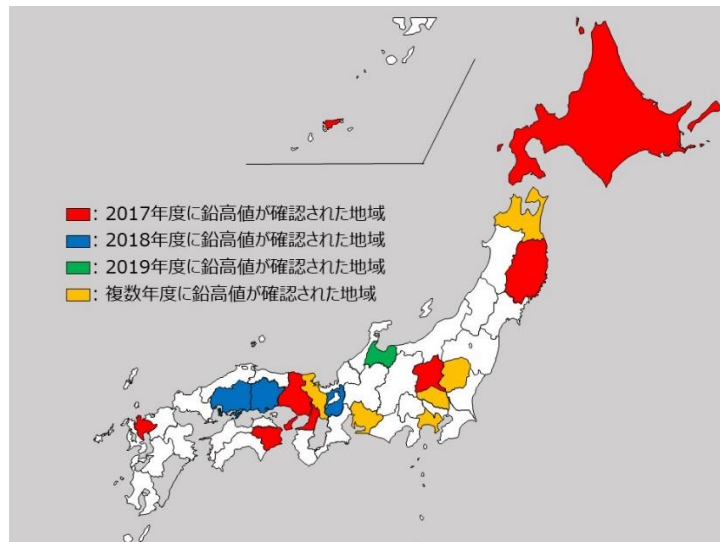


図 3. 9 高濃度の鉛がカモ類の糞便から確認された地域

4) 生体捕獲調査による猛禽類の鉛汚染状況および鉛汚染ルートの解明

北海道で多数の鉛中毒が確認され、狩猟残滓への嗜好性が高いクマタカを対象に、同種の生体捕獲を実施して鉛汚染状況の把握を試みた。調査地は同種が狩猟残滓を採食していることが確認されている山梨県を選定した。捕獲したクマタカの血中鉛濃度を測定した結果、2019年1月に捕獲したクマタカ2羽のうち1羽は血中鉛濃度が極めて高く、急性鉛中毒であると診断されALAD活性の低下が確認された。また、2019年12月と2020年1月に同地でクマタカ計4羽を捕獲したところ、うち1羽で血中鉛濃度が高濃度鉛暴露レベルであることが確認された。本個体は地元の動物病院の協力を得て鉛中毒の治療を試みたが数日後に落鳥した（表 3. 8）。同年の調査では、放鳥した2羽にGPS送信機を装着して鉛汚染ルートの解明を試みたが、クマタカが高頻度に利用していた環境やその利用状況を確認したところ、亜成鳥一羽が河川敷に放置された狩猟残滓を採食していたことが示唆された（図 3. 12）。捕獲作業の過程で同一のクマタカ（複数羽）が度々誘引用のシカの死体を食べて来ていたこと、翌年に同一個体が捕獲されたこと、道内での捕獲調査結果などから、クマタカの狩猟残滓に対する嗜好性や依存度が高いことが示

唆された。猛禽類についても、死体や傷病個体のモニタリングに加えて、生体捕獲調査と行動追跡を全国各地で行うことにより、鉛汚染の実態や潜在的なリスクを把握できると思われた。

表 3. 8 クマタカを対象にした生体捕獲調査の実績

リング#	齢	捕獲日	捕獲地	血中鉛濃度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	備考
14C0989	幼鳥	2019年1月13日	山梨県A地点	2.0	
14C0990	成鳥	2019年1月18日	山梨県A地点	High	治療後、ロガーを装着し放鳥
14C0994	成鳥	2019年12月5日	山梨県A地点	9.0	GPS送信機装着
14C0989	亜成鳥	2019年12月6日	山梨県A地点	Low	GPS送信機装着
14C0997	成鳥	2020年1月16日	山梨県B地点	5.9	
未標識	成鳥	2020年1月16日	山梨県B地点	40.7	1月21日落鳥

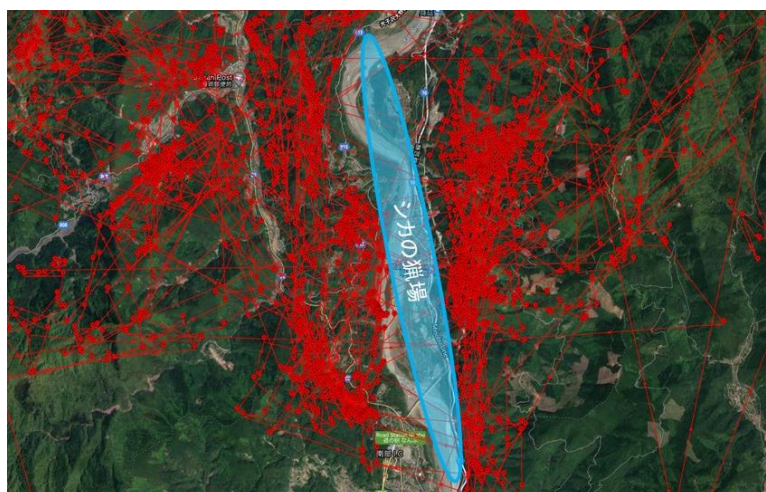


図 3. 1 2 クマタカ亜成鳥の行動軌跡とシカの猟場との位置関係

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

- 1) 全国の猛禽類やカモ類の臓器等に蓄積する鉛濃度を分析し、北海道だけではなく、本州にも鉛中毒個体が発生していることを明らかにした。これらの結果は、2025年度から鉛弾の使用を段階的に規制し、2030年度までに野生鳥類の鉛中毒ゼロを目指す方針を環境省が表明する際の根拠資料として活用された（2021年9月10日発表）。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

- 1) 鉛濃度の分析機器であるLeadCareについて、ICP-MSとの比較を行い、その精度について明らかにし報告した。
- 2) 鉛の免疫抑制が鳥類でも起こっていることを示唆するデータを提供した。
- 3) 鉛弾の規制を優先的に進めるべき地域を明確にした。

5-3. 研究目標の達成状況

全体目標を達成するため、サブテーマ1で、サブテーマ2とサブテーマ3の情報を統合し、以下の成果を挙げた。

- ① 猛禽類の鉛曝露リスクが高い地域を具体的に図示した（図1. 8）。
- ② HPAIVが死亡した猛禽類から分離された地点の周辺では、他地域と比較して、狩猟数が多く、結果として、猛禽類は鉛に曝露される機会が多かった可能性を示した（図1. 9）。
- ③ 猛禽類の培養細胞を利用し、鉛曝露によって免疫系の遺伝子発現が抑制傾向を示すことを明らかにした（図1. 11、図1. 12）。これは、鳥類が鉛曝露によって免疫系が抑制されることを遺伝子発現レベルで証明した初の報告である。

以上の成果から、今回掲げた全体目標を全て達成することができたと判断した。特に、鉛曝露による免疫抑制を遺伝子発現レベルで証明した点は、設定した目標以上の成果である。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

7件

<主な査読付き論文>

- 1) Nakata H, Nakayama SMM, Yabe J, Muzandu K, Toyomaki H, Yohannes YB, Kataba A, Zyambo G, Ikenaka Y, Choongo K, Ishizuka M. Assessment of LeadCare® II analysis for testing of a wide range of blood lead levels in comparison with ICP-MS analysis. *Chemosphere*. 129832 (2021) (IF:7.086) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129832
- 2) Ryouta Torimoto, Chihiro Ishii, Hiroshi Sato, Keisuke Saito, Yukiko Watanabe, Kohei Ogasawara, Ayano Kubota, Takehisa Matsukawa, Kazuhito Yokoyama, Atsushi Kobayashi*, Takashi Kimura, Shouta M. M. Nakayama, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka. Analysis of lead distribution in avian organs by LA-ICP-MS: study of experimentally lead-exposed ducks and kites. *Environmental Pollution*. 117086 (2021) (IF:8.071) DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117086
- 3) Ushine N, Nakayama SMM, Ishizuka M, Sato T, Kurahashi Y, Wakayama E, Sugiura N, Hayama S. Relationship between blood test values and blood lead (Pb) levels in Black-headed gull (*Chroicocephalus ridibundus*: Laridae) *J. Vet. Med. Sci.* 82(8):1124-1129 (2020) (IF: 1.267)
- 4) Ishii C, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Kuritani T, Nakagawa M, Saito K, Watanabe Y, Ogasawara K, Onuma M, Haga A, Ishizuka M. Current situation regarding lead exposure in birds in Japan (2015-2018); lead exposure is still occurring. *J. Vet. Med. Sci.* 82(8):1118 -1123 (2020) (IF: 1.267)
- 5) Togao M, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Mizukawa H, Makino Y, Kubota A, Matsukawa T, Yokoyama K, Hirata T, Ishizuka M. Bioimaging of Pb and STIM1 in mice liver, kidney and brain using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) and immunohistochemistry. *Chemosphere*. 238:124581 (2020) (IF:7.086) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124581

- 6) Ishii C, Nakayama SMM, Kataba A, Ikenaka Y, Saito K, Watanabe Y, Makino Y, Matsukawa T, Kubota A, Yokoyama K, Mizukawa H, Hirata T, Ishizuka M. Characterization and imaging of lead distribution in bones of lead-exposed birds by ICP-MS and LA-ICP-MS. *Chemosphere*, 212: 994-1001 (2018) (IF: 7.086) DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.149>
- 7) Ishii C, Ikenaka Y, Ichii O, Nakayama SMM, Nishimura S, Ohashi T, Tanaka M, Mizukawa H, Ishizuka M. A glycomics approach to discover novel renal biomarkers in birds by administration of cisplatin and diclofenac to chickens. *Poultry Science*. pey016 (2018) (IF: 3.196) DOI:10.3382/ps/pey016

6-2. 知的財産権

なし。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	1件
その他誌上発表（査読なし）	0件
口頭発表（学会等）	20件
「国民との科学・技術対話」の実施	7件
マスコミ等への公表・報道等	2件
本研究に関連する受賞	2件

7. 国際共同研究等の状況

鉛の分析方法や毒性影響の解析に関してはザンビア大学と共同研究を実施している。

8. 研究者略歴

研究代表者：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

研究分担者：

石塚 真由美

北海道大学獣医学部卒業、獣医学博士、現在北海道大学大学院獣医学研究院教授

齊藤 慶輔

日本獣医生命科学大学獣医学部卒業、獣医師、現在株式会社猛禽類医学研究所代表取締役

II. 成果の詳細

II-1 生態ニッチモデリングを活用した希少鳥類鉛汚染リスク評価

国立研究開発法人国立環境研究所

生物多様性領域	生態リスク対策評価対策研究室	大沼 学
生物多様性領域	生態リスク対策評価対策研究室	研究協力者 池上 真木彦

【要旨】

希少鳥類である猛禽類4種（イヌワシ、オオタカ、クマタカ、ハヤブサ）の生息適地を生態ニッチモデルによって推測したところ、オオタカとハヤブサは日本全土の平地の人里に分布する一方、イヌワシとクマタカは主に山地に分布することが示された。狩猟統計データから鉛曝露リスクを推定したところ、オオタカとハヤブサの分布予測地域である平地里山における狩猟が多いためこの2種の鉛曝露リスクが高いことが示された一方、イヌワシやクマタカの分布予測地域である山地では狩猟が比較的限られ、鉛曝露リスクは相対的に低いことが示された。銃による狩猟が多く、猛禽類種数が多い場所（ホットスポット）として、宮城県北部、関東北部（栃木茨城埼玉）、富山県、滋賀・福井南部、岡山南部、九州北部（福岡大分）、愛媛が挙げられるが、狩猟統計で狩猟方法が抜けているなど情報不足の自治体も多く存在するため、狩猟実態の把握が急務であることが示唆された。猛禽類でHPAIが発生した地点とそれ以外の地点の間で狩猟数・銃による狩猟数を比較したところ、HPAIが発生した地点の方が狩猟数も銃による狩猟数も多いことが判明した。しかしながら、これは狩猟数が多い場所ほど人が多く入り、HPAIによって死亡した野鳥を見つける機会が高いためなのか、それとも鉛曝露によりHPAIでの死亡率が増加したかの区別はつかなかった。今後HPAI検査で陰性だった地点のデータを考慮するなどする必要がある。HPAIと鉛曝露リスクがともに高い都道府県として、青森県太平洋側、茨城県、富山県、福井県、滋賀県、福岡県、宮崎県が挙げられた。

1. 研究開発目的

ニホンジカやイノシシの分布範囲そして個体数は近年増加傾向にあり、環境省と農林水産省はニホンジカとイノシシの個体数を2023年度までに半減させる目標を設定している。捕獲対策が強化されることによって、本州以南では鉛製銃弾による捕獲は増加傾向にあり、鉛は本州以南において環境中への拡散が今後確実に増加する重金属だと考えられている。高濃度の鉛曝露は多くの脊椎動物で中毒症状を起こすが、中毒症状をおこさない低濃度であっても鳥類などでは免疫抑制影響があることが知られ、感染症による猛禽類など希少鳥類の死亡率増大と絶滅リスクに繋がるのではないかと危惧されている。環境省の調査によると、本州以南の猛禽類の傷病鳥獣個体の約1割から中毒症状は示さない低濃度の鉛が血液等から検出されている。その一方で、一部鳥類への高い死亡率を示すことで知られるHPAIV（HPAI）がクマタカ、オオタカ、ハヤブサ等の猛禽類の死亡個体から断続的に分離されており、鉛曝露によるHPAI死亡率増大の危険性が指摘されている。そこで本サブテーマでは、狩猟統計を用いて猛禽類分布範囲内における鉛曝露リスクを算定し、HPAIとの関係を探ることを目的とする。本州以南における猛禽類の鉛製銃弾等を介する鉛汚染状況の実態を把握するためには、まず猛禽類の国内分布データを収集整理する必要がある。しかしながら、猛禽類分布データの多くは調査不足などからその種本来の分布域すべてを表すわけではないため、リスク分析には分布している可能性がある地域を生態ニッチモデルなどにより推定する必要がある。次に猛禽類への鉛曝露リスク地域を特定するため、鉛製銃弾使用量が多いと考えられる地域を算出し、鉛製銃弾を使用することによる猛禽類への鉛曝露リスクを計算する。そして猛禽類におけるHPAIの発生と鉛曝露の高リスク地域との関連性を評価し、猛禽類のHPAI発生に鉛曝露が影響を与えているのか明らかにする。その結果に基づき、鉛中毒や低濃度の鉛曝露が個体群に影響を与える可能性が高い地域を特定し、優先的に鉛製銃弾等の規制を実施すべき地域を提案する。

2. 研究目標

サブテーマ2とサブテーマ3の情報を統合し、鉛に対して高感受性の希少鳥類（特に猛禽類）の鉛中毒高リスク地域の可視化を行い、鉛製銃弾等の規制地域を具体的に政策提言する。また、鉛曝露高リスク地域とHPAI高リスク地域との関連性について評価、検討する。

3. 研究開発内容

1) 猛禽類の種分布予測

サブテーマ1において解析対象とする猛禽類は、①～③の理由により、イヌワシ (*Aquila chrysaetos*)、オオタカ (*Accipiter gentilis*)、クマタカ (*Nisaetus nipalensis*)、ハヤブサ (*Falco peregrinus*) とした。

- ① 本州においてイヌワシの鉛汚染事例がすでに報告されている。
- ② サブテーマ2で実施した培養細胞を活用した鉛の免疫系への影響評価の結果、ハヤブサとクマタカにおいて自然免疫に関連する遺伝子 (Mx遺伝子) の発現に鉛添加による影響が見られた。また、クマタカ、ハヤブサ、オオタカで高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染例が確認されている。
- ③ サブテーマ3で収集した猛禽類の鉛汚染状況に関する情報によると、鉛曝露あるいは鉛中毒レベルの汚染が確認されたのは、クマタカ、オオタカ、ハヤブサである。

これらの種の分布情報は、環境省のデータや各地の博物館等の情報が統合されたGBIFのデータを手し (<https://www.gbif.org/> アクセス：2019年2月)、さらに国土交通省の水辺の国勢調査データを手し利用した (図1. 1)。分布概況は、イヌワシとクマタカは山間部に、ハヤブサとオオタカは平野部に多く分布することが示された。概ね既知の分布地点をカバーしていると考えられるが、生物多様性調査第3回で確認されている岩手県太平洋側のデータなどが含まれていなかった。しかしながら、当該地域をカバーする分布データが入手できなかったため本解析ではこの分布データを用いてニッチモデル開発を進めた。

ニッチモデリングに供試する気候データとして、月ごとの平均最高気温、平均最低気温、降水量の値をWorldClim2.1 (<http://www.worldclim.org/>) よりダウンロードし (アクセス：2020年3月)、各種生物気候パラメーター (年最低気温、年最高気温、最寒3ヶ月の降水量、最暖3ヶ月の降水量、降水量の変動率) の計算と整備を行った¹⁾。土地利用データは国土交通省の平成26年度に整備された国土数値情報土地利用細分メッシュデータを利用した

(<https://nlftp.mlit.go.jp/ksj/gml/datalist/KsjTmplt-L03-b.html> アクセス：2018年11月)。土地利用データは全国の土地利用状況を3次メッシュの1/10細分区画毎に、水田、他の農用地、森林、荒地、建物用地、幹線交通用地、湖沼、河川等に区分し整備したものであり、ここでは各区分、1 km² の比率を求め各地点の土地利用パラメーターとして整備を行った。種分布予測には、生態ニッチモデルの一種、MaxEntと呼ばれる無料ソフトを利用した²⁾。生態ニッチモデルとは、対象とする種の分布情報と分布地点の気候や植生などの環境情報の関係を統計的に推測し、生息確率を推定する手法であり³⁾、元となる統計推定の手法に応じたさまざまなモデルが提案されている。MaxEntは最大エントロピーモデル (Maximum Entropy model) と呼ばれる機械学習の手法を用いた生態ニッチモデルの一種であり、不在データが不要でサンプルサイズが小さくても実行可能であり、高精度で分布予測が可能なことから多くの研究で利用されている。生態ニッチモデルはある生物が任意の地点で存在するかしないのかを統計的に判定する。その判定結果を実際の分布と比較する際、予測は「偽陽性 (本来分布しないのに分布すると判定) ・真陽性 (本来分布し、かつ分布すると判定) ・偽陰性 (本来分布するのに分布しないと判定) ・真陰性 (本来分布せず、かつ分布しないと判定)」の4つに別けられる。生態ニッチモデルの精度判定には、いくつかの手法が存在するが、不在データが存在しない場合にはAUC (Area Under the Curve) と呼ばれる手法で評価するのが一般的であり、MaxEntでも標準で装備されている。AUCはROC曲線 (Receiver Operating Characteristic) とよばれる、横軸に偽陽性率 (本来分布しないのに分布

すると判定する率)、縦軸に敏感度(実際の分布地点を分布していると予測する率)をプロットした曲線の下の部分の面積を表す。ROC曲線は陰性と陽性を区別する閾値を大から小へと変化させることで描かれるため、AUCの値が1に近いほど、モデルは対象となる種の存在を正確に判別することができ、0.5の時はランダムな予測であることを示している。本研究では分布データのうち、70%を用いてMaxEntで予測モデルを作成し、残り30%でモデルを検証する作業を10回繰り返し、予測モデル10回の平均を取ったものを猛禽各種の分布予測図として利用した。

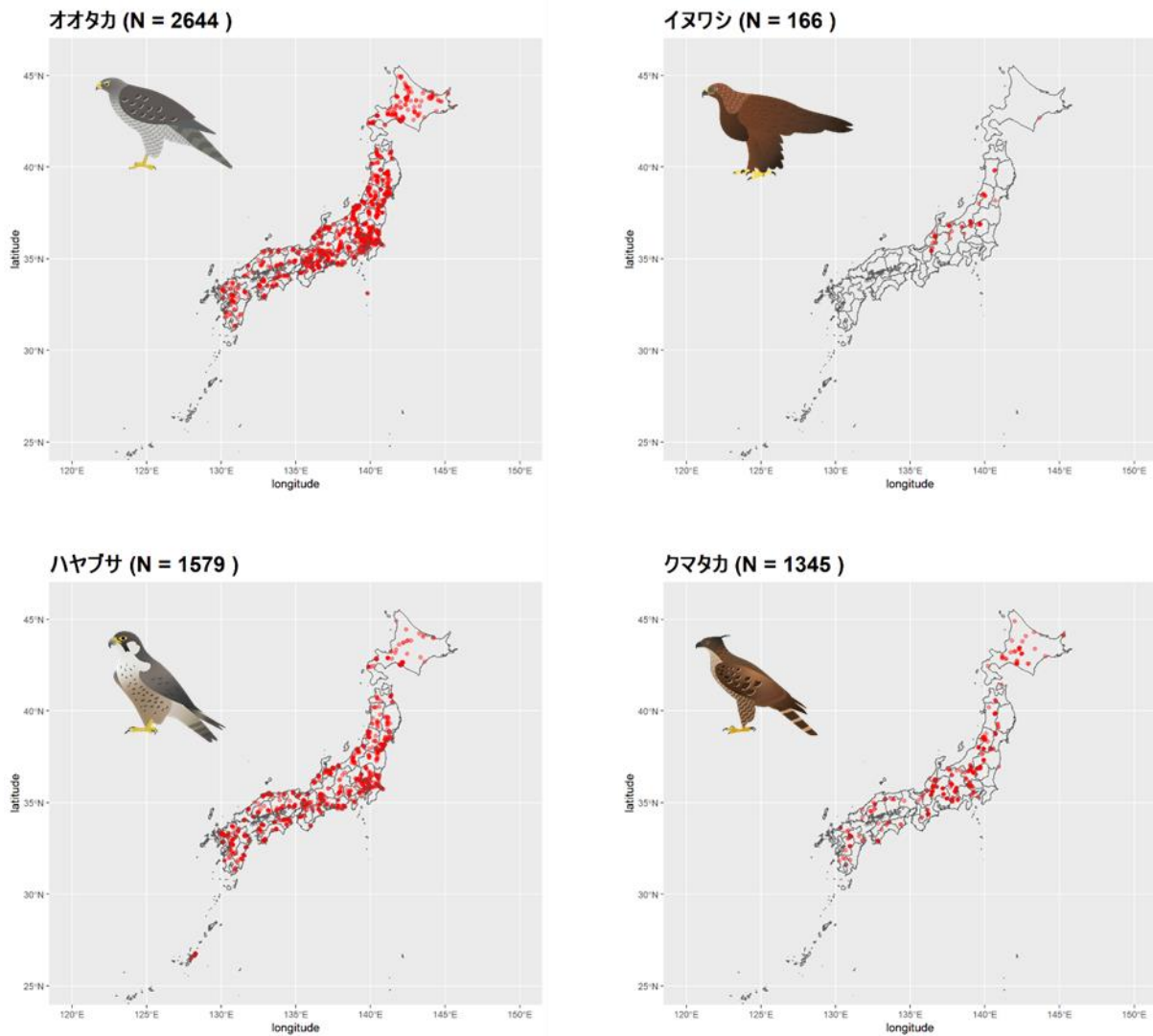


図1. 1 猛禽類4種の国内分布図

2) 狩猟統計データを活用した猛禽類の鉛曝露リスク評価

猛禽類の鉛汚染リスク評価には、銃によって実施された狩猟数のデータ(狩猟統計データ)を活用した。海外や北海道における猛禽類の鉛中毒の発生状況から、猛禽類における鉛汚染源としては鉛製銃弾が最も重要であることが判明しており、また、今回の課題で以下の①～③の結果が得られていることから、本州以南に分布する猛禽類の鉛汚染源も、狩猟残滓に残った鉛弾の破片やカモ類が保持する鉛散弾といった鉛製銃弾である可能性が高いと考えられた(図1. 2)。

- ① 本州においても、北海道と同様に、狩猟残滓に猛禽類が集まっていることが確認されている。また、本州以南でも猛禽類によるカモ類の捕食が確認されている(サブテーマ3より)。
- ② 狩猟獣の鉛濃度は検出限界以下であった(サブテーマ3より)。

③ カモ類の血中および臓器中の鉛濃度を測定した結果、高濃度の鉛汚染が複数例確認された（サブテーマ2、3より）。また、カモ類の糞便中に含まれる鉛の由来は、主に鉛製銃弾であることを示すデータも得られた（サブテーマ2、3より）。従って、国内においても、他の地域で報告されているように、カモ類が誤って小石の代わりに鉛散弾を筋胃に取り込んでいると考えられる。

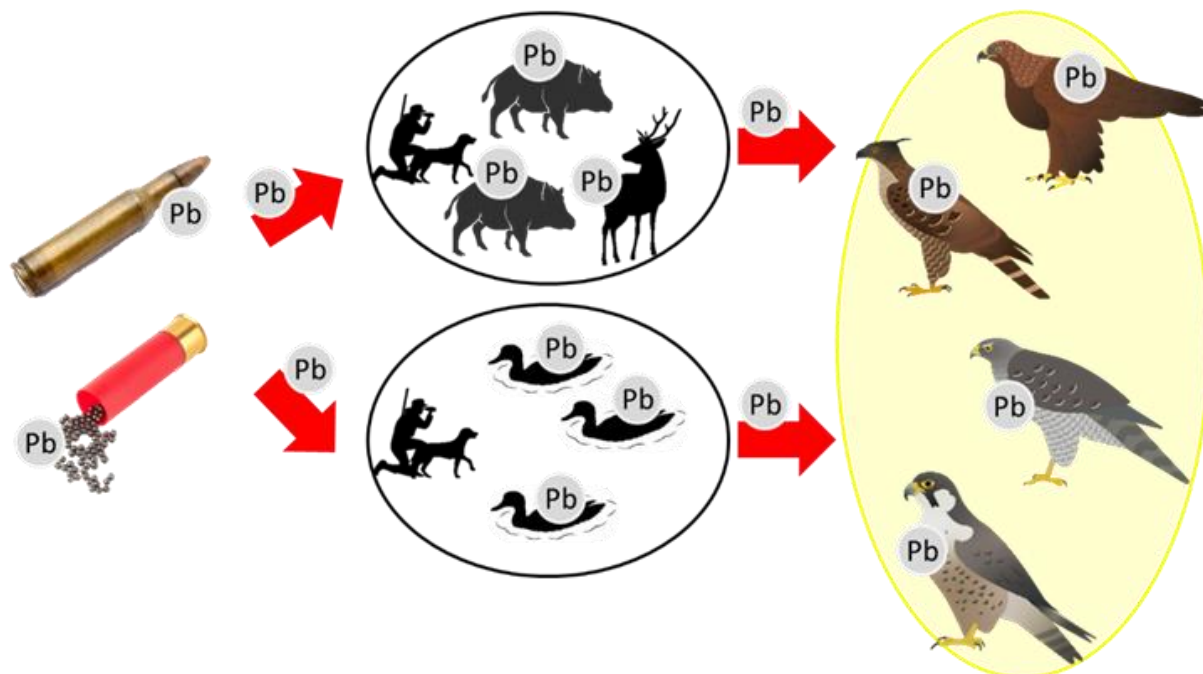


図1. 2 想定される猛禽類の鉛曝露経路

鉛曝露リスク評価に利用する狩猟データは、環境省より提供された2013年から2018年までの狩猟統計を利用した。狩猟統計は一辺約5 kmの5倍地域メッシュ内の狩猟数を、対象種と狩猟方法や目的ごとに集計したもので、各都道府県や地方事務所そして北海道の各管区から環境省に報告される。環境省より得られた狩猟統計データは、報告漏れや狩猟方法などの詳細が記載されていない都道府県が存在する。そこでまず各都道府県で狩猟方法の報告が存在するかを評価し、銃による狩猟が確認されている都道府県とそれ以外の都道府県を別けた上で、5倍メッシュごとに総狩猟数と銃による狩猟数の平均値を算出した。

