

課題番号：SII-1-2

希少鳥類における鳥インフルエンザウイルス感染対策の確立

(JPMEERF18S20120)

研究代表者

鳥取大学農学部 山口剛士

研究実施期間：2018年度～2020年度

サブテーマ（研究分担機関/分担者）

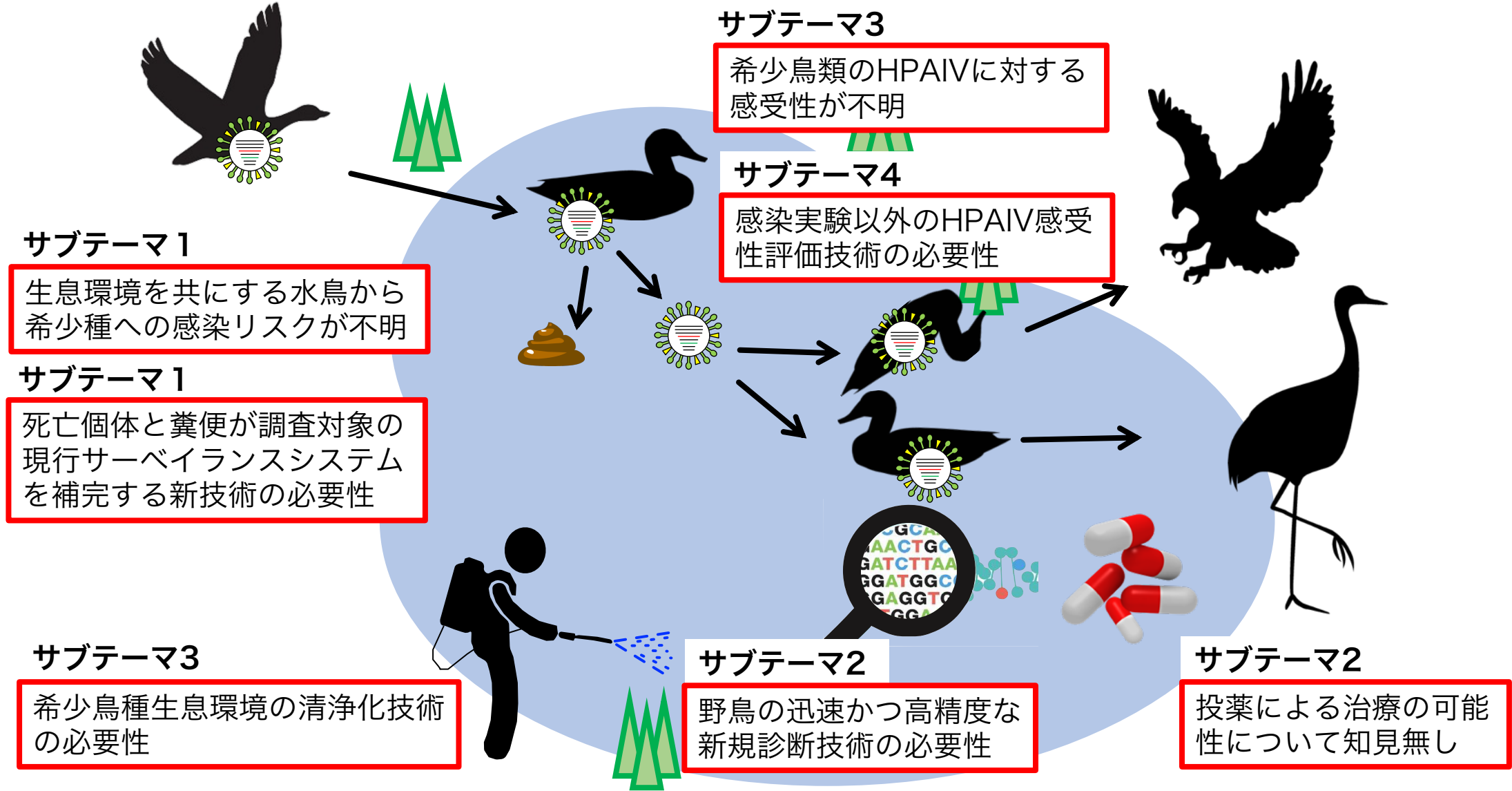
サブテーマ1：鳥インフルエンザウイルスの効率的サーベイランスシステムの開発と希少鳥類への感染源となる水鳥の感受性評価（鳥取大学/山口剛士・伊藤壽啓・村瀬敏之・伊藤啓史・尾崎弘一・笛吹達史・曾田公輔）

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種における抗ウイルス薬の有効性評価（北海道大学/迫田義博）

サブテーマ3：鳥インフルエンザウイルス感染による希少鳥類の減少リスク評価と生息環境清浄化技術の確立（鹿児島大学/小澤 真・畑井 仁・正谷達膳）

サブテーマ4：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（国立環境研究所/大沼 学）

背景：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解決すべき問題



サブテーマ1

生息環境を共にする水鳥から希少種への感染リスクが不明

サブテーマ1

死亡個体と糞便が調査対象の現行サーベイランスシステムを補完する新技術の必要性

サブテーマ3

希少鳥類のHPAIVに対する感受性が不明

サブテーマ4

感染実験以外のHPAIV感受性評価技術の必要性

サブテーマ3

希少鳥種生息環境の清浄化技術の必要性

サブテーマ2

野鳥の迅速かつ高精度な新規診断技術の必要性

サブテーマ2

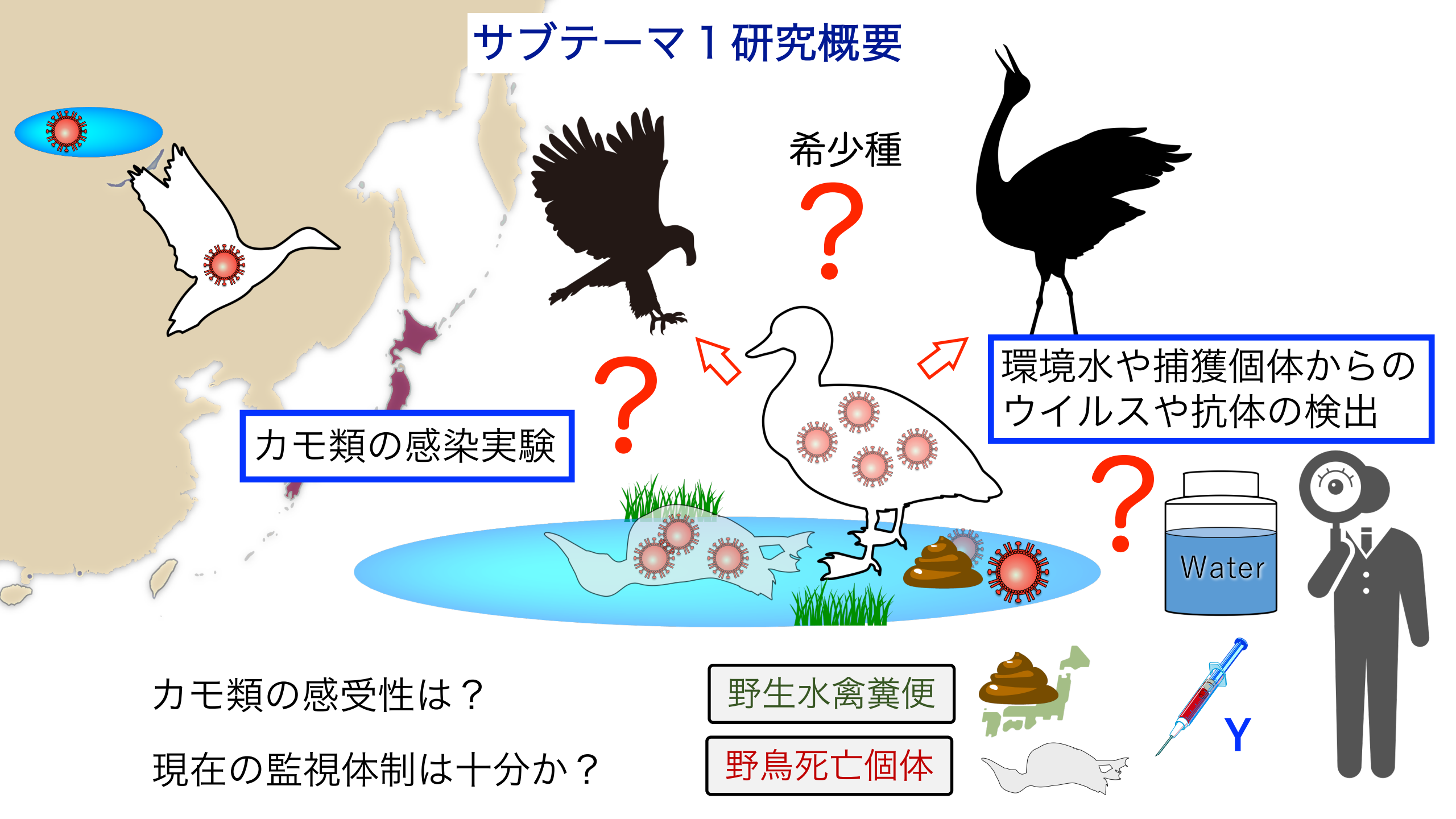
投薬による治療の可能性について知見無し

研究目標

テーマ全体

- 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**、**治療法**、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。
- 希少鳥類および希少鳥類と生息域を共有する**一般種の HPAIV感受性解明**および**培養細胞**を用いた希少鳥類の**感受性評価法**を確立し、希少鳥類におけるリスク評価と感染予防の基礎を構築する。

サブテーマ1 研究概要

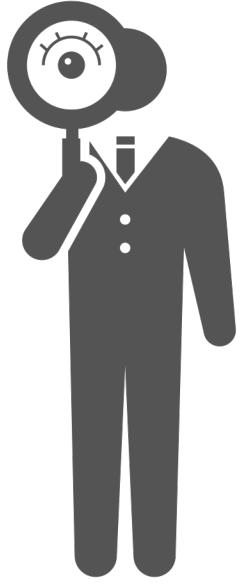


希少種



環境水や捕獲個体からの
ウイルスや抗体の検出

カモ類の感染実験



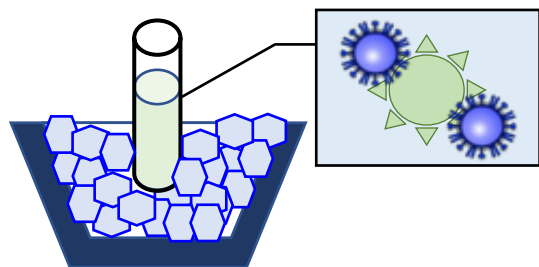
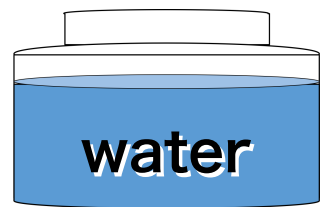
カモ類の感受性は？

