

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 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
(JPMEERF18S20100)

平成30年度～令和3年度

Development of a Risk Factor Surveillance System for Conservation of Endangered Bird Species and Studies on the Risk for their Population Reduction Due to Avian Influenza Virus Infection and a Countermeasure against the Risk

〈戦略研究プロジェクト代表機関〉

学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学

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
2. 研究開発目的	3
3. 研究目標	4
4. 研究開発内容	4
5. 研究成果	5
5-1. 成果の概要	5
5-2. 環境政策等への貢献	14
5-3. 研究目標の達成状況	15
6. 研究成果の発表状況	16
6-1. 査読付き論文	16
6-2. 知的財産権	17
6-3. その他発表について	17
7. 国際共同研究等の状況	18
8. 研究者略歴	18
II. 英文Abstract	19

I. 成果の概要

プロジェクト名 SII-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

プロジェクトリーダー 羽山 伸一 (学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学獣医学部 教授)

研究実施期間 平成30年度～令和3年度

但し、テーマ1および3については新型コロナウイルスの影響のため、令和4年3月まで延長

研究経費

(千円)

	契約額
平成30年度合計額	86,768
テーマ1	9,000
テーマ2	50,556
テーマ3	27,212
令和元年度合計額	98,814
テーマ1	12,055
テーマ2	50,604
テーマ3	36,155
令和2年度合計額	92,385
テーマ1	8,334
テーマ2	50,602
テーマ3	33,449
令和3年度合計額	13,662
テーマ1	3,721
テーマ2	0
テーマ3	9,941
合計額	291,629

研究体制

テーマ1：希少鳥類の保全のための総合的リスク評価手法の開発と社会実装（学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学）（JPMEERF18S20110）

（サブテーマ1）希少鳥類の保全のための総合的リスク評価手法の開発と社会実装（学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学）（JPMEERF18S20101）

テーマ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（国立大学法人鳥取大学）（JPMEERF18S20120）

（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）（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) (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) (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 (国立研究開発法人国立環境研究所) (JPMEERF18S20105)

テーマ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 (国立研究開発法人国立環境研究所) (JPMEERF18S20130)

(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 (国立研究開発法人国立環境研究所) (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 (国立大学法人北海道大学) (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 (株猛禽類医学研究所) (JPMEERF18S20108)

研究協力機関

(テーマ1)

国立研究開発法人国立環境研究所、国立大学法人北海道大学、国立大学法人鹿児島大学、国立大学法人鳥取大学、公益財団法人宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団、公益社団法人日本動物園水族館協会

(テーマ2)

株猛禽類医学研究所

(テーマ3)

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 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、感染症、高病原性鳥インフルエンザ、サーベイランス、鉛汚染、リスク評価

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 (HPAIV) 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、家畜・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 (HPAI) は、平成16年から断続的に確認されているが、平成28-29年シーズンにH5N6亜型のウイルスによる野鳥等の事例が過去最高の22都道府県、218例確認され、この中にはツル類をはじめとする希少鳥類も含まれている。さらに、ウイルスは変異しやすいことから、希少鳥類で病原性が高い新たなウイルスが出現する可能性があり、保全上の新たな脅威となっている。

しかし、希少鳥類では、本ウイルスへの感受性や病原性などの知見に乏しく、さらに個体数が少ないことから非侵襲的な新たな検査手法の開発が必要となっている。

一方、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曝露による免疫抑制などの影響が報告されるようになり、感染症の流行などで大量死をまねくおそれがあるため、低濃度鉛汚染による免疫抑制と併せた感染症の発生が絶滅リスクになることが指摘されている。

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、猛禽類などの中毒症例は環境省の調査では1例しか確認されていないことから、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が、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。

このような状況を受けて、平成28年の中央環境審議会において、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。」と指摘されており、近年、HPAIVが断続的に確認されるような状況下において、今後、鉛中毒症状は示さない低濃度の鉛汚染について、希少鳥類にどのようなリスクがあるか、また希少鳥類を対象としたモニタリングの効果的な手法を研究的側面から明らかにする必要がある。

以上の背景のもと、本研究プロジェクトは、希少鳥類の新たな脅威となるHPAIに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発するとともに、対策方法も含め提案することを目的とする。特に希少鳥類においては、収集できる検体が少ないことから、HPAIと低濃度の鉛汚染のサーベイランスにおいて検体を共有するとともに、糞や羽などのサンプルから非侵襲的かつ効率的に必要な検査が可能となる手法の確立を目指す。

本プロジェクトで開発するリスク評価手法は、今後出現が予想される新たな絶滅リスク因子（上記以外の感染症や環境汚染物質など）も検知可能なものを目指す。環境省でも、野生生物を対象とした化学物質のモニタリングは昭和49年から継続しているが、野生動物の健康影響や感染症へのリスク評価などに対応したものは未発達である。そこで、本研究プロジェクトでは国外事例等の最新の知見を調査分析し、希少鳥類の絶滅リスク回避を目的とした総合的なリスク評価手法も開発し、わが国の実情に適した手法を社会実装するための提案をまとめる。

2. 研究開発目的

前述の背景を踏まえ、本研究では以下を目的とした。

- 希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザ及び免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な影響も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発するとともに、希少鳥類の保全対策の推進に貢献する。
- 総合的なリスク評価手法の開発により、高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監視による迅速な対策の推進、鉛汚染のリスク評価を踏まえた本州以南の鉛弾規制の強化に寄与する。

3. 研究目標

プロジェクト 全体目標	<p>希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザ及び免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な影響も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発するとともに、希少鳥類の保全対策の推進に貢献する。</p> <p>総合的なリスク評価手法の開発により、日本を含む東アジアにおける高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監視による迅速な対策の推進、鉛汚染のリスク評価を踏まえた本州以南の鉛弾規制の強化に寄与する。</p>
----------------	--

テーマ1	希少鳥類の保全のための総合的リスク評価手法の開発と社会実装
テーマリーダー/ 所属機関	羽山伸一/学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学 獣医学部
目標	<p><u>研究全体を総括し、希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発する。</u></p> <p><u>また、総合的なリスク評価手法の開発により、日本を含む東アジアにおける高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監視による迅速な対策の推進、鉛汚染のリスク評価を踏まえた本州以南の鉛弾規制の強化に寄与する。研究全体を総括し、希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発するとともに、それを社会実装する手法を提案する。</u></p> <p><u>—また、国内外の実践事例を参考にして開発した実効性の高いリスク評価手法を用い、モデル拠点における実装シミュレーションを試行し、アウトカムとして社会実装可能なリスク評価手法を提案する。</u></p>