3) 高病原性鳥インフルエンザ発生地点における鉛曝露リスクの評価

鉛曝露量とHPAI発生に関係があるかを検討するため、猛禽類でHPAI発生が確認された地点における狩猟数並びに銃による狩猟数の平均が、母集団の平均より高いかを検証した。HPAIの発生データは、Empres (<http://empres-i.fao.org/eipws3g/> アクセス：2022年1月2日)より入手し、国内で猛禽類にHPAIの発生が確認されたデータを抽出し、発生が確認された5倍メッシュならびにその周辺の8メッシュの総狩猟数・銃による狩猟数の平均値を解析に用いた。全国の5倍メッシュから1000メッシュを無作為に選択し比較対象の母集団とした。そして、銃による狩猟が確認されている都道府県のデータのみを利用した場合と狩猟統計が存在するすべての地点を利用した場合それぞれで、総狩猟数そして銃による狩猟数の平均値が母集団とHPAI陽性サイトの間で差があるかをWilcoxon testにより検定した。

4) 鉛曝露リスクを考慮した猛禽類の高病原性鳥インフルエンザリスクマップの作成

鳥インフルエンザウイルスはマガモ属によって運ばれると考えられるため⁴⁾、まずマガモ属主要4種（オナガガモ・カルガモ・コガモ・マガモ）の冬季（12月—2月）における東アジア全域での分布デー

タをGBIFより入手し（アクセス：2020年12月）、種分布モデルにより冬季分布推定を行った。ニッチモデリングに供試する気候データは国内猛禽類分布モデルと同じものを用いた。アジア地域を含めてモデル化するため、土地利用データは世界規模で100 m精度で土地利用状況を表すCopernicus Global Land Operationsをダウンロードし（<https://land.copernicus.eu/global/index.html> アクセス：2021年6月）、5 km四方メッシュ内での各利用区分の比率を求め、土地利用パラメーターとして整備を行い、マガモ属の分布推定をMaxEntにて行った。マガモ属の分布推定結果をもとに、東アジア地域における野鳥におけるHPAIの発生予測を同じくMaxEntにて行った。HPAI発生地点データは、3) で用いたEmpresのデータからアジア地域の野鳥におけるHPAI発生事例を抽出し、そのうち2020年9月までのデータをモデル作成に、それ以降のデータをモデルの検証用に供試した。HPAI発生予測に最適なパラメーター選択を行ったところ、冬季におけるカモ属4種の分布と気候データ5種（年最低気温、年最高気温、最寒3ヶ月の降水量、最暖3ヶ月の降水量、降水量の変動率）が重要であることが示されたため、本研究では冬季カモ属分布予測と気候データを用いてHPAI発生リスクを計算した。最後に、鉛曝露リスク評価結果とHPAI発生リスク評価の結果を統合し、鉛曝露リスクを考慮したHPAIリスクマップを作成した。

5) 野鳥細胞を用いた鉛曝露による鳥インフルエンザ感受性への影響評価

サブテーマ2で実施した、野鳥細胞を活用した鉛曝露下におけるHPAIV感染実験の結果から、Mx遺伝子の発現レベルが鉛曝露によって減少することが明らかになった。特に、クマタカとハヤブサについては、Mx遺伝子の発現レベルの減少が統計学的に有意であった。サブテーマ2では、Mx遺伝子のみを観察対象としていたため、クマタカとハヤブサを対象に、鉛曝露による遺伝子発現への影響を網羅的に解析した。

図1. 3に実験手順を示した。最初に、ニワトリ、クマタカ、ハヤブサの繊維芽細胞を48時間培養した。その後、鉛感作群では10 μ Mの濃度で鉛を添加し24時間培養し、コントロール群では鉛を添加せずに同時間培養した。培養液を除去し、鳥インフルエンザウイルス（A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1)) を1時間感染させ、ウイルス液を除去し、再度ウイルスが入っていない培養液で培養した。培養後6時間と12時間で細胞を回収し、全RNAを抽出した。鉛と鳥インフルエンザを感作させた6時間後の群をPbAI6、12時間後の群をPbAI12、鳥インフルエンザのみを感作させた6時間後の群をAI6、12時間後の群をAI12とした。

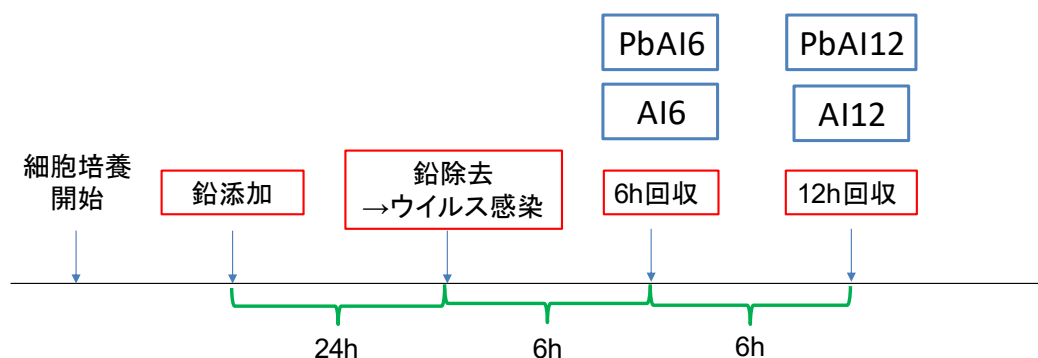


図1. 3 野鳥細胞を用いた鉛曝露による遺伝子発現への影響評価

抽出したRNAサンプルを用いてTruSeq stranded mRNA (Illumina) によりライブラリー調整を行い、イルミナプラットフォームを用いてRNA-sequencingを行った。RNA-sequencingにおいては各系列で3回実施し、サンプルごとにデータを統合しトランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析には国立遺伝学研究所が提供しているwebベースの解析パイプラインであるMaserを使用した。各サンプルのPbAI6とAI6、PbAI12とAI12のそれぞれの間でTrinityによりde novoトランスクリプトームアセンブルを行い、bowtieによってリードをコンティグにマッピングした。その後、eXpressによって発現量(FPKM)を算出し、サンプル間の遺伝子発現量をDEGseqにより比較した。トランスクリプトーム配列のア

ノテーションはAvian Immunome DB に登録されているニワトリ、並びに猛禽類の免疫に関連する遺伝子データベースを基にblastnによって行った。サンプル間で発現量に2倍以上差がある遺伝子を抽出し、解析を行った。鉛に抵抗性のあるニワトリを比較対象とし、ハヤブサ、クマタカそれぞれの鉛に対する感受性を遺伝子発現の面から評価を行った。

4. 結果及び考察

1) 猛禽類分布予測

MaxEntによって各種の分布地域推定をおこなったものを図1. 4に示した。AUC値を算出したところ、いずれに種においても高いAUC値を示し(0.88以上)、作成されたモデルが高い予測精度を持つことがわかる。説明変数の解析を行ったところ、イヌワシとクマタカは山間部に、ハヤブサとオオタカは平野部に多く分布することが確認された。

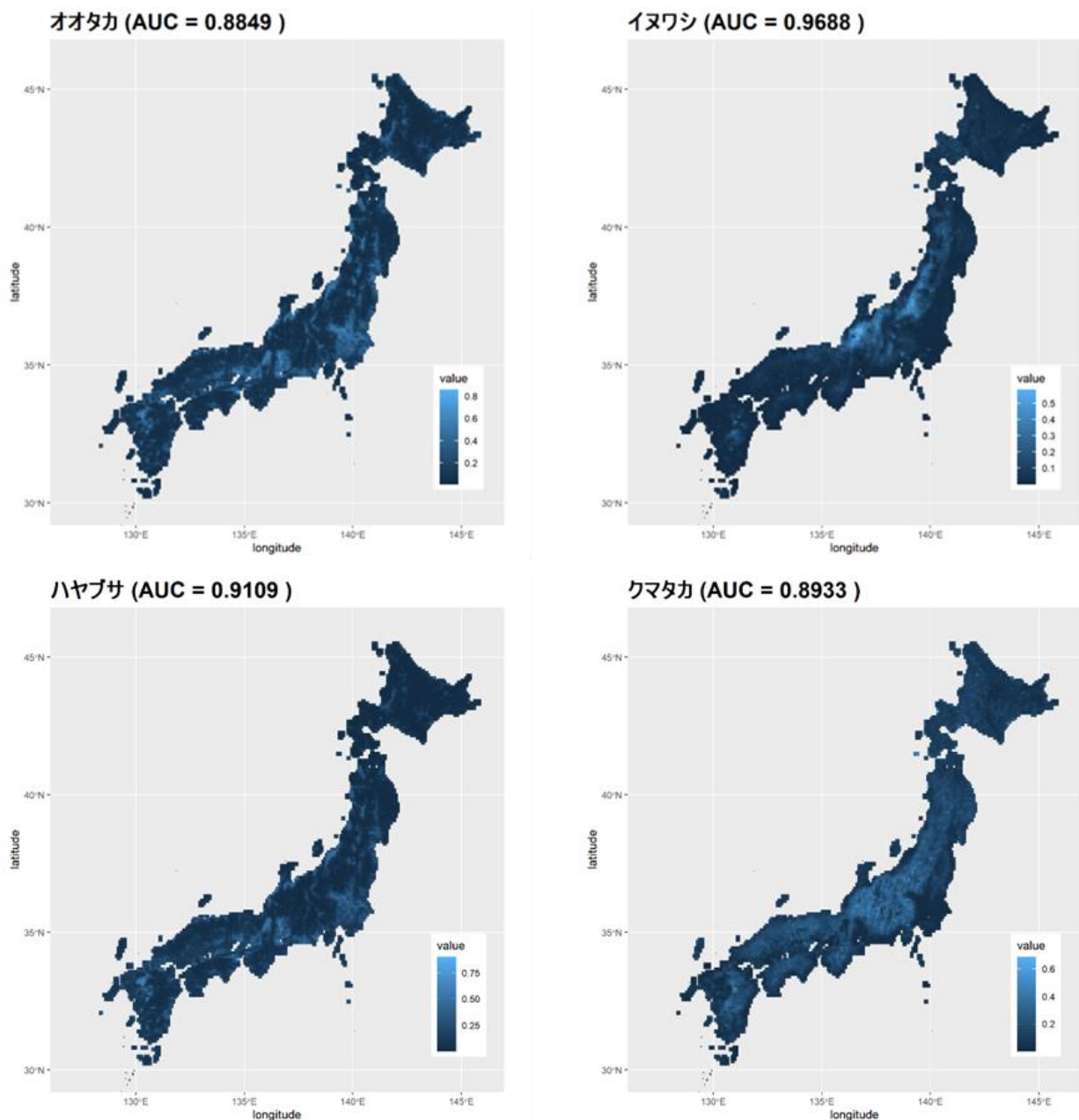


図1. 4 種分布モデル (MaxEnt) による猛禽類主要4種の国内分布推定図。色が薄くなるほど分布する可能性が高いことを示す。

2) 狩猟データからの鉛リスク

図1. 5に全国の2013年から2018年までの総狩猟数平均を、図1. 6に、銃による総狩猟数平均を図示した。総狩猟数平均の図から、兵庫県や群馬県、北海道の多くの地域からは、狩猟統計自体が欠損していることが判明した。都道府県別に狩猟統計をまとめたところ（表1. 1）、兵庫県、群馬県、北海道は1-2年分のデータしか報告されておらず、その狩猟総数も周辺都道府県と面積に比べて非常に少ないことが判明した。銃による統計はデータの欠損がより顕著で、都道府県別にみると、鹿児島県、京都府、千葉県、広島県では銃によると報告された狩猟数が極端に少なく（平均150頭以下、全体に占める割合が1%以下）、また広島県、愛知県、岐阜県、香川県、高知県、佐賀県、新潟県、神奈川県、東京都、奈良県では狩猟統計に狩猟方法の記載が存在しなかった。そこで、これら狩猟データが不足していると考えられる地域は、鉛リスクの推定において「情報不足」の地域として扱う事とした。

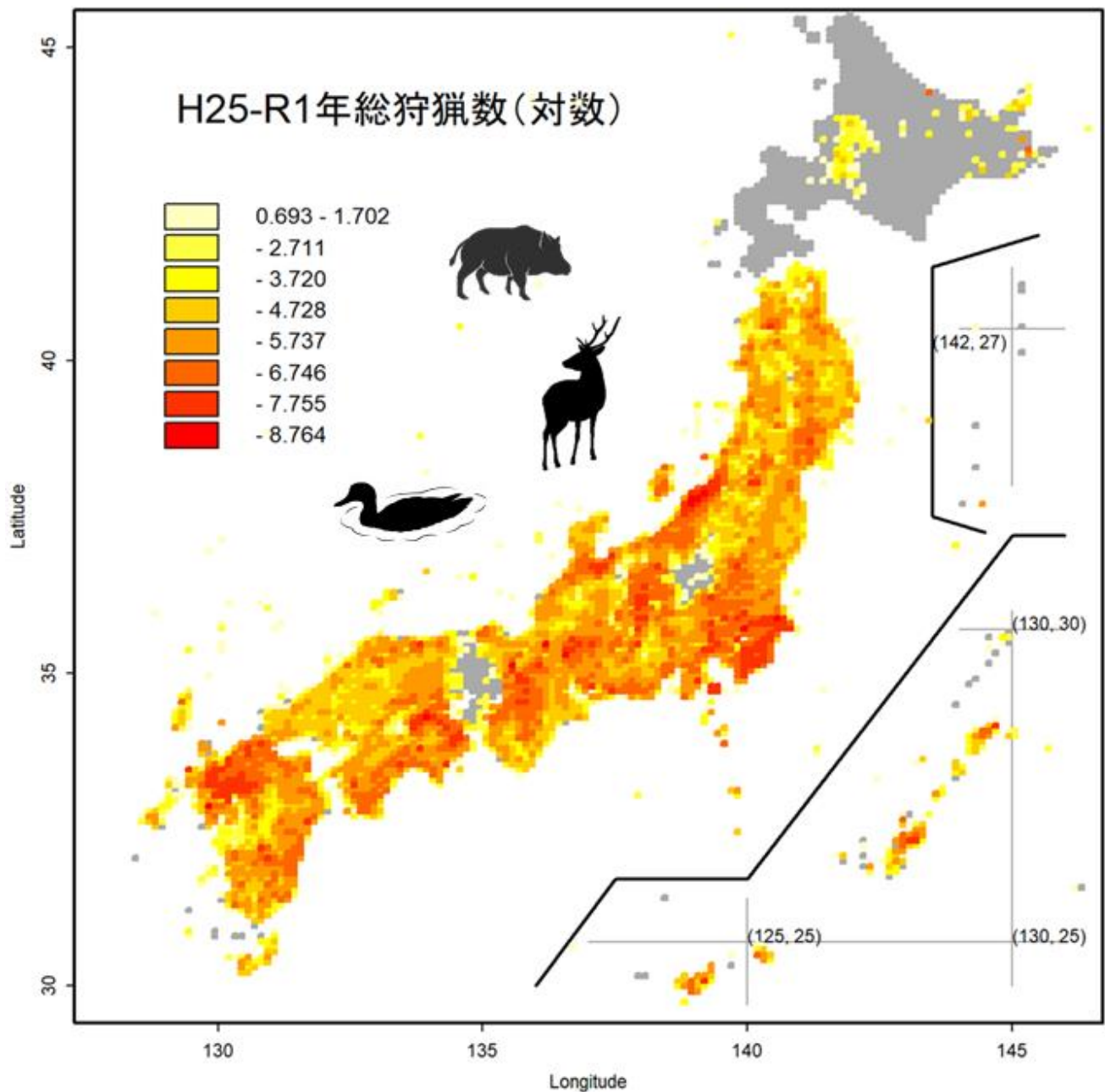


図1. 5 2013年から2018年までの全国各地の5倍メッシュ（約25km²）における年平均総狩猟数（対数）、一部都道府県では報告漏れなどによりデータ欠損・不足あり（表1. 1参照）。（注：元データのメッシュコードの問題で海洋に点が打たれている箇所がある）

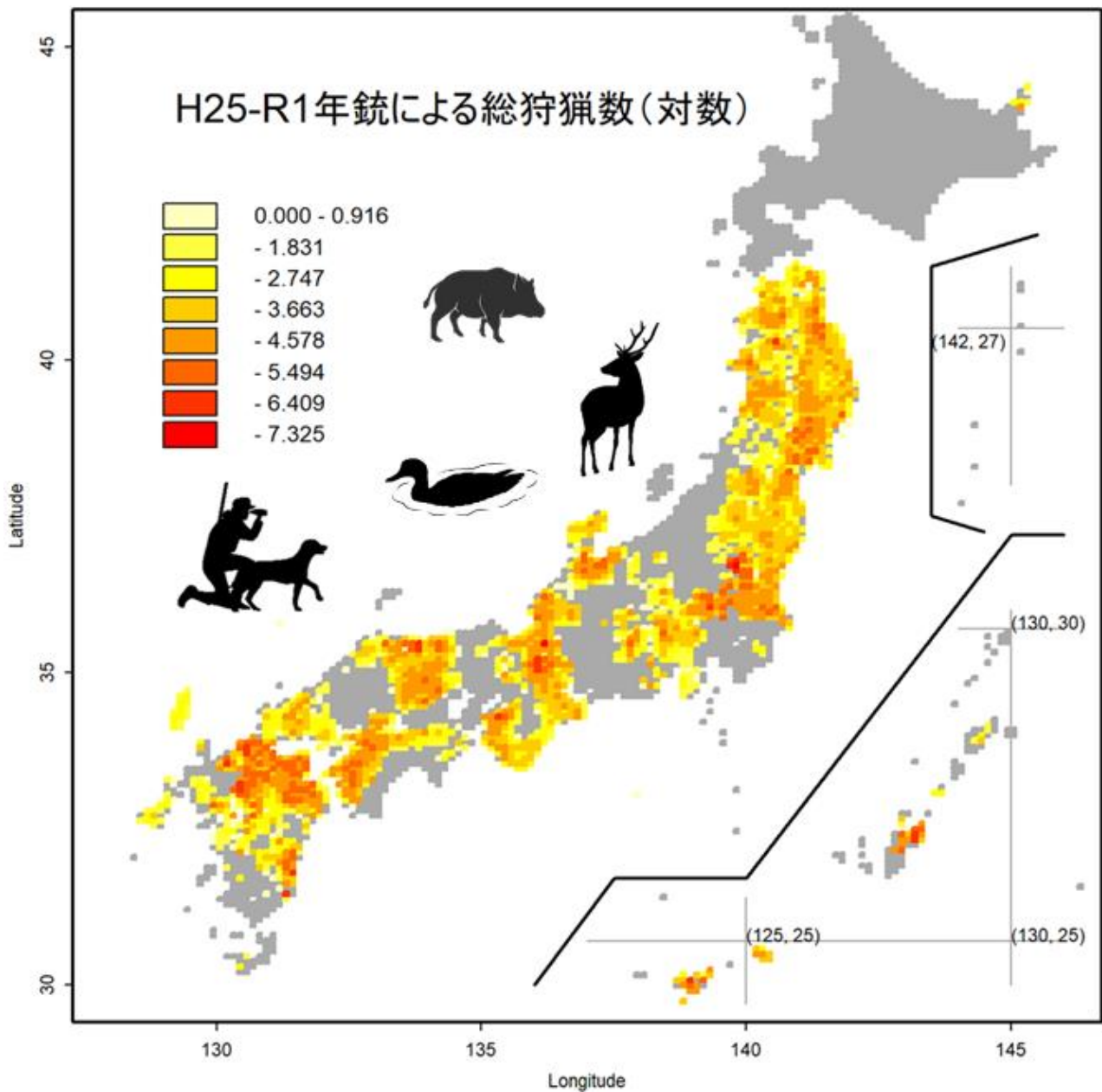


図1. 6 2013年から2018年までの全国各地の5倍メッシュ（約25km²）における、銃による年平均総狩猟数（対数）。一部都道府県では報告漏れ、狩猟方法が特定されないなどによりデータ欠損・不足あり（表1. 1参照）。（注：元データのメッシュコードの問題で海洋に点が打たれている箇所がある）

表1. 1 各都道府県における年平均狩猟統計一覧（銃による狩猟数順）。表下部16都道府県に属するデータは情報不足として処理。

都道府県名	総狩猟個体数	銃による狩猟数	銃の比率（％）	報告年数
福岡県	35950.8	7412.9	20.62	7
大分県	13333.8	5739.3	43.04	7
岩手県	21478.8	5227.3	24.34	7
滋賀県	11679.2	5069.1	43.4	6
愛媛県	11519.8	4671.9	40.56	5
青森県	15157.7	3884.5	25.63	7
栃木県	15622.2	3739.8	23.94	6
茨城県	17186.1	3643.7	21.2	7
秋田県	14936.9	3438.5	23.02	7
宮城県	16580.1	3396.4	20.49	6
岡山県	12398.9	3314.2	26.73	7
沖縄県	12419.8	2798.7	22.53	5
福島県	12635.0	2613.2	20.68	6
鳥取県	7280.5	2502.8	34.38	6
埼玉県	15315.4	2463.9	16.09	7
富山県	13820.8	2113.6	15.29	7
宮崎県	26694.8	2029.0	7.6	7
福井県	4512.5	1923.9	42.64	6
和歌山県	6309.0	1904.6	30.19	7
三重県	6967.4	1484.1	21.3	7
山梨県	6362.0	1229.3	19.32	7
山口県	5326.7	1183.7	22.22	4
熊本県	7498.6	1181.9	15.76	4
長野県	44141.1	1135.6	2.57	5
山形県	13061.1	844.2	6.46	7
長崎県	15201.4	616.9	4.06	5
大阪府	9929.8	397.6	4	7
石川県	7489.6	372.6	4.98	6
徳島県	15821.1	289.6	1.83	7
静岡県	20500.1	279.2	1.36	7
島根県	9349.7	248.2	2.66	6
鹿児島県	19184.1	121.2	0.63	5
京都府	16162.0	110.3	0.68	5
北海道	2697.2	79.0	2.93	2
兵庫県	83.7	32.8	39.2	2
千葉県	66102.0	21.0	0.03	7
群馬県	46.3	9.0	19.42	1
広島県	6142.1	1.0	0.02	7
愛知県	15317.2 NA	NA		6
岐阜県	28869.2 NA	NA		5
香川県	21369.9 NA	NA		7
高知県	26615.9 NA	NA		5
佐賀県	31279.3 NA	NA		7
新潟県	68878.6 NA	NA		7
神奈川県	11706.3 NA	NA		6
東京都	18624.8 NA	NA		6
奈良県	16380.3 NA	NA		7

猛禽類4種各種の分布予測地点における鉛曝露リスクを図示したものを図1.7に、猛禽類4種のリスクマップを重ね合わせ、野生の猛禽類からHPAIウイルスが確認された地点をプロットしたものを図1.8に示した。これらの図では銃による狩猟が多い地点を「ホットスポット高」、少ない地点を「ホットスポット中」、銃による狩猟が無い地点を「ホットスポット低」とし、狩猟が行われているが銃によるものか不明な地点を「情報不足」、対象となる猛禽類の分布が予測されなかった地点や狩猟データが存在しなかった地点を「鳥ナシ」もしくは「NA」として表示している。銃による狩猟が多く、猛禽類種数が多い場所（ホットスポット）として、宮城県北部、関東北部（栃木、茨城、埼玉）、富山県、滋賀・福井南部、岡山南部、九州北部（福岡大分）、愛媛が挙げられる。しかし狩猟統計で狩猟方法が抜けているなど情報不足の自治体も多く存在し、新潟県や岐阜県など総狩猟数が多い県のデータが不完全であるなどするため、実態の把握が急務である。データが欠損している場合には過去のデータなどから、銃による狩猟比率推定などを通じて、銃による狩猟数を割り出し、鉛曝露リスク評価を進める必要がある。