現在の監視体制は十分か？

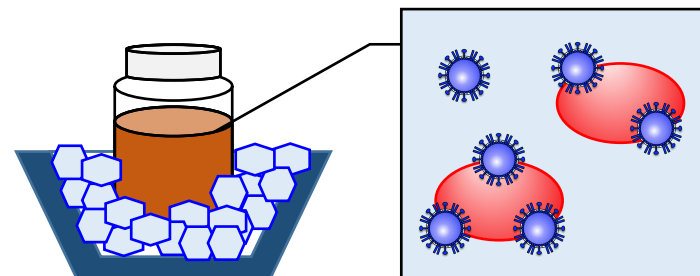
野生水禽糞便

野鳥死亡個体



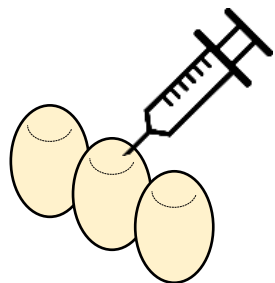


Neu5Ac α 2,3LacNAc
固定化微粒子

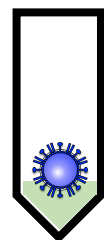
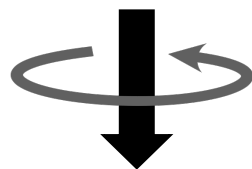


鶏赤血球添加

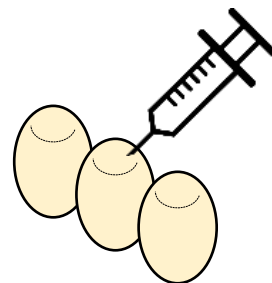
ウイルス吸着



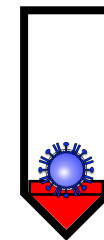
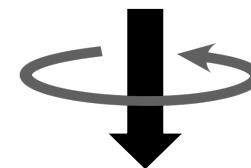
直接接種



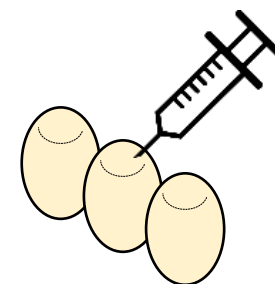
粒子回収
(ウイルス濃縮)



糖鎖付加粒子
で濃縮後接種



血球回収
(ウイルス濃縮)







血球で濃縮後
接種

条件検討で環境水1リットルからの血球濃縮後接種が最適

環境水からの鳥インフルエンザウイルスの検出

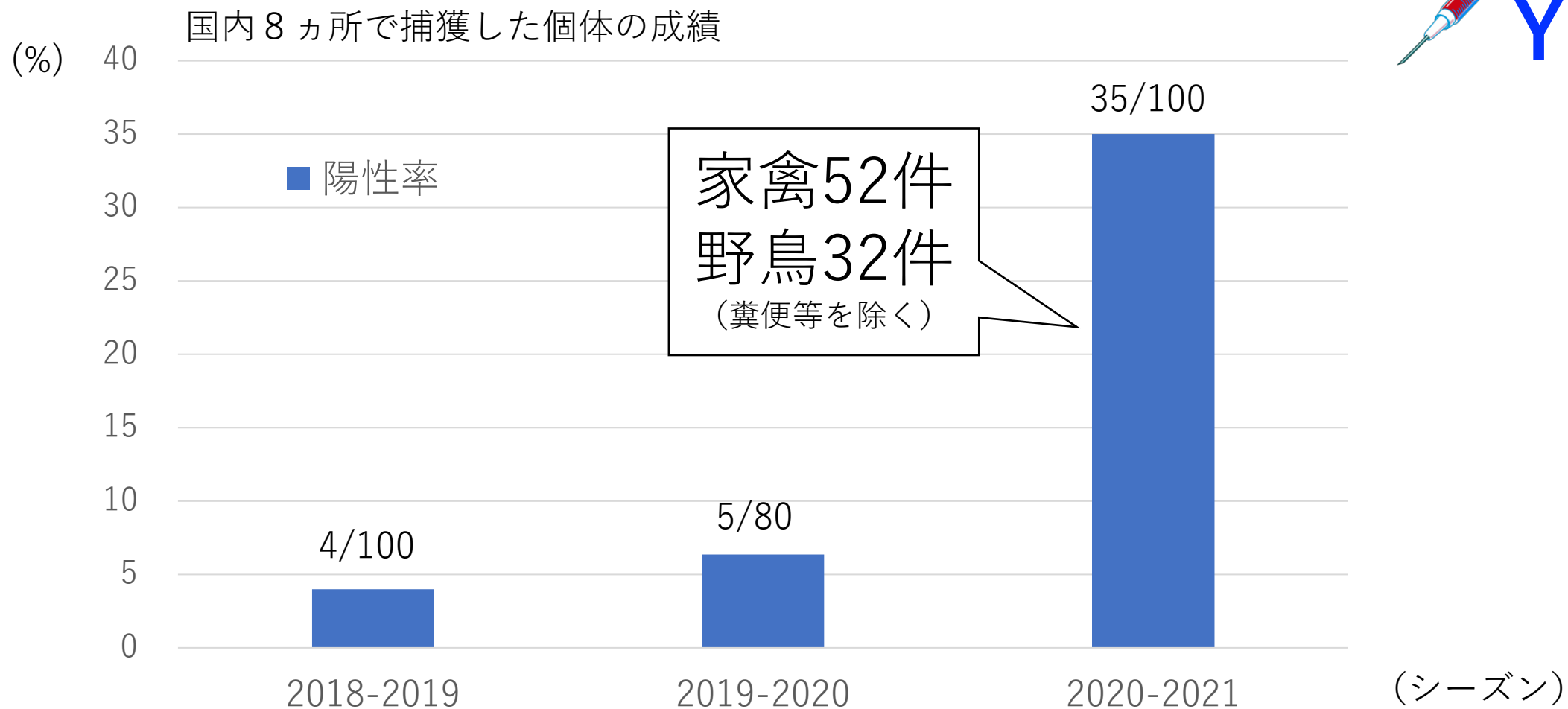
野鳥および渡り鳥飛来地で採取した環境水、水鳥糞便からの鳥インフルエンザウイルス分離成績

調査年	ウイルス分離陽性数／検体数				
	環境水 (100mL)	環境水 (1L) 	水鳥糞便 	捕獲水鳥 	狩猟カモ類 
2018－2019	0/54	1/14 * H6N6	1/69 H3N2	1/100 H7N7	—
2019－2020	—	0/28	0/120	0/80	0/39
2020－2021	—	5/38 H5N8 H1N1 H5N8 H6N8 H5N8	1/198 H6N1	0/100	1/53 H4N1
	0/54	6/80	2/387	1/280	1/92

* 分離ウイルス亜型(高病原性、低病原性)

環境水からの分離は現行の検出方法を補完する新技術として有効

捕獲水鳥のH5亜型HPAIVに対する抗体保有状況



国内で多発したシーズンに陽性率が高くリスク評価に有用である可能性

希少鳥類への感染源となる水鳥のHPAIV感受性評価試験

鼻腔内へのウイルス接種
A/コガモ/鳥取/1/2016 (H5N6) $10^{6.0\sim 2.0}$ EID₅₀/200 μ L

採材群 (3羽)



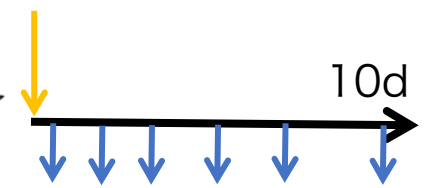
体内のウイルス
分布は?



結果：HPAIVはヒドリガモ、マガモおよびオナガガモの諸臓器で増殖した。

→ これら鳥種は猛禽に捕食され感染源になりうる。

観察群 (7羽)



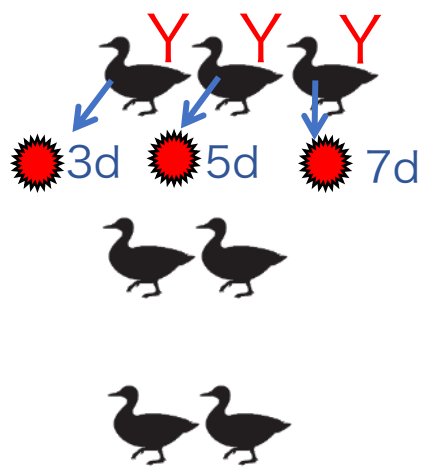
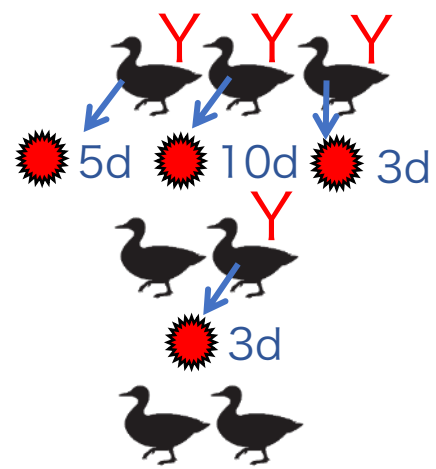
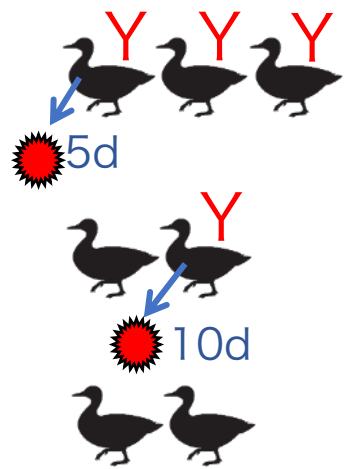
Y抗体応答?



体外へのウイルス
排出期間は?



観察期間中
の臨床症状は?