テーマ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
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 農学部
目標	<p><u>—鳥インフルエンザウイルスの迅速検出手法等の効率的モニタリング手法の開発(担当:サブテーマ(1)及び(2))</u></p> <p><u>培養細胞を用いた希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染感受性評価法の確立(担当:サブテーマ(4))</u></p> <p><u>希少鳥類及びその感染源となる水鳥における鳥インフルエンザ感染のリスク評価(担当:サブテーマ(1)及び(3))</u></p> <p><u>希少鳥類生息環境における鳥インフルエンザウイルス消毒法の確立(担当:サブテーマ(3))</u></p> <p><u>抗インフルエンザウイルス薬による希少鳥類の予防・治療法の確立(担当:サブテーマ(2))</u></p> <p><u>総合的なリスク評価手法の開発により、日本における高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監視による迅速な対策の推進に寄与する。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。</u></p> <p><u>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。</u></p>

テーマ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
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	<p>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(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)なリスクを明らかにする。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</p>

	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。
--	---

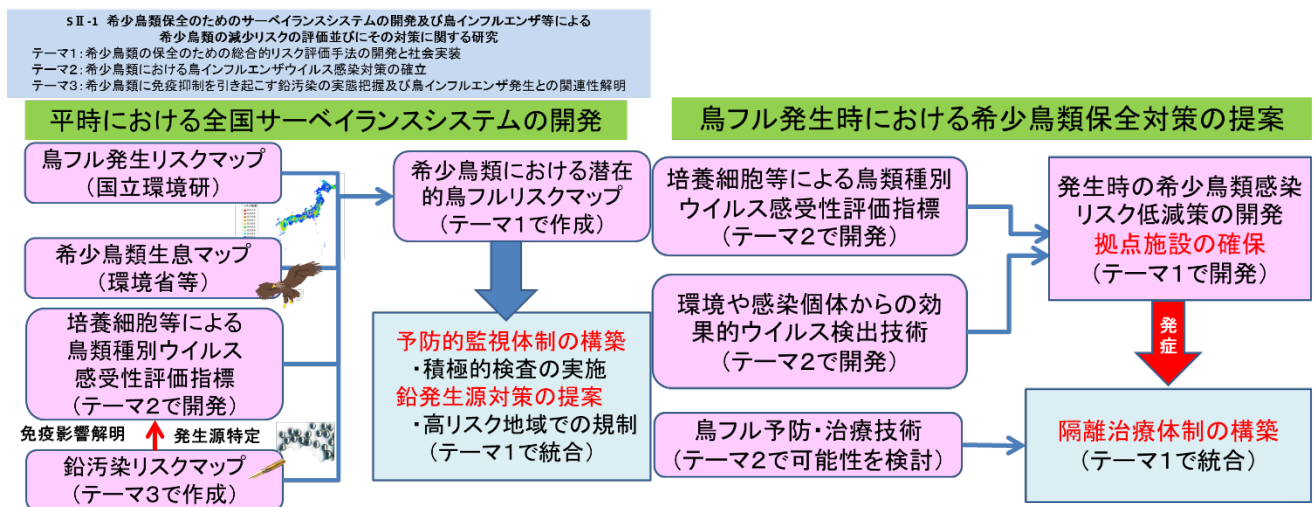
4. 研究開発内容

本研究プロジェクトでは、希少鳥類の新たな脅威となるHPAIにおいて、下記の研究を実施する。なお、研究の遂行にあたっては、研究の全体概要図に示す3つのテーマで研究チームを編成し、それぞれの成果を統合してゆく。

プロジェクトの実施に当たって、希少鳥類等の検体は多く収集することができないことから、各研究テーマ間で共有するとともに、培養細胞、糞および環境水など様々なサンプルから効率的に必要な項目を検出できるよう、検出手法については研究テーマ間で意見交換等を実施する。さらに、希少鳥類の絶滅リスクを回避するため、各研究成果を総合的に評価する手法の開発と社会実装を提案するための研究を実施する。

研究成果のアウトカムとして、研究の全体概要図に示すように平時および鳥フル発生時のそれぞれに対応する体制や対策を想定している。平時（左図）では、HPAIによる希少鳥類への影響を低減するために、各種のマップを重ね合わせて解析し、希少鳥類種ごとに潜在的なHPAIリスクマップを作成する。これをもとに、予防的監視体制を整備し、また必要に応じて鉛発生源対策も提案する。一方、鳥フル発生時（右図）では、感染あるいはそのおそれのある個体を、あらかじめ設定した拠点施設にいち早く収容し、隔離や治療などの処置を行える体制整備を目指す。

研究の全体概要図



5. 研究成果

5-1. 成果の概要

(1) 希少鳥類の保全のための総合的リスク評価手法の開発と社会実装

今後、わが国で必要となるサーベイランスシステムを検討するため、国内外における野生動物疾病に関わるサーベイランスの現状を調査し、そこから得られた課題を解決するための手法とその社会実装を提案した。

<国内における鳥インフルエンザおよび鉛汚染のサーベイランス>

都道府県では、通常時の野鳥サーベイランスとして死亡野鳥の検査と糞便調査が主に実施されており、それらの50%以上では、救護個体などの生体は検査の対象とされていない。生息状況調査または巡視

を、都道府県内で発生する前の段階で強化する都道府県は25%に満たなかった。通常時には24都道府県、野鳥監視重点地域内で回収された場合も23都道府県では、家畜保健衛生所が野鳥の簡易検査を担っていた。

救護専用施設では半径30km圏内でHPAIが発生しても半数以上の施設で受け入れが停止されない一方、動物園救護施設では、国内でHPAIが発生した時点で50%以上の施設で受け入れが停止された。隔離施設は、救護専用施設、動物園救護施設ともに30%以上、治療施設については、両施設ともに40%以上で整備されていたが、両施設を飼養動物と救護動物で共用したり、飼養動物と救護動物の両方を同じ獣医師が治療を担当する動物園救護施設もみられた。