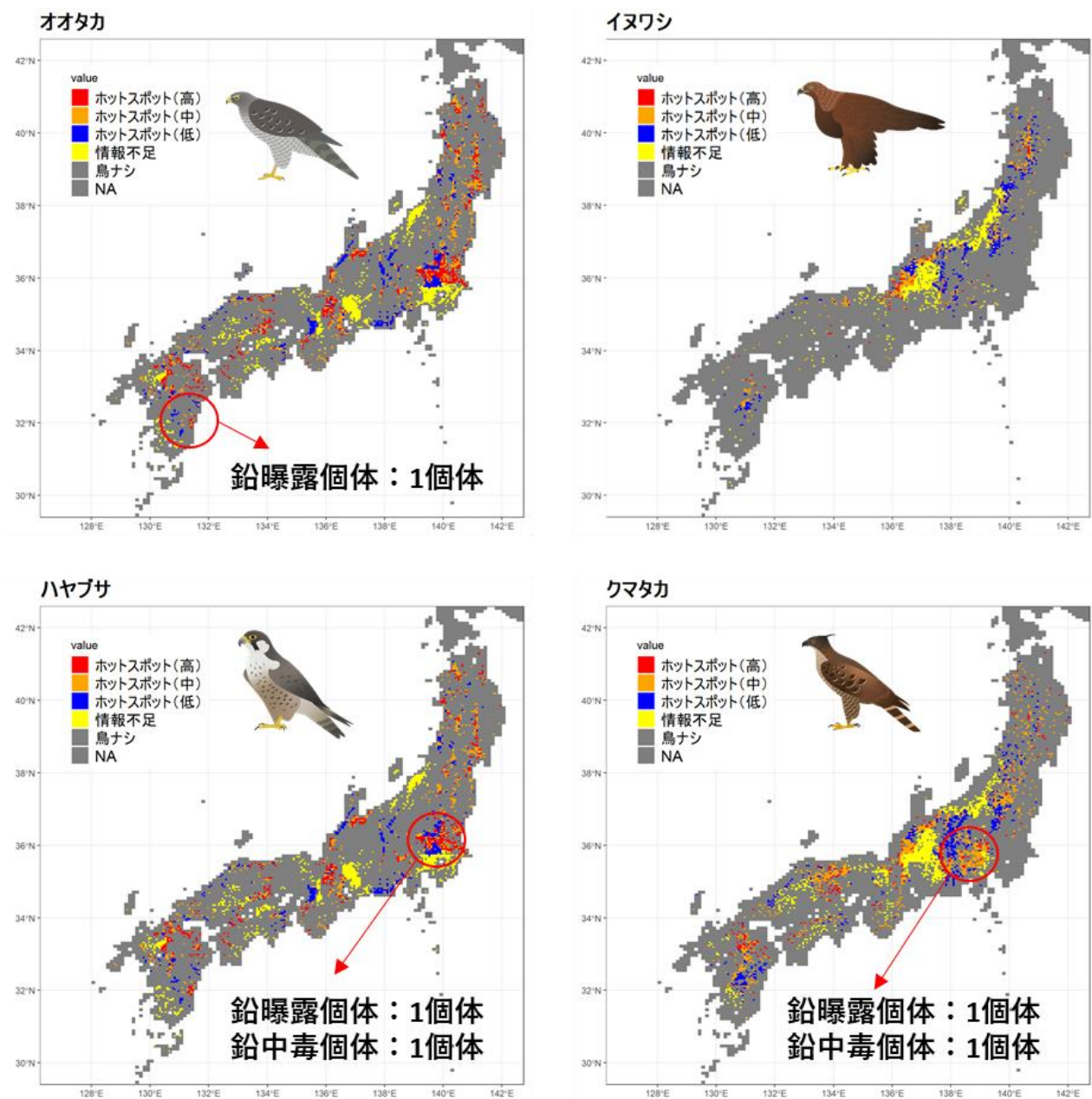


図1.7 猛禽類4種の鉛リスク地図。表1.2に各ホットスポットが占める比率を表記。

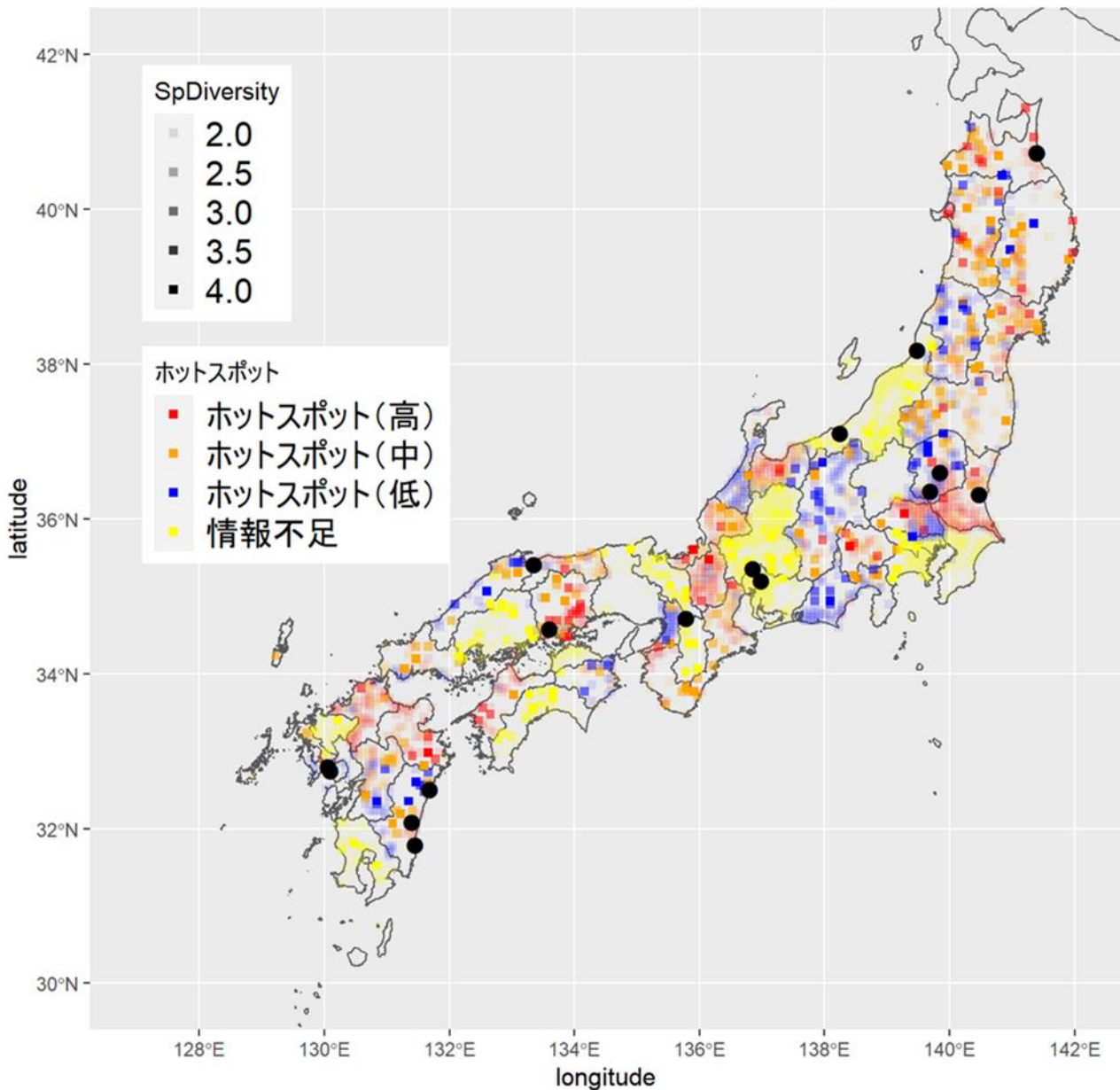


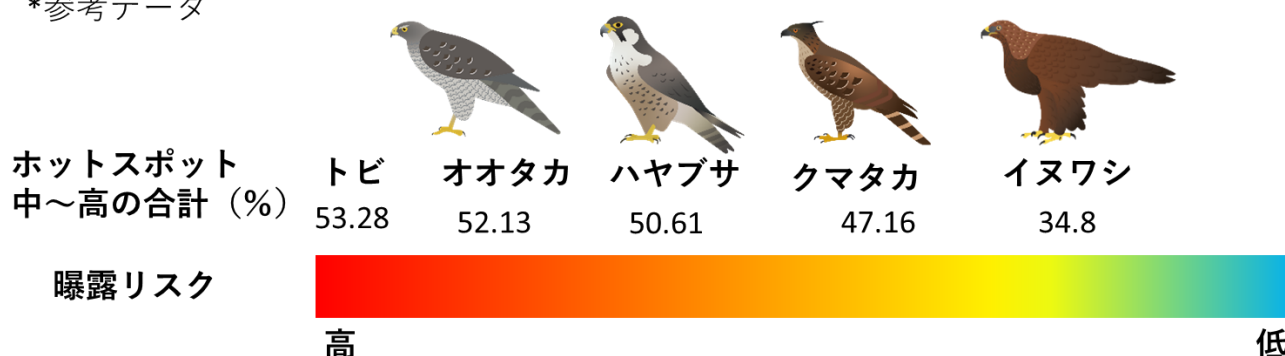
図1. 8 猛禽類鉛リスク地図、猛禽類種数が多い地点を濃い色で表示。黒丸は猛禽類でHPAI陽性が確認された地点

ホットスポットの各区分が分布域全体に占める比率を計算したものを表1. 2に示した(参考データとしてトビを追加した)。オオタカ、ハヤブサ、クマタカは全国的に広く分布するが、その中でもオオタカとハヤブサは高リスクホットスポットに分布する比率が高い一方、クマタカは中-低リスクに分布する比率が高かった。イヌワシは分布範囲が狭く、また高リスクスポットに分布する比率も低かった。ハヤブサとオオタカは平野部に多く分布し、比較的狩猟が盛んな里山や害獣駆除が行われる農村地帯などに分布するため、生息地の一部が高リスクになると考えられる。一方、イヌワシが比較的风险が低いのは、生息地は他の3種と比較して限定的であることと、生息地が山間部であることから、生息地内における狩猟活動が限定されるためと考えられる。今回、サブテーマ3で収集した試料について鉛の濃度を定量したところ(図3. 7)、鉛曝露のリスクが高いとされた、オオタカで鉛曝露個体が1個体、ハヤブサで鉛中毒個体1個体と鉛曝露個体1個体、クマタカでも同様に鉛中毒個体1個体と鉛曝露個体1個体がホットスポットと分類された地域で実際に確認された。これは、今回の鉛曝露リスク評価が実態を反映していることを示唆するものである。

表1. 2 鉛リスクホットスポットが猛禽類各種分布地点に占める比率（参考データとしてトビを追加した）

種名	ホットスポット高(%)	ホットスポット中(%)	ホットスポット低(%)	情報不足(%)
イヌワシ	4.79	30.01	27.58	37.62
クマタカ	9.34	37.82	21.34	31.50
ハヤブサ	23.74	26.87	18.58	30.82
オオタカ	23.56	28.57	17.90	29.97
トビ*	23.79	29.49	16.81	29.90

*参考データ



3) 高病原性鳥インフルエンザ発生地点における鉛曝露リスクの評価

今回の解析対象外の地域である北海道の発生地点や重複して発生したメッシュなどを除いた結果、猛禽類におけるHPAI発生地点は16地点あり（図1. 8）、そのうち11地点で銃による狩猟が確認された。銃による狩猟が確認された都府県での解析、北海道を除いた全都府県すべてを含んだ解析いずれの比較においても、HPAI発生地点とその周辺メッシュにおける銃による狩猟も総狩猟数も、それ以外の地点（母集団）より多いことが明らかになった（図1. 9）。

今回HPAI陽性サイトでの狩猟数平均が全国平均より高いことが示されたが、Empresのデータからは、狩猟数が多いため低濃度鉛中毒に由来するHPAI発症確率が高くなったためなのか、それとも狩猟数が多い、つまり多くの人がある地点を訪れるため、死亡野鳥個体を発見しHPAI検査をする機会が高くなったかの判別を付けることが出来なかった。今後、全国各地のどこで死亡個体が発見されてHPAIの調査が行われたかを調べ、各地点での狩猟総数と死亡個体発見数の関係を精査し、狩猟による鉛中毒の効果と発見率を切り分ける必要がある。国立環境研究所では、各地で発見される死亡野鳥個体が鳥インフルエンザウイルスに感染しているかの調査を行っており、数多くの野生個体におけるHPAI感染有無を記録したデータを保有している。しかしこの調査データは市町村単位で集計されるため、発見された地点のメッシュ情報が存在しないため今回の研究では利用できなかった。今後これらのデータの発見地点特定を進めることで、より精度の高い解析が可能となり、鉛汚染と鳥インフル発症リスクの関連性を議論できると考えられる。

4) 鉛曝露リスクを考慮した猛禽類の高病原性鳥インフルエンザリスクマップの作成

野鳥におけるHPAIの冬季発生予測モデルのAUC値は国内の予測は0.831、アジア全域での予測は0.954と比較的高く、2021年のアジア地域におけるH5N8型発生予測は0.924と非常に高かった。この

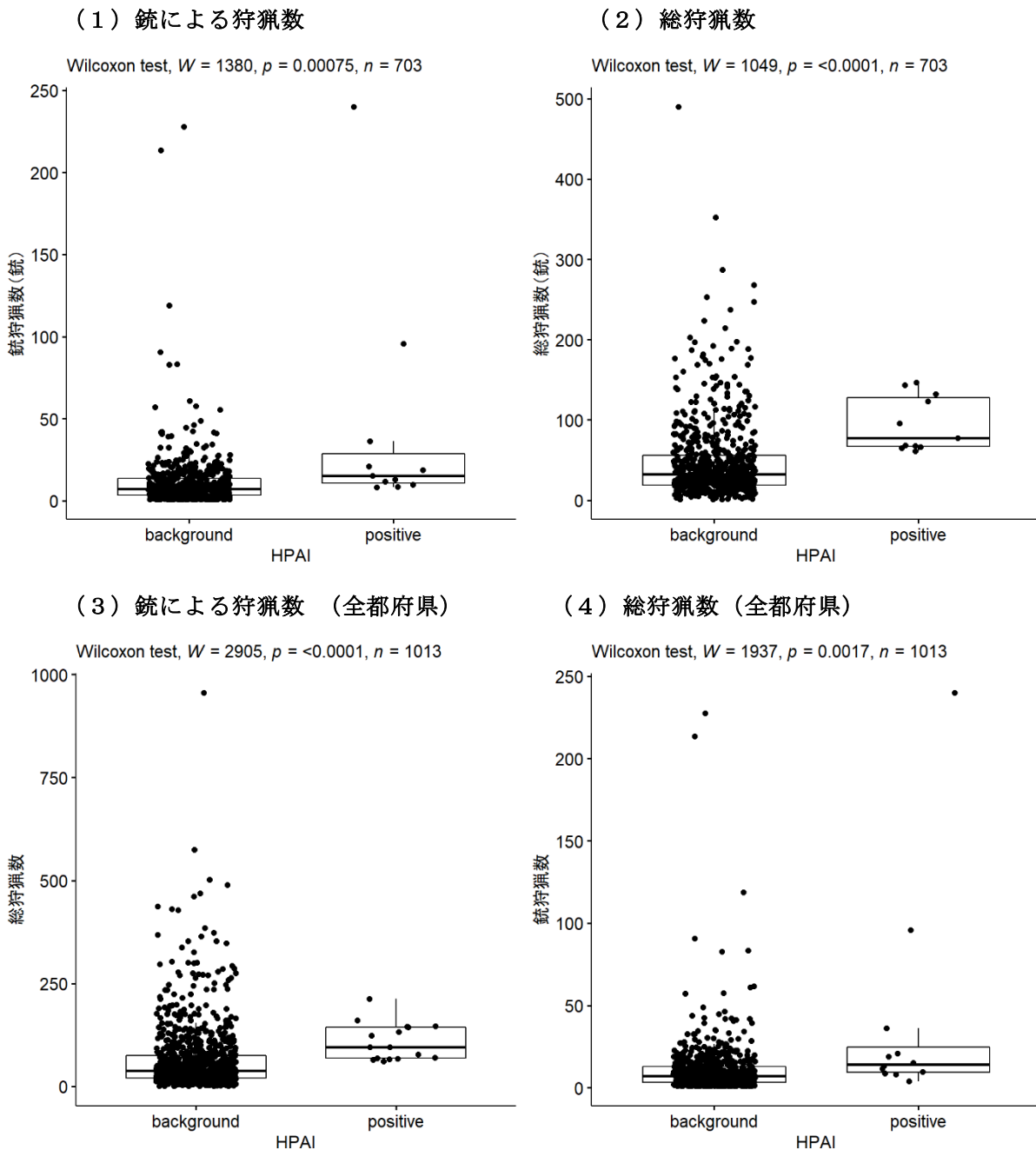


図1. 9 猛禽類のHPAI死亡個体が確認されたサイト (positive) とランダムサンプルによる疑似母集団 (background) 間の「銃による狩猟が確認されている都道府県での (1) 銃による狩猟数、(2) 総狩猟数、全都道府県における (3) 銃による狩猟数、(4) 総狩猟数」のウィルコクソン検定による比較。いずれの場合においても、HPAI死亡個体が確認されたサイトの狩猟数が有意に多い。

HPAI リスクマップと鉛曝露リスクを重ね合わせたものを、図1. 10 に示す。水鳥の分布が平地に集中しているため、平野部がHPAI 高リスクと予測されている。この予測は、これまでの報告⁵⁾ と概ね一致するが、関東・東北や中国地方での発生確率がやや低くなっていた。サブテーマ2において鉛曝露により免疫系の遺伝子発現が抑制されることが明らかになっているため、鉛曝露リスクを考慮したHPAI リスクマップにおいてHPAI の発生リスクが高いとされた地域 (青森県太平洋側、茨城県、富山県、福井県、滋賀県、福岡県、宮崎県の平野部) では、冬季間中は特に猛禽類の死亡事例の発生の監視を強化する必要がある。

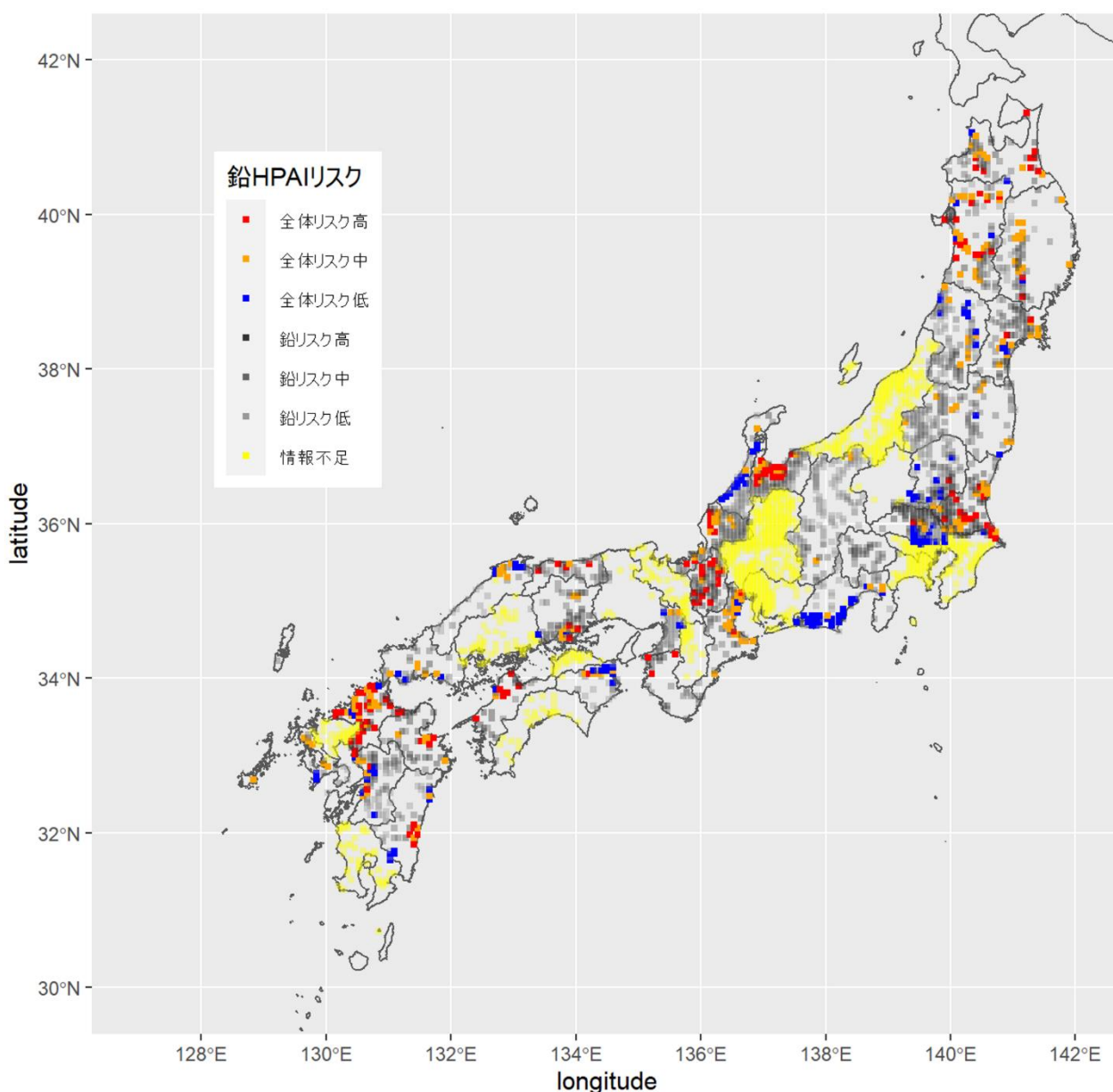


図1. 10 種分布モデルにより予測された野鳥におけるHPAI発生リスクと鉛曝露リスク地図。鉛リスクのみの地点は灰色で、HPAI感染リスクが高い地点で、リスクが高い場所から低い場所へ赤・橙・青で表示。

5) 野鳥細胞を用いた鉛曝露による鳥インフルエンザ感受性への影響の評価

トランスクリプトーム解析の結果、全ての培養細胞において、鉛を添加した場合には多くの遺伝子はその機能に関係なく発現量が半分以下に減少した。AI6とPbAI6間において発現量が2倍以上上昇（Upregulate）、もしくは半分以下に減少（Downregulate）した遺伝子は全体の遺伝子のうちニワトリで24.8%が上昇、57.5%が減少、ハヤブサで3%が上昇、59.3%が減少、クマタカで0.26%が上昇、83.8%が減少となった。AI12とPbAI12間においては、ニワトリで20%が上昇、60.6%が減少、ハヤブサで6%が上昇、57.2%が減少、クマタカで0.7%が上昇、73.7%が減少となった。（図1. 11）

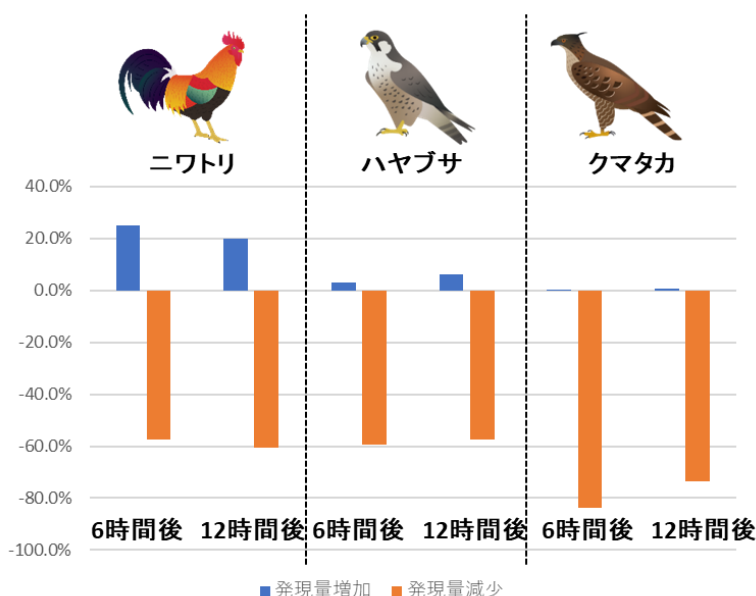


図 1. 1 1 鉛添加で発現量が増減した遺伝子の割合

この中から、免疫に関連する遺伝子に着目したところ、AI6 と PbAI6 間において発現量が上昇、もしくは減少した遺伝子は全体の遺伝子のうちニワトリで 19.7%が上昇、63%が減少、ハヤブサで 2.6%が上昇、66.6%が減少、クマタカで 0.45%が上昇、82.5%が減少となった。AI12 と PbAI12 間においては、ニワトリで 14.5%が上昇、21.3%が減少、ハヤブサで 4.8%が上昇、63.4%が減少、クマタカで 0.95%が上昇、65.7%が減少となり、全体の遺伝子発現量の増減と同様の傾向を示した（図 1. 1 2）。このことから、鉛添加により免疫系の遺伝子発現が特異的に抑制されるのではなく、鉛添加により遺伝子発現が全体的に抑制されていることが示唆された。遺伝子発現が全体的に抑制される場合、鳥インフルエンザ感染に対しての最初の防御機構である自然免疫系の遺伝子発現も抑制されることから、鉛暴露は鳥類において鳥インフルエンザに対する防御機能である自然免疫系の遺伝子発現をも下げることが考えられる。これまでの研究で人を含む哺乳類において、鉛暴露は種々の感染症に対して易感染性になることが報告されている⁶⁾。本研究により鳥類においても哺乳類と同様の傾向がある可能性が初めて示された。

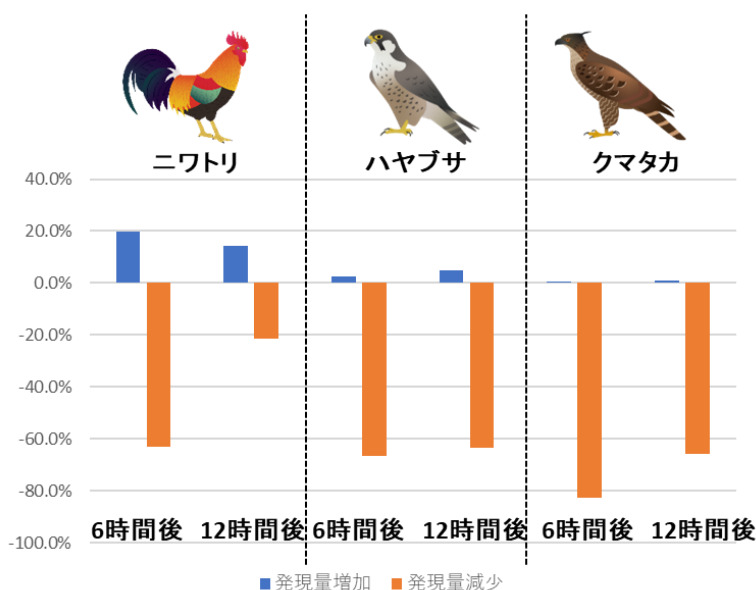


図 1. 1 2 鉛添加で発現量が増減した免疫関連遺伝子の割合

ニワトリとハヤブサ、クマタカの遺伝子発現が増減した遺伝子数を比較すると、ハヤブサ、クマタカの発現が増加した遺伝子数、免疫関連遺伝子数がニワトリのそれに比べ有意に少なかった（表1. 3； $p < 0.05$ ）。また、AI12 vs PbAI12の群では、減少した免疫関連遺伝子数はニワトリに比べ有意に多かった。このことから、クマタカ、ハヤブサはニワトリよりも鉛暴露に対して強い影響を受けると考えられた。これまでの研究から、ニワトリにおいては160mg/kg/dayの鉛を投与し、血中鉛濃度が6.2ppmと高濃度になっても臨床症状を示さない⁷⁾一方で、猛禽類においてはおよそ0.6ppm以上の血中鉛濃度で神経症状や消化器症状を示すことが報告されている⁸⁾。このように、これまで得られた猛禽類における鉛感受性の高さを遺伝子発現プロファイリングによっても裏付けられたと考えられた。

表1. 3 各鳥類種において、鉛暴露により増加/減少した遺伝子数

		遺伝子数	No. upregulate	No. downregulate
AI6 vs PbAI6	ニワトリ	161407	▲40147	92885
	ハヤブサ	143262	▽28698	86819
	クマタカ	198178	▽6002	117678
AI12 vs PbA12	ニワトリ	192641	▲11599	110302
	ハヤブサ	150016	▽391	125748
	クマタカ	165107	▽1135	121743

表2. 各鳥類種において、鉛暴露により増加/減少した免疫関連遺伝子数

		免疫関連遺伝子数	No. upregulate	No. downregulate
AI6 vs PbAI6	ニワトリ	7388	▲1458	4655
	ハヤブサ	5740	▽26	4736
	クマタカ	7273	▽192	4848
AI12 vs PbA12	ニワトリ	6436	▲931	▽1370
	ハヤブサ	6567	▽316	▲4164
	クマタカ	6329	▽60	▲4162

これまでの結果をまとめると、鳥類において、鉛暴露は個体の遺伝子発現レベルそのものを低下させ、鳥インフルエンザだけでなく種々の感染症に易感染性になる可能性が示唆された。さらに、クマタカとハヤブサにおいてはニワトリよりも鉛暴露による遺伝子発現が強く抑制されることが示された。また、これまでの検討でハヤブサやクマタカなどの猛禽類は鳥インフルエンザウイルスへの感受性が高いことが判明している。これらのことから、鉛暴露は猛禽類の鳥インフルエンザウイルス感受性をさらに上昇させる可能性があることが本研究で明らかとなった。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ①では以下の成果を挙げた。

① 銃による狩猟数を基に、猛禽類4種ごとの鉛曝露高リスク地域を可視化した（図1. 7）。また、4種の情報を統合し、猛禽類の鉛曝露高リスク地域を示した（図1. 8）。本成果は今後鉛弾使用を制限する必要が高い場所の選定に役立つものと考えられる。

② 猛禽類でHPAIVが分離された地点において、銃による狩猟数が多いことを統計的に示した（図1. 9）。これは、HPAIVが分離された地点では、猛禽類が鉛弾を介して鉛に曝露されるリスクが高いことを示す結果である。また、鉛曝露リスクを踏まえた、猛禽類における高病原性鳥インフルエンザリスクマップを作成した（図1. 10）。このリスクマップにおいての高病原性鳥インフルエンザの発生リスクが高いとされた地域では、冬季間中は猛禽類の死亡事例の発生の監視を強化する必要がある。

③ 鉛曝露によって免疫系の遺伝子発現が抑制傾向を示すことを、サブテーマ②と共同で、猛禽類の培養細胞を利用し明らかにした（図1. 11、図1. 12）。これは、鳥類が鉛曝露によって免疫系が抑

制されることを遺伝子発現レベルで証明した初の報告である。

以上の成果から、今回掲げた目標を全て達成することができたと判断した。特に、鉛曝露による免疫抑制を遺伝子発現レベルで証明した点は、設定した目標以上の成果である。

6. 引用文献

- 1) Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37(12), 4302-4315. <https://doi.org/10.1002/JOC.5086>
- 2) Phillips, S. J., Anderson, R. P., & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190(3-4), 231-259. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
- 3) Guisan, A., Thuiller, W., & Zimmermann, N. E. (2017). *Habitat suitability and distribution models: with applications in R*. Cambridge University Press.
- 4) Onuma M., Kakogawa M., Yanagisawa M., Haga A., Okano T., Neagari Y., Okano T., Goka K., Asakawa M. (2017) Characterizing the temporal patterns of avian influenza virus introduction into Japan by migratory birds. *The Journal of veterinary medical science*, 79 (5), 943-951
- 5) Moriguchi S., Onuma M., Goka K. (2013) Potential risk map for avian influenza A virus invading Japan. *Diversity and Distributions*, 19, 78-85
- 6) Fenga, C., Gangemi, S., Di Salvatore, V., Falzone, L., & Libra, M. (2017). Immunological effects of occupational exposure to lead (Review). *Molecular Medicine Reports*, 15, 3355-3360. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6381>
- 7) Vengris, V. E., & Maré, C. J. (1974). Lead poisoning in chickens and the effect of lead on interferon and antibody production. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*, 38(3), 328-335.
- 8) Fallon, J. A., Redig, P., Miller, T. A., Lanzone, M., & Katzner, T. (2017). Guidelines for evaluation and treatment of lead poisoning of wild raptors. *Wildlife Society Bulletin*, 41(2), 205-211.