結果：ヒドリガモ、マガモおよびオナガガモは、HPAIVに感染し無症状でウイルスを排出した。

→ これら鳥種は感染後もHPAIVを排出しながら飛び回り感染源となりうる。
→ HPAIVは主に呼吸器から検出され、糞便のみの検査では不十分と考えられた。

サブテーマ2 研究概要

【小課題1】

現在流行しているウイルスの把握とそれらのウイルスの性状の把握



分離ウイルスの分子疫学解析
分離ウイルスの抗原性解析
分離ウイルスの病原性解析



【小課題2】

死亡個体等からの鳥インフルエンザウイルス抗原および遺伝子検出手法の開発

イムノクロマトグラフィー法の評価



リアルタイムPCR法の評価



【小課題3】

鳥種に応じた診断に適切なサンプリング部位の検索



【検討する材料】
・結膜スワブ ・羽軸
・皮膚

【従来の材料】
・気管／クロアカスワブ
・臓器乳剤

希少鳥種あるいはその近縁種の感染実験
(【サブテーマ3】との連携)

【小課題4】 希少鳥類における抗ウイルス薬の有効性評価



+



希少鳥類のモデル実験として、ニワトリとアヒルに抗インフルエンザ薬を投与

・血液中の活性型薬剤の濃度を測定



感染実験でH5ウイルスに対する予防・治療効果を評価



+



希少鳥類へ抗インフルエンザ薬を投与

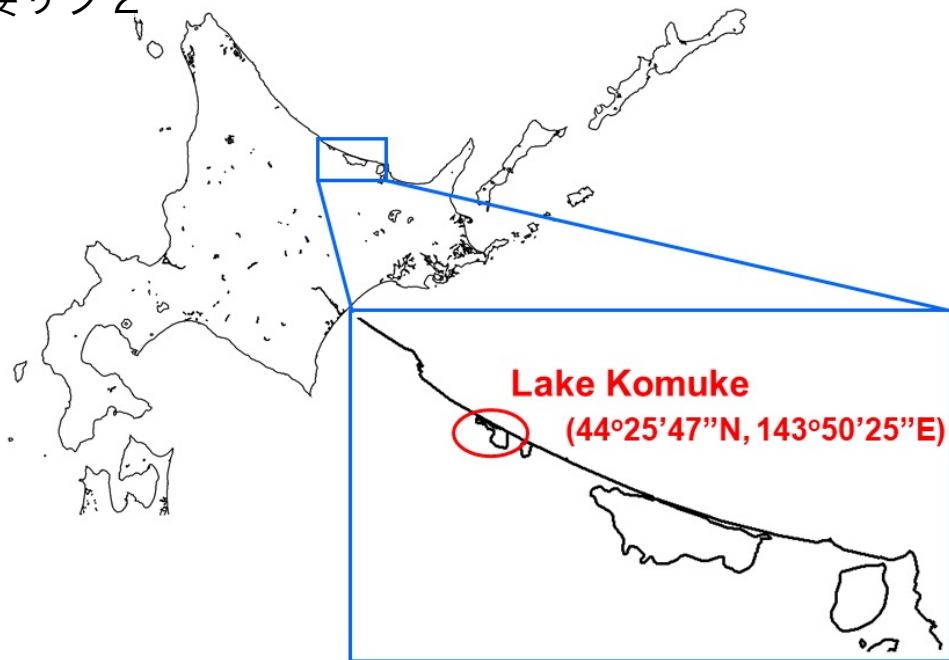
血液中の活性型薬剤の濃度を測定



左記モデル動物を用いた実験の成績から、希少鳥種に対する予防・治療効果を推定

【目指す社会実装】

- ・ 流行ウイルスの早期検出
- ・ 分離ウイルスの性状解明と共有
- ・ 迅速な診断技術の確立
- ・ 診断に適した材料の採材
- ・ 抗ウイルス薬による治療



北海道における鳥インフルエンザ 糞便調査と検出されたウイルス

2020年度に分離された高病原性株(赤字)
のサンプリング地であるコムケ湖を左図で示す

年度	サンプル数	分離されたウイルス亜型と株数
2018年度	542	H5N2(1株)
2019年度	409	H3N8 (1株) H6N1 (1株) H6N2(1株) H13N2 (1株) H13N6 (1株)
2020年度	591	H2N2(1株) H5N8(1株) H6N5(1株) H6N2(1株) H12N2(1株) H14N2(1株)

2020-2021年冬の大流行に先立ち、10月中旬に流行ウイルスを検出し警鐘を鳴らした

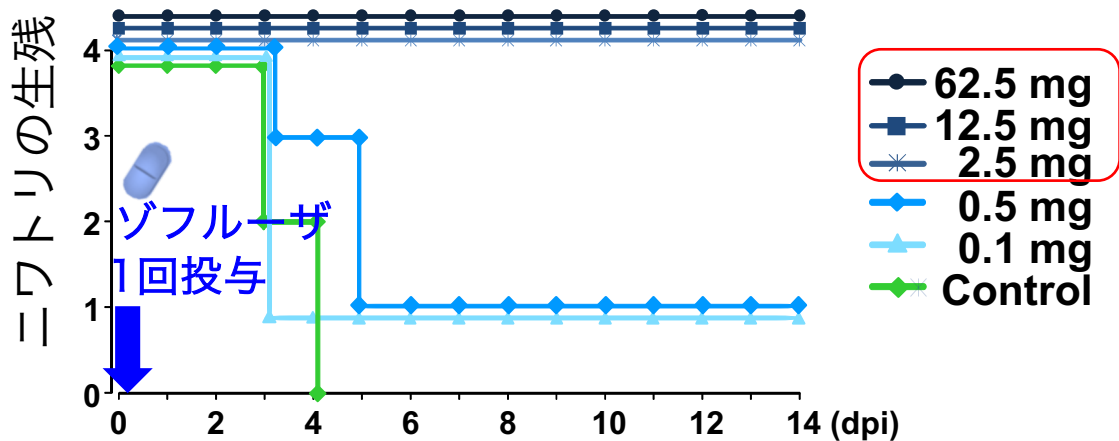
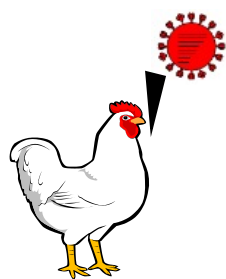
分子疫学的解析で流行ウイルスの由来を特定し、鳥インフルエンザ対策に還元した

リアルタイムRT-PCRを用いたH5亜型ウイルス遺伝子の検出

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

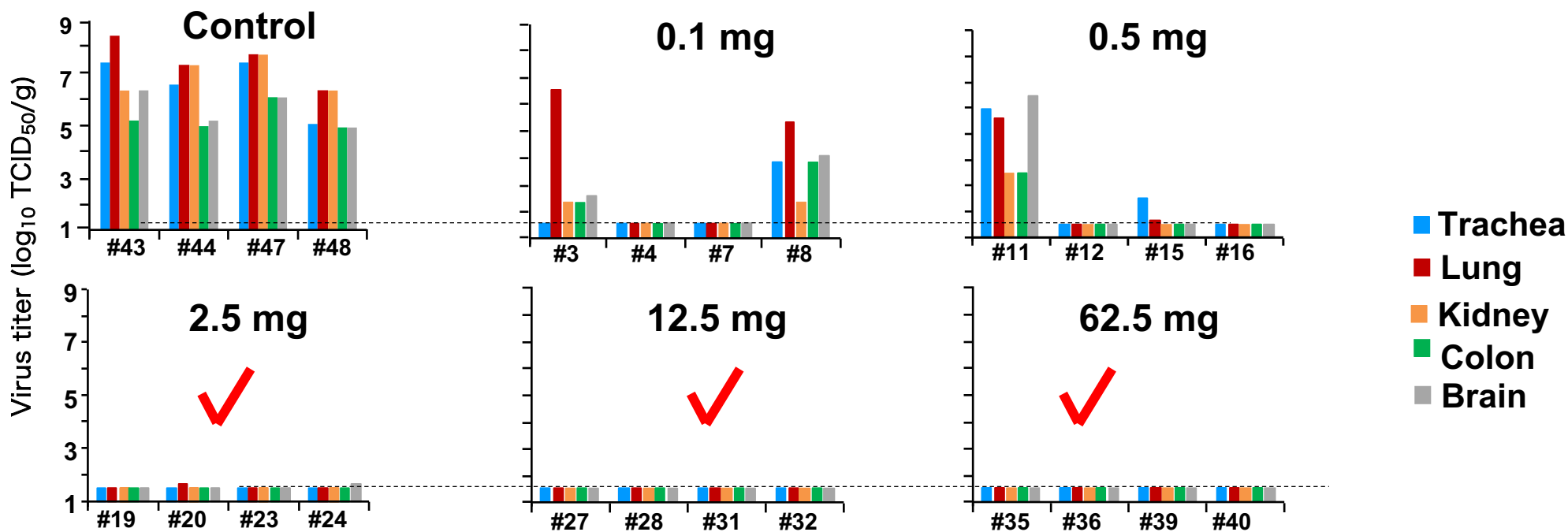
野鳥における診断に遺伝子診断が有用であることを実証
→2021-2022年冬からマニュアルを改訂し、実装済み