動物園水族館では、飼養鳥の簡易検査は各園館で実施されることが多かったが、遺伝子検査機関が決められていない自治体は13都道府県および25政令市等でみられた。動物園水族館では、HPAI感染が疑われる飼養動物は隔離飼育される傾向にあり、HPAI感染が確定された時点で安楽殺が検討されることが多かった。園内HPAI対策マニュアルの整備・運用が開始されていた園館は、2016-2017年シーズンには31園館(70%)であったが、2020-2021年シーズンには37園館(84%)まで増加した。

野鳥および野鳥の救護個体の鉛汚染サーベイランス体制について、都道府県の自然環境部局(47カ所)、地方環境事務所(11カ所)、都道府県が傷病鳥獣の救護施設として指定する施設および希少鳥類の繁殖施設を含む39施設を対象としてアンケートを実施した。鉛汚染検査は、地方環境事務所で2カ所、都道府県で2カ所、救護専用施設は7カ所、動物園救護施設は6カ所で実施されていた。一方、鉛中毒の疑われる事例がみられたのは、都道府県5カ所、救護専用施設は9カ所、動物園救護施設7カ所であり、鉛汚染検査を実施していない地域でも発生している可能性があることが推察された。

<諸外国における鳥インフルエンザおよび鉛汚染のサーベイランス>

野鳥における鳥インフルエンザ(AI)サーベイランスは、主に家きんや飼養鳥の感染を防ぐための早期警戒情報として、世界各国で実施されてきた。欧米諸国では、主に動物衛生部局により、家きんと飼養鳥に加え、野鳥も一括して所管されている。韓国では、家きんは農林畜産食品部、野鳥と飼養鳥は環境部により、それぞれの検査体制が構築されている。野生動物、家畜、人の健康という多様な分野に関わる問題のため、野鳥のAIサーベイランスは、複数の省庁や研究分野を越えた連携が進められている。2005年ごろより、欧米諸国をはじめとして野鳥におけるAIのリスク評価が実施され、検査対象種やサーベイランスの重点地域の特定が行われた。現在多くの国々で実施されているAIサーベイランスは、死亡鳥や衰弱鳥を発見した際の通報によるパッシブサーベイランスが主流であるが、一部の国々では、捕獲個体や狩猟個体、糞便などを対象としたアクティブサーベイランスも継続的に実施されている。

野鳥における鉛汚染サーベイランスは、欧米で盛んに実施されてきたが、その多くはNGOや大学等研究機関などの民間団体によるものであり、政府によるサーベイランスは限られている。欧米をはじめとする海外の鉛弾や鉛製釣おりの影響評価や規制は、渡り性水鳥類の生息地の保全を軸に進められてきたが、シカなどで使用される鉛製ライフル弾の使用規制は一部の地域に限定されており、国レベルではほとんど進んでいない。EUでは、2023年までに湿地での鉛散弾の使用禁止が開始される予定であり、デンマークではライフル弾を含むすべての鉛弾と鉛製釣り錘が2023年に完全撤廃される予定である。アメリカでは水鳥類の生息地における鉛散弾の使用禁止が全米で実施されており、さらにカリフォルニア州ではすべての鉛弾の使用が禁止されている。イギリスでは、ハクチョウ類の釣り錘の誤飲による鉛中毒が問題視され、釣り錘の規制につながった。南米では、欧米の研究チームと協働して野生動物や人における鉛汚染の実態把握が進められ、野生鳥類だけでなく、狩猟された肉類を日常的に摂取している子供でも鉛汚染レベルが高かったことが明らかになり、鉛弾の規制につながった。

<総合的リスク評価手法>

本プロジェクトでは、野生動物疾病における総合的リスク評価手法として、3段階の評価手法を開発した(図1)。第1段階では、調査すべき感染症および化学物質を見極めるため、それらの優先順位を決定する手法を開発した(テーマ1)。第2段階では、優先度が高いとされた疾病としてHPAIおよび鉛汚染を

例に、個体や細胞の感染曝露実験により影響の大きい分類群や種（テーマ2-1、2-3、2-4、3-2）、リスクマップ作成やホットスポット解析（テーマ3-1）などの空間的リスク評価により感染（曝露）リスクの高い地域を明らかにし、検体種別や検査方法の検証（テーマ2-1、2-3、3-3）、感染症や化学物質汚染の有無の確認に必要とされる検体数の推定（テーマ1）により、効率的に検出可能なサーベイランス方法を開発した。第3段階では、希少動物をはじめとする野生動物への感染症や化学物質の影響の緩和策として、HPAIおよび鉛汚染を例に、早期発見およびエビデンスに基づいた監視体制の構築・維持方法（テーマ1）と希少動物の治療法を開発した（テーマ2-2）。さらに、影響の大きい製品を解明することで（テーマ3-2）、規制強化に向けたエビデンスとした。