II-2 希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な基盤技術開発

国立大学法人北海道大学

大学院獣医学研究院 毒性学教室

石塚 真由美

大学院獣医学研究院 毒性学教室

中山 翔太

大学院獣医学研究院 附属動物病院

池中 良徳

[要旨]

鳥類における鉛中毒は世界的な課題であり、国内では北海道において猛禽類の被害を報告してきた。一方で北海道以南についての鳥類の鉛被害状況や鉛の汚染源について調べられていない。また鳥類における鉛の毒性やその種差も明らかにされていない。そこで、1) 鉛の汚染源の同定方法を検討し、評価方法の妥当性を明らかにすること、2) サブテーマ3と共同で、鳥類の鉛散弾投与試験を行い、鉛の動態や毒性の種差について評価すること、3) 猛禽類を中心とした5種の鳥類の培養細胞における鉛曝露実験を行い、鉛曝露への反応や鳥インフルエンザ抵抗因子の発現変動の種差について評価すること、4) 鉛曝露に対して高感受性と評価された種の情報をサブテーマ1へ提供することを目標とした。

本研究では、水鳥、猛禽類を飼育し、鉛弾を投与してその毒性変化、鉛の体内動態について明らかにした。LA-ICP-MSにより、初めて鳥類体内での鉛の動態やその種差を報告した。また、鉛を暴露した鳥類の遺伝子網羅的解析や鳥類の細胞を用いた鉛および鳥インフルエンザウイルスの曝露感染研究により、鉛曝露が免疫抑制を引き起こす可能性を示唆した。多元素解析や同位体分析により、生態や金属断片の鉛の由来（ライフル弾、散弾、釣り錘）を同定する手法を報告した。

1. 研究開発目的

鳥類における鉛中毒は、世界中で頻発している。最新の報告では、欧州では年間16種、70万羽の水鳥が鉛中毒で死亡していると指摘されている。米国では毎年数百万羽の野鳥が鉛中毒で死亡していると指摘されているが、特にカリフォルニアコンドルは一時期鉛中毒により絶滅寸前に追い込まれ、現在でも生存するコンドルの45～95%の個体が鉛に汚染されていることが確認されている。一方、日本では、鳥類の鉛中毒は主に北海道棲息の猛禽類を中心として顕在化している。我々は1993年から2015年にかけて、北海道および本州、四国で死亡したオジロワシ、オオワシ、シマフクロウ、クマタカ、オオタカなど21種177個体の肝臓や血液について、鉛分析を行った。北海道では鉛弾の使用禁止後においてもオオワシ18個体（43個体中）、オジロワシ12個体（50個体中）において、鉛中毒基準値（2.0mg/kg、肝臓、湿重量）を超える蓄積濃度が肝臓から検出され、未だに鉛中毒が多く個体で生じていることが明らかとなった。本州、四国の個体からも、イヌワシ、トビ、オオタカにおいて鉛が高濃度で検出され、北海道以外の地域でも希少鳥類の鉛汚染が拡大している可能性を示している。

このように道内を中心とした鉛弾の規制にも関わらず国内で鳥類の鉛中毒が頻発しており、早急な対策を必要としている。しかし国内の鳥類で起こっている鉛中毒の由来は科学的に証明されておらず、基盤的データの不足が全国規模での規制を難しくしている。また一方で、鳥類間でも鉛毒性の感受性には大きな種差があり、これまでのような家禽を用いた研究ではその種差を推測することは困難である。鉛は多様な毒性を示し、血液、神経毒性から免疫毒性まで幅広い。潜在的な環境汚染物質が引き起こす免疫抑制により、ジステンパー感染症のアウトブレイクとなる可能性は野生哺乳類ではたびたび指摘されてきたが、鳥類における免疫抑制による鳥インフルエンザなど感染症の拡大はこれまで研究されてこなかった。そこで、本研究では、鳥類における鉛中毒問題解決のための基盤的技術の開発とデータの提供を目的とした。

2. 研究目標

鉛の汚染源の同定方法を検討し、評価方法の妥当性を明らかにする。サブテーマ3と共同で、鳥類の鉛散弾投与試験を行い、鉛の動態や毒性の種差について評価する。猛禽類を中心とした5種の鳥類の培養細胞における鉛曝露実験を行い、鉛曝露への反応や鳥インフルエンザ抵抗因子の発現変動の種差について評価する。鉛曝露に対して高感受性と評価された種の情報をサブテーマ1へ提供する。

3. 研究開発内容

鉛の汚染源となりうるライフル弾、散弾、釣り錘の同定技術を確立する。また、北海道大学にて野生種鳥類の飼育実験を開始し、その試料の採集を行う。

飼育実験により採集した試料を用いて、 δ ALAD解析を行い、その定量性について評価する。また、様々な鳥類種の培養細胞を用いて、細胞死などにより鉛毒性の細胞感受性の種差を評価するとともに、鳥インフルエンザ抵抗因子の発現変動の種差について明らかにする。鉛安定同位体分析技術をフィールドに応用する。

1) 野生種鳥類の飼育実験と試料採集

①飼育実験

北海道大学大学院獣医学研究院では化学物質曝露実験棟を新設しており、鳥類飼育施設を有しているため、これらの種の飼育実験と鉛の曝露実験が可能である。また、猛禽類医学研究所では猛禽類の飼育が

可能である。そこで、両施設において、この施設において、猛禽類とカモの飼育と鉛の投与実験を行った（図2.1）。

動物実験は、北海道大学動物実験等に関する規程に基づき、厳重に実施した。動物実験のプロトコルは、国際実験動物管理認定協会（AAALAC）および北海道大学施設動物管理使用委員会の承認を得た（承認番号18-0092および19-0033）。

三共ラボサービス（日本、東京）から7羽の飼育された15週齢のMuscovy duck (*Cairina moschata*)を購入した。カモは無処理群（ $n = 3$ ）と鉛処理群（ $n = 4$ ）の2群に無作為に分けられた。カモは、光（12時間明暗サイクル）および温度（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）を制御し、餌と水に自由にアクセスできるケージに個別に收容された。すべてのカモは処理前に1週間馴化させ、新鮮な餌を与えて飼育した。鉛投与カモには、鉛ペレット3個（ $240 \pm 1.7 \text{ mg}$ ）を経口強制摂取させるスタイルで投与した。対照群および鉛投与群は、鉛投与後29日にペントバルビタールナトリウムの過量投与により安楽死させた。

日本猛禽類研究所で5羽のトビ(*Milvus migrans*)を飼育した。ほとんどのトビが翼を損傷している個体であり、トビは個々に屋外のケージに入れられた。各ペンに止まり木と水槽を設置した。すべてのトビを処理前に1週間以上慣らし、食餌を与えた。トビは無作為に無処理対照群（ $n = 2$ ）と鉛処理群（ $n = 3$ ）の2群に分けられた。鉛投与したトビには、鹿肉に混ぜた鉛ペレット（ $77.9 - 88.4 \text{ mg}$ ）1個を与えた。消化管内の鉛ペレットの存在を確認するため、鉛投与後14日間、毎日尻のX線撮影を行った。2羽のトビでは、鉛投与後それぞれ7日目および10日目に、逆流または排泄によるものと思われる鉛ペレットがX線写真上で消失した。そこで、これらのトビには24時間以内に再度鉛ペレットを1個ずつ投与した。対照群および鉛投与群は、最初の鉛投与から30日後にペントバルビタールナトリウムの過量投与で安楽死させた。

カモの飼育実験では、鉛投与後1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日に鳥の上腕静脈から5 mlの血液サンプルを採取した。血液は凝固を避けるために速やかにヘパリン処理し、2時間以内に処理するまで氷上に置いた。ヘパリン処理した血液は2つの分注に分けた。1つは血中鉛分析用、もう1つはALAD活性測定用として保存した。

トビの投与実験では、鉛処理後6時間と12時間、1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日目に鳥の上腕静脈から4 mlの血液サンプルを採取し、すぐにヘパリン処理をして、2時間以内に処理するまで氷上に保存した。血液の処理は、アヒルの実験と同じであった。

安楽死後、臓器を摘出し、3つに分割した。一つは病理組織学的な解剖に、もう一つはLA-ICP-MS分析に、もう一つは鉛濃度の分析に使用された。

鉛はシステイン残基を介して δ ALADに結合し、その活性を阻害することが知られている。ポルフォビリノーゲン合成酵素とも呼ばれる δ ALADはヘム環を合成する最初のステップを担っているが、通常、亜鉛によって触媒されるこの反応が鉛によって亜鉛が入れ替わることで不活化し、ヘムが合成できないことで貧血など血液毒性を起こす。 δ -ALAD活性および非活性化酵素とin vitro活性化酵素の比率は、既報に従い、分光光度法アッセイにより測定した。0.5 M モルホリンスルホン酸（MES）の代わりにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を使用する。ALADを過剰な δ -アミノレブリン酸（ALA）と亜鉛の存在下/非存在下でインキュベートした。その後、ALAから変換されたポルフォビリノーゲンをEnrich試薬と混合し、555nmの吸光度を分光光度計で測定した。

②鉛濃度の分析

鳥類臓器中の鉛濃度の分析は、既報の通り行った。サンプルは、マイクロウェーブで硝酸（ HNO_3 ）および過酸化水素（ H_2O_2 ）で消化された。鉛の濃度はICP-MS 7700シリーズ（Agilent Technology, Tokyo, Japan）を用いて測定した。分析品質管理は、Bone Ash（National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD）、DOLT-4（イヌ肝臓）およびDORM-3（魚タンパク質）（National Research Council of Canada, Ottawa, Canada）認証標準物質を用いて実施した。これらの標準物質の繰り返し分析では、良好な回収率（95 - 105%）を示しました。機器の鉛の検出限界は $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。Pb 濃度分析には、タリウム（205TI）を内部標準物質として用いた。

③病理学的解析

病理組織学的解析のため、臓器（肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳、中脳、小脳、骨髄）を10%緩衝ホルマリンで室温48時間固定し、パラフィンに包埋した。埋没した臓器を4 μ mの厚さで切片化し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）で染色した。

④LA-ICP-MS

LA-ICP-MSのために、臓器（肝臓、脾臓、腎臓、大脳）を滅菌PBSで洗浄して血液を除去し、Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan Co.,Ltd., Tokyo, Japan) で包埋した。埋め込んだ組織は、ドライアイスで冷やしたイソペンタン中で凍結し、乾燥させた後、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。凍結した組織は、クライオスタットLeica CM 3500を用いて15 μ mの厚さで切片化した。隣接する切片はHE染色用に8 μ mの厚さに切断した。切片はICP-MS 8800 series (Agilent Technology, Tokyo, Japan) で分析し、集光レーザービームで走査した。レーザースポットサイズ、スキャン速度線、線間オフセットは、それぞれ100 μ m、100 μ m s⁻¹、100 μ mに設定した。ICP-MSの条件は以下の通りである。RFプラズマ源、1600 W; Heキャリアガス、0.8 L min⁻¹。測定された同位体（滞留時間，秒）は以下の通りであった。13C (0.005), 206 Pb (0.01), 207 Pb (0.01), 208Pb (0.01)である。

⑤遺伝子網羅的解析

また、飼育実験により得られた試料を用いて、マイクロアレイなど網羅的解析により、新たな毒性の指標を同定した。鉛が引き起こす毒性影響のイメージングと合わせて、鉛分布とバイオマーカーの発現について明らかにした。

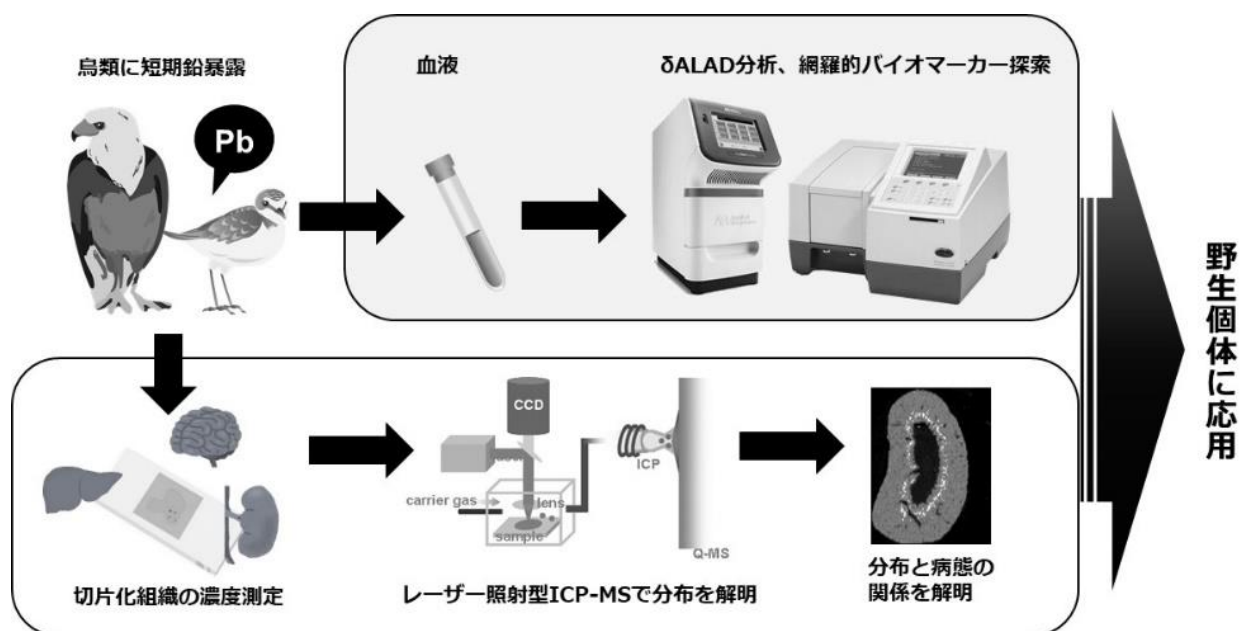


図2. 1 研究スキームI

2) 鳥類培養細胞による鉛の免疫系への影響評価

国立環境研究所でストックされているハヤブサ、イヌワシ、オオタカ、クマタカ等の培養細胞を用いて、インフルエンザウイルスの増殖を抑制する機能があるMX遺伝子の発現について、鉛の影響を明らかにした（図2. 2）。鉛10 μ Mを暴露した後に、鳥インフルエンザウイルス（H5N1亜型）に感染させ、Mx遺伝子、GAPDH遺伝子、PGK1遺伝子について、感染12時間後のmRNAの発現量を定量的リアルタイムPCRで調べた。また、発現する遺伝子を網羅的に解析するため、サブテーマ1と共同でトランスクリプトーム解析を行った。

3) 鉛の由来の同定

鉛は、すべての原子に陽子が82個存在するが、中性子が122個ある ^{204}Pb の量は一定であるが、時間の経

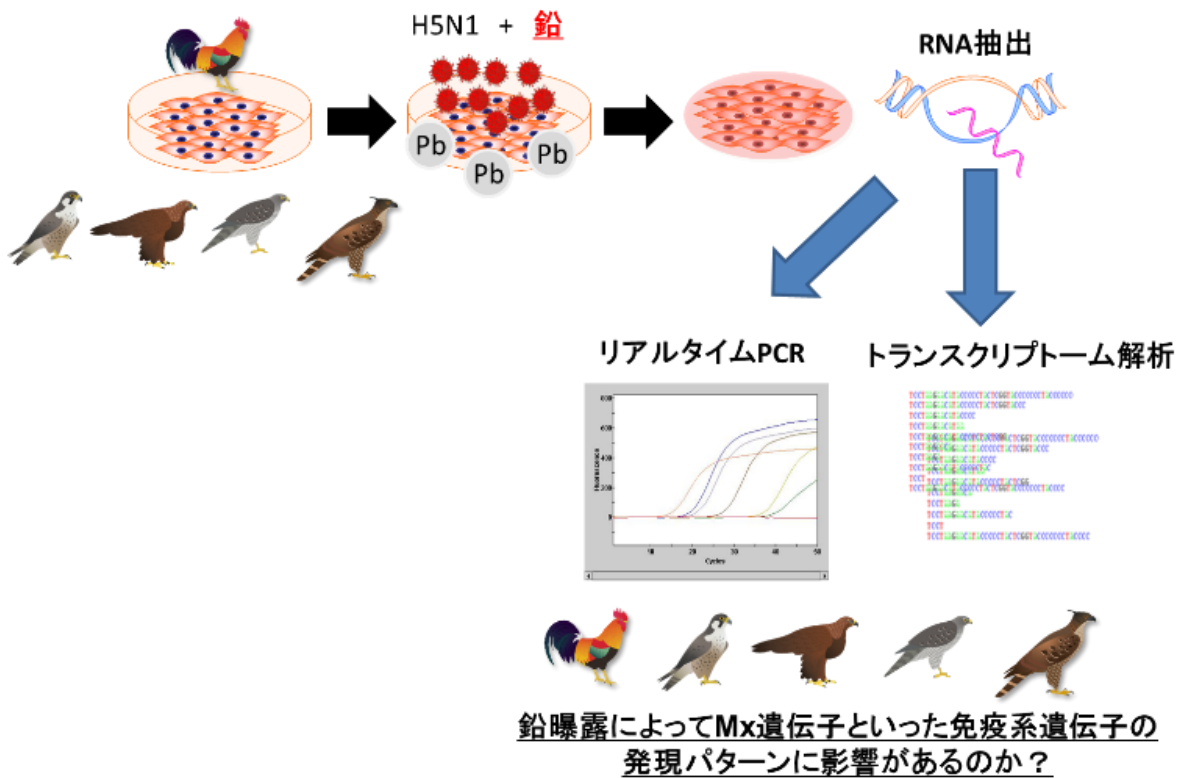


図2. 2 研究スキームII

過により、ウラン、トリウムが壊変し、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb 、 ^{208}Pb が生成される。これを利用し、鉛の生産地もしくは鉛鉱床ができた時期の違いにより、同位体比 ($^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$) を分析することで、その由来を判別することができる。野生動物の鉛中毒の主な原因となっているのは、鉛ライフル弾、散弾、釣錘などである。これらの鉛製品にはそれぞれ特有の鉛安定同位体比があることが報告されている。我々はこれまで、鉛同位体分析により、鉛中毒となったオオワシ、オジロワシなどの汚染源について、ライフル弾が主であることを報告してきた。そこで、さらにこの安定同位体分析の精度を上げ、より詳細な汚染源の特定を行う技術を開発する。フィールド採集において鉛が検出された個体について、高解像マルチコレクターICP-MS (Neptune Plus) を用いて鉛同位体比を測定した。また、誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry: ICP-MS) を用いて多元素分析による鉛由来の同定方法についても検討した。

4) 野生鳥類の鉛分析

サブテーマ1および3との協働により、北海道及び本州より採集された鳥類の肝臓や腎臓、血液より、鉛濃度を分析する。高濃度の鉛曝露が検出される場合には、②で確立する安定同位体比などでその由来について検討した。

4. 結果及び考察

1) 野生種鳥類の飼育と鉛曝露

①カモとトビにおける鉛の一般毒性

体重に鉛投与に起因すると思われる変化は認められなかった。カモの解剖所見では1羽を除くすべての鉛投与カモの胃には、鉛ペレットが残存していた。対照群1羽を含むカモ3羽では肝臓の表面に局所的な変色病巣が見られた。鉛投与のカモ1羽では、軽度の肝腫大と肝臓の表面に多発性の黄色い病巣が観

察された。脾臓は軽度に腫脹していた。また、右後脚に欠損が見られた。その他のカモでは、肉眼的な病理学的変化は認められなかった。肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、副腎、甲状腺、大脳、中脳、小脳、膵臓、空回腸、盲腸、直腸、ファブリキウス嚢、筋肉、骨、羽を採集し、重量について調べたが、鉛に起因すると思われる臓器重量の変化は認められなかった。また、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、大脳、小脳、ファブリキウス嚢について一般的な病理組織学的検査を行ったが、鉛に起因すると思われる毒性学的な変化は認められなかった。

トビについては、鉛処理した全てのトビの消化管内には鉛のペレットは見られなかった。鉛投与したトビの内2羽では肝臓の表面に黄白色の局所的な病巣が見られた。そのうち1羽の心臓は軽度の脆弱性を有していた。鉛を投与したトビおよび対照群のその他の臓器には、肉眼的な病理学的変化は認められなかった。血中の鉛濃度は投与後速やかに上昇した。投与後24時間以内に、通常、鳥類で鉛ばく露レベルと判定される0.1-0.6mg/L濃度に到達した。

鉛を投与したカモ2羽および対照群1羽3は肝細胞の水腫性変性や肝細胞の空胞性変性が認められた。多くのカモで、腎尿細管上皮の空胞化が見られた。カモ投与個体のうち1羽では肝門部、肝類洞、脾臓の白色パルプにアミロイドの沈着が認められた。

トビの病理組織学的所見について、鉛投与群1羽では、腎臓の集合管の肥大と骨髄の軽度の低形成が観察された。また他の鉛投与群1羽で、軽度の心筋炎と軽度の肺うっ血が認められた。すべてのトビで、腎尿細管上皮にリポスチンの沈着が認められた。対象群のトビ1羽では肝臓の類洞にアミロイドの沈着が認められた。

カモおよびトビの酸菌染色した腎臓切片では、核内鉛封入体は認められなかった。

以上より、鉛投与による病理学的な変化は認められなかった。

②カモとトビにおける鉛の動態と排泄

鉛散弾投与後、カモではトビの三倍量を投与したにもかかわらず、血中の鉛濃度はトビの方が高い値を示した(図2. 3)。また糞便では、トビは鉛排泄をスパイク的に高濃度で排泄することが分かり、カモとの種差を示した(図2. 4)。

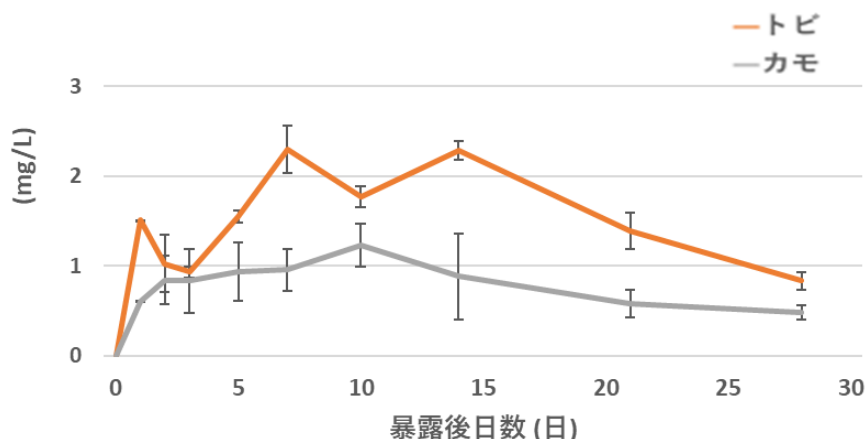


図2. 3 鉛の血中濃度の経時的変化

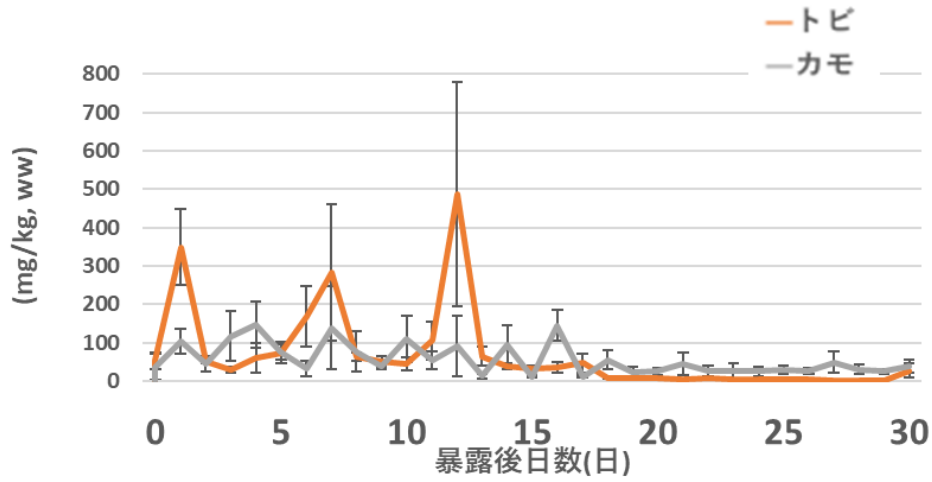


図 2. 4 鉛の糞中濃度の経時的変化

③鉛の臓器蓄積変化

カモおよびトビはいずれも腎臓は予想通り、臓器中で鉛の高い蓄積性を示した。また、両種ともに、鉛投与後に速やかに骨に鉛が蓄積した（図 2. 5、図 2. 6）。

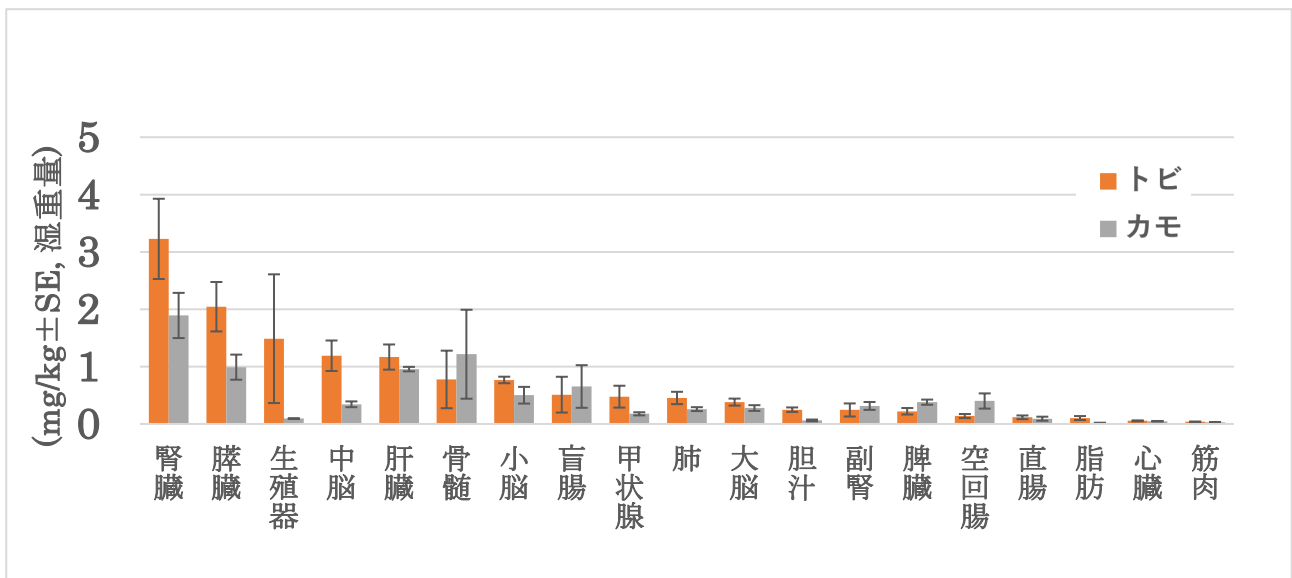


図 2. 5 鉛投与群におけるカモとトビの臓器中鉛濃度

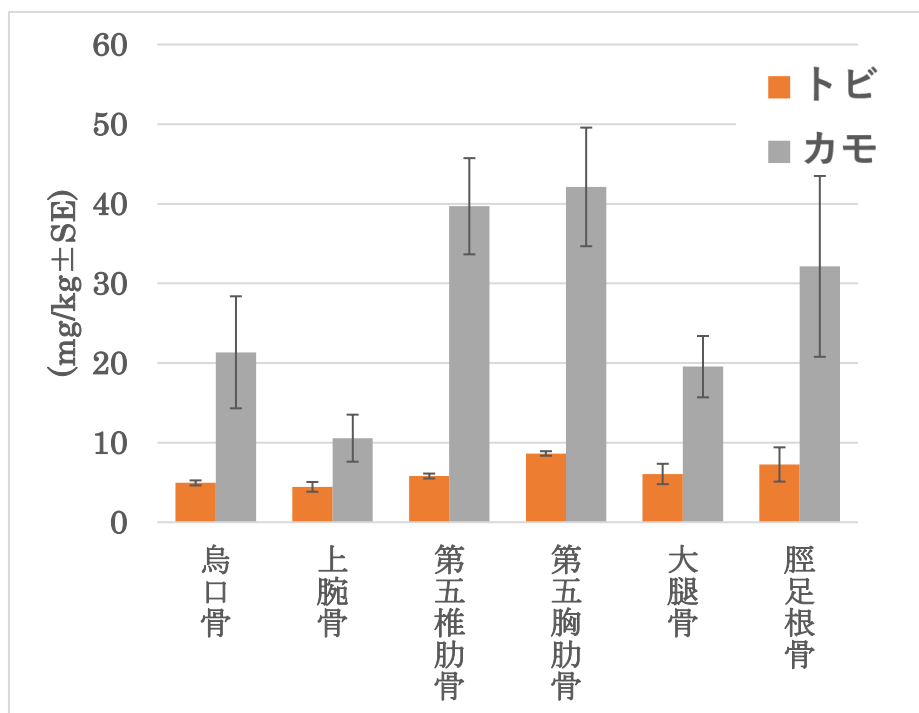


図2. 6 鉛投与群におけるカモとトビの骨中鉛濃度

④鉛のバイオマーカー試験

さらに、血液のALAD活性を分析したところ、鉛投与後24時間以内に速やかに減少した（図2. 7）。ALAD活性は血中鉛濃度と負の相関を示すが、カモでは鉛濃度が0.1-0.2mg/Lを超えると急激に減少することから、定量性を得られる鉛濃度の範囲は狭いことが分かった。しかし、その減少は速やかであり、鉛曝露の指標として鳥類でも有効であることが分かった。