抗インフルエンザ薬でニワトリを治療するために必要な投与量



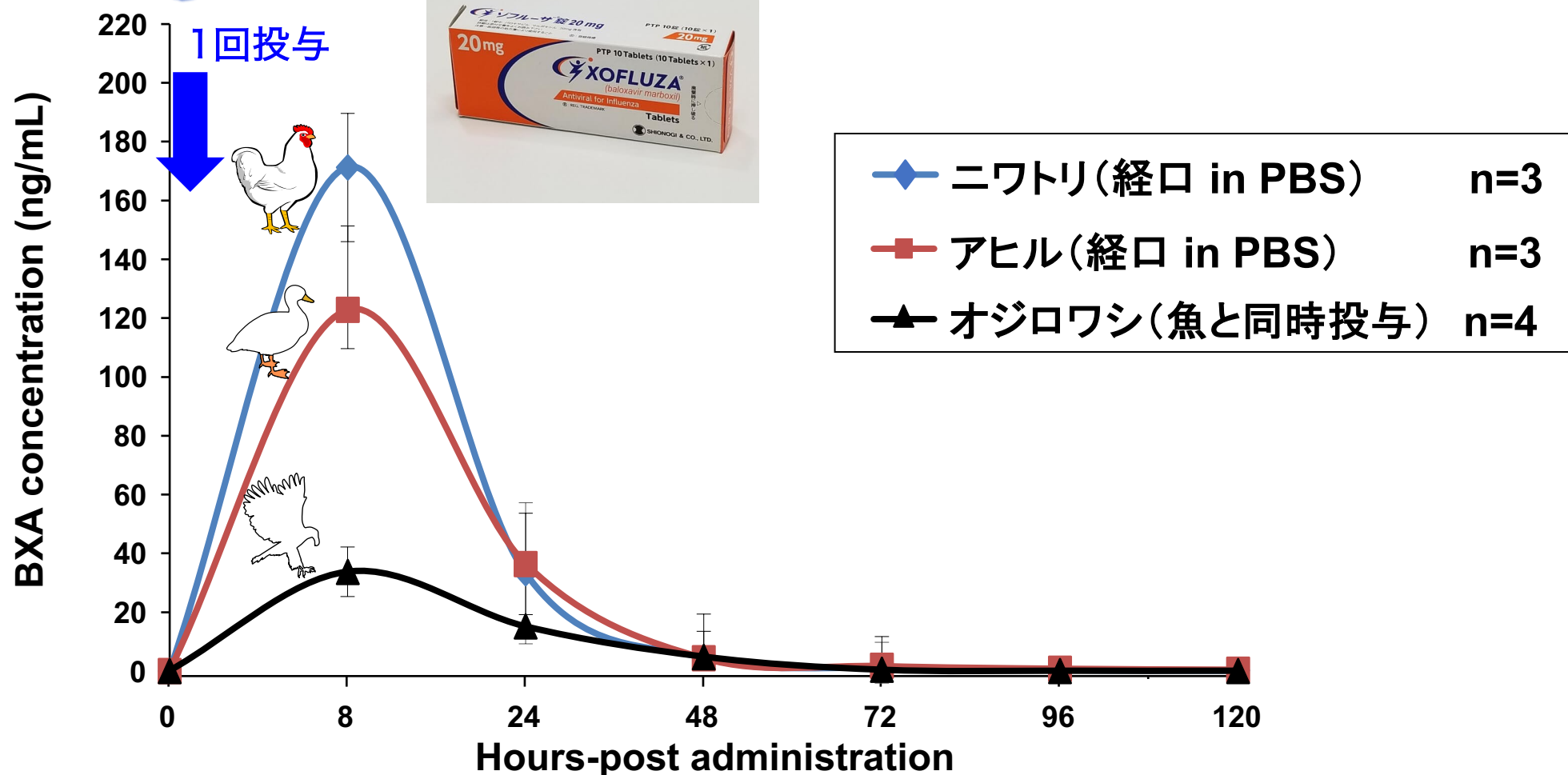
経口投与 (in PBS) での
最小有効投与量は
2.5 mg/kg

ウイルス増殖



鳥種による抗インフルエンザ薬の血中動態の比較

2.5 mg/kg



鳥の種類および薬の投与方法に合わせた投与量を設定

→ 2021-2022年冬に治療の試行開始

→ 感染したオジロワシとクマタカを治療薬投与により6羽救った

サブテーマ3 研究概要

希少鳥類の減少リスク評価



ツルのねぐら環境水を用いた 鳥インフルエンザサーベイランス



生息環境清浄化技術の確立

希少鳥類の減少リスク評価

オジロワシ感染実験



3日

7日 8日



H5N6亜型黒鳥分離株
(2016年)

接種力価：
鶏致死量の千倍

個体A 経鼻接種 — 安楽殺

個体B 経鼻接種 — 安楽殺

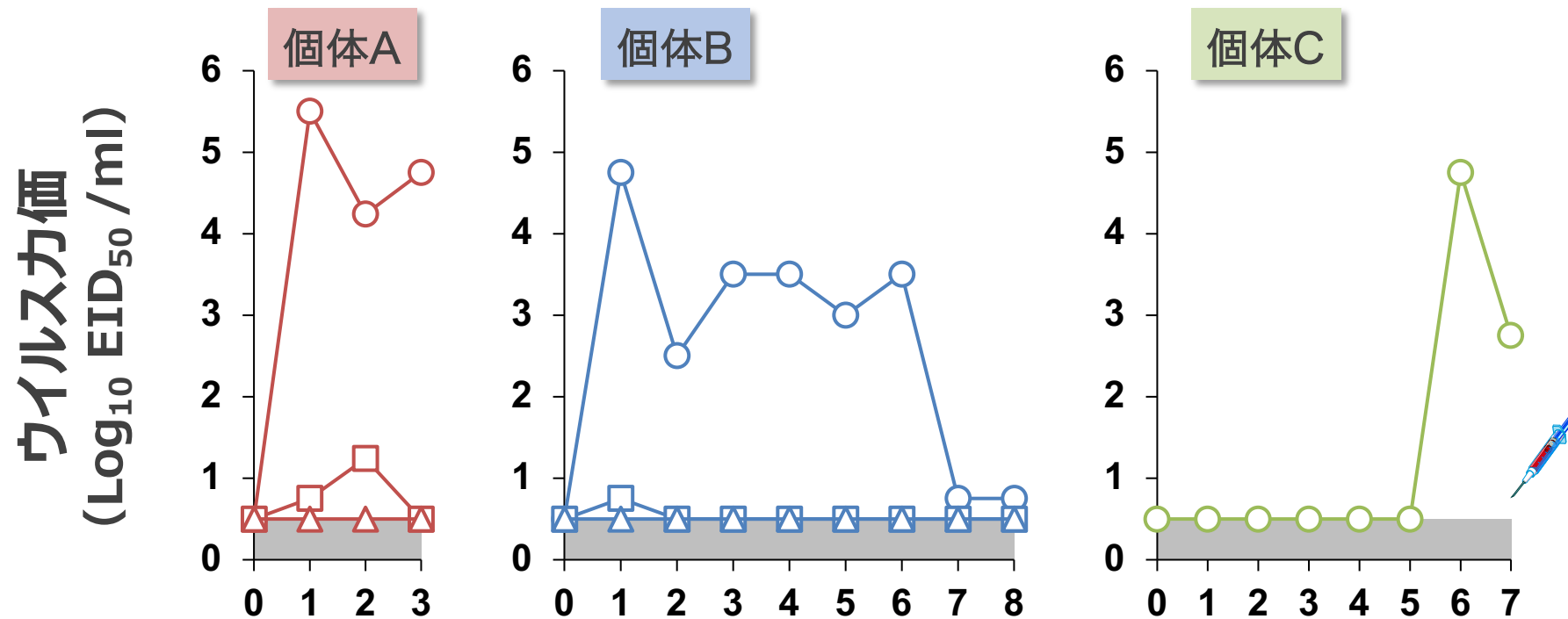
個体C 非接種 (個体Bと隣接飼育)

いずれの個体も無症状

静脈内接種 — 安楽殺

希少鳥類の減少リスク評価

△ 結膜スワブ ○ 口咽頭スワブ □ クロアカスワブ



H5N6亜型黒鳥分離株 (2016年)

接種力価：
鶏致死量の千倍

個体A 経鼻接種 — 安楽殺

個体B 経鼻接種 — 安楽殺

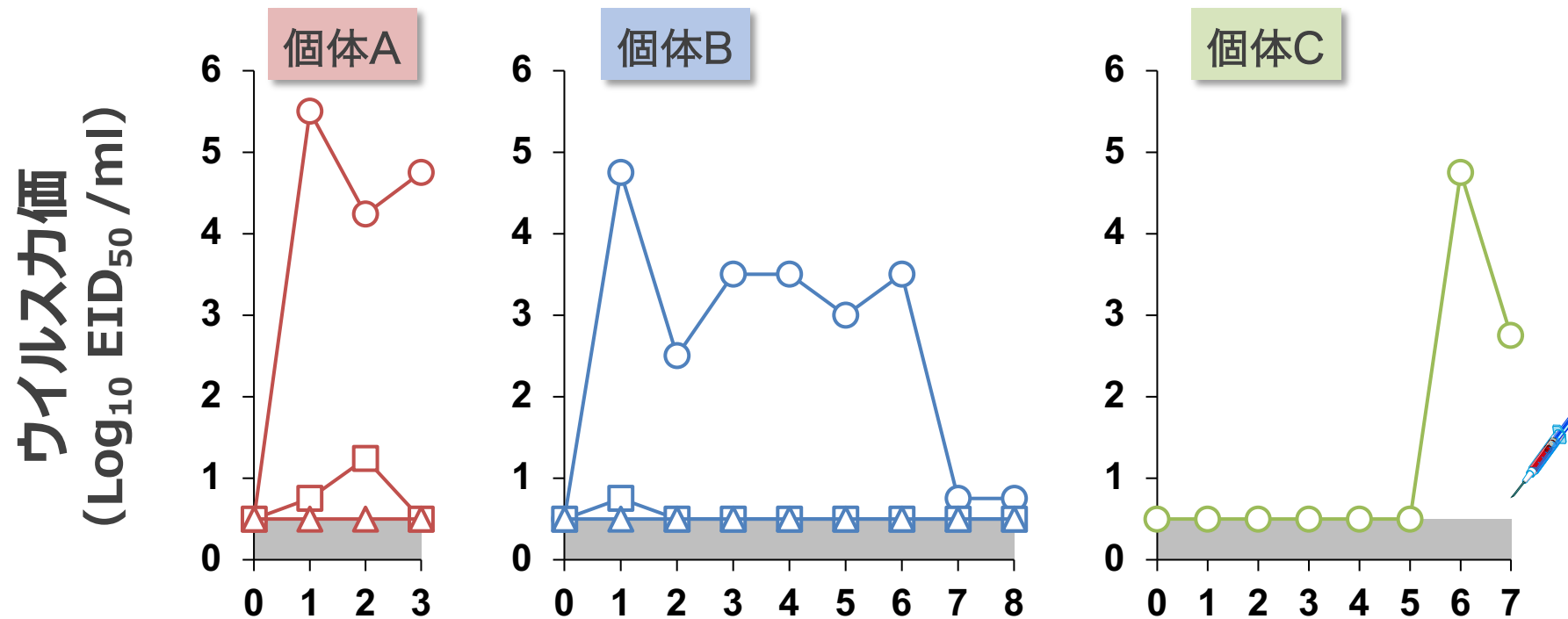
個体C 非接種 (個体Bと隣接飼育)