総合的リスク評価手法

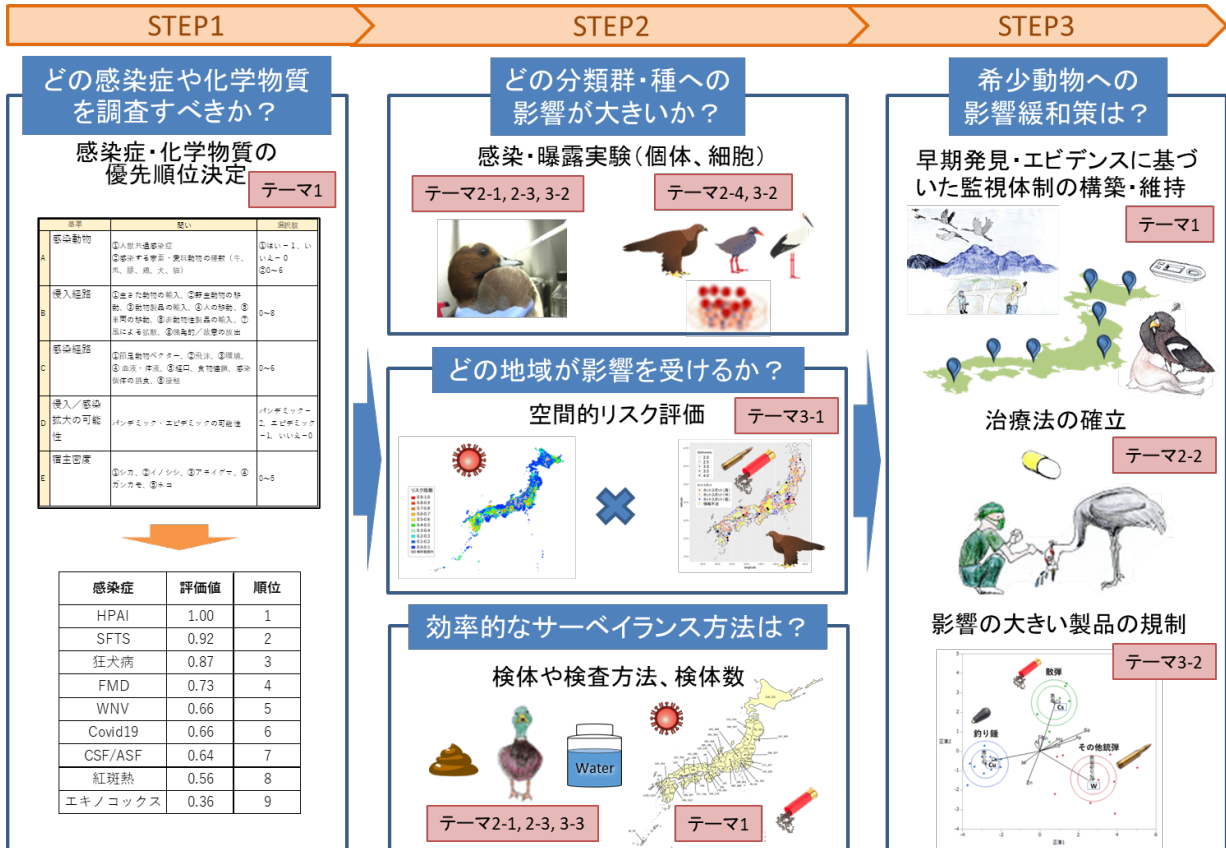


図1. 総合的リスク評価手法

<鳥インフルエンザのサーベイランスと防疫対策>

①早期警戒システムとして積極的なサーベイランス体制の整備

環境省HPAIサーベイランスによる死亡野鳥等調査と糞便採取調査では、HPAIウイルスの侵入を早期発見は難しいことが示された。しかしながら、大学等研究機関により採取および検査された水鳥類の糞便からはHPAIVが検出されており、国内におけるHPAI侵入の早期発見に成功した例もみられる。テーマ2で実施した様々な検体によるAI検査では、環境水のみで検出された都道府県もあり、調査自体も簡便なことから、糞便調査を補完する手法として有用であったため、環境省HPAIサーベイランスでも普及が望まれる。そして、都道府県の自然環境部局職員を対象としたサーベイランス講習会を定期的で開催し、担当者のスキルアップを図ることを提案する。また、韓国の糞便サーベイランス体制のように、獣医大学の協力を得て、糞便採取調査や環境水検査等のHPAIサーベイランスへの協力を得ることも、人材育成や普及啓発の面でも検討すべきと考える。

ガンカモ類などの渡り鳥生息地、特にラムサール条約登録湿地には水鳥・湿地センターなどの拠点施設が設置されている。これらの拠点施設では、生息地の巡視や鳥類調査が施設職員により定期的実施されていた。そこで、渡り鳥生息地の拠点施設での巡視状況を都道府県や地方環境事務所と積極的に情

報共有することで、HPAIの監視強化につながると考えられる。

②早期発見等に適した鳥種を見極める適正なリスク評価

検査優先種やその優先度は、死亡鳥および衰弱鳥における陽性率や陽性事例の有無を基に作成されてきた。さらに検査優先種における検査対象数を決定することにより、HPAIVのキャリアとして考えられているカモ類や、単独で行動する猛禽類などの鳥類ですら、対象数に満たなければ検査されず、正確なリスク評価や早期発見の妨げになってきた可能性が示された。海外のように、検査対象数自体を決めず、発見時の状況や場所等の情報により検査の実施を判断したり、1羽から検査を実施し、HPAI流行時に正確なリスク評価ができるよう、努めることが重要であろう。また、サーベイランスマップを作成することで、各都道府県で糞便や死亡鳥などの検体の採取目標数を視覚化し、定期的に更新することも有用と考えられる。

③死亡野鳥検査における診断の迅速化

2016-2017年シーズンから2020-2021年シーズンまでの死亡野鳥等調査において、回収から確定検査結果が得られるまでの所要日数は、 8.8 ± 3.4 (SD) 日 (N=283) を要していた。2021年10月の環境省HPAIマニュアルの改訂により、検査機関（旧遺伝子検査機関）または研究機関（旧確定検査機関）における遺伝子検査で検査結果を確定可能となり、2021-2022年シーズン3月末までにおける同日数は、 6.5 ± 2.0 日 (N=104) に改善された。

④発生時の監視体制強化

HPAI発生時、都道府県は死亡鳥の検査対象は増やされるものの、野鳥の生息地等の巡視や鳥類生息調査などのアクティブサーベイランスは、自都道府県内で発生した際も35%にとどまっていた。これまでのHPAI流行シーズンにおける野鳥での発生パターンより、日本全国で同時多発的にHPAIが発生するため、1例目が検出された時点で、野鳥のHPAIサーベイランスはただちに全国で監視が強化されるべきである。

<希少鳥類の救護と防疫対策>

イギリスの希少鳥類の保護増殖施設では、飼養施設自体が希少性に基づいて整備されていた。感染症対策を十分に施した施設で全ての飼養鳥を飼養できない場合は、希少性に応じて優先順位を決定し、飼養施設を整備すべきである。また、国内の救護施設の設備や規模は施設ごとに大きく異なり、ヘパフィルターなどの感染症対策が完備された隔離施設をはじめ、治療施設、HPAI感染時に専任の獣医師が配置可能な救護施設は限られている。そのため、HPAIなどの重大な感染症が発生した際に施設に貸し出せる移動式の隔離施設を、環境省の野生動物保護センターなど希少動物保全の拠点施設に配備することを提案する。