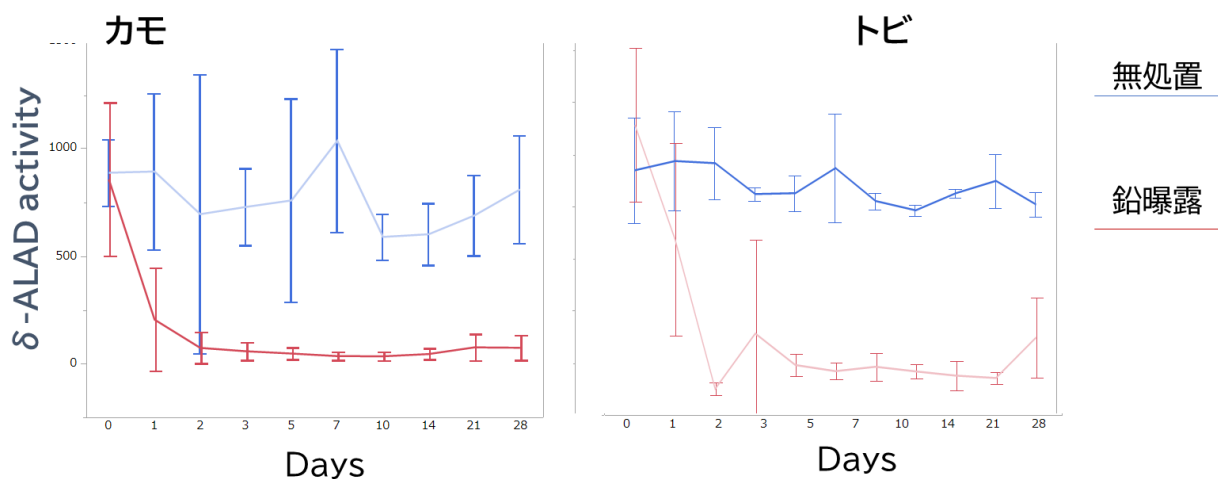


図2. 7 鉛投与群におけるカモとトビの血液のALAD活性の経時的変化。

⑥鉛投与後のRNA-seq解析による遺伝子変化

脾臓に発現する遺伝子を次世代シーケンサーによって網羅的に解析した結果、鉛曝露の起因する特徴的な遺伝子発現パターンは得られていないが、鉛濃度の高い個体では、エンリッチメント解析により、薬物代謝酵素群や酸化ストレス関連遺伝子について変動が認められた。また、一部免疫関連遺伝子に変化が認められたため、定量的PCRにより発現するmRNA量を定量したところ、TLR3について発言の上昇が認められた（図2. 8）。

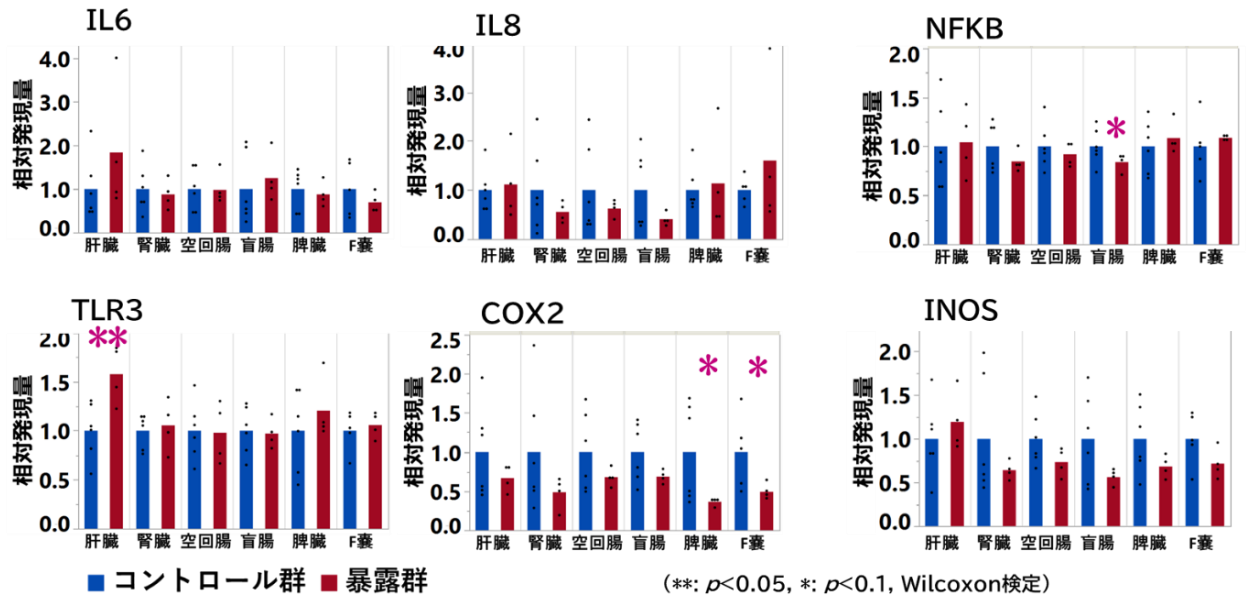


図 2. 8 免疫系関連遺伝子の発現変化

⑤鳥類培養細胞による鉛の免疫系への影響評価

図のように、鉛曝露により、インフルエンザウイルス感染時のMx遺伝子の発現量が低下することが明らかとなった(図 2. 9)。また、培養細胞における鉛曝露後の遺伝子網羅的解析を実施したが、結果についてはサブテーマ 1 に詳細を記載した。

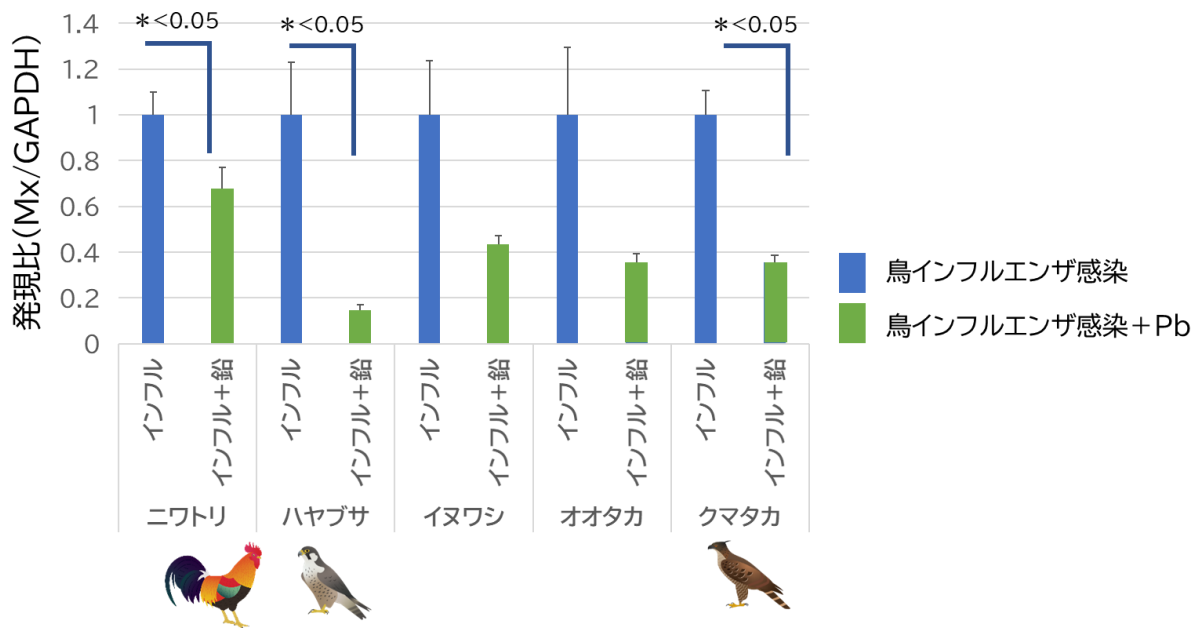


図 2. 9 鳥類種の細胞への鉛曝露によるMx遺伝子発現実験

⑥LA-ICP-MSによるカモ及びトビの鉛の臓器分布分析(表 2. 1)

鉛の臓器分布を明らかにするために、モデル実験としてマウスに鉛を投与してLA-ICP-MSによる臓器のイメージング解析技術を確認し、予定通り2020年度に鉛投与後の鳥類に応用可能とした。カモでは、肝臓に静脈を除くびまん性の集中的な鉛の集積が認められた。胆嚢の内腔にも鉛の集積が見られた。脾臓では、鉛の蓄積は赤色脾髄に限定されていた。腎臓の皮質には、びまん性に鉛の蓄積が見られた。小葉間静脈の周囲の皮質は、中心静脈の周囲に比べ、より多量の鉛の蓄積を示した。特に、髓

円錐部には鉛の蓄積は見られなかった。大脳では、線条体や視床に比べ、淡蒼球や海馬にやや高い濃度で拡散的に鉛が蓄積された。

トビの肝臓では、実質へのびまん性蓄積に加え、血管壁への集中的な鉛の蓄積が観察された。脾臓では、脾動脈の壁に、赤色脾髄よりもはるかに多量の鉛の集積が見られた（図2. 10）。腎臓では、鉛の分布パターンは鴨の腎臓と同じであった。皮質部にびまん性に鉛が蓄積し、小葉間静脈付近でより高濃度であった。拡張した集合管に含まれる物質も鉛のシグナルを示した。大脳では、実質部でのびまん性集積に加え、過皮質、海馬、視床の周辺部での集中的な鉛集積が認められた。

また、鉛を投与したカモにおいて、必須元素である銅の脳の局在に変化が認められた（図2. 11）。鉛に投与によって、中枢神経において他の金属の局在が変化することを示唆した。

表2. 1 各臓器における鉛局在

臓器	カモ	トビ
肝臓	びまん性	血管壁
脾臓	赤脾髄領域	赤脾髄領域、血管壁
腎臓	中心静脈周囲の皮質領域 / 髄質にはなし	
心臓	解析なし	血管壁および心軟骨組織
脳	カモ	トビ
大脳	びまん性	視床、高外套、海馬
中脳	灰白質の一部(※バラツキあり)	灰白質の一部
小脳	プルキンエ細胞層および白質の一部	分子層、プルキンエ細胞層

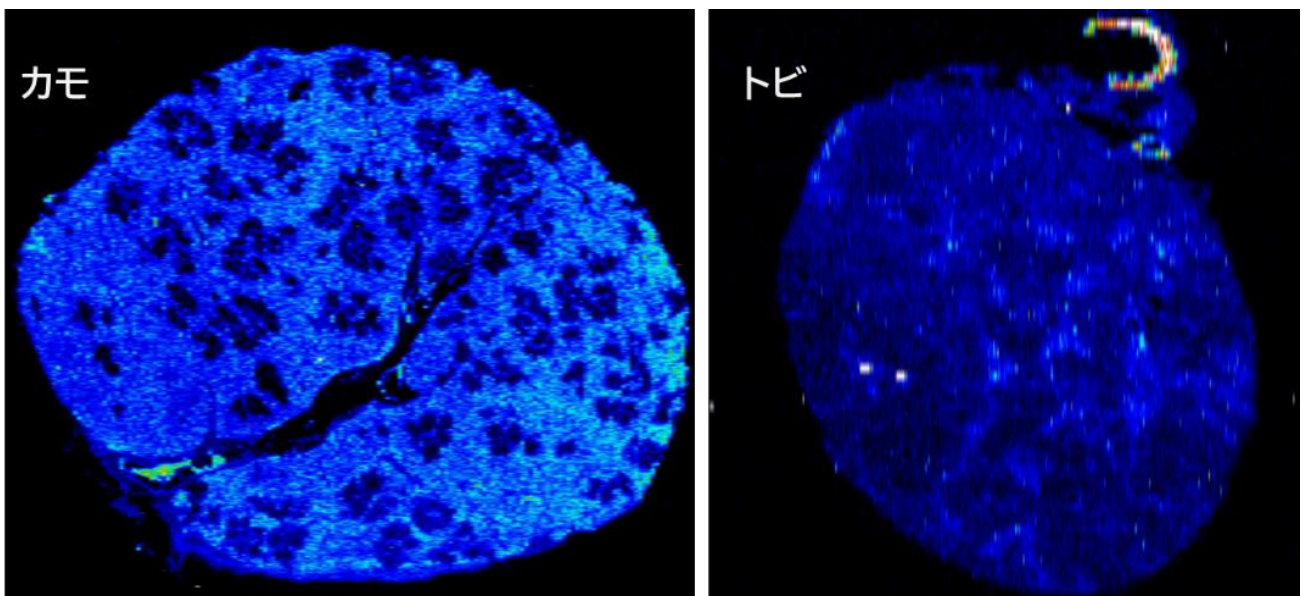


図2. 10 脾臓における鉛局在

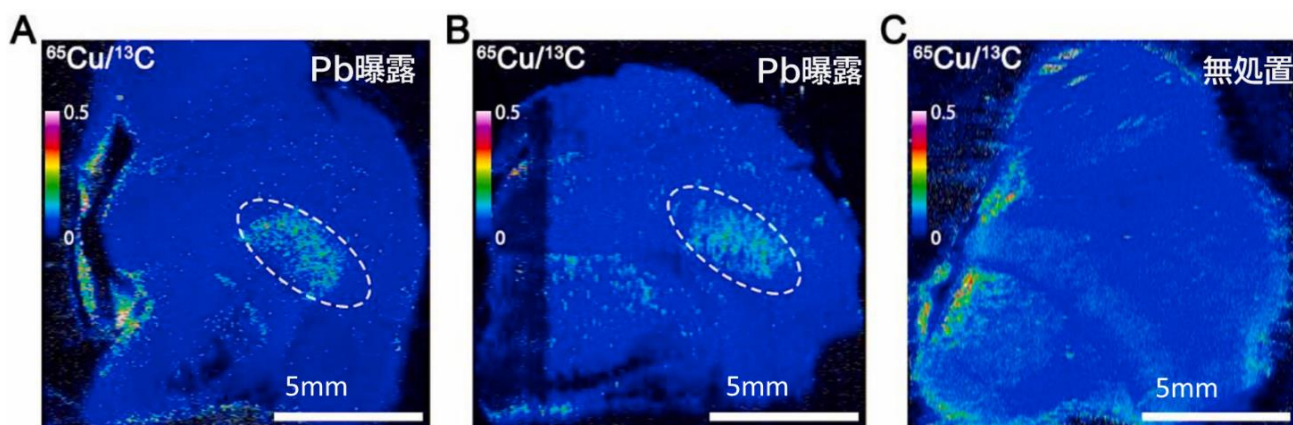


図2. 1.1 鉛曝露による脳の銅の局在変化

2) 鉛の由来の同定

鉛は、すべての原子に陽子が82個存在し、中性子が122個ある。204Pbの量は一定であるが、時間の経過により、ウラン、トリウムが壊変し、206Pb、207Pb、208Pbが生成される。これを利用し、鉛の生産地もしくは鉛鉱床ができた時期の違いにより、安定同位体比（207Pb/206Pb、208Pb/206Pb）を分析することで、その由来を判別することができる。野生動物の鉛中毒の主な原因となっているのは、鉛ライフル弾、散弾、釣錘などである。これらの鉛製品にはそれぞれ特有の鉛安定同位体比があることが報告されている。そこで、鉛弾や釣り鉛を入手し、鉛の安定同位体分析を行った（図2. 1.2）。鉛安定同位体により、206Pb、207Pb、208Pbの比率を分析し、鉛の由来について推測をすることを計画した。さらに、204Pbの安定同位体も分析し、より正確な同定が可能かどうか検討した。また、誘導結合プラズマ質量分析計（Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry: ICP-MS）を用いて多元素分析による鉛由来の同定方法についても検討した。

① 同位体解析

野生動物の鉛中毒の主な原因となっているのは、鉛ライフル弾、散弾、釣錘などである。これらの鉛製品にはそれぞれ特有の鉛安定同位体比があることが報告されている。そこで、この安定同位体分析を用いて、より詳細な汚染源の特定を試みた。入手可能な鉛弾（ライフル弾、スラグ、散弾：n=17）および釣り鉛（ナス型、ガン玉：n=14）、ICP-MSにより、206Pb、207Pb、208Pbの比率を用いて鉛の由来を同定したところ、それぞれの比率により一定程度の同定は可能であった（図2. 1.3）。



図2. 1.2 解析に用いた鉛ライフル弾

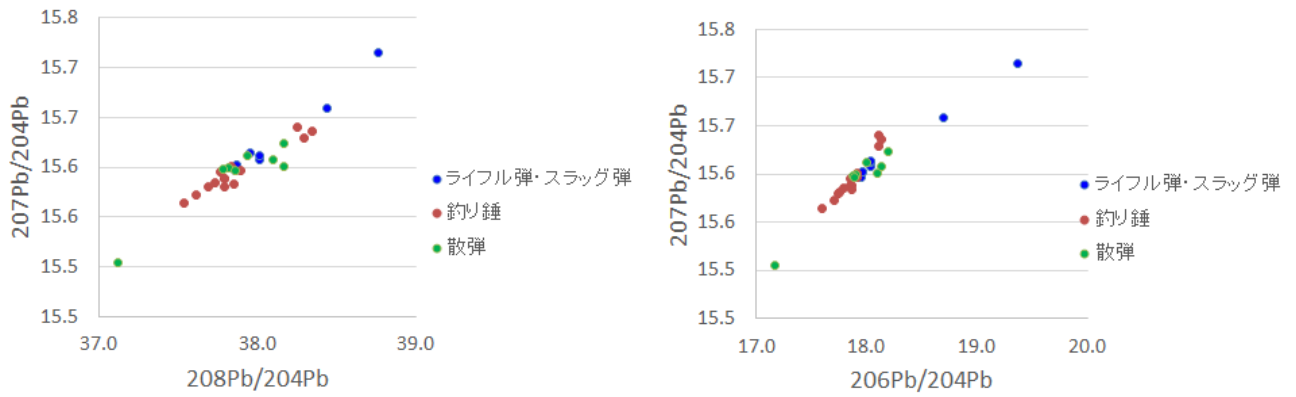


図2. 13 鉛ライフル弾、散弾、釣り錘における鉛安定同位体比。

しかし、一部、安定同位体比が類似する領域があったことから、さらに精緻な安定同位体比を求めるために、より精度の高い質量分析計 (High Resolution Multicollector ICP-MS ; Neptune plus) を用いて204Pbについても分析を行った (図2. 14)。フィールド採集において鉛が高濃度で検出された個体について、高解像マルチコレクターICP-MS (Neptune Plus) を用いて鉛安定同位体比を測定した。しかし、204Pbを含めての安定同位体比を用いても、弾丸と釣り錘のプロットは重なるため鑑別は難しいことが分かった。

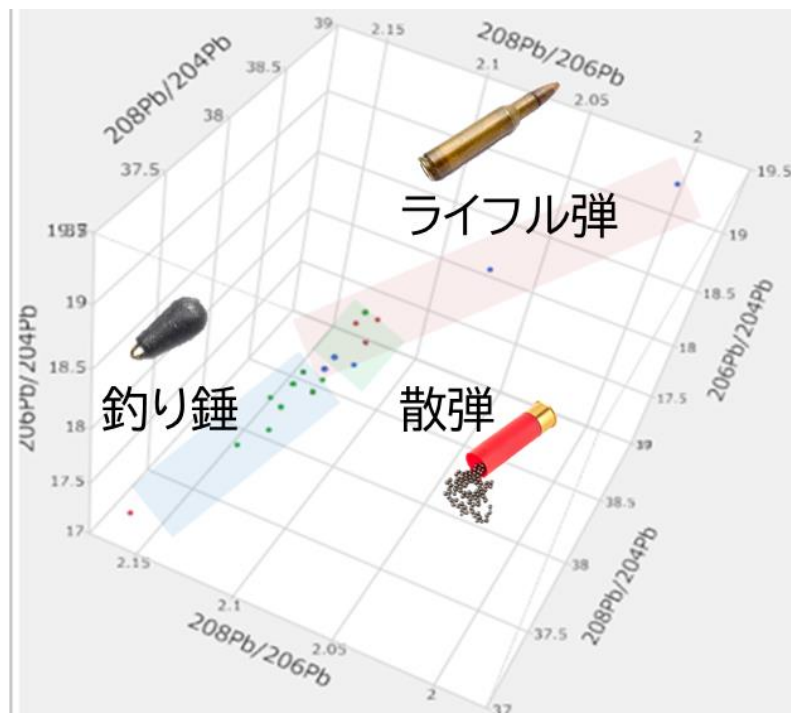


図2. 14 生体試料の鉛同位体解析による由来分別

この手法により野外で採取したカモ類の糞便から検出される鉛の由来を判定した。対象はサブテーマ3で収集した野生カモ類の糞便の中で、特に鉛の濃度が高かった13検体とした (濃度27.69～856.08mg/kg) (図3. 8)。各同位体を測定し、206Pb / 204Pb、207Pb / 204Pb、208Pb / 204Pb、208Pb / 206Pb、207Pb / 206Pbの値についてクラスター解析を行った。その結果、13検体中11検体が鉛製銃弾による鉛が糞便中に含まれていることが明らかとなった (図2. 15)。このように、フィールドの糞便試料においても、鉛由来の同定が一部可能であることが明らかとなった。

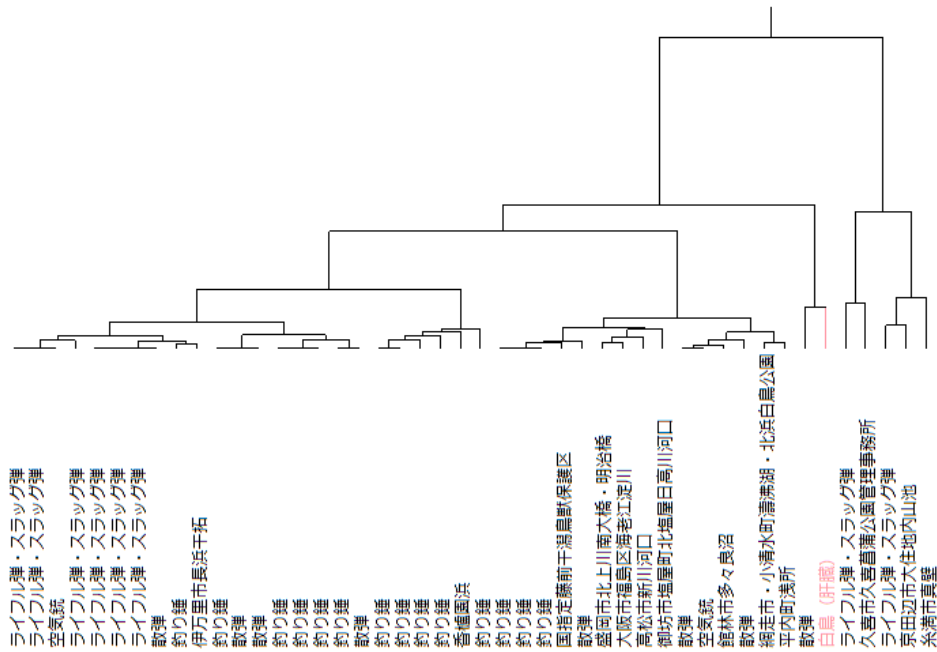


図2. 15 鉛同位体による国内のカモ糞便の鉛汚染の判別解析

② 多元素解析

多元素分析のために、ICP-MSにて35元素を分析した。そのうち、Mg、Al、Ni、Cu、Zn、As、Cd、Sn、Sb、Cs、Ba、Wについて、相対標準偏差（RSD, relative standard deviation） < 10を示した（図2. 16）。散弾ではCs（セシウム）、ライフル・スラッグ弾ではW（タングステン）、釣り錘ではCu（銅）の含有量が比較的高い傾向を示した。従って、ライフル弾、散弾、釣り錘に含まれるセシウムやタングステンなどの微量な元素の違いにより、胃内破片の場合は、由来を同定することが可能であることが分かった。しかし、野生個体の肝臓試料においては、各曝露原因に認められた傾向は確認できず、食餌由来等による金属蓄積の個体差が、曝露原因物質の元素構成比の違いを上回っていることが推測された。