いずれの個体も無症状

静脈内接種 — 安楽殺

希少鳥類の減少リスク評価

△ 結膜スワブ ○ 口咽頭スワブ □ クロアカスワブ



すべてのオジロワシ個体でウイルス感染が成立

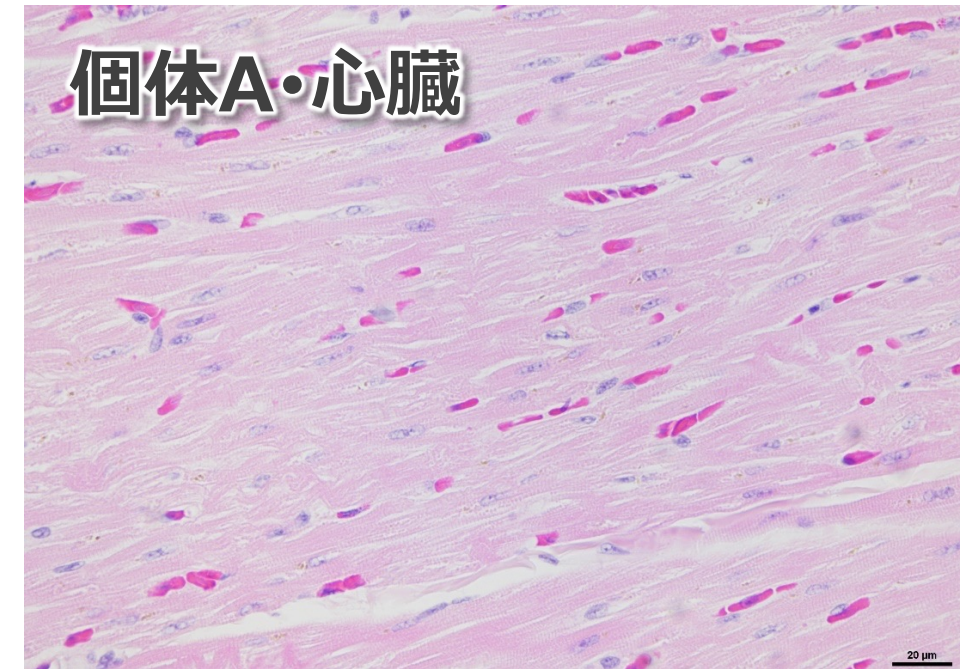
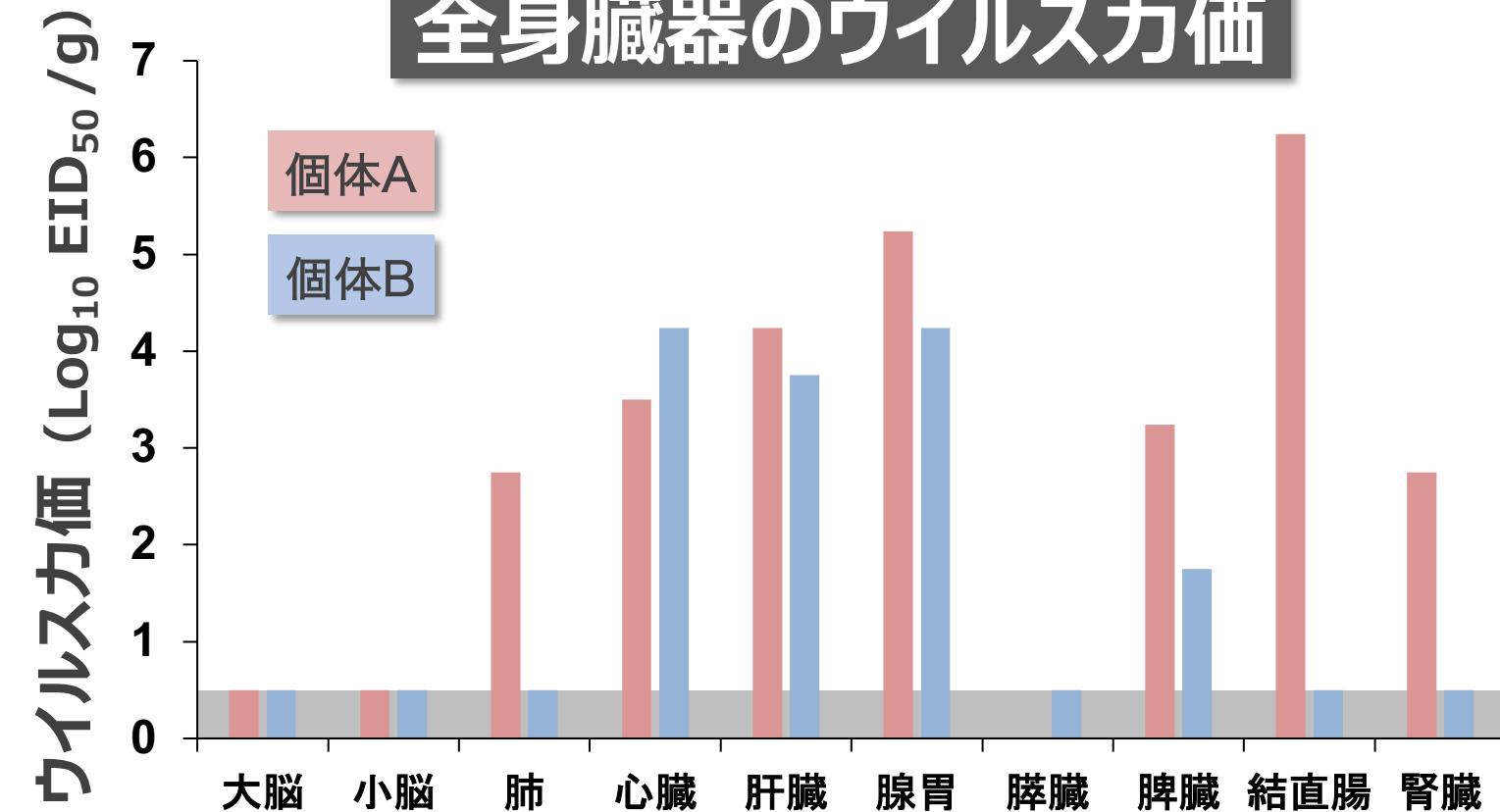
口腔から高カ価のウイルスを排出

(口腔排出ウイルスの) 非接触的な水平伝播が成立

希少鳥類の減少リスク評価

全身臓器のウイルスカ価

病理学的検索



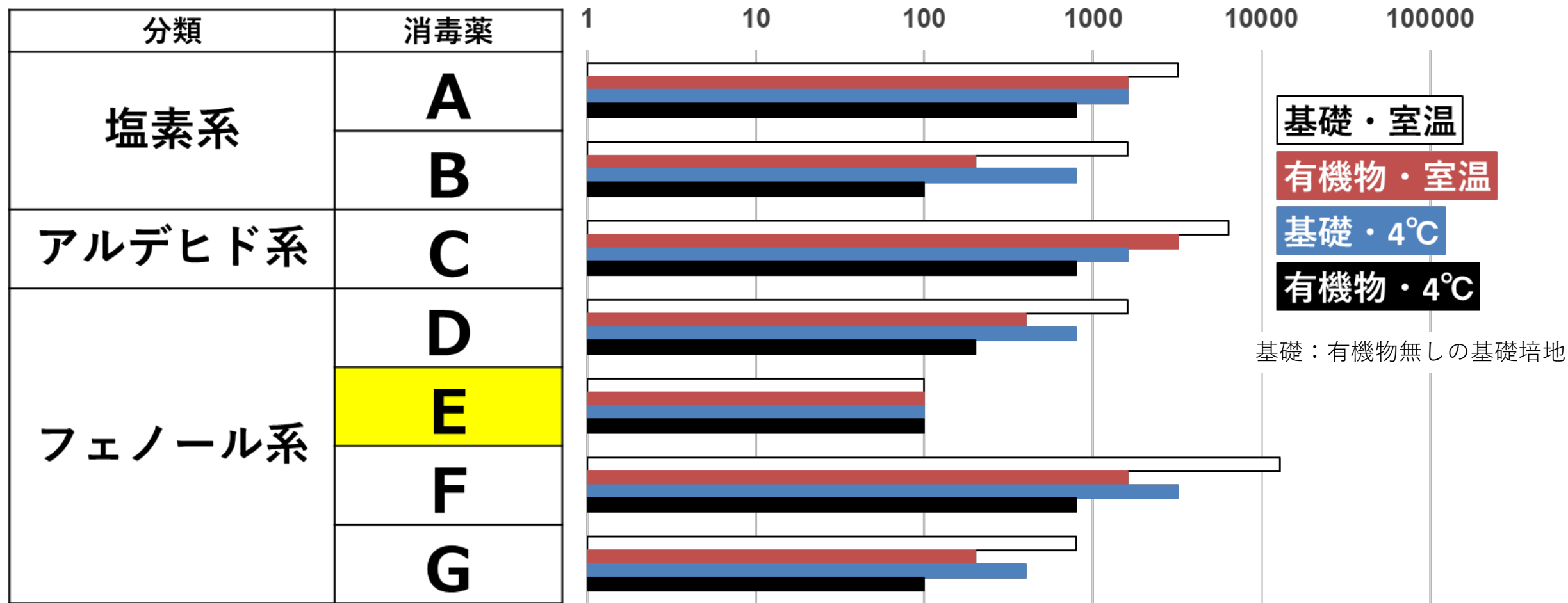
中枢神経以外の全身臓器で増殖

異常は認められず

ウイルス増殖と病理学的変化や症状に相関なし

生息環境清浄化技術の確立

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)が死滅する最大希釈倍率 (希釈倍率)



評価基準：低温や有機物存在下でも「本来の消毒効果」を発揮できること

生息環境清浄化技術の確立

様々なウイルス株で 同様の試験結果

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-G/2018 (H3N8)

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-E/2018 (H4N6)

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-I/2014 (H6N2)

A/duck/Kagoshima/KU-57/2015 (H11N9)

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-B1/2020 (H5N8)

A/environment/Kagoshima/KU-ngr-H4/2018 (H7N9)