<飼養鳥の防疫対策>

①動物園等飼養施設と関係機関の連携体制の整備

動物園水族館におけるHPAI発生時は、動物愛護管理局、自然環境部局、そして畜産部局など、関連部局が多岐にわたる。それらの連携体制をあらかじめ構築し、相互に確認している必要がある。そのためには、各部局が一堂に会し、合同講習会や防疫訓練を定期的に行ったり、動物園職員の災害時や日々の感染症対策を普及啓発するプログラムを実施し、当事者たちの意識を高めることが重要である。

②飼養鳥の隔離・治療体制の整備

救護施設と同様に、動物園水族館の設備や規模は施設ごとに大きく異なり、感染症対策が完備された隔離施設をはじめ、治療施設、HPAI感染時に専任の獣医師を配置可能な園館は限られている。そのため、HPAIなどの重大な感染症が発生した際に園館に貸し出せる移動式の隔離施設を、環境省の野生動物保護センターなど希少動物保全の拠点施設に配備することを提案する。また、救護個体を受け入れている園館は、救護個体を介したHPAIVの侵入を防ぐため、救護個体と飼養鳥が施設や人員を共有しないようすべきである。これらを共有する場合は、HPAIが発生しやすい秋から春にかけての渡り鳥飛来時期には救護個体の受け入れを停止し、HPAI対策を強化することが望まれる。

現在の飼養鳥指針では、国内の動物園等の飼養鳥でHPAIが発生した際、感染個体や感染疑い個体の安

楽殺に関する基準がなく、全て園館の判断に委ねられており、十分な設備がないまま隔離飼育を継続する方針の園館がみられる。環境省は、隔離飼育を許可する基準の整備を進めることを提案する。また、

<鉛汚染のサーベイランス>

国内における鉛汚染の実態把握は、本州以南の猛禽類やその他の鳥類については、全国的に不足している。本プロジェクトでは、本州の猛禽類とカモ類の死亡鳥や救護個体に加え、捕獲した生体や糞便からの鉛濃度測定により実態把握が進んだ。今後も野鳥HPAIサーベイランス体制を拡張して検体の収集体制を整備し、エビデンスの収集を進められれば、全国規模の鉛汚染地域の解明につながるだろう。

<総合的リスク評価を踏まえた野生動物疾病のサーベイランス>

①一般サーベイランスの情報共有や情報提供のためのデータベース整備

日本でも全国規模の野生動物疾病データベースを構築し、野生動物疾病情報の一元化や情報発信ができる体制を構築すべきである。一般市民にも、可能な範囲で情報発信することで、野生動物疾病サーベイランスへの理解を深め、大量死等の情報提供をしやすい環境づくりをすることは、野生動物疾病サーベイランスを円滑に進める上でも重要な課題である。

②総合的リスク評価

本テーマで対象とした鉛などの重金属や化学物質汚染が野生動物に与える影響の大きさは、まだ十分に解明されていない。また、これまではHPAIや鉛汚染など、単独の感染症や汚染物質についてのサーベイランスに焦点が当てられ、その他の汚染物質による曝露レベルとHPAIなどの感染症の発症や重症化との関連性は、ほとんど検証されていない。重大な野生動物感染症や化学物質については優先順位をつけて定期的に更新し、監視対象疾病を選定するとともに、生体や糞便などアクティブサーベイランスを実施する機会が得られた際には、対象とする疾病のほか、優先度の高い感染症や化学物質についても検査を行なえるよう、検体採取を実施すべきである。

野生動物感染症の優先順位決定では、感染症自体のリスクだけでなく、経済的影響などあらゆる側面から検討するには、多分野の関係者がリスク評価に関わることの重要性が示された。

都道府県においてカモ類の疾病（AIウイルス（AIV）（A型インフルエンザウイルス（IAV）、HPAIV）および鉛汚染（血中鉛濃度：20 µg/dℓ以上、糞便中鉛濃度：30 mg/dℓ以上））の有無を調べるために必要とされる検体数を都道府県レベルで推定したサーベイランスマップを作成した。各都道府県におけるIAVの有無を確認するには、1都道府県あたり49-1,257検体、HPAIVの場合は718-17,009検体の糞便が必要と推定された。同様にカモ類の血中鉛濃度より鉛汚染の有無を確認するには、1都道府県あたり8-66羽、糞便による鉛汚染の有無では104-108検体の検査が必要と推定された。

宮城県伊豆沼・内沼においてオナガガモを捕獲し、生体を検査する野鳥HPAIサーベイランスの実装シミュレーションを行い、環境省と都道府県とサーベイランス体制に関する合意形成を試みた。AIVは検出されなかったが、各年で49-59%のIAV抗体陽性率を示した。血中鉛濃度は平均3.7-50.3 µg/dℓ（範囲0.2-474.0）であり、鉛中毒レベル（50 µg/dℓ以上）の個体は各年で0-24%みられた。免疫指標であるCD4およびCD8αは、それぞれ血中鉛濃度と有意な負の相関がみられ、鉛による免疫抑制が起きていることが示唆された。栄養状態が標準以上の個体のうち、血中鉛濃度が5 µg/dℓ以上の個体は、鉛濃度が低い個体よりもA型インフルエンザおよびH5亜型の抗体保有率が19-20%高かったため、鉛の低濃度曝露により、鳥インフルエンザに感染しやすくなっている可能性が推測された。

③法制度の整備

わが国の現状では、野生動物に対する感染症対策に法的な根拠は乏しい。一方で、諸外国では野生動物感染症に関する法制度を整備し、それに基づいてサーベイランスシステムを構築しているところが少なくない。

アジアでも、例えば中国では野生動物保護法に基づいて陸生野生動物の伝染病及び感染源の監視・管理が実施されている。2005年には、法を所管する林業部門の下に陸生野生動物を対象とする疫病・感染源の監視センターが設置され、現在では、国、省市／郡レベルの監視ステーションおよびオンライン報告システムに参加する約2,000の組織からなる幅広いネットワークに発展している。また、韓国では2014

年に野生生物保護管理法を改正し、「野生動物の疾病管理」の節を立てて5年ごとに野生動物疾病管理基本計画を樹立して施行することが政府に義務付けられた。この計画に基づき、2021年に国立野生動物疾病管理院が設置され、全国的なサーベイランスネットワークが構築された。

わが国でも、これらを参考に野生動物管理および生物多様性に関わる法律制度に野生動物感染症や疾病のサーベイランスを位置づけるべきである。

(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

<効率的な診断法の確立と感染源の特定>

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 AI の診断高度化を進める予定である。

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。一方、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。