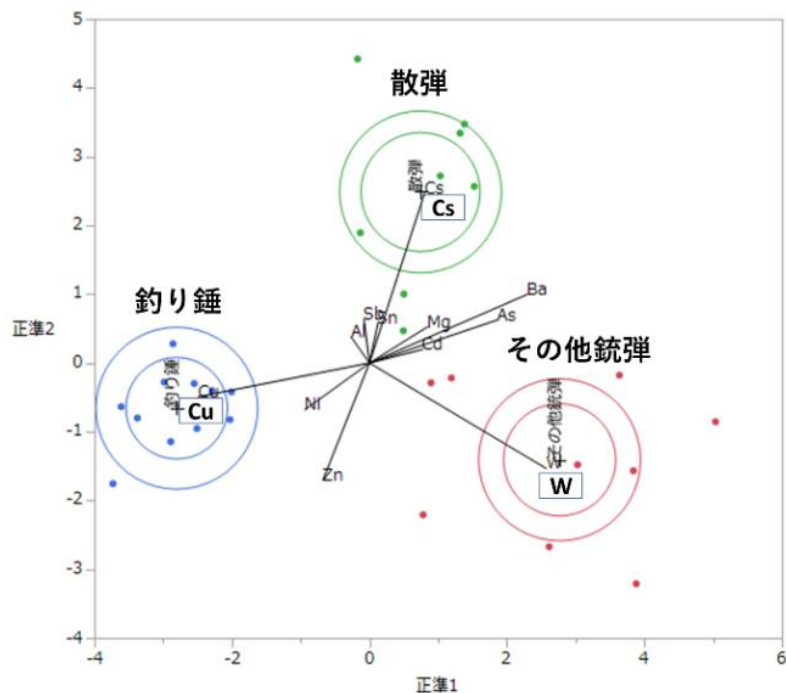


図2. 16 鉛ライフル弾、散弾、釣り錘におけるICP-MSを利用した多元素分析結果。

3) 野生鳥類の鉛分析

国内より回収された鳥類の試料臓器について、鉛濃度の解析を行った。北海道では中毒レベルの鉛濃度が検出された。一部、本州で採集されクマタカについては高濃度の鉛が検出されたため、安定同位体比解析を行った。また、本州より採集されたオナガガモでも高濃度の鉛暴露を示すレベルで、肝臓から鉛濃度が検出された。北海道に限らず、本州においても鉛中毒個体が散見する可能性が示唆された。データの詳細については、サブテーマ3において記載する。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ②では以下の成果を挙げた。

- ① 同位体を用いた分類方法について検証し、鉛破片そのものにおいては他元素解析（図2. 16）、生物試料においては同位体解析（図2. 14）が、鉛由来の推測に役立つことが明らかにした。
- ② サブテーマ3と共同で、カモ及びトビの鉛投与実験を行い、鉛の動態や毒性の種差について明らかにした（図2. 3、図2. 4、図2. 5、図2. 6、図2. 7）。
- ③ 5種の鳥類の培養細胞に鉛を暴露し、鳥インフルエンザウイルスに感染させ、Mx遺伝子の発現量について定量した。いずれも、鉛曝露によってMx遺伝子の発現量が対照群に比べて抑制されることが明らかとなった。特に、ハヤブサ、クマタカ、ニワトリの抑制状態は統計的に有意であった（図2. 9）。加えて、Mx遺伝子の発現量が有意に減少していたハヤブサ、クマタカ、ニワトリについては、サブテーマ1と共同で、発現遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、鉛の曝露下でHPAIVをこれら3種の細胞に感染させると、発現している遺伝子のうち約半数のもので発現量がコントロールと比較して減少することが明らかにした（図1. 11、図1. 12）。

以上のような成果を挙げたことから、掲げた全ての目標を達成したと判断した。特に、鉛曝露による免疫抑制を遺伝子発現レベルで証明した点は、設定した目標以上の成果である。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

II-3 希少鳥類の鉛汚染実態把握を行うための効率的な全国サーベイランス技術の開発

[要旨]

今回の研究により、カモ類を生体捕獲して血中鉛濃度を測定することによって、これまで死体や傷病個体の調査では明らかになっていなかった個体群の鉛汚染状況や汚染率の季節的差、鉛散弾を摂食する可能性がある場所などが判明した。全国で同様の生体捕獲を行い、送信機を用いた追跡調査を行うことにより、越冬地や渡りのルート上における鉛中毒の発生状況や潜在的なリスクを把握できる可能性があり、全国的なサーベイランス手法の一つになると考えられた。猛禽類についても、死体や傷病個体のモニタリングに加えて、生体捕獲と行動追跡を全国各地で行うことにより、鉛汚染の実態や潜在的なリスクを明らかにできると考える。また、全国を対象にした傷病個体や死体の調査については、とくに収容地における検体の一時保管体制を強化することにより、鉛汚染状況調査に資する検体の充実化を図ることができると思われる。さらに、HPAI調査で採取されたカモ類の糞便は、全国的な水鳥の鉛汚染状況を把握する上での一助となり得ることが明らかとなった。

1. 研究開発目的

希少猛禽類の鉛汚染が世界的な問題になっており、北海道においては1990年代よりオオワシ (*Haliaeetus pelagicus*) やオジロワシ (*Haliaeetus albicilla*) など200羽以上が鉛中毒により死亡している^{1, 2, 3)}。また、本州以南にも広く分布するクマタカ (*Nisaetus nipalensis*) において

も、多数の鉛中毒個体が確認されている³⁾。主な鉛汚染源は狩猟用の鉛ライフル弾や鉛散弾で、特に大型獣の狩猟残滓を採食する事により発生している。北海道では2000年度より段階的に鉛弾の使用が禁止されたが猛禽類の鉛中毒は現在も発生しており、規制の無い道外から鉛弾が持ち込まれ使用されている可能性が高い。北海道以南において鉛弾は一部を除き合法的に使用されており、同地域に生息するイヌワシ (*Aquila chrysaetos*) やクマタカでも鉛中毒が確認されているが、希少性や広い行動圏を持つ生態などからその実態は十分に把握できているとは言えない。このような状況を踏まえ、希少鳥類（特に猛禽類）における鉛中毒の防止策を講じるために、全国を視野に入れた効率的なサーベイランス技術の開発を実施した。

2. 研究目標

飼育下で野生鳥類の鉛散弾投与試験を実施し、鳥類において血液や糞便等が鉛汚染状況のモニタリングの指標となりうるのか評価する。希少鳥類への鉛汚染源となる狩猟動物の各種データ（狩猟数、血液や糞便などの鉛濃度）と希少鳥類の血中鉛濃度のデータを全国レベルで入手し、サブテーマ1へ情報を提供する。送信機を装着したクマタカの行動解析を進め、鉛汚染の経路と過程を推察する。

3. 研究開発内容

1) 餌資源となる野生動物の鉛汚染状況の把握

猛禽類における鉛中毒の防止策を検討する上で、自然餌資源の鉛汚染状況を把握することは重要である。猛禽類の鉛中毒の発生機序には2通りあり、ひとつは鉛散弾を誤食した水鳥などを捕食することによる食物連鎖を介したもので、もう一つは狩猟において鉛弾に被弾した獲物を採食することによるものである。

水鳥用の鉛散弾を筋胃内に蓄積する小石と誤認して飲み込み、鉛中毒になることが以前より知られているカモ類は、生態系における高次消費者の餌資源となっていることから、その鉛汚染状況の把握が不可欠である。本研究において、埼玉県と千葉県にある宮内庁鴨場において網によって捕獲されたカモ類の血中鉛濃度を測定した。鴨場は、伝統的な鴨猟などを継承することを目的に、埼玉県越谷市の「埼玉鴨場」と千葉県市川市の「新浜鴨場」の2か所が存在し、それぞれ約12,000平方メートルの元溜（もとだまり）と呼ばれる池には、毎年2千羽を超える野生のカモ類が渡りの中継地や越冬地として利用している。同地では鳥を傷つけない伝統的な鴨猟が行われているが、これは訓練したアヒルを使ってカモを猟者が潜む直線的な細い水路に誘導し、飛び立つ瞬間を網で捕獲するものである。捕獲されたカモ類は通常、種や性別などを記録したのち、環境省発行の標識用足環をつけて放鳥されている（図3.1）。今回の研究では、これら銃猟以外の方法で捕獲された様々なカモ類を放鳥前に採血し、個体群における鉛汚染状況の把握を試みた。調査地は同じ関東圏ではあるものの、海に面した千葉県と内陸の埼玉県に位置していることから、異なる周辺環境における鉛汚染状況を調べることができる。また、カモ類の多くが越冬する冬期に加えて、越冬地に渡来した直後または渡りの中継地として鴨場を利用する秋期に調査を行うことにより、季節による鉛汚染状況の差を確認することとした。調査は当日午前中の鴨猟で捕獲されたカモ類を対象とし、捕獲状況に応じて個体を選定した。その結果、供した種は、オナガガモ (*Anas acuta*)、ホシハジロ (*Aythya ferina*)、キンクロハジロ (*Aythya fuligula*)、ハシビロガモ (*Anas clypeata*)、マガモ (*Anas platyrhynchos*)、コガモ (*Anas crecca*)、ヨシガモ (*Anas falcata*) の7種となり、オナガガモが全体の64.0%、次いでホシハジロが17.1%を占めた。また、調査した個体数は総計で309羽となり、2020年2月13日に埼玉鴨場での92羽（29.7%）が1箇所における1日の調査数としては最も多くなった（表3.1）。

本調査ではカモ類の13.9%（309羽中43羽）で高濃度の鉛汚染が確認された（表3.2）。2018年度は2019年2月、2019年度は2020年2月に調査を実施したが、鉛汚染率はそれぞれ14.6%（n=89）、17.8%（n=135）であった。また、2020年度は同年11月に同様の調査を行ったところ、鉛汚染率は7.0%（n=85）に過ぎず、当地を利用する個体群の入れ替わりや越冬中に周辺環境で鉛を摂取していること

が示唆された。

また、両調査地における鉛汚染状況を比較すると埼玉県は13.9%、千葉県13.1%となり大きな差は確認されなかった。種における鉛汚染状況の比較では、被検個体数順にオナガガモでは10.1%、ホシハジロ22.6%、キンクロハジロ20.8%、ハシビロガモ26.7%、マガモ5.9%、ヨシガモ100%、コガモ0%となった（表3.3）が、検査に供した個体数が種によって大きなばらつきがあるため、汚染状況については参考値となる。種によって傾向が異なる行動生態に視点を置くと、水面採餌性のハシビロガモ、逆立ちをして水底の餌も採食することが多いオナガガモ、潜水採餌性のハジロ類のすべてにおいて高濃度の鉛汚染が確認された。高濃度の鉛汚染が確認された時期を種毎に比較してみると、オナガガモではすべての調査時期において鉛汚染個体が確認された一方、マガモやハシビロガモでは冬期調査のみ、ヨシガモでは秋期調査のみで確認されているが、各調査において調査に供した個体数が種によって異なることが影響している可能性がある（図3.2）。



図3.1 伝統的な鴨猟で捕獲されたカモ類

表3.1 調査に供した種と個体数

	2019年2月		2020年2月		2020年11月		小計(種)
	2019/2/7埼玉	2019/2/15千葉	2020/2/13埼玉	2020年2月千葉	2020/11/17埼玉	2020/11/千葉	
オナガガモ	23	34	42	43	18	38	198
ホシハジロ	17	2	26	0	1	7	53
キンクロハジロ	5	1	13	0	0	5	24
ハシビロガモ	1	5	0	0	1	8	15
マガモ	1	0	10	0	6	0	17
ヨシガモ	0	0	0	0	0	1	1
コガモ	0	0	1	0	0	0	1
小計(採取日)	47	42	92	43	26	59	309

表3. 2 捕獲されたカモ類の鉛汚染状況

年.月	捕獲羽数		鉛汚染確認数		鉛汚染率	
	埼玉県	千葉県	埼玉県	千葉県		
2019. 2	47	42	7	6	14.6%	
2020. 2	92	43	16	8	17.8%	
2020.11	26	59	0	6	7.0%	
計	165	144	23	20		
	総数		総数		43	13.9%

表3. 3 高濃度の鉛が確認されたカモ類の地理的および时期的な内訳

	2月 (2019,2020) 埼玉		2月 (2019,2020) 千葉		11月 (2020) 埼玉		11月 (2020) 千葉		全調査 高濃度鉛汚染率(%)
	全捕獲数	鉛汚染個体数	全捕獲数	鉛汚染個体数	全捕獲数	鉛汚染個体数	全捕獲数	鉛汚染個体数	
オナガガモ	65	5	77	10	18	0	38	5	10.1
ホシハジロ	43	12	2	0	1	0	7	0	22.6
キンクロハジロ	18	5	1	0	0	0	5	0	20.8
ハシビロガモ	1	0	5	4	1	0	8	0	26.7
マガモ	11	1	0	0	6	0	0	0	5.9
ヨシガモ	0	0	0	0	0	0	1	1	100.0
コガモ	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
小計	139	23	85	14	26	0	59	6	13.9

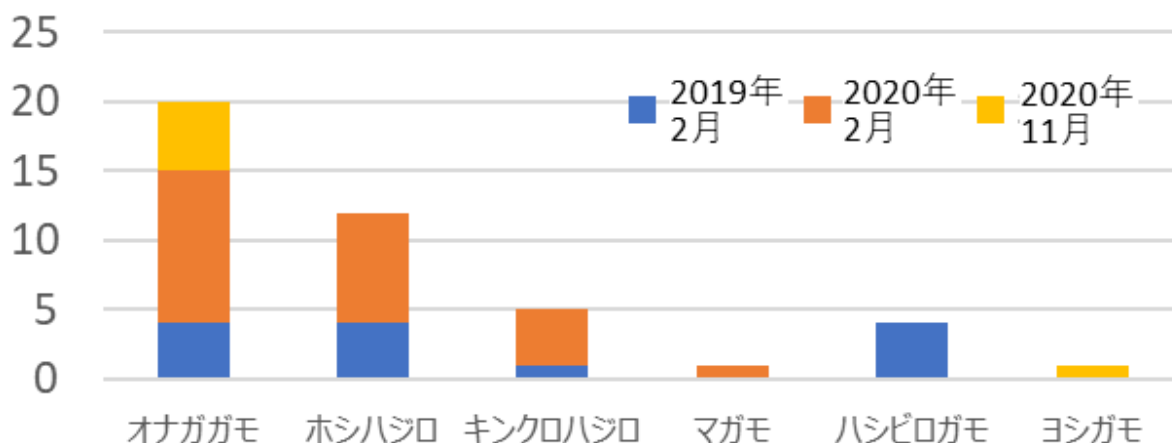


図3. 2 高濃度の鉛汚染が確認された種と調査時期

カモ類の血中鉛濃度の測定には、簡易血中鉛濃度測定機であるMagellan Diagnostics社製のLeadCare II Blood Lead Analyzer を用いて実施した。これは抗凝固処理した全血50 μ Lを用いて3分間で鉛濃度を測定できるものである。

3回の調査において確認された鉛汚染の程度として、2019年2月では鉛暴露レベル12個体、鉛中毒レベル1個体が確認された（表3. 4）。また、2020年2月の調査では鉛暴露レベルが21個体、鉛中毒レベルが3個体で確認された（表3. 5, Highは簡易鉛濃度測定機の測定限界値65 μ g/dl以上を示す）。さらに、2020年11月の調査では高濃度鉛汚染レベルの個体のみが6羽確認された（表3. 6）。なお、血中鉛濃度のレベルを評価する上で、ワシ類鉛中毒ネットワークによる基準を用いたが、これは全血の湿重

量換算で、 $10 \mu\text{g}/\text{dl} \leq$ 鉛暴露レベル $< 60 \mu\text{g}/\text{dl} \leq$ 鉛中毒レベルとなっている。

本研究においては、正常値以上の血中鉛濃度が確認された検体を対象に、 δ -アミノレブリン酸脱水酵素（ALAD）活性の測定し、鉛による抑制の程度を確認した。ALADは δ -ALA2分子からポルフォビリノーゲン（PBG）を生成するヘム合成カスケードのはじめの段階に作用する酵素であるが、鉛イオンが赤血球内に取り込まれると、ALADのSH基に結合し、ALADの活性が拮抗阻害される事が知られている。その結果、以降のカスケードが阻害され、ヘムが合成されなくなることから鉛中毒個体が貧血を呈する原因とされている（図3. 3）。血中鉛濃度とALAD活性は負の相関があることが報告されており、比較的低濃度の鉛汚染であってもこの傾向が認められることが知られている^{4)・5)}。本研究においても鉛中毒レベルの鉛汚染が確認された個体の他、鉛暴露レベルの汚染個体においてもALAD活性の低下が認められた（表3. 4、5、6）。このことは、比較的低濃度の鉛汚染が認められる個体でも、個体の健康被害が及んでいる事実を示しており、渡り行動や繁殖といった生態面での悪影響を裏付けるものである。

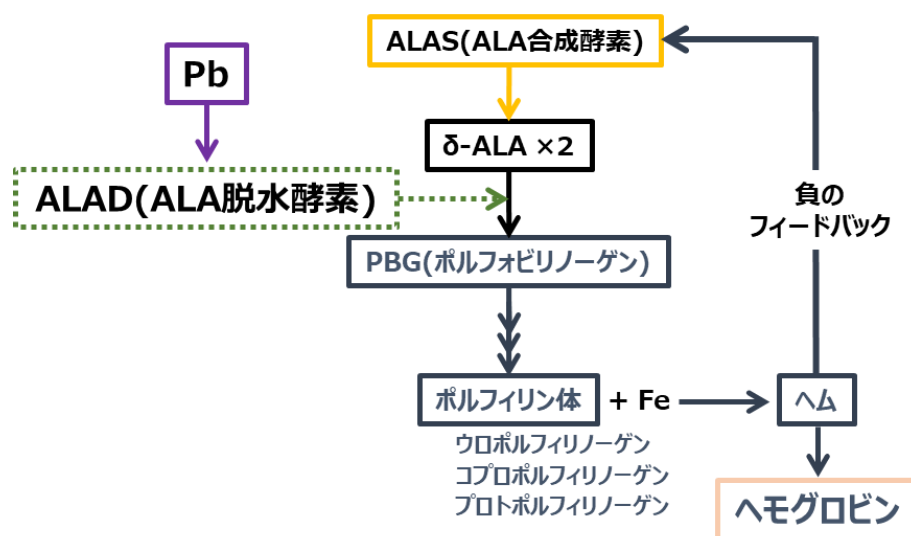


図3. 3 鉛による δ -アミノレブリン酸脱水酵素（ALAD）活性の抑制

今回の研究のように、多くの個体を渡りや越冬の時期に生体調査することができる場所は全国的に多くないものの、このような環境を観測ステーションとして位置づけて定期的にモニタリングすることは個体群における鉛汚染状況を把握する上で有意義である。カモ類においては湖沼や河川、海などの水域を中継しながら長距離を移動することが多いため、捕獲調査を実施する季節によって渡りの途中や越冬中の個体など、様々な生活様式を営んでいる個体の状況を効率よく把握することができると思われる。さらに、宮内庁鴨場は伝統猟法の継承のため、自然界で自活している健全な（傷病個体ではない）な個体を安定的に捕獲しているため、鉛汚染状況のモニタリングのために特別な捕獲を行わずとも被検個体を確保することができ、水鳥の鉛汚染状況に関する効率よいサーベイランスを行う上で極めて有用な場所であると言える。

2020年11月の調査では、両鴨場で捕獲されたオナガガモ(n=6)にGPS送信機を装着し、その行動を追跡した。本調査はKoEco社製の送信機であるWT-300 Pintail（オナガガモ用）をテフロンリボンでランドセル様に装着し、リボン同士は手術用の絹糸で結紮により固定した（図3. 4）。送信機はオナガガモ用に特化して製作されている製品で、質量22g、長さ48 x 幅36 x 高さ16 (mm)となっている。また、GPS測位は1日あたり2:00、6:00、10:00、14:00、18:00、22:00の6回行われ、携帯電話網を使って毎日14:00に専用のクラウドにデータが蓄積されるように設定した。追跡調査により、捕獲地を離れて広域を移動する個体の存在が明らかになったが（図3. 5）、個体によっては東京湾を横断して移動したのちに放鳥地点の鴨場に帰ってきたもの、鴨場を離れたのちに長距離を移動して放鳥地に帰らなかった個体などが確認され、その行動様式に特定の傾向は認められなかった。各送信機からのデータは翌年2月末までに途絶える、もしくは個体が死亡した可能性を示すものとなった。送信機2個からのデータは

個体が鴨場から離れた後に途絶えたが、その原因としては送信機の故障、個体の死亡、送信機の脱落、送信機の損傷やソーラーパネルの角度異常による電源不足、渡り等により日本の携帯電話網の圏外になったことなどが考えられた。また、4個の送信機から得られたデータが、特定の時期を境にほぼ同一の地点から発信されるものとなり、個体が死亡したことが示唆された。測位データを頼りに送信機および死体の捜索を試みたところ、1個の送信機は埼玉鴨場の敷地内で、その他の送信機は鴨場から離れた場所で発見された。送信機周辺で確認されたカモの羽毛や骨から、これらの個体が猛禽類や哺乳類といった高次消費者によって捕食されたことが判明した（図3.6）。

カモ類を生体捕獲して血中鉛濃度を測定することにより、これまで死体や傷病個体の調査では明らかになっていなかった個体群の鉛汚染状況や季節的な汚染率の差違、鉛弾を誤食する可能性がある場所などが判明したことから、全国各地でカモ類の生体捕獲調査を行うことで、鉛中毒の発生状況や潜在的なリスク（カモを捕食する猛禽類における鉛中毒の発生リスクを含む）を把握できると思われた。

表3.4 2019年2月の調査で高濃度の鉛汚染が確認されたカモ類

No. Sample No.	種	性別	PCV (%)	TP (g/dl)	Pb (μg/dl) ^a	ALAD活性 (μmol PBG/h/l RBC)
9W-9	ホシハジロ	オス	-	-	12.7	355
10W-10	ホシハジロ	オス	-	-	22.5	349
12W-12	オナガガモ	オス	-	-	55.9	226
19W-19	オナガガモ	オス	50	4.2	21.6	321
35R-5	キンクロハジロ	オス	-	-	15.3	408
41R-11	ホシハジロ	メス	-	-	13.2	-
46R-16	ホシハジロ	オス	44	6	11.3	392
49B-2	ハシビロガモ	メス	-	-	21.8	274
50B-3	ハシビロガモ	メス	-	-	10.9	401
51B-4	ハシビロガモ	メス	-	-	11.1	-
52B-5	ハシビロガモ	オス	-	-	14.9	-
69B-22	オナガガモ	メス	49	4.4	12.7	417
74Y-2	オナガガモ	オス	48	5.6	16.0	434

a: 10 μg/dl ≤ 鉛暴露 < 60 μg/dl, 60 μg/dl ≤ 鉛中毒

表 3. 5 2020年2月の調査で高濃度の鉛汚染が確認されたカモ類

No. Sample No.	種	性別	PCV (%)	TP (g/dl)	Pb ($\mu\text{g}/\text{dl}$) ^a	ALAD活性 ($\mu\text{mol PBG}/\text{h}/\text{l RBC}$)
5Y-3'	オナガガモ	オス	-	-	High	-
7Y-4'	オナガガモ	オス	-	-	19.6	-
11Y-6'	オナガガモ	メス	54	4	27.8	708
14R-1	オナガガモ	オス	48	5	11.0	737
18R-3	オナガガモ	オス	52	5	17.1	994
30R-9	オナガガモ	オス	53	4.6	10.2	1281
33R-10'	オナガガモ	オス	53	5	11.7	969
39R-13'	オナガガモ	オス	55	4.8	13.8	761
53Or-19	オナガガモ	オス	54	5	13.8	1645
64Or-21	マガモ	メス	50	6	High	79
73Or-30	ホシハジロ	オス	-	-	11.5	521
74Or-31	ホシハジロ	メス	-	-	33.2	153
76Or-33	キンクロハジロ	オス	56	7.8	14.0	1031
81Or-38	キンクロハジロ	メス	-	-	11.6	1127
98B-13	オナガガモ	メス	48	4	18.8	595
112B-27	ホシハジロ	オス	-	-	17.3	545
113B-28	ホシハジロ	オス	-	-	14.0	887
114B-29	ホシハジロ	オス	-	-	11.6	693
126B-41	ホシハジロ	オス	-	-	26.5	326
127B-42	ホシハジロ	オス	-	-	27.3	551
128G-1	オナガガモ	メス	50	4.4	26.9	256
131G-4	キンクロハジロ	メス	-	-	High	206
132G-5	ホシハジロ	オス	51	-	31.4	211
134G-7	キンクロハジロ	オス	57	9	11.1	846

a: 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ \leq 鉛暴露 < 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$, 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ \leq 鉛中毒

表 3. 6 2020年11月の調査で高濃度の鉛汚染が確認されたカモ類

Sample No.	種	性別	PCV (%)	TP (g/dl)	Pb ($\mu\text{g}/\text{dl}$) ^a	ALAD活性 ($\mu\text{mol PBG}/\text{h}/\text{l RBC}$)
Y-5	オナガガモ	メス	54	5.0	10.0	-
Y-18	オナガガモ	メス	52	4.4	53.2	135
G-6	ヨシガモ	オス	57	5.2	13.2	442
G-12	オナガガモ	オス	47	5.6	16.4	307
G-19	オナガガモ	メス	51	4.0	17.9	440
G-26	オナガガモ	メス	53	4.4	18.0	403

a: 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ \leq 鉛暴露 < 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$, 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ \leq 鉛中毒



図 3. 4 GPS送信機を装着したオナガガモのメス

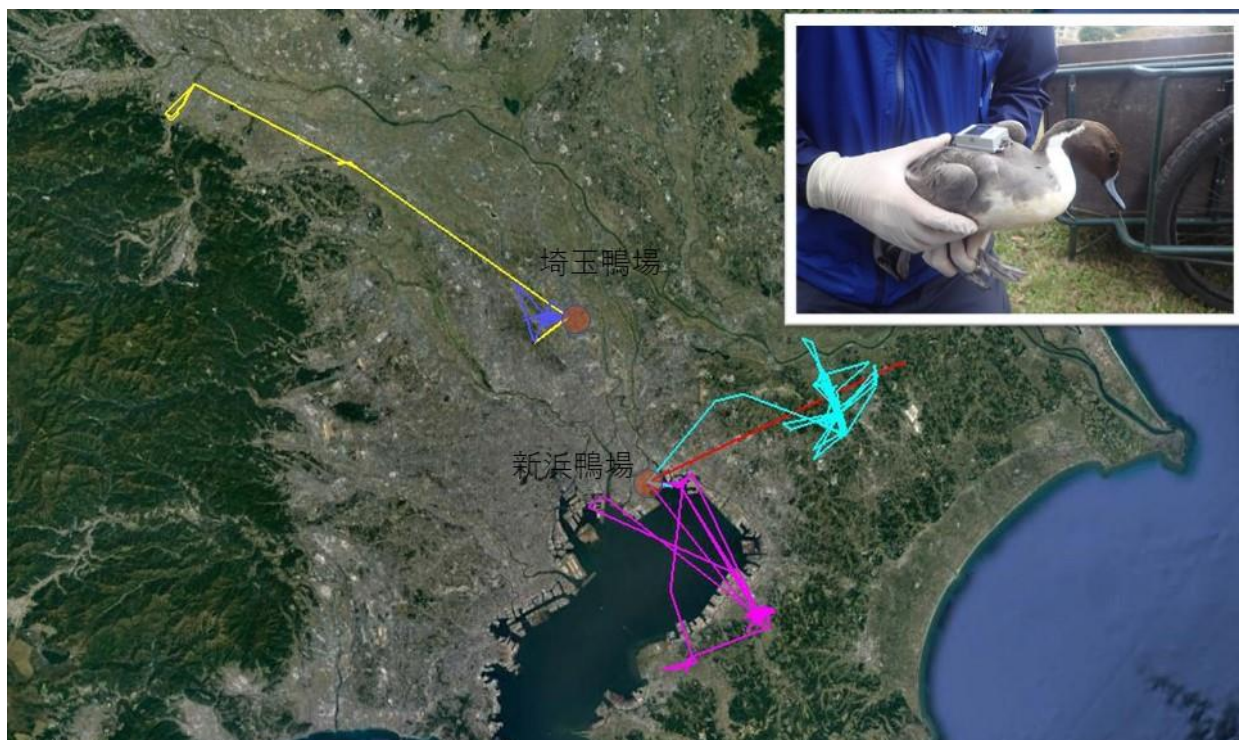


図 3. 5 GPS送信機を装着したオナガガモ (*Anas acuta*) 6羽の行動軌跡



図3. 6 食痕から猛禽類に捕食されたと推察される標識鳥（円内：送信機、右下：測位位置の集中）

猛禽類が鉛中毒に至る原因として、狩猟の際に鉛弾に被弾した鳥獣を採食することによるものがある。とくに、狩猟の対象となっているニホンジカ (*Cervus nippon*) などの大型獣が鉛弾に被弾し、猟場で解体された場合、食用として適さない被弾部や骨格、内臓などが狩猟残滓として自然界に放置されることにより、これを餌として採食した猛禽類が混入した鉛弾を摂取し鉛中毒になる事例が北海道を中心に数多く報告されている。北海道における調査では、鉛弾に被弾したシカの死体をレントゲン撮影することにより、とくに獲物の骨などに当たったライフル弾が砂粒状に肉や内臓中に砕け散ることが判明している。鉛弾に被弾した場合、同様の現象が起こることについては地域的な差異は無いと考えられるが、一方で自然環境中に存在する鉛によって狩猟対象動物が汚染されていないかを検証することも、猛禽類の鉛中毒原因を明らかにする上で必要である。本研究では狩猟統計から狩猟実績が多数存在し、希少鳥類であるイヌワシやクマタカの生息が確認されている山梨県を対象に、食肉用に捕獲されたニホンジカについて鉛汚染状況を調査した。地元のジビエ業者からニホンジカ25頭分の肝臓サンプルを入手し、鉛濃度を定量分析した結果、極めて低濃度の鉛が検出されたに過ぎず (Pb 0.005~0.034 $\mu\text{g/g}$ 湿重量)、鉛弾に被弾していない個体を採食することによって猛禽類が鉛中毒になることは否定された (表3. 7)。また、調査の過程で全国の狩猟統計データを収集し、テーマ1に提供した。