消毒薬E

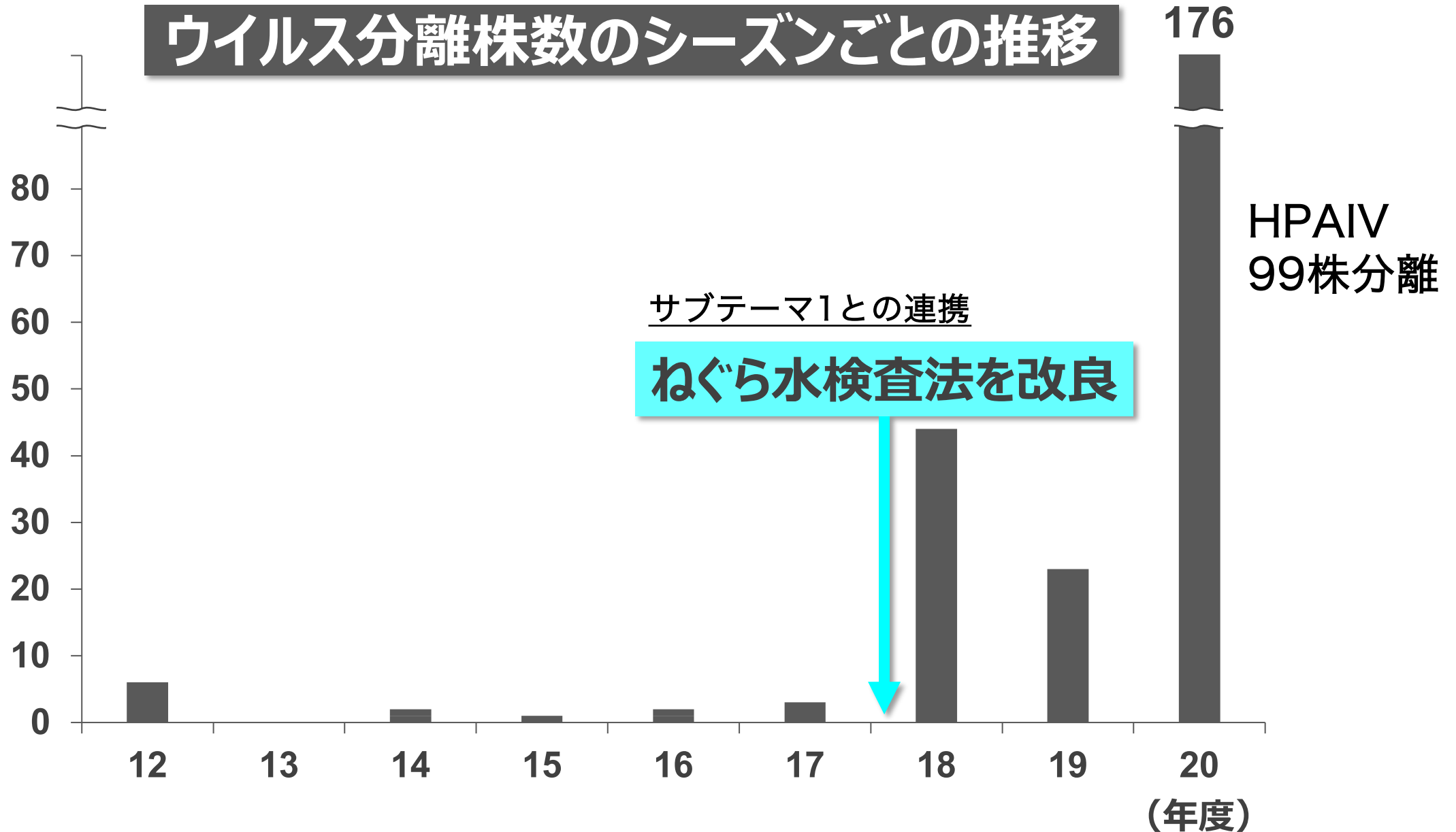
- ・ハエの幼虫や鶏コクシジウムオーシストにも有効
- ・自然環境への負荷が高く環境水の消毒には不向き
- ・養鶏場や動物園など排水管理が可能な場所でも有効

ツルのねぐら環境水を用いた鳥インフルエンザサーベイランス



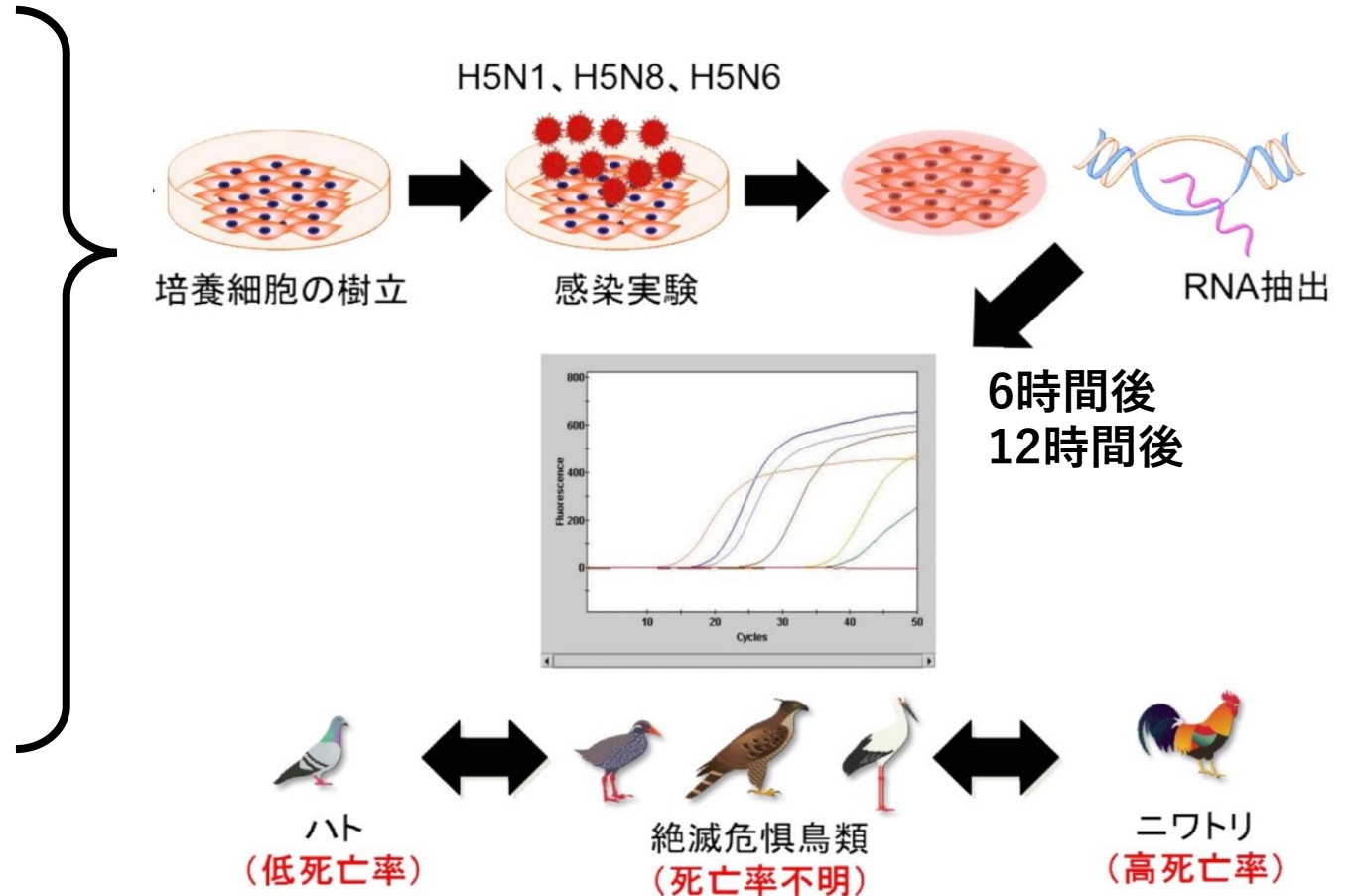
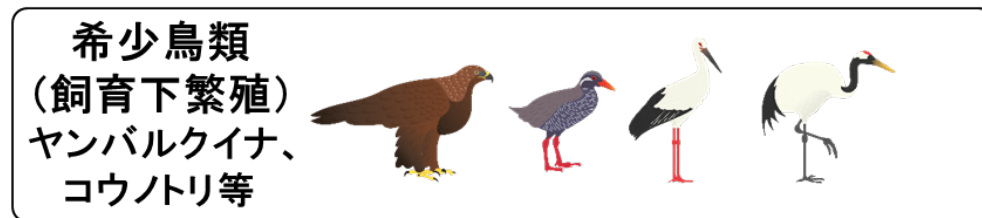
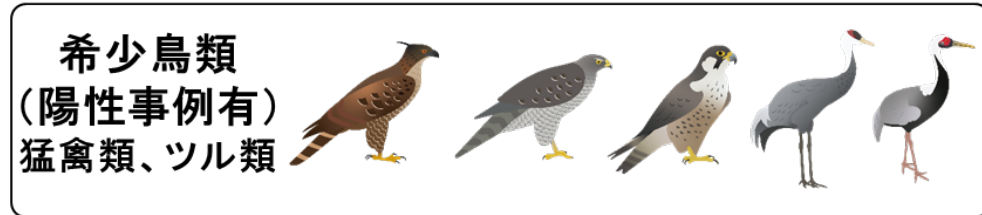
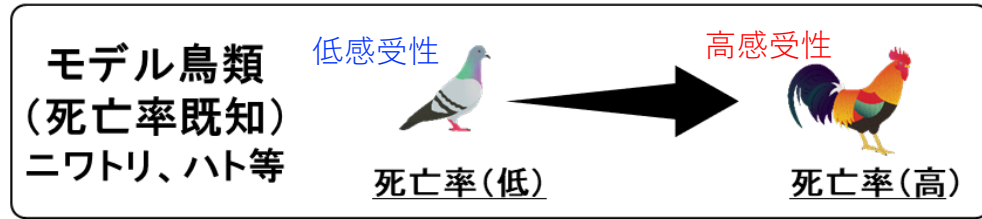
ツルのねぐら環境水を用いた鳥インフルエンザサーベイランス