<環境水からの効率的なウイルス分離法の確立>

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。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。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 AI 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、今後も新たなウイルス学的知見の蓄積が期待できる。

<希少鳥類の培養細胞を用いた感受性評価手法の確立>

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、HPAIV 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。

＜治療薬の特定と治療法の確立＞

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、経口薬であるパ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。

（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

＜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＞

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、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。

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。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、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。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）を把握できると考えられる。

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。

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、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げられると期待される。

③カモ類の糞便サンプルの鉛汚染状況調査への利用

高病原性鳥インフルエンザ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。まず、2017年度から2019年度までに収集され、国立環境研究所で保存されていたサンプルのうち、i) HPAIの遺伝子検査で陽性となった糞便、ii) 猟期中に採取された糞便、の2項目を優先し、iii) 同都道府県において異なる地点で採取された糞便があれば考慮して選択した。上記を踏まえ、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。検出された鉛の濃度を比較した結果、30mg/kgが正常値と異常値を隔てるカットオフ値になることが推察され、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。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る。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。カモ類の多くは渡り鳥であり、複数の都道府県を経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。

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曝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。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。捕獲作業の過程で同一のクマタカ（複数羽）が度々誘引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考えられた。

<希少鳥類の鉛汚染影響把握に必要な基盤技術の開発>

①鉛の汚染源の同定方法を検討し、評価方法の妥当性

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。マグネシウム (Mg)、アルミニウム (Al)、ニッケル (Ni)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ヒソ (As)、カドミウム (Cd)、スズ (Sn)、アンチモン (Sb)、セシウム (Cs)、バリウム (Ba)、タングステン (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、ライフル・スラッグ弾ではW、釣り錘ではCu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CsやW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。

野生動物の鉛中毒の主な原因となっているのは、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、スラッグ、散弾：n=17）および鉛製釣り錘（ナス型、ガン玉：n=14）を、誘導結合プラズマ質量分析法（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。また、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。

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

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。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。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。

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（LA-ICP-MS）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。LA-ICP-MSにより、実験的に鉛に曝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、大脳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、および大脳の過皮質、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。

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。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。

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

種々の鳥類の線維芽細胞の初代培養細胞を用いて、TLR3リガンドである合成dsRNAのpoly(I:C)曝露し、MX遺伝子の発現変動を調べた。2020年度は、さらに、鳥インフルエンザウイルスに感染させたハヤブサ、カラバト、イヌワシ、クマタカ、オオタカ、ニワトリに鉛を曝露し、12時間後にMx遺伝子の発現量を測定した。イヌワシを除いた5種では、いずれもMx遺伝子の発現抑制が認められた。

<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>

以上の結果をもとに、希少鳥類鉛汚染リスク評価の解析対象種は、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。

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よりダウンロードしたデータをもとに計算した。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）。

猛禽類の鉛曝露リスク評価には、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。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。

猛禽類の鉛曝露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、鉛曝露の「ホットスポット」を特定した。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」とした。

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、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。

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種のデータを統合した。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、希少な猛禽類の鉛曝露リスクを低減できると考えられる。

次に、鉛曝露量と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。

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曝露してから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。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

本プロジェクトによる成果は下記の通りである。

- 1) テーマ1で行った環境省HPAIサーベイランスにおける検査所要時間の解析により、結果が確定するまでにかかる時間が長いことを指摘した。これを受けて、環境省HPAIサーベイランスの検査体制の見直しが図られた結果、2021-2022年シーズン（2022年4月7日時点で環境省より公表されていた確定個体）の検査所要時間は、従来の 8.8 ± 3.4 (SD) 日から 6.5 ± 2.0 日に短縮された。
- 2) テーマ1では、福岡県からの要請を受け、家畜保健衛生所職員3名を対象とする野生動物衛生に関する研修会を開催した（2022年3月14-15日）。本研究結果である国内外のAIサーベイランス体制、国内におけるサーベイランスの課題について講義するとともに、野生動物感染症のリスク評価と行動計画作成のシミュレーション実習を実施した。
- 3) テーマ2では、2020年10月に北海道紋別市のコムケ湖からH5N8亜型のHPAIVを分離し、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AI対策に活用された。
- 4) テーマ3では、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、環境省が設置した「鳥類の鉛汚染による影響評価検討会」で活用され、またこの検討会の委員としてプロジ

ェクトリーダーの羽山とテーマリーダーの大沼が参画し、今後の全国的な鉛汚染対策について貢献することになった。

- 5) 令和3年度に環境省が設置した「野生鳥獣に関する感染症対策としての鳥獣保護管理方針検討会」にプロジェクトリーダーの羽山が座長として参画した。検討会では、HPAIVをはじめとした生物多様性保全の観点から対策が必要とされる野生鳥獣に関する感染症のリスク評価を行うなど、本プロジェクトの成果が活用された。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

- 1) 本プロジェクトで提案した総合的リスク評価手法やサーベイランスシステムは、新たな生物多様性国家戦略に盛り込まれるワンヘルスアプローチによる政策の具体化に活用されることが見込まれる。
- 2) 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見込まれる。
- 3) 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・遂行への貢献が見込まれる。
- 4) 本プロジェクトで有効性が示唆された HPAIV 感受性に関する判定基準を、すべての種の保存法指定鳥類種に適用することで、HPAIV の種別のリスク評価が可能となり、国内発生時における重点的な保全対策を実施することが見込まれる。
- 5) 本プロジェクトで開発された総合的リスクマップにより、野生鳥類における鉛汚染実態をリアルタイムで把握すれば、重点的な感染症対策や発生源対策を行うべき場所が特定され、対策を効率的に実施することが見込まれる。