表 3. 7 ニホンジカ25個体の肝臓における元素濃度 ($\mu\text{g/g}$, mg/kg)

Sample Name	63 Cu	66 Zn	75 As	111 Cd	208 Pb
	Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Conc. ($\mu\text{g/g}$)
Deer_Liver01	47.04	14.55	0.005	0.046	0.008
Deer_Liver02	49.86	21.90	0.004	0.037	0.006
Deer_Liver03	15.31	32.54	0.003	0.030	0.009
Deer_Liver04	32.40	25.87	0.003	0.014	0.015
Deer_Liver05	48.77	34.01	0.005	0.055	0.005
Deer_Liver06	26.21	26.23	0.004	0.035	0.015
Deer_Liver07	52.61	23.80	0.004	0.055	0.009
Deer_Liver08	39.01	30.43	0.004	0.046	0.009
Deer_Liver09	56.53	20.28	0.004	0.016	0.011
Deer_Liver10	65.97	25.79	0.004	0.026	0.020
Deer_Liver11	59.26	19.11	0.004	0.046	0.011
Deer_Liver12	27.06	25.39	0.002	0.027	0.009
Deer_Liver13	90.75	23.00	0.003	0.040	0.010
Deer_Liver14	138.60	23.62	0.008	0.069	0.005
Deer_Liver15	66.11	35.85	0.003	0.055	0.006
Deer_Liver16	56.70	25.11	0.003	0.026	0.011
Deer_Liver17	42.20	24.12	0.004	0.058	0.007
Deer_Liver18	51.17	30.99	0.003	0.022	0.008
Deer_Liver19	21.34	20.00	0.002	0.026	0.034
Deer_Liver20	66.35	21.07	0.004	0.078	0.008
Deer_Liver21	102.66	30.30	0.003	0.034	0.010
Deer_Liver22	43.38	15.82	0.002	0.046	0.005
Deer_Liver23	19.18	26.64	0.003	0.082	0.010
Deer_Liver24	61.48	24.55	0.002	0.009	0.007
Deer_Liver25	53.94	25.41	0.002	0.013	0.007

*湿重量あたりで計算

2) 猛禽類および水鳥における鉛中毒発生事例の把握 (本州以南)

本州以南において傷病収容された猛禽類や水鳥の血液、拾得された死体を収集し、血中もしくは肝臓中の鉛濃度を定量した。猛禽類65羽の血液や肝臓を分析した結果、6羽 (9.2%)から高濃度の鉛が確認された。また、水鳥については28羽を調査し、12羽 (42.8%)で高濃度の鉛汚染が確認されたが (図 3. 7)、分析に供したサンプルの種、採取地、季節、検体数などが結果に大きく影響している可能性もあり、今後さらに充実したサンプル収集体制を構築できるように、より多くの組織や機関との協力体制を築く事が重要である。とくに死体については、環境省が地方公共団体の協力を得て実施している全国を対象としたHPAIのモニタリング調査において、極めて多数が拾得されていることが明らかになっているものの、都道府県の担当部局に冷蔵・冷凍庫などの一時的な保管場所が無いことなどから本来目的以外の調査にも有効活用されているとは言いがたい。今後、検体の一時保管場所を提供・整備するなど、全国からのサンプル収集体制の充実化を図ることで、効率の良い鉛中毒の実態把握に繋がれると期待される。

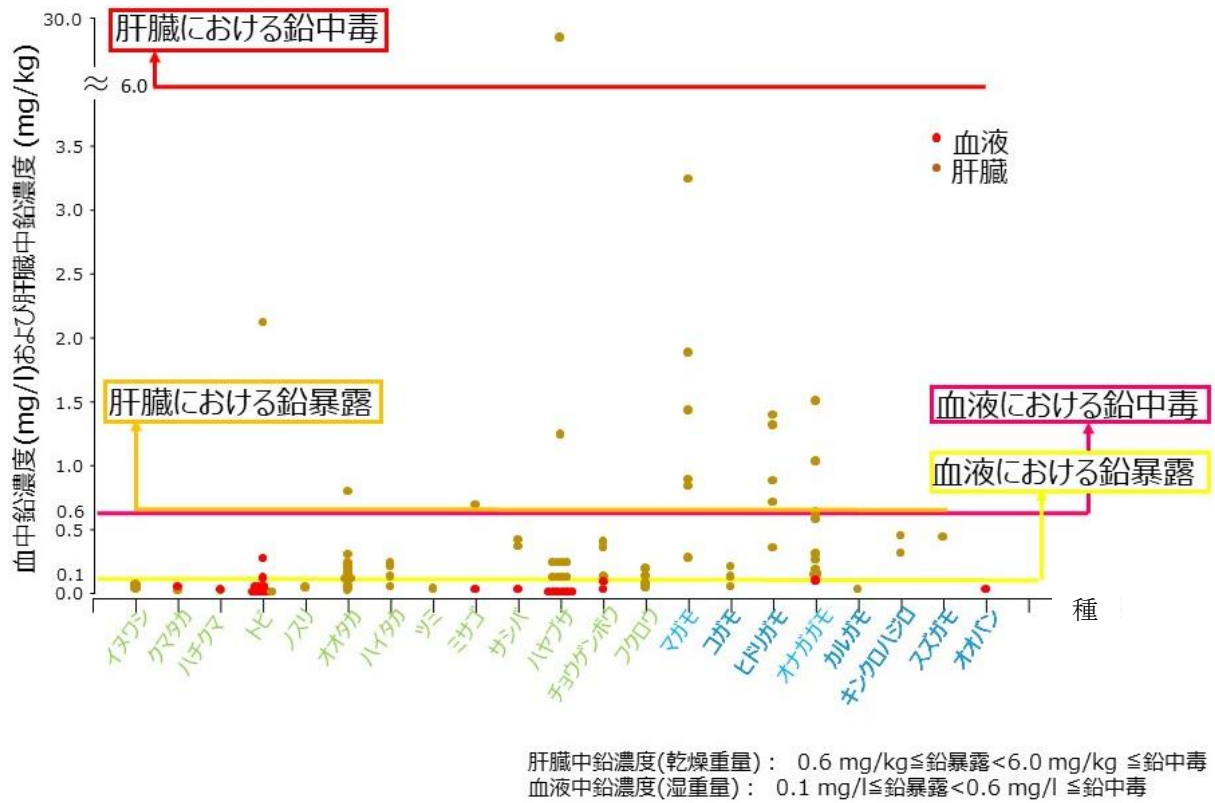


図3. 7 全国から収集した猛禽類および水鳥の血中および肝臓中鉛濃度
(血液：湿重量、肝臓：乾燥重量)

3) カモ類の糞便サンプルの鉛汚染状況調査への利用

HPAI発生状況のモニタリングのため、環境省により全国で収集されている水鳥の糞便サンプルを、鉛汚染状況の把握に利用することが可能であるか否かを検証した。全47都道府県のサンプルを各所10~20程度を抽出し、2017年度500検体（参考として北海道の東西部で採取されたもの各5検体を含む）、2018年度523検体、2019年度531検体を用いて鉛濃度を測定した。サブテーマ2と共同で実施した鉛投与実験の結果、投与後30日後に採取した糞便中に含まれる鉛の濃度の平均値が38mg/kgであること、測定した糞便を採取した時期が猟期開始から1ヶ月以上経過した1~2月であることを考慮し、正常値と異常値を隔てるカットオフ値を30mg/kgに設定した。この値以上となる検体は3年度の合計で43サンプル、26地点となった（図3. 8）。高濃度の鉛を排泄していた個体は、鉛に汚染されていたと推察された。そのため、特に高濃度の鉛が検出された13検体をサブテーマ2に提供し、今回開発した同位体比による鉛の由来判定を実施した（濃度27.69~856.08mg/kg）。その結果、13検体中11検体が鉛製銃弾による鉛が糞便中に含まれていることが明らかとなった。また、高濃度の鉛が検出されたサンプルの採取地点を見てみると、日本列島の南北に渡って広く分布しており、複数年度において高い鉛濃度の糞便が確認された地域も複数存在した（図3. 9）。カモ類の多くは渡り鳥であり、複数の都道府県を經由して行き来している。このため、高濃度の鉛が検出された糞便の採取地が必ずしも鉛を摂食した地域とは限らず、他の場所で鉛に汚染された個体が別の場所で鉛中毒死する可能性もある。このため、カモ類における鉛中毒を根絶するためには、渡りのルート上に位置すると思われる地域をすべて鉛散弾の規制対象地域とする必要があることが裏付けられた。本調査で得られた各種の情報はテーマ1に提供した。

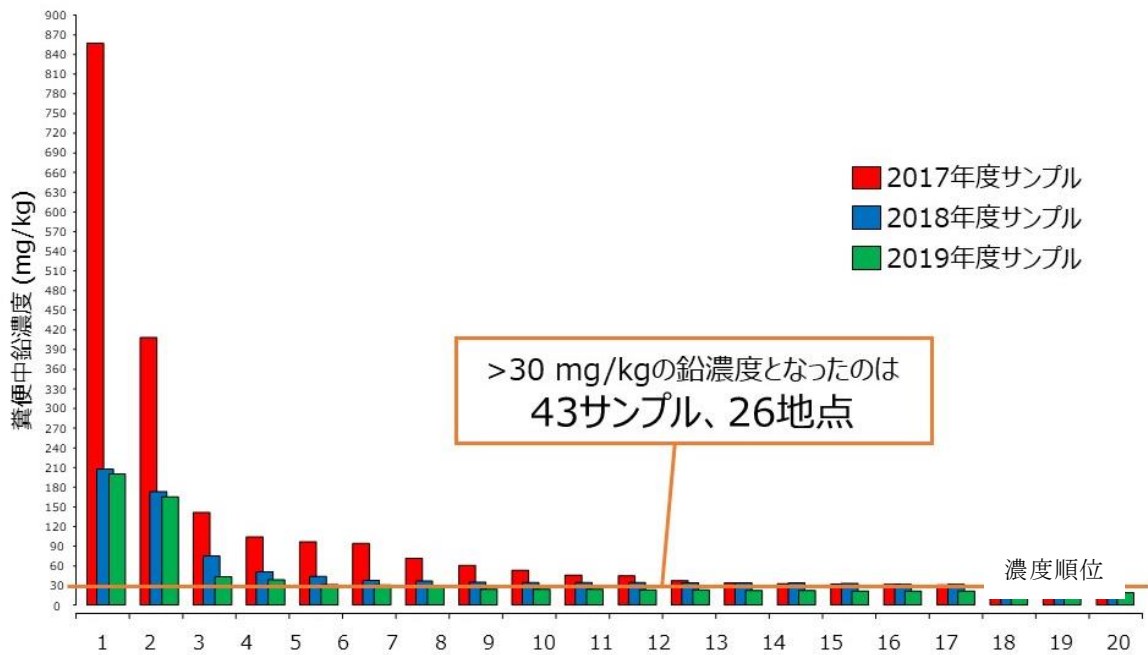


図3. 8 高濃度の鉛が検出された糞便サンプル（上位20検体）

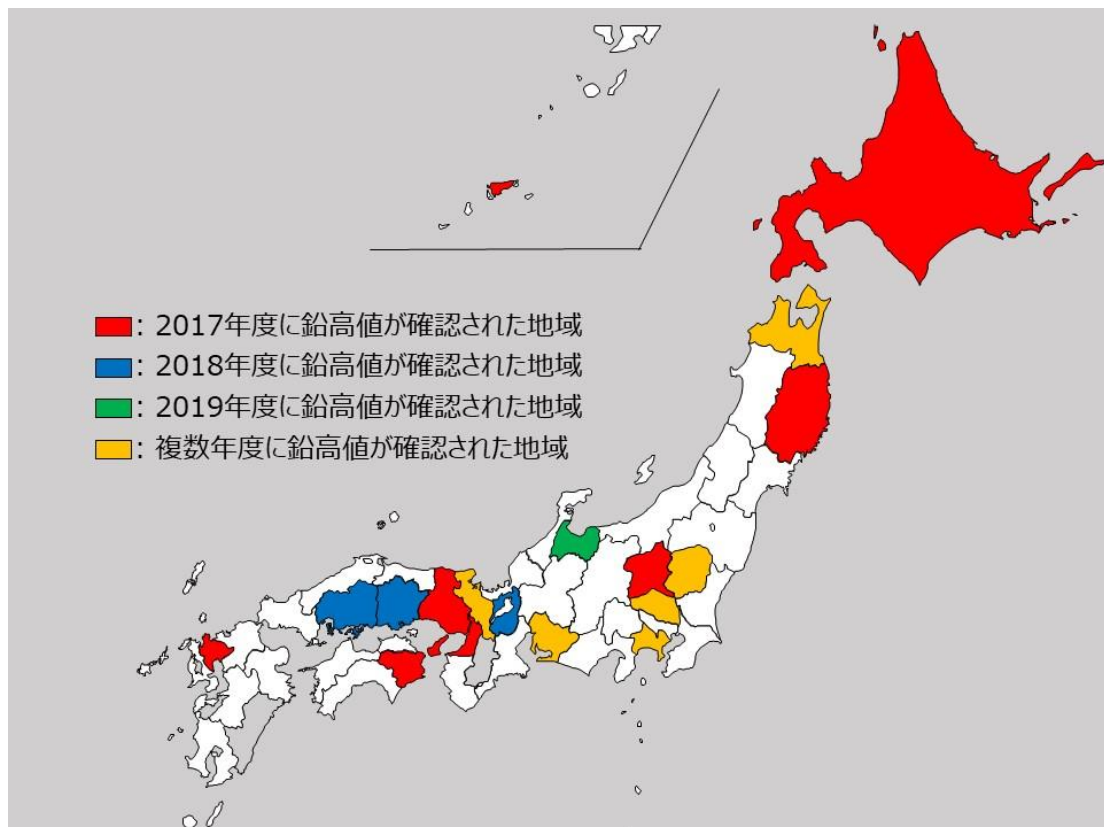


図3. 9 高濃度の鉛がカモ類の糞便から確認された地域

4) 生体捕獲調査による猛禽類の鉛汚染状況および鉛汚染ルートの解明

北海道で多数の鉛中毒が確認され、狩猟残滓への嗜好性が高いクマタカを対象に、同種の生体捕獲を実施して鉛汚染状況の把握を試みた。調査地は同種が狩猟残滓を採食していることが確認されている山梨県を選定した。

クマタカの捕獲は遠隔操作で作動するボウネットを用いて実施し、誘引用の餌として被弾部を含まないニホンジカの肉を利用した。研究期間中、計6回、5個体のクマタカを捕獲した（図3. 10、表

3. 8)。捕獲調査では、複数の同一個体が頻繁に餌のシカ肉に誘引されたこと、同じ個体が年度の異なる2冬（2019年1月と同年12月）に捕獲されたことなどから、北海道と同様に、本州以南においてもクマタカの狩猟残滓に対する嗜好性と依存度が極めて高いことが明らかになった。

捕獲したクマタカの翼下静脈から血液を採取し、ただちにLeadCare IIを用いて血中鉛濃度を測定した。また、外部計測を行うとともに、窒素炭素比率（N/C比）による餌資源の推定を試みるために羽毛を採取した。鉛濃度が低かった場合は標識調査用の足環を装着し、速やかに捕獲地点にて放鳥した。2019年1月に捕獲したクマタカ2羽のうち1羽（14C0990）は血中鉛濃度が極めて高く、急性鉛中毒であると診断されALAD活性の低下が確認されたため、地元の動物病院の協力を得て鉛解毒剤（Ca-EDTA）の投与による鉛中毒の治療を行い、数日後に血中鉛濃度が低下したことを確認したのちに捕獲地点で野生復帰させた。また、2019年12月と2020年1月に捕獲したクマタカ計4羽では、うち1羽で血中鉛濃度が鉛暴露レベルであることが確認された。本個体についても鉛解毒剤の投与による治療を試みたが第6病日に落鳥した。

2019年に捕獲放鳥した成鳥（14C0990）を鉛中毒治療の過程でレントゲン検査を実施したところ、胃内には鉛陰影が確認されなかったものの、6発の散弾を体躯に被弾していたことが判明した（図3. 11）。被弾による傷はいずれも古く、過去に受傷したものと思われた。比較的体表に使い尾羽基部に被弾していた散弾を外科的に摘出したところ、一般的にカモ猟時に使用される鉛散弾であった。本散弾は結合組織に埋没しているような状態で見つかり、血管等との接点が見つからなかったため、高値を示した血中鉛濃度との因果関係は無いものと思われたが、これを科学的に証明する目的で摘出した鉛散弾と血液の鉛安定同位体比を比較した。北海道大学毒性学教室に依頼して行った検査の結果、摘出した鉛散弾と血中鉛の安定同位対比は一致しないことが判明し、被弾した鉛散弾が本個体で認められた血中鉛濃度の上昇とは無関係であることが証明された。血中鉛の同位体比は鉛ライフル弾と鉛散弾の双方が分布する領域であった。個体に他の鉛弾による新鮮な被弾創が認められないことから、血中に認められた高濃度の鉛は鉛を経口摂取したことによる可能性が最も高く、捕獲の際にシカ肉に誘引されたことなどから狩猟残滓など鉛弾に被弾した動物を採食したことによると思われた。また、鉛暴露レベルの鉛汚染が確認されたクマタカ成鳥（2020年1月捕獲）は、レントゲン検査で胃内に鉛と思われる陰影は確認されなかった。本個体は解毒治療の過程で死亡し、剖検の結果、重度の呼吸器不全に陥り死亡したことが明らかとなったものの、鉛汚染との明かな因果関係は証明されなかった。

表3. 8 クマタカを対象にした生体捕獲調査の実績

リング#	齢	捕獲日	捕獲地	血中鉛濃度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	備考
14C0989	幼鳥	2019年1月13日	山梨県A地点	2.0	
14C0990	成鳥	2019年1月18日	山梨県A地点	High	治療後、ロガーを装着し放鳥
14C0994	成鳥	2019年12月5日	山梨県A地点	9.0	GPS送信機装着
14C0989	亜成鳥	2019年12月6日	山梨県A地点	Low	GPS送信機装着
14C0997	成鳥	2020年1月16日	山梨県B地点	5.9	
未標識	成鳥	2020年1月16日	山梨県B地点	40.7	1月21日落鳥



図3. 10 捕獲したクマタカ成鳥(2019年2月)

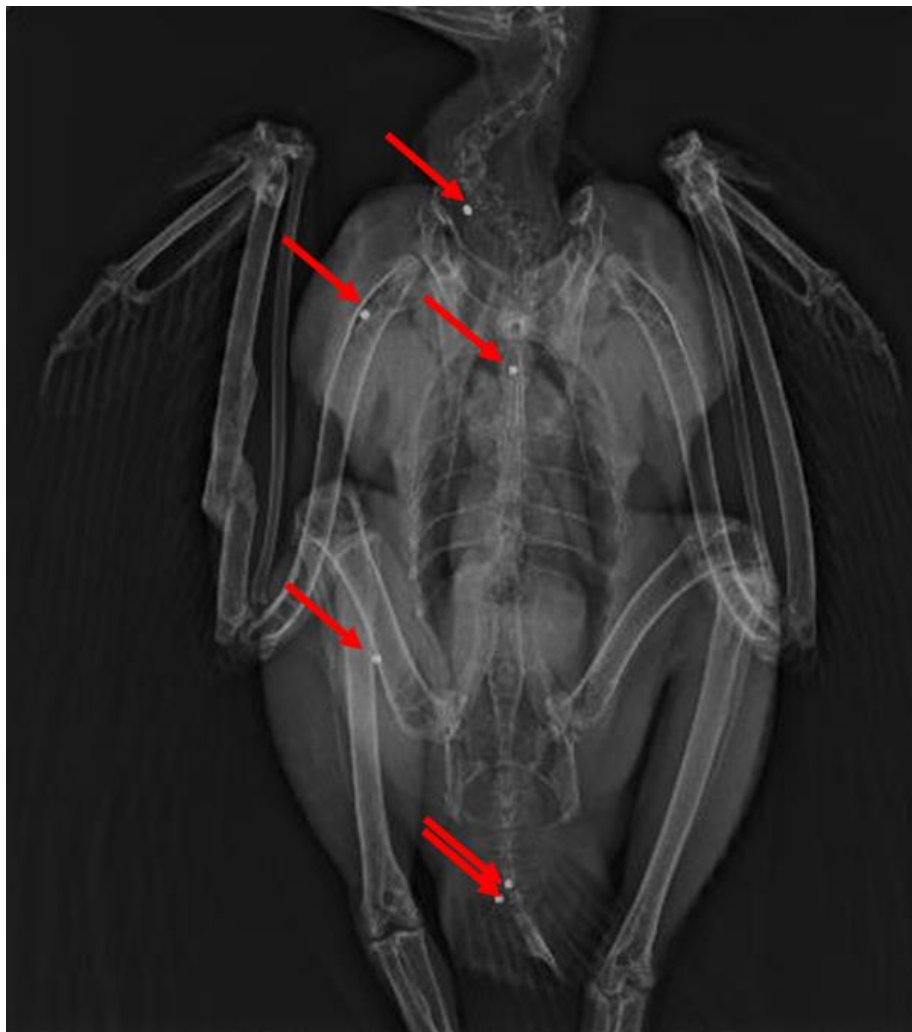


図3. 11 高濃度の血中鉛が確認されたクマタカのレントゲン写真(矢印は被弾した鉛散弾)

2019年12月の調査では、放鳥した2羽にGPS送信機を装着して鉛汚染ルートの解明を試みた。使用した送信機はKoEco社製のWT-300 Eagleであり、テフロンリボンを用いてランドセル方式で個体に装着した。GPS測位は一日あたり14回（6:00～18:00）とし、毎日2回携帯電話網から専用のクラウドにデータが回収されるようセッティングした。得られた測位データをGIS解析し、クマタカが高頻度に利用していた環境やその利用状況を確認したところ、亜成鳥一羽（14C0989）が河川敷に放置された狩猟残滓を採食していたことが示唆された（図3. 12）。さらに、クマタカ成鳥（14C0994）の行動を解析した結果、本個体の行動範囲は限定的であり、地域に定着している個体であることが明らかになった。また、GIS解析により、狩猟残滓が発生しやすい猟期と非猟期に分けてクマタカの測位位置を比較したところ、猟期に集中して個体が利用している地域が存在していることが明らかとなった（図3. 13）。現地へ赴きその状況を確認したところ、猟期に集中している場所の多くは猟場の林道付近であり、地元住民への聞き取りによりシカの狩猟が盛んに行われ、時には狩猟残滓が確認されている地域であることが判明した。このため、クマタカが狩猟残滓を餌として求め、同地域を採餌環境として多用している可能性が高いことが明らかとなった。カモ類と同様に、猛禽類についても死体や傷病個体のモニタリングに加えて、生体捕獲調査と行動追跡を全国各地で行うことにより、鉛汚染の実態や潜在的なリスクを効率よく把握できることが確認された。