ウイルス分離株数のシーズンごとの推移



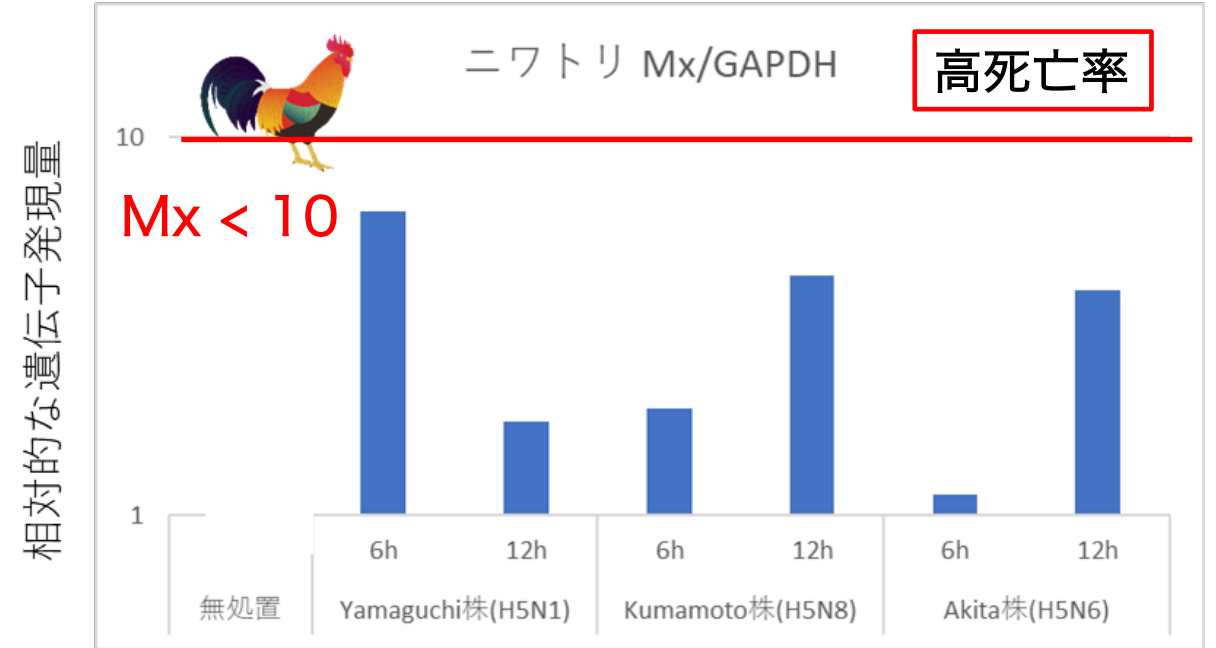
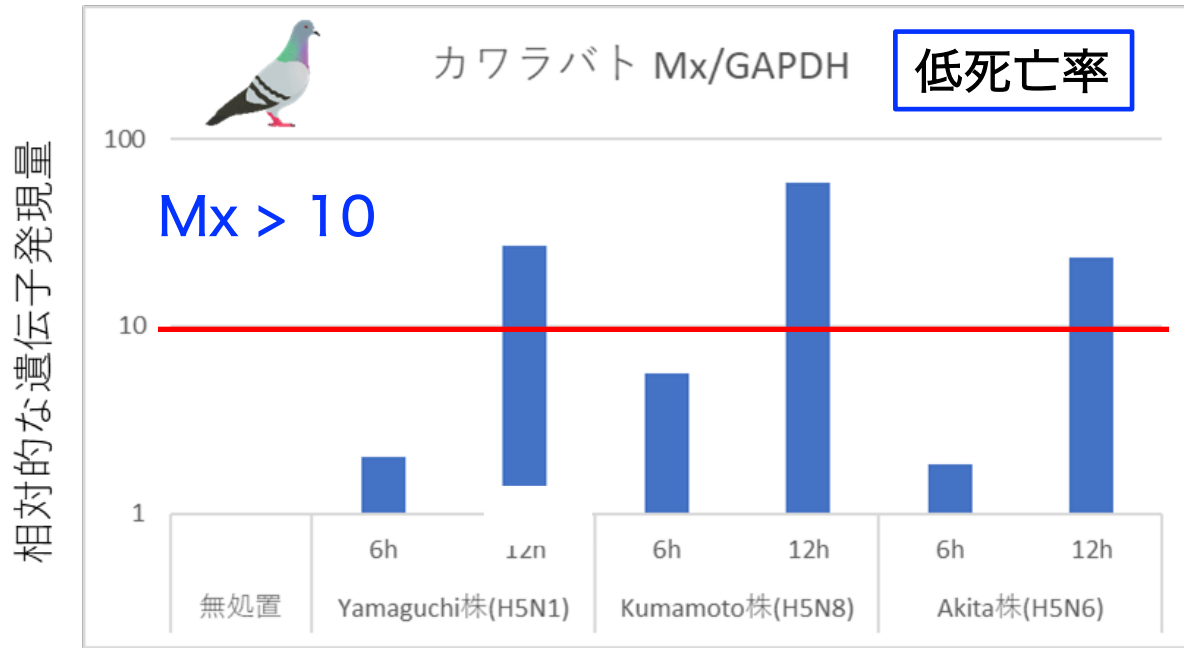
サブテーマ4 研究概要

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



リアルタイムPCRによるMx遺伝子発現パターンの種間比較

モデル鳥類におけるMx遺伝子発現パターン



(各時間のコントロールに対する相対的な発現量)

カワラバトは時間の経過に伴いMx遺伝子の発現量が増加する。

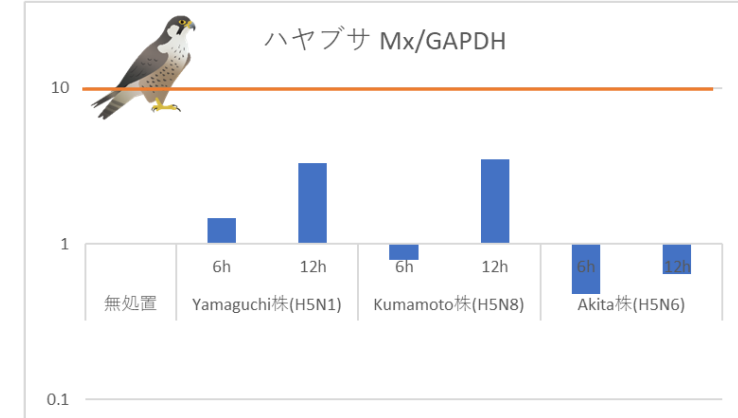
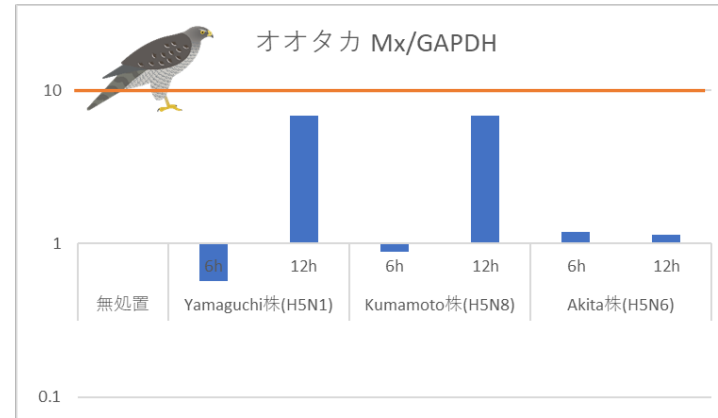
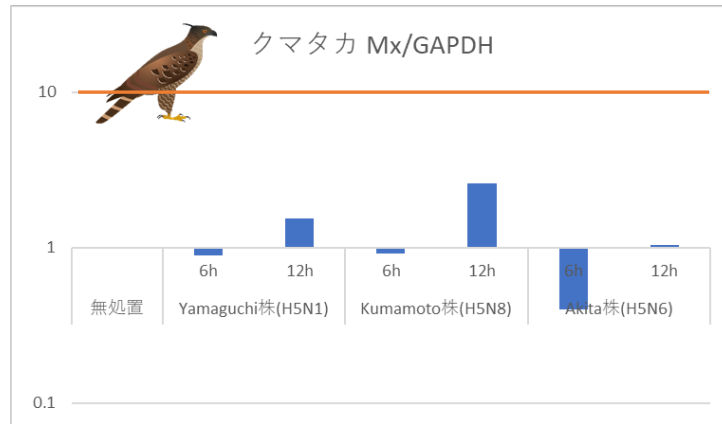
ニワトリでは発現量の増加は10倍を超えることが無く、時間経過とともに発現量が低下する場合もある。

希少鳥類（陽性事例有）におけるMx遺伝子発現パターン

Mx < 10



相対的な遺伝子発現量

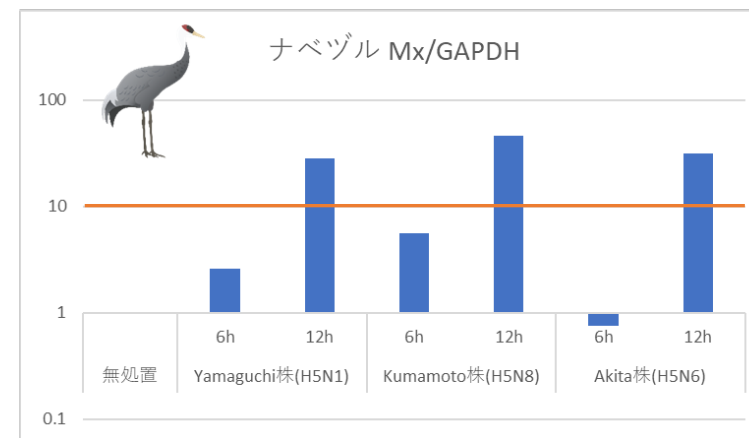
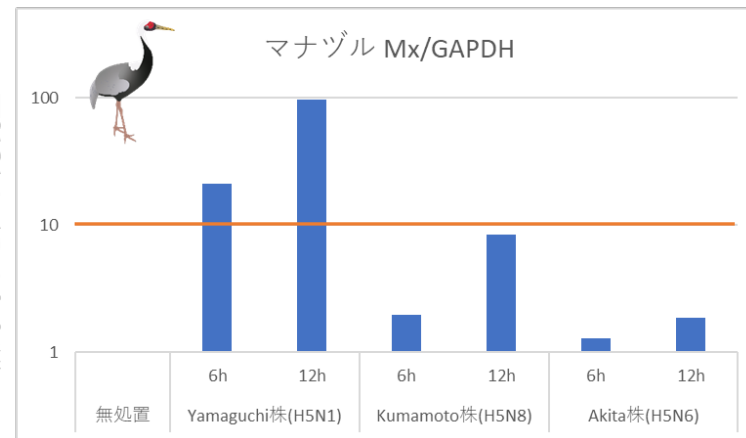