5-3. 研究目標の達成状況

以下にまとめたとおり、すべての目標を達成するとともに、目標を上回る成果を得ることができた。

	設定目標	達成状況
プロジェクト	<p>希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザ及び免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な影響も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発するとともに、希少鳥類の保全対策の推進に貢献する。</p> <p>総合的なリスク評価手法の開発により、日本を含む東アジアにおける高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監視による迅速な対策の推進、鉛汚染のリスク評価を踏まえた本州以南の鉛弾規制の強化に寄与する。</p>	<p>設定目標を達成した。<u>高病原性鳥インフルエンザに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的リスク評価手法を開発し(図2)、治療法の開発などにより、希少鳥類の保全対策の推進に貢献した。</u></p> <p><u>環境省の感染症対策及び鉛対策の検討会にプロジェクトメンバーらが参画して政策提言を行い、感染症対策の推進や鉛弾規制の強化に向け、目標を上回る成果を上げた。</u></p>
テーマ 1	<p><u>研究全体を総括し、希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発する。</u></p> <p><u>また、総合的なリスク評価手法の開発により、日本を含む東アジアにおける高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監</u></p>	<p>設定目標を達成した。研究全体の総括し、高病原性鳥インフルエンザに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的リスク評価手法を開発し(図2)、国内外の野鳥HPAIV等のサーベイランス体制の実態把握や水鳥越冬地での実装シミュレーションにより、社会実装す</p>

	<p>視による迅速な対策の推進、鉛汚染のリスク評価を踏まえた本州以南の鉛弾規制の強化に寄与する。研究全体を総括し、希少鳥類の新たな脅威となる高病原性鳥インフルエンザに着目して、免疫抑制を引き起こす低濃度の鉛汚染との複合的な評価も踏まえた総合的なリスク評価手法を開発するとともに、それを社会実装する手法を提案する。—また、国内外の実践事例を参考にして開発した実効性の高いリスク評価手法を用い、モデル拠点における実装シミュレーションを試行し、アウトカムとして社会実装可能なリスク評価手法を提案する。</p>	<p>る手法を提案した。さらに、—設定目標に加え、<u>水鳥類越冬地でのアクティブサーベイランスや行政獣医師を対象とした野生動物感染症のリスク評価ワークショップを試行し、わが国でも社会実装可能な総合的リスク評価手法を提案できた。</u></p>
<p>テーマ 2</p>	<p><u>鳥インフルエンザウイルスの迅速検出手法等の効率的モニタリング手法の開発(担当: サブテーマ(1)及び(2))</u> <u>培養細胞を用いた希少鳥類の鳥インフルエンザウイルス感染感受性評価法の確立(担当: サブテーマ(4))</u> <u>希少鳥類及びその感染源となる水鳥における鳥インフルエンザ感染のリスク評価(担当: サブテーマ(1)及び(3))</u> <u>希少鳥類生息環境における鳥インフルエンザウイルス消毒法の確立(担当: サブテーマ(3))</u> <u>抗インフルエンザウイルス薬による希少鳥類の予防・治療法の確立(担当: サブテーマ(2))</u> <u>総合的なリスク評価手法の開発により、日本における高病原性鳥インフルエンザモニタリングの実施、監視による迅速な対策の推進に寄与する。</u>—<u>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。</u></p>	<p>設定目標を概ね達成した。<u>に加えて、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。</u> <u>また、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すると共に、した。環境水の清浄化対策における薬剤使用の限界を示した。また、国内分離HPAIVの性状解析と感染動物を用いた評価試験により、野鳥の鳥インフルエンザ診断法の高度化を達成した。</u><u>さらに、近年の国内分離株を用いたに感染実験で、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や、オジロワシの感受性や排泄部位・期間等を明らかにした。</u><u>加えて、希少鳥類を含む11種の</u> <u>—鳥類11種の培養細胞を用い、にHPAIVを感染させ、抗ウイルス作用のあるMx遺伝子の発現パターンを観察し、高死亡率のモデル鳥類であるニワトリの発現パターンと希少猛禽類4種(クマタカ、イヌワシ、オオタカ、ハヤブサ)およびヤンバルタイサの発現パターンが類似していることを確認した。</u><u>この手法により、非侵襲的に希少鳥類のHPAIV感受性を推定する法を検討、抗ウイルス作用のあるMx遺伝子発現パターンが個体の感受性を反映することを示した。</u><u>ことが可能となった。</u><u>この他、鳥類への抗インフルエンザ薬投与後の体内動態等を明らかにし、HPAIV感染鳥治療の基盤を構築した。</u></p>
<p>テーマ 3</p>	<p>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(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)なリスクを明らかにする。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</p>	<p>設定目標に加えて、<u>鉛曝露による免疫抑制を世界で初めて遺伝子発現レベルで証明した。</u> <u>また、猛禽類の鉛曝露リスクが高い地域を具体的に図示するだけでなく、死亡した猛禽類からHPAIVが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、猛禽類は鉛に曝露さ</u></p>

	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。	れる機会が多かった可能性を示すこともできた。
--	--	------------------------

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

13件

<主な査読付き論文>

【テーマ1】

- 1) N. USHINE, S.M.M. NAKAYAMA, M. ISHIZUKA, T. SATO, Y. KURAHASHI, E. WAKAYAMA, N. SUGIURA, S. HAYAMA: J. Vet. Med. Sci, 82, 8, 1124-1129 (2020) (IF:1.267) Relationship between blood test values and blood lead (Pb) levels in Black-headed gull (*Chroicocephalus ridibundus*: Laridae).
- 2) N. USHINE, O. KURATA, Y. TANAKA, T. SATO, Y. KURAHASHI, S. HAYAMA: J. Vet. Med. Sci, 82, 11, 1619-1626 (2020) (IF:1.267) The effects of migration on the immunity of Black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*: Laridae).
- 3) S. MORIGUCHI, R. HOSODA, N. USHINE, T. KATO and S. HAYAMA: Prev. Vet. Med, 187, 2, 105234 (2021) (IF:2.67) Surveillance system for avian influenza in wild birds and implications of its improvement with insights into the highly pathogenic avian influenza outbreaks in Japan.

【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.
- 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.