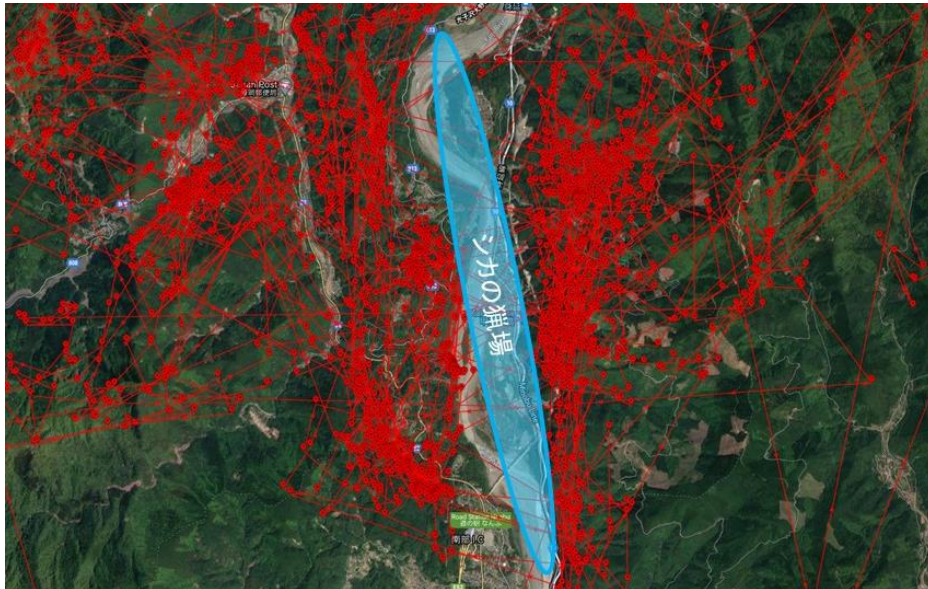


図3. 12 クマタカ亜成鳥の行動軌跡とシカの猟場との位置関係

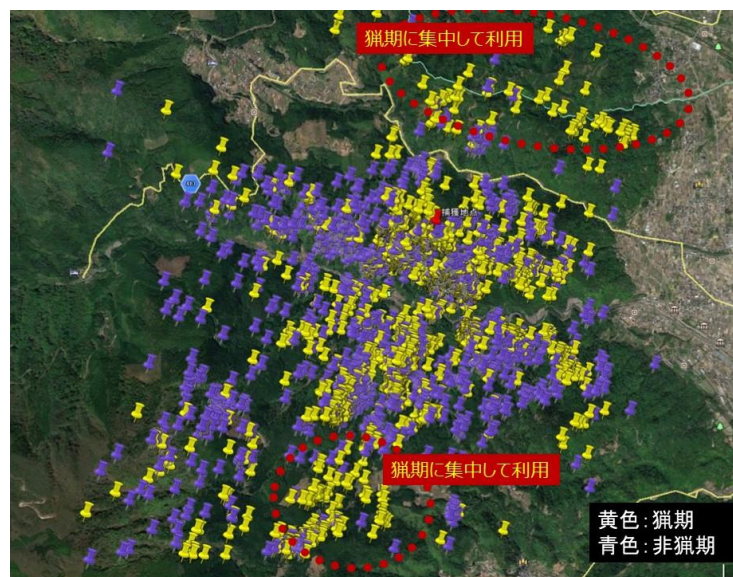


図3. 13 クマタカ成鳥の猟期と非猟期における位置情報

今回、山梨県で実施したクマタカの捕獲調査で採取した羽毛を用いて、窒素・炭素安定同位体測定による餌種類の分析を試み、将来的に狩猟残滓への依存度を明らかにするための基礎研究を実施した。本研究では、本州のクマタカ6個体（青森県1個体、山梨県4個体、長野県1個体）の初列風切と胸羽の炭素（ δC ）と窒素（ δN ）の安定同位体比を分析した。また、餌生物として、哺乳類（ニホンリス、ミンク、ニホンイタチ、タヌキ、アライグマ、ホンドキツネ、イノシシ、ホンシュウジカ）、鳥類（オシドリ、オナガガモ、カワウ、アオサギ、コジュケイ、ヤマドリ、キジ）、爬虫類（アオダイショウ、シマヘビ）の筋肉片の δC と δN も分析し、クマタカの値と比較した。クマタカの初列風切（ $n=8$ ）の δC と δN の平均値 \pm SDは、 $-22.2 \pm 0.7\text{‰}$ と $6.4 \pm 1.0\text{‰}$ 、胸羽（ $n=4$ ）は $-22.1 \pm 0.9\text{‰}$ 、 $6.4 \pm 0.3\text{‰}$ となり、羽毛の部位間で差はなかった（表3.8）。また、餌生物の δC と δN は、大型獣のイノシシで -25.5‰ と 3.9‰ 、シカで -23.9‰ と 5.3‰ 、水鳥のオシドリで -25.0‰ と 4.8‰ 、オナガガモで $-23.9 \sim -22.1\text{‰}$ 、 $4.8 \sim 7.6\text{‰}$ となった。一般的に動物の体の同位体比は、それぞれの餌の炭素同位体比に「炭素の濃縮係数」 0.8‰ 、窒素同位体比に「窒素の濃縮係数」 3.4‰ を足した値となる。クマタカが複数の餌種を食べると考えると、濃縮係数はこれらの値より減少するため、炭素と窒素の安定同位体比からクマタカはこれらの大型獣や水鳥を餌として利用していると考えられた（図3.14）。今後は、クマタカの各地域のサンプル数を増やし、代表的な餌種の依存度を定量的に推定する必要がある。また、残滓への依存度をより明確にするための一助として、飼育下のクマタカを用いてシカ肉供給群と非供給群との比較も実施することが望ましい。

表3.8 クマタカの初列風切と胸羽の $\delta C \cdot \delta N$ 安定同位体

	δN (‰)	SD	δC (‰)	SD
初列風切 (n=8)	6.4	1.0	-22.2	0.7
胸羽 (n=4)	6.4	0.3	-22.1	0.9

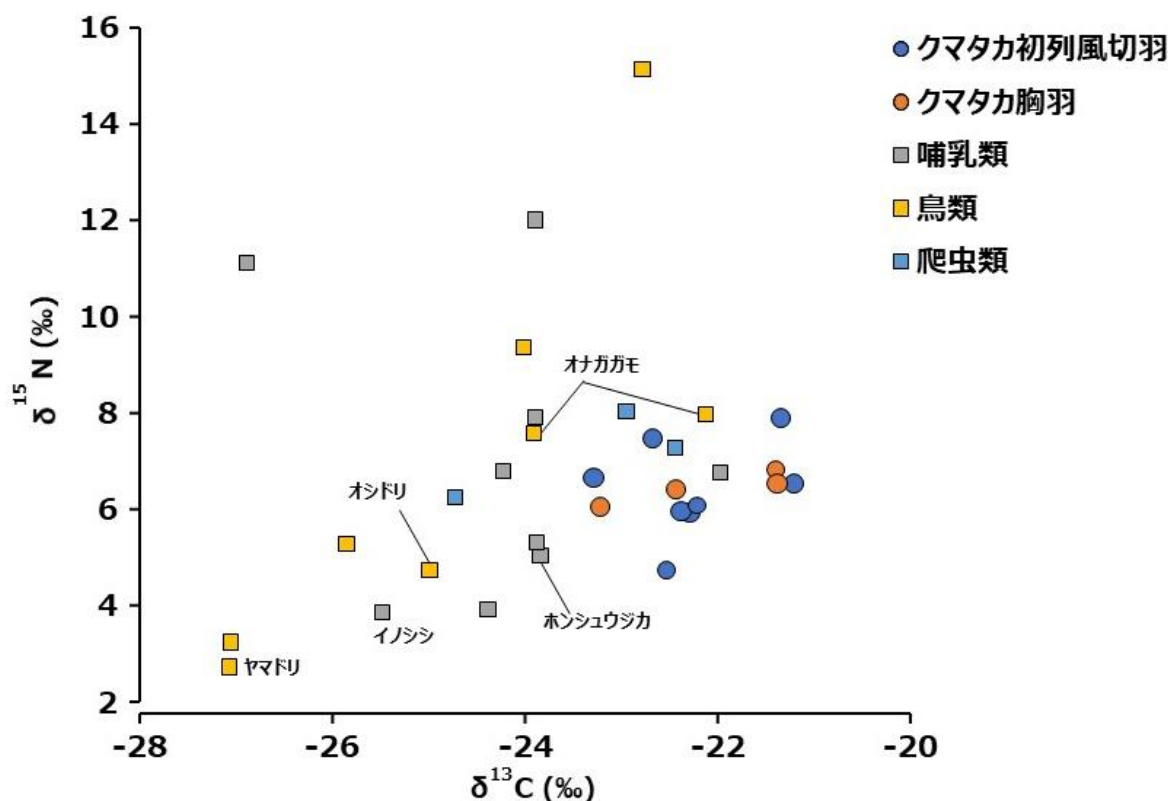


図3.14 クマタカの羽毛と餌動物における炭素（ δC ）と窒素（ δN ）の安定同位対比

4. 結果及び考察

今回の研究により、カモ類を生体捕獲して血中鉛濃度を測定することによって、これまで実施されてきた死体や傷病個体の調査では明らかになっていなかった個体群や種の鉛汚染状況や汚染率の季節的な差異が明らかとなった。また、捕獲個体をGPS送信機により追跡することにより、鉛散弾を摂食する可能性がある場所や猛禽類など食物連鎖における上位消費者に対する潜在的なリスクなどが判明した。同様の生体捕獲調査を全国で行い、越冬地や渡りのルート上における鉛中毒の発生状況をモニタリングすることが望ましいが、広範な地域を対象にした調査は、捕獲候補地の事前調査、資金、捕獲や検査にあたる従事者の選定、地元協力体制の構築など課題が多い。このため、水鳥の鉛汚染状況を把握するための効率的なサーベイランス手法としては、①今回の研究結果を元にした全国の地方単位での生体捕獲調査、②極めて多くの被検個体を効率的に入手できる可能性がある宮内庁鴨場との協力体制の構築が考えられる。①に関しては今後更なる裏付け調査が必要なものの、各地方における水鳥の集結地において20～30羽程度の生体捕獲を行うことにより鉛汚染個体を発見できる可能性があることが調査の結果から示唆された（汚染率10～20%を想定）。各地域での捕獲地の選定にあたっては、生息個体数が多いことに加えて、送信機による追跡結果を応用することも有用と考える。後者については、過去に水鳥の鉛中毒が発生したり捕獲調査等で鉛汚染個体が確認されたりした場所は、当該地もしくは同地に飛来する個体の移動ルート上で、水鳥が鉛散弾を摂食していることを示唆している。このため、同地域でカモ類を捕獲して追跡することで、鉛弾を飲み込む可能性がある場所を突き止められる可能性があり、これらを結ぶ移動経路上で鉛中毒が潜在しているもしくは発生するリスクが高いと思われる。多くのカモ類は、繁殖期以外は集団で行動することから、鉛汚染個体の確認実績は群単位の汚染を示唆するものである。加えて、誤食した鉛弾と区別するために（可能であれば）非鉛弾を用いて射止められたカモ類を同等数ハンターから購入し、肝臓等を検査に供することも効率良いモニタリング手法と考える。②については、特に宮内庁鴨場は多くのカモ類が移動（渡りを含む）の経路や越冬地として利用していることに加えて、伝統的な鴨猟の技術継承のために、宮内庁職員により冬期を中心に多くの個体が網を用いて定期的に捕獲されており、同庁との協力関係を築くことにより、極めて効率よく多くの種および個体の鉛汚染状況を把握することができると考えられた。猛禽類についても、死体や傷病個体のモニタリングに加えて、生体捕獲と行動追跡を全国各地で行うことにより、鉛汚染の実態や潜在的なリスクを明らかにできると考えられ、特にクマタカについては狩猟残滓への依存度が極めて高く、本研究においても複数の個体で鉛汚染が確認されたことから、猛禽類の鉛汚染実態を評価する上での指標種に適していると考えられる。また、全国を対象にした傷病個体や死体の調査については、とくに収容地における検体の一時保管体制を強化することにより、鉛汚染状況調査に資する検体の充実化を図ることができると考えられる。さらに、HPAI調査で採取されたカモ類の糞便は、全国的な水鳥の鉛汚染状況を把握する上での一助となり得ることが明らかとなった。今回の研究において実施した鉛汚染実態を把握するための各種アプローチは、いずれも効率的な全国サーベイランスの手法として有意義であることが判明した。今後、これらの調査を組み合わせ、継続的に実施することにより、全国における猛禽類や水鳥の鉛汚染実態を科学的にモニタリングできると考えられる。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ③では以下の成果を挙げた。

- ① サブテーマ2と共同で実施した鉛散弾投与試験によって、鳥類における血中鉛濃度と糞中鉛濃度の経時的変化を明らかにした（図2. 3、図2. 4）。糞中鉛濃度の経時的変化のデータについては、正常値と異常値を隔てるカットオフ値（30mg/kg）の設定に活用した。この基準によって、鉛に曝露されているのか否かを、糞中の鉛濃度を測定することで判別可能となった（図3. 8）。
- ② 収集した狩猟動物に関連するデータをサブテーマ1へ提供し、猛禽類の鉛汚染リスク地図の作成に貢献した（図1. 8）。

- ③ クマタカ 2羽に装着したGPS送信機から得られたデータから、クマタカはシカの猟場付近を集中的に利用していることが分かった。この行動パターンは、狩猟残滓を餌として利用している可能性が高いことを示すもので、本州でも狩猟残滓を介する猛禽類の鉛汚染が発生する状況であると考えられる（図3. 12, 図3. 13）。

以上のような成果を挙げたことから、掲げた全ての目標を達成したと判断した。

6. 参考文献

- 1) Saito K, Kurosawa N, Ryoji Shimura: Lead poisoning in endangered sea-eagles (*Haliaeetus albicilla*, *Haliaeetus pelagicus*) in eastern Hokkaido through ingestion of shot Sika deer (*Cervus nippon*), Raptor Biomedicine III including Bibliography of Diseases of Birds of Prey, Zoological Education Network, Inc, Florida, 2000, pp163-6.
- 2) Saito K: Lead poisoning of Steller's Sea Eagle (*Haliaeetus pelagicus*) and White-tailed Eagle (*Haliaeetus albicilla*) caused by the ingestion of lead bullets and slugs, in Hokkaido Japan, Ingestion of Lead from Spent Ammunition: implication for Wildlife and Humans, The Peregrine Fund. Boise, Idaho, USA, 2009, pp302-9.
- 3) 齊藤慶輔: 北海道における猛禽類の鉛中毒—現状, 診断と治療, 課題一. 中毒研究 30, 2017, pp357-362.
- 4) E. Martinez-Lopez et al., Lead in Feathers and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in Three Raptor Species from an Unpolluted Mediterranean Forest (Southeastern Spain), Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47, 2004, pp. 270-5.
- 5) M. Martinez-Haro et al., Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field, Environment Research 111, 2011, pp. 530-8

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) Nakata H, Nakayama SMM, Yabe J, Muzandu K, Toyomaki H, Yohannes YB, Kataba A, Zyambo G, Ikenaka Y, Choongo K, Ishizuka M. Assessment of LeadCare® II analysis for testing of a wide range of blood lead levels in comparison with ICP-MS analysis. Chemosphere. 129832 (2021) (IF:7.086) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129832
- 2) Ryouta Torimoto, Chihiro Ishii, Hiroshi Sato, Keisuke Saito, Yukiko Watanabe, Kohei Ogasawara, Ayano Kubota, Takehisa Matsukawa, Kazuhito Yokoyama, Atsushi Kobayashi*, Takashi Kimura, Shouta M. M. Nakayama, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka. Analysis of lead distribution in avian organs by LA-ICP-MS: study of experimentally lead-exposed ducks and kites. Environmental Pollution. 117086 (2021) (IF:8.071) DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117086
- 3) Ushine N, Nakayama SMM, Ishizuka M, Sato T, Kurahashi Y, Wakayama E, Sugiura N, Hayama S. Relationship between blood test values and blood lead (Pb) levels in Black-headed gull (*Chroicocephalus ridibundus*: Laridae) J. Vet. Med. Sci. 82(8):1124-1129 (2020) (IF: 1.267)

- 4) Ishii C, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Kuritani T, Nakagawa M, Saito K, Watanabe Y, Ogasawara K, Onuma M, Haga A, Ishizuka M. Current situation regarding lead exposure in birds in Japan (2015-2018); lead exposure is still occurring. *J. Vet. Med. Sci.* 82(8):1118 -1123 (2020) (IF: 1.267)
- 5) Togao M, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Mizukawa H, Makino Y, Kubota A, Matsukawa T, Yokoyama K, Hirata T, Ishizuka M. Bioimaging of Pb and STIM1 in mice liver, kidney and brain using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) and immunohistochemistry. *Chemosphere.* 238:124581 (2020) (IF:7.086) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124581
- 6) Ishii C, Nakayama SMM, Kataba A, Ikenaka Y, Saito K, Watanabe Y, Makino Y, Matsukawa T, Kubota A, Yokoyama K, Mizukawa H, Hirata T, Ishizuka M. Characterization and imaging of lead distribution in bones of lead-exposed birds by ICP-MS and LA-ICP-MS. *Chemosphere.* 212: 994-1001 (2018) (IF: 7.086) DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.149>
- 7) Ishii C, Ikenaka Y, Ichii O, Nakayama SMM, Nishimura S, Ohashi T, Tanaka M, Mizukawa H, Ishizuka M. A glycomics approach to discover novel renal biomarkers in birds by administration of cisplatin and diclofenac to chickens. *Poultry Science.* pey016 (2018) (IF: 3.196) DOI:10.3382/ps/pey016

【サブテーマ 3】

特に記載すべき事項はない。

<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】

- 1) Chihiro Ishii, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Kohei Ogasawara, Yukiko Watanabe, Keisuke Saito, Mayumi Ishizuka, Lead exposure situation in wild birds in Japan, 2019, (proceeding, International CHEMICAL HAZARD Symposium p43)

【サブテーマ 3】

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) Manabu Onuma. Potential Risk Map Construction of Lead Poisoning in Raptors in Japan. International Symposium on Chemical Hazard in Wildlife. 5th February 2020. Hokkaido University

【サブテーマ 2】

- 1) 石塚真由美、池中良徳、石井千尋、中田北斗、中山翔太、希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な

- な基盤技術開発、第164回 日本獣医学会学術集会 野生動物学分科会シンポジウム、Online、2021年9月7～9日（招待講演）（口頭）
- 2) Chihiro Ishii, Yusuke K. Kawai, Yoshinori Ikenaka, Naoya Maekawa, Osamu Ichii, Shouta M.M. Nakayama, Kazuki Takeda, Mayumi Ishizuka. A potential novel biomarker for kidney injury in chicken as an avian model. The 14th Asian Society of Conservation Medicine. Hokkaido University/hybrid. 22-24 Sep 2021 (Poster)
 - 3) Keisuke Saito, Yukiko Watanabe, Kohei Ogasawara, Chihiro Ishii, Shouta MM Nakayama, Yoshinori Ikenaka, Hikaru Adachi, Haruko Kono, Mayumi Ishizuka. Lead poisoning situation in large raptors in Japan. The 14th Asian Society of Conservation Medicine. Hokkaido University/hybrid. 22-24 Sep 2021 (Poster)
 - 4) 小笠原浩平、渡辺有希子、安達光、河野晴子、中山翔太、石井千尋、池中良徳、大沼学、石塚真由美、齊藤慶輔、近年の野生鳥類における鉛中毒、第23回環境ホルモン学会研究発表会、Online、2021年9月12-13日（口頭）
 - 5) 佐藤裕、石井千尋、中山翔太、齊藤慶輔、渡邊有希子、小笠原浩平、池中良徳、石塚真由美、水鳥・猛禽における鉛散弾の経口投与による鉛の体内動態、超異分野meetup ～Toward innovation beyond boundaries～、2020年3月4日、北海道大学、（ポスター）
 - 6) Hiroshi SATO, Chihiro ISHII, Shouta M. M. NAKAYAMA, Takahiro ICHISE, Keisuke SAITO, Yukiko WATANABE, Kohei OGASAWARA, Ryota TORIMOTO, Atushi KOBAYASHI, Takashi KIMURA, Yoshinori IKENAKA, Mayumi ISHIZUKA. Organ Pb distribution and temporal change of blood Pb concentrations with oral administration of Pb bullets in waterfowls and raptors. International Symposium on Chemical Hazard in Wildlife. 5th February 2020. Hokkaido University(Poster)
 - 7) Shouta M.M. Nakayama, Masao Togao, Yoshinori Ikenaka, Yoshiki Makino, Ayano Kubota, Takehisa Matsukawa, Kazuhito Yokoyama, Takafumi Hirata, Mayumi Ishizuka, Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) reveals detailed distribution patterns of Pb in mice organs, SETAC North America 40th Annual Meeting, 3rd-7th November, 2019, Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada (Poster)
 - 8) Hiroshi Sato, Chihiro Ishii, Shouta M. M. Nakayama, Takahiro Ichise, Keisuke Saito, Yukiko Watanabe, Kohei Ogasawara, Ryota Torimoto, Atushi Kobayashi, Takashi Kimura, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka, Time trend of blood Pb concentration and toxicological effects of Pb gunshots through oral administration in waterfowl' s, 第3回環境化学会 北海道東北地区部会 & 3rd Chemical Hazard Symposium in 札幌、2019年9月29日～9月30日、北海道大学（口頭）
 - 9) 佐藤裕、石井千尋、中山翔太、一瀬貴大、齊藤慶輔、渡邊有希子、小笠原浩平、鳥本亮太、小林篤史、木村亨史、池中良徳、石塚真由美、鉛散弾の経口投与によるバルバリーガモの鉛の血中濃度の経時変化および体内分布の解析、第162回日本獣医学会学術集会、2019年9月10日～9月12日、つくば国際会議場、茨城県（口頭）
 - 10) 牛根奈々、中山翔太、石塚真由美、羽山伸一、鉛汚染は末梢血中の免疫系細胞を変動させるのか？、第25回日本野生動物医学会大会（山口）、2019年8月30日～9月1日、山口大学、山口県（ポスター）
 - 11) Chihiro Ishii, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Kohei Ogasawara, Yukiko Watanabe, Keisuke Saito, Mayumi Ishizuka, Lead exposure situation in wild birds in Japan, International CHEMICAL HAZARD Symposium 2019, 20th March 2019, Hokkaido University (Poster)
 - 12) Shouta M.M. NAKAYAMA, Ayuko MORITA, Yoshinori IKENAKA, Yusuke K. KAWAI, Kazuki

TAKEDA, Hazuki MIZUKAWA, Chihiro ISHII, Keisuke SAITO, Yukiko WATANABE, Masaki ITO, Natsuo Ohsawa, Mayumi ISHIZUKA. Avian interspecific differences in rodenticide sensitivity: amino acid sequence and mRNA expression ratio of VKORC1 and VKORC1L1, SETAC North America 39th Annual Meeting. 4th ~ 8th Nov 2018. Sacramento Convention Center, CA, USA (口頭)

- 1 3) 石井 千尋、池中 良徳、中山 翔太、齊藤 慶輔、渡辺 有希子、小笠原 浩平、水川 葉月、石塚 真由美、国内に生息する野生鳥類における鉛曝露状況の解明、第24回日本野生動物医学会大会、2018年8月31日～9月2日、大阪府立大学 りんくうキャンパス (ポスター)
- 1 4) 中山翔太、池中良徳、石井千尋、水川葉月、川合佑典、平野なぎ沙、齊藤慶輔、渡邊有希子、大澤夏生、伊藤真輝、中村亮平、石塚真由美、PCR法による鳥類の雌雄判定：孵化前雌雄判定の試みとその課題、第24回日本野生動物医学会大会、2018年8月31日～9月2日、大阪府立大学 りんくうキャンパス (ポスター)
- 1 5) 井上春奈、齋藤瞬、吉澤未来、渡部孝、中山翔太、池中良徳、石塚真由美、鉄中毒を疑うコガネメキシコインコの一例、第66回動物園技術者研究会、27 ~ 29 Sep 2018、おびひろ動物園 (ポスター)
- 1 6) Shouta M.M. Nakayama, Masao Togao, Yoshinori Ikenaka, Hazuki Mizukawa, Yoshiki Makino, Ayano Kubota, Takehisa Matsukawa, Kazuhito Yokoyama, Takafumi Hirata, Mayumi Ishizuka. Distribution of Pb in mice organs using bioimaging by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). 7th Zambia Water Forum and Exhibition. 12 June 2018. Government Complex, Lusaka, Zambia (招待講演) (口頭)

【サブテーマ3】

- 1) Keisuke Saito Current status and issues of lead poisoning in large birds of prey International Symposium on Chemical Hazard in Wildlife. 5th February 2020. Hokkaido University
- 2) KEISUKE SAITO, YUKIKO WATANABE, KOHEI OGASAWARA 2021 Raptor Research Foundation Virtual Conference, Raptor Research Foundation and The Peregrine Fund, Lead in Wildlife Symposium, 10 Oct. 2021, Current Status of Lead Poisoning in Eagles in Japan,
- 3) 環境道民会議ウィンターミーティング2021, 道庁保健環境部環境局環境政策課, 2022年2月22日, 全国における野生鳥獣の鉛中毒と狩猟用鉛弾規制の動きについて

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 大沼学「国内に分布する猛禽類の鉛曝露リスク評価」野生動物の健康・一般公開シンポジウム、2022年3月21日、オンライン開催

【サブテーマ2】

- 1) 石塚真由美「鳥類に蓄積する鉛の検出と毒性学的解析」野生動物の健康・一般公開シンポジウム、2022年3月21日、オンライン開催
- 2) 石塚真由美、池中良徳、中山翔太「鳥類の鉛曝露の実態とその毒性」希少な鳥を守るには・一般公開シンポジウム、2019年6月23日、日本獣医生命科学大学、東京
- 3) 石塚真由美、他10名、あの子はオス？メス？～動物の性別をDNAから科学的に調べてみよう！～北大獣医×円山動物園科学技術セミナー(出前授業)、2018年5月13日、円山動物園、札幌
- 4) 石塚真由美、他10名、①色を分けてみよう、②DNAを分けてみよう、③毒のはなし、2018年10

月25日、帯広市立緑丘小学校、帯広市

【サブテーマ3】

- 1) 斎藤慶輔「本州以南における猛禽類の鉛中毒実態にせまる」野生動物の健康・一般公開シンポジウム、2022年3月21日、オンライン開催
- 2) 斎藤慶輔「野生鳥類における鉛中毒の実態にせまる！～水鳥と猛禽類を中心に～」希少な鳥を守るには・一般公開シンポジウム、2019年6月23日、日本獣医生命科学大学、東京

(4) マスコミ等への公表・報道等>

【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) 読売新聞（全国版科学面）2022年1月16日 狩猟用鉛弾 全国で使用規制へ 希少鳥類の鉛中毒防止 北海道で20年の実績

【サブテーマ3】

- 1) 読売新聞（全国版）2022年3月22日 渡り鳥カモ鉛汚染深刻

(5) 本研究費の研究成果による受賞

【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) 石塚真由美、北海道大学教育研究総長表彰、2022年2月16日
- 2) Chihiro Ishii, Yusuke K. Kawai, Yoshinori Ikenaka, Naoya Maekawa, Osamu Ichii, Shouta M.M. Nakayama, Kazuki Takeda, Mayumi Ishizuka. A potential novel biomarker for kidney injury in chicken as an avian model. The 14th Asian Society of Conservation Medicine. Hokkaido University/hybrid. 22-24 Sep 2021 (Poster, Excellent Presentation Award)

【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Understanding the present situation of lead contamination causing immunosuppression in endangered birds and elucidating the relationship with avian influenza outbreak

Principal Investigator: Manabu ONUMA

Institution: 16-2, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506, JAPAN

Tel: +81-29-850-2498 / Fax: +81-29-850-2210

E-mail: monuma@nies.go.jp

Cooperated by: Laboratory of Toxicology, Hokkaido University

Institute for Raptor Biomedicine Japan

[Abstract]

Key Words: lead、endangered species、raptor、Immunosuppression、avian influenza

Several toxic effects of exposure to lead are reported in human and wildlife. Immunosuppression is thought to be one of lead toxicities and there are concerns about mass mortality in wildlife due to infectious diseases linked to immunosuppression caused by lead exposure. In Hokkaido, Japan, lead poisoning was confirmed in raptors caused by the ingestion of lead bullets from remaining deer hunting carcasses in 1997. As a result, restrictions on lead bullets were introduced in all areas of Hokkaido in 2000. However, lead bullets are not regulated in Honshu Island, except in major wintering areas, although it has been reported that some birds, such as golden eagles, have been exposed to lead in Honshu Island. Therefore, the objectives of this study were to understand the current situation involving lead contamination and to elucidate the direct (lead poisoning) and indirect risks (changes in susceptibility to highly pathogenic avian influenza virus [HPAIV]) of lead exposure in raptors in Honshu and areas to the south. This study consists of three subthemes. Subtheme 1 is the integration of the results of sub-themes 2 and 3, described below, to identify areas where lead poisoning and low levels of lead contamination are likely to affect raptor populations, and to prioritize these areas for the control of lead bullet use. In subtheme 2, we administered lead bullets to captive ducks and raptors to determine toxicological differences between the two species. Additionally, differences between the lead kinetics in the two species was observed using LA-ICP-MS. Gene expression profiling of lead-exposed birds and experimental infection with HPAIV alongside lead exposure suggested that lead exposure may cause immunosuppression. Furthermore, a method to identify the origin of lead (rifle bullets, shotgun shells, and fishing weights) using multi-element and isotopic analyses was developed. In subtheme 3, the organs and blood of live or dead raptors were collected to measure the concentration of lead in order to understand the current situation of lead exposure of wild raptors outside of Hokkaido. As a result, it was found that the peregrine falcon (*Falco peregrinus*), northern goshawk (*Accipiter gentilis*), mountain hawk-eagle (*Nisaetus nipalensis*), and several other raptor species had been exposed to lead. Based on behavioral observations using GPS telemetry and measurements of lead concentrations in potential raptor prey, it was determined that game animals, such as deer, wild boar, and waterfowl are likely sources of lead contamination in raptors. Therefore, it was suggested that risk assessment of lead exposure in raptors could be conducted using hunting statistics.