クマタカ、オオタカ、ハヤブサはウイルス感染後のMx遺伝子発現が抑制傾向にある。増加しても感染12時間後に発現量が10倍を超えることは無い。

Mx > 10



相対的な遺伝子発現量



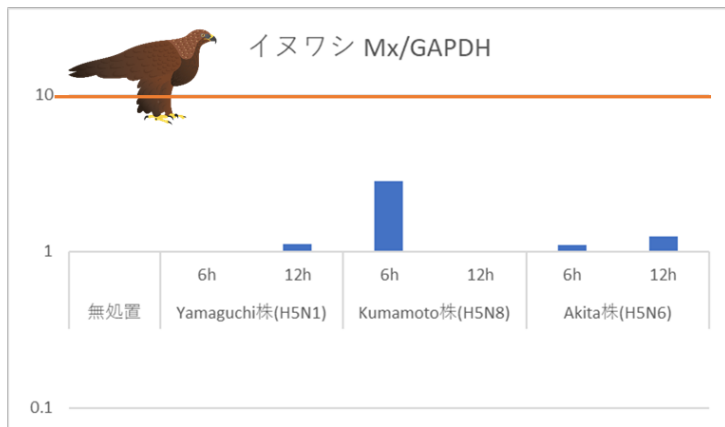
マナヅル、ナベヅルはウイルス感染後のMx遺伝子発現量が常に経時的に増加する。

希少鳥類（飼育下繁殖中）におけるMx遺伝子発現パターン

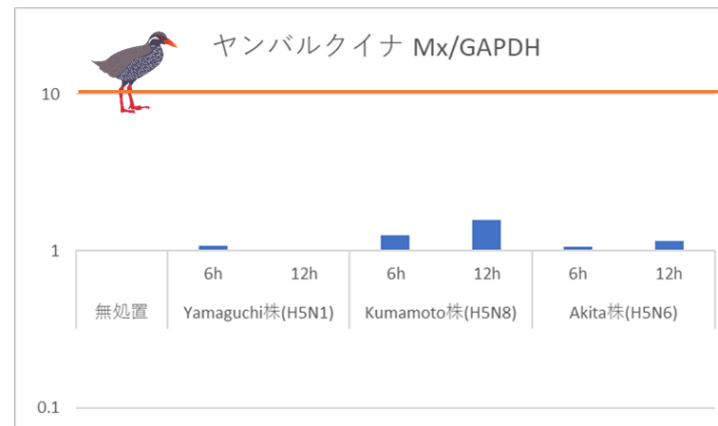
Mx < 10



相対的な遺伝子発現量



相対的な遺伝子発現量

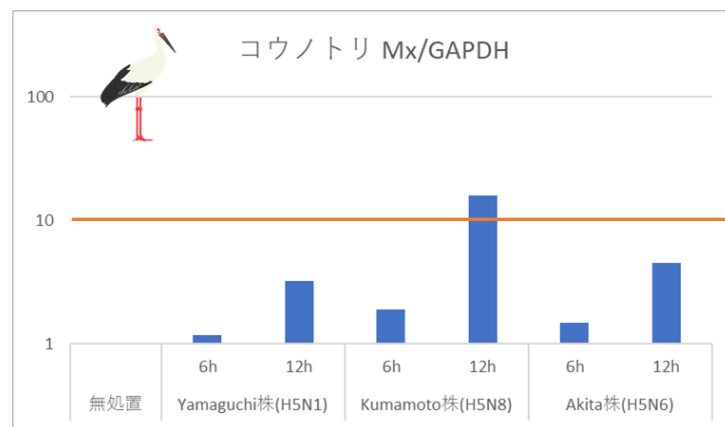


イヌワシ、ヤンバルクイナはウイルス感染後のMx遺伝子発現が抑制傾向にある。増加しても感染12時間後に発現量が10倍を超えることは無い。

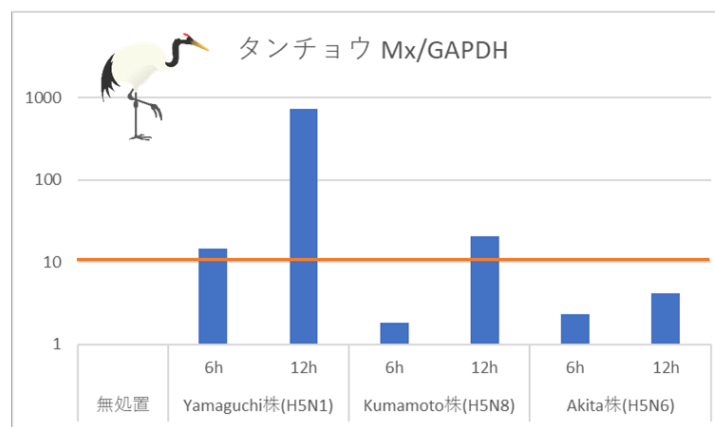
Mx > 10



相対的な遺伝子発現量



相対的な遺伝子発現量



コウノトリ、タンチョウはウイルス感染後のMx遺伝子発現量が常に経時的に増加する。

まとめ

低感受性



$Mx > 10$

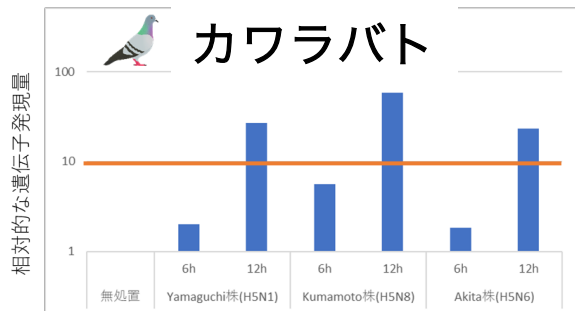


図4.7 カワラバトMx遺伝子発現量の経時的変化

高感受性



$Mx < 10$

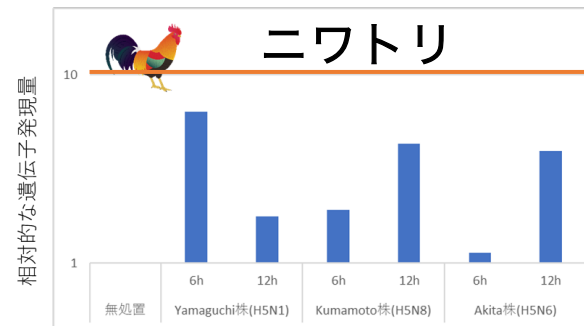


図4.8 ニワトリMx遺伝子発現量の経時的変化

経時的にMx遺伝子の発現が**増加**する傾向があるカワラバト（**低死亡率**）の発現パターンが類似

Mx遺伝子の発現が**抑制**される傾向があるニワトリ（**高死亡率**）の発現パターンが類似

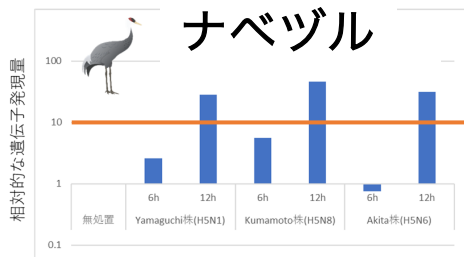


図4.12 ナベヅルMx遺伝子発現量の経時的変化

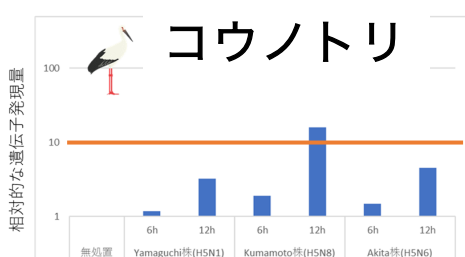


図4.18 コウノトリMx遺伝子発現量の経時的変化

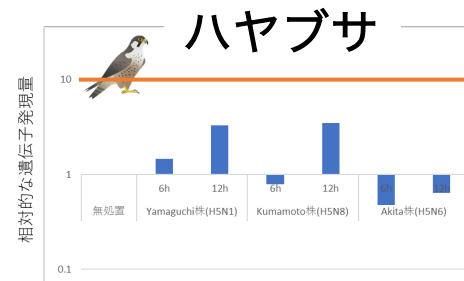


図4.11 ハヤブサMx遺伝子発現量の経時的変化



図4.10 オオタカMx遺伝子発現量の経時的変化

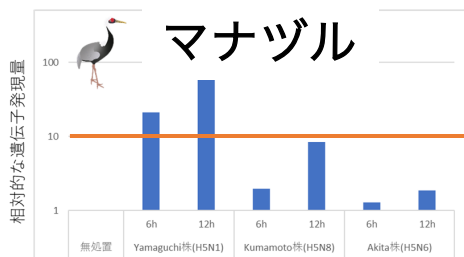


図4.13 マナヅルMx遺伝子発現量の経時的変化

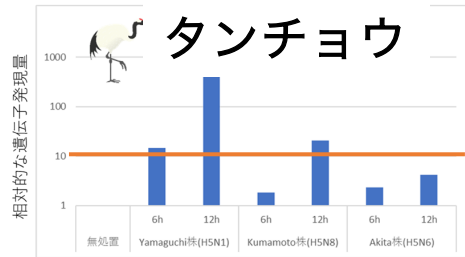


図4.17 タンチョウMx遺伝子発現量の経時的変化

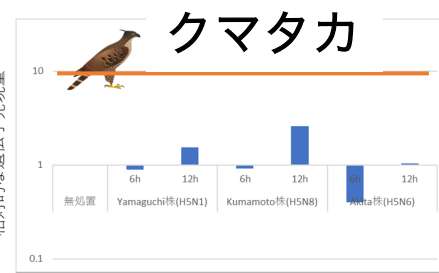


図4.9 クマタカMx遺伝子発現量の経時的変化



図4.14 イヌワシMx遺伝子発現量の経時的変化



図4.16 ヤンバルクイナMx遺伝子発現量の経時的変化

環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

2020年10月に北海道紋別市コムケ湖で、2020年～2021年冬季に国内で初めてH5N8亜型HPAIVを分離し、分離ウイルスのニワトリに対する病原性の他、診断やウイルスの起源予測に有用な遺伝子情報を環境省および農林水産省に提供し、各省の鳥インフルエンザ対策に活用された。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

サブテーマ1：2020年から2021年に3地点で採取した環境水からHPAIVが検出された。いずれの採水地点でも死亡個体は認められず、1地点からは糞便からも検出例が無く、環境水がHPAIVの早期発見に有用であることが実証され、現行の監視体制を補完する新たな検査対象としての活用が期待され、確定検査機関では一部導入済み。また、「野鳥における高病原性鳥インフルエンザに係る対応技術マニュアル」に示された検査優先種の各種水鳥を用いた感染実験の成績は、今後の検査優先種評価や希少鳥種へのリスク評価への活用が見込まれる。

サブテーマ2：近年分離されたHPAIVや野鳥の臨床材料を用いた現行のリアルタイムRT-PCR法の感度と特異性の評価成績は、今後の野鳥における鳥インフルエンザ診断法の高度化の基盤となり、令和3年度以降の環境省の鳥インフルエンザ診断にも活用された。また抗インフルエンザ薬による希少鳥類の治療に関する科学的知見の集積は、希少鳥類保全のための基盤構築はもちろん、野生動物と感染症における問題解決のモデルケースとして、将来における環境政策の立案・遂行への貢献が期待される。

サブテーマ3：希少鳥類オジロワシのHPAIVに対する感受性や排泄様式は、今後の保護対策立案に重要な基盤となる知見を提供する。また、動物園のような排水の処理・管理が可能な閉鎖環境における環境水の清浄化対策には、『動物用タナベゾール』が有用であることを示した。さらに、冬鳥越冬地の環境水を検体とする鳥インフルエンザサーベイランスの効率性は、適用条件が揃う新たな採材ポイントを探索しサーベイランス体制を構築する価値を明示した。

サブテーマ4：培養細胞によるHPAIV感受性評価基準の有効性が示唆され、特に感染実験が困難な国内希少野生動植物種に指定されている鳥類種への適用により、希少な鳥類種に対するHPAIVのリスク評価に道を拓いた。

研究成果の発表状況

誌上発表（査読有り：5報）

- 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.
- 5) K. SODA, Y. TOMIOKA, C. HIDAKA, M. MATSUSHITA, T. USUI and T. YAMAGUCHI: BMC Vet Res., 18, (2022) (IF:2.741), Susceptibility of common family Anatidae bird species to clade 2.3.4.4e H5N6 high pathogenicity avian influenza virus: an experimental infection study. （終了研究成果報告書提出以降に発表）

その他発表件数

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