【テーマ3】

- 1) H. NAKATA, SMM. NAKAYAMA, J. YABE, K. MUZANDU, H. TOYOMAKI, YB. YOHANNES, A. KATABA, G. ZYAMBO, Y. IKENAKA, K. CHOONGO, M. ISHIZUKA: Chemosphere, 129832 (2021) (IF:7.086)

- Assessment of LeadCare® II analysis for testing of a wide range of blood lead levels in comparison with ICP-MS analysis.
- 2) R. TORIMOTO, C. ISHII, H. SATO, K. SAITO, Y. WATANABE, K. OGASAWARA, A. KUBOTA, T. MATSUKAWA, K. YOKOYAMA, A. KOBAYASHI, T. KIMURA, SMM. NAKAYAMA, Y. IKENAKA, M. ISHIZUKA: Environ. Pollut, 117086 (2021) (IF:8.071) Analysis of lead distribution in avian organs by LA-ICP-MS: study of experimentally lead-exposed ducks and kites.
 - 3) M. TOGAO, SMM. NAKAYAMA, Y. IKENAKA, H. MIAUKAWA, Y. MAKINO, A. KUBOTA, T. MATSUKAWA, K. YOKOYAMA, T. HIRATA, M. ISHIZUKA: Chemosphere, 238, 124581 (2020) (IF:7.086) Bioimaging of Pb and STIM1 in mice liver, kidney and brain using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) and immunohistochemistry.
 - 4) C. ISHII, SMM. NAKAYAMA, A. KATABA, Y. IKENAKA, K. SAITO, Y. WATANABE, Y. MAKINO, T. MATSUKAWA, A. KUBOTA, K. YOKOYAMA, H. MIZUKAWA, T. HIRATA, M. ISHIZUKA: Chemosphere, 212, 994-1001 (2018) (IF: 7.086) Characterization and imaging of lead distribution in bones of lead-exposed birds by ICP-MS and LA-ICP-MS.

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）	11件
口頭発表（学会等）	51件
「国民との科学・技術対話」の実施	34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	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。具体的には、血中鉛濃度のオンサイト分析機器と、高精度の重金属分析機器ICP-MSのデータ精度の比較を行い、LeadCareのデータの正確性に関する研究成果を学術雑誌に発表している。また、鉛が引き起こす毒性影響について、ヒトや哺乳動物での影響は鳥類にも起こりえる可能性があり、ザンビア大学との協働で行っているLA-ICP-MSを用いた臓器の鉛局在に関する基礎データや、鉛曝露によるヒトや哺乳類のエピゲノム変化など、鉛毒性に関する国際共同研究の研究成果について参照している。

一方、海外、特に途上国では鉛弾による生態系への影響については研究が進んでいない。すでに、ナミビア共和国などからも鉛弾の生態系への影響に関して共同研究の依頼があり、今後、アフリカにおけるゲームランチの鉛弾の生態系への影響についても共同研究を進める予定である。

8. 研究者略歴

プロジェクトリーダー

羽山 伸一

帯広畜産大学畜産学部卒業、博士（獣医学）、現在、学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学獣医学部 教授

テーマリーダー

1) 羽山 伸一

帯広畜産大学畜産学部卒業、博士（獣医学）、現在、学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学獣医学部 教授

2) 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、獣医学博士、岐阜大学農学部助手、現在、鳥取大学農学部教授

3) 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、博士（獣医学）、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. 英文Abstract

Development of a Risk Factor Surveillance System for Conservation of Endangered Bird Species and Studies on the Risk for their Population Reduction Due to Avian Influenza Virus Infection and a Countermeasure against the Risk

Principal Investigator : Shin-ichi Hayama

Institution: Nippon Veterinary and Life Science University, Musashino City, Tokyo,
JAPAN

Tel: +81-422-31-4151 / Fax: +81-422-34-6201

E-mail: hayama@nvl.u.ac.jp

Cooperated by: Hokkaido University, Tottori University, Kagoshima University, National Institute for Environmental Studies, Institute for Raptor Biomedicine Japan.

[Abstract]

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

Endangered birds are threatened by avian influenza epidemics and low-level lead exposure. Therefore, the purpose of this project was to develop a comprehensive risk assessment method for infectious diseases and environmental pollution and to promote conservation measures for endangered birds. The development of such a method would also help to facilitate the implementation of avian influenza monitoring in East Asia, including Japan, the promotion of prompt countermeasures, and the strengthening of lead bullet regulations outside of Hokkaido based on risk assessments of lead contamination.

The project comprises three themes. In the theme 1, we summarized the overall research, focusing on highly pathogenic avian influenza. Then, we developed a comprehensive risk assessment methodology considering low-level lead exposure, which causes immunosuppression. In addition, we proposed a method for social implementation of this methodology. We also proposed a socially implementable risk assessment method as an outcome by (i) using a highly effective method developed with reference to practical examples in Japan and overseas and (ii) conducting simulations at a model site. Furthermore, we conducted active surveillance at waterfowl wintering grounds, performed risk assessment workshops for government veterinarians, and proposed a comprehensive risk assessment method that can be socially implemented in Japan.

In the theme 2, we developed an effective new rapid diagnostic method, technology for early detection of the virus, and environmental cleanup technology, with the aim of establishing countermeasures against highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infection in endangered birds. In addition, we elucidated the HPAIV susceptibility of endangered species and common species that share habitats with them and developed a method for evaluating susceptibility in endangered bird species by using cultured cells, thereby establishing a basis for risk assessment and infection prevention in endangered bird species. In addition, we obtained knowledge that will provide the basis for developing treatment methods for endangered birds infected with HPAIV. We also established the utility of environmental water in the early detection of HPAIV as well as efficient methods for its detection by demonstrating

that ducklings, pintails, and mallards infected with recent domestic isolates shed the virus for a period of time asymptotically and serve as a source of infection for endangered bird species. We infected cultured cells of 11 bird species with HPAIV and observed the expression pattern of the antiviral Mx gene and found that the expression pattern of the chicken, a model bird species with high mortality, was similar to that of four endangered raptor species (bear hawk, golden eagle, goshawk, falcon) as well as the Okinawa rail. This method enabled the non-invasive estimation of HPAIV susceptibility in endangered bird species.

In the theme 3, we aimed to determine the status of lead contamination in raptors outside of Hokkaido via lead bullets and other sources and to clarify the direct (i.e., the development of lead poisoning) and indirect (i.e., changes in susceptibility to HPAIV) risks to raptors from the use of lead bullets. We identified areas where lead poisoning and low-level lead exposure are likely to affect populations and made policy recommendations regarding areas where restrictions on the use of lead bullets and other materials should be prioritized as an outcome. In addition, we were the first in the world to demonstrate immunosuppression caused by lead exposure at the gene expression level. Based on these results, we were not only able to reveal specific areas where raptors are at high risk of lead exposure, but also to show that raptors may be at higher risk of lead exposure because of the higher number of hunters compared with other areas around the site where HPAIV was isolated from dead raptors.