第 50 回 獣疫学会学術集会

野生動物医学会連携シンポジウム “野生動物の保全と感染症疫学～タスマニアデビルの DFTD
(デビル顔面腫瘍性疾患) 対策から学ぶわが国のネットワーク構築と疫学視点の導入～”

野生動物感染症ネットワーク構築の進捗 鳥インフルエンザウイルス 保有状況調査データの活用—リスクマップの作成と侵入経路の解明— ＜獣疫学の視点から＞

大沼 学*

国立研究開発法人国立環境研究所, 生物・生態系環境研究センター, 生態リスク評価・対策研究室

Utilization of Molecular Surveillance Data of Avian Influenza Virus —Creating a Potential Risk Map and Introduction Route Analysis—

Manabu ONUMA*

Ecological Risk Assessment and Control Section, Center for Environmental Biology and Ecosystem,
National Institute for Environmental Studies

Summary

High pathogenic avian influenza virus (HPAIV) was isolated from wild birds found dead in 2004, 2007, 2008, 2010–2011, 2014–2015 and 2016–2017 in Japan. Some endangered species were included in the infected wild birds. Thus, HPAIV was thought to be one of the factors for population decline. HPAIV infection not only cause serious economic damage to poultry farm industry but also could affect to biodiversity.

On the circumstance, Ministry of Environment, Japan started a nationwide avian influenza virus survey program since 2008. National Institute of Environmental Studies (NIES) joined the program as the responsible organization of the first screening. In addition, NIES conducted the research regarding the virus, especially the aspect of the ecology of the virus. The research results showed that the virus could enter the western Japan in autumn through crossing the Sea of Japan and through the Korean Peninsula by mallards and northern pintails.

1. はじめに

2004 年 1 月, 山口県において, 79 年ぶりとなる高病原性鳥インフルエンザが国内で発生した。その際に分離されたのは, H5N1 亜型のウイルスであった。また, 同年には, ハシブトガラスからも同亜型が分離されている¹⁾。その後,

国内では 2007 年, 2008 年, 2010 年～2011 年, 2014 年～2015 年, 2016 年～2017 年に死亡した野鳥から高病原性鳥インフルエンザウイルス (以後, HPAIV) が分離されている²⁻⁶⁾。分離されたウイルスの亜型は, 2004 年から 2011 年までが H5N1 亜型, 2014 年から 2015 年が H5N8 亜型, 2016 年から 2017 年が H5N6 亜型であった。2007 年以降には, 死亡した状態で発見された, クマタカ, ハヤブサ, ナベヅル, マナヅルといった環境省レッドデータブック⁷⁾に掲載されている絶滅危惧種からもウイルスが分離されている。海外でも野鳥から HPAIV が分離される事例は報告されており, 中には, 野鳥が六千羽死亡する, 大量死事例も報告されている⁸⁾。

連絡先: 大沼 学*

国立研究開発法人国立環境研究所生物・生態系環境
研究センター 生態リスク評価・対策研究室
〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2
Tel : 029-850-2498 ; Fax : 029-850-2673
E-mail : monuma@nies.go.jp

前述のように、国内では HPAIV が死亡した絶滅危惧種からも分離されている。そのため、高病原性鳥インフルエンザが原因となり絶滅危惧種の個体数が減少する可能性がある。つまり、高病原性鳥インフルエンザは養鶏産業への経済的な被害をもたらすばかりではなく、生物多様性へも影響を与えかねない感染症となっているのである。このような状況の中、環境省は、2008 年より野鳥を対象とした鳥インフルエンザウイルス（以後、AIV）の保有状況について全国調査を実施している。国立環境研究所は、動物検疫所（農林水産省）とともに遺伝子検査機関（一次スクリーニング）としての役割を担ってきた。それに加え、国立環境研究所は、所内の研究プログラム「課題解決型研究プログラム」の一環で、AIV に関連する研究を実施してきた。本稿では、国立環境研究所が、全国ウイルス保有状況調査結果を活用して実施した、AIV の生態学的側面に関する研究例について紹介する。

2. 野鳥を対象とする AIV 保有状況 全国調査の概要

AIV の主要な自然宿主であるカモ類の糞便サンプルと死亡野鳥から採取したスワブサンプルが AIV の遺伝子検査用試料となっている。糞便については、各自治体の協力を得て、環境省が設定した全国 52 地点で採取している。また、死亡した野鳥からは、口腔内スワブとクロアックスワブを、各自治体の協力を得て、採取している。それらの試料から RNA を抽出し、RT-LAMP 法（栄研化学）^{9,10)} によりウイルス遺伝子の検出を実施する。なお、遺伝子検査では A 型インフルエンザウイルス検査キット（Loopamp A 型インフルエンザウイルス検出試薬キット、（栄研化学））を使用しており、この段階での亜型判定は行っていない。遺伝子検査が陽性となった場合は、試料を確定検査機関である農研機構動物衛生研究部門、北海道大学、鳥取大学、鹿児島大学に送付し、ウイルス分離、亜型判定、病原性評価等を実施する。

3. AIV 保有状況全国調査結果の活用事例 1 —野鳥版鳥インフルエンザリスクマップの作成—

2010 年～2011 年に国内で高病原性鳥インフルエンザが家禽類および野鳥で発生した（野鳥 63 個体。養鶏農場 24 箇所）。この状況を受け、国立環境研究所では生態ニッチモデリングによって、AIV が渡り鳥を含む野鳥から分離されやすい地域を可視化することを試みた。生態ニッチモデリングとは、ある生物の分布域に関する位置情報と環境情報（気温、降水量、標高など）を統合的に分析することで、ある場所に、その生物種が生息する確率を推定する方法である。生態ニッチモデリングには幾つかのアルゴリズムが

あるが、我々は MaxEnt version 3.3.3e¹¹⁾ を使用した最大エントロピーモデルにより、野鳥版鳥インフルエンザリスクマップの作成を行った¹²⁾。

「生物の分布域に関する位置情報」については、2010 年～2011 年に野鳥から HPAIV（H5N1 亜型）が分離された地点（42 地点）と、遺伝子検査で陽性を示した糞便を採取した地点（22 地点）のデータを利用した。環境情報については 12 種類のデータ（冬季の最低気温、冬季の平均降水量、標高、淡水ガモの飛来数、潜水ガモの飛来数、耕作地面積、湖沼面積、湖沼からの距離、市街地面積、高速道路までの距離、道路密度、家禽密度）を解析に使用した。その結果、野鳥から AIV が分離される可能性が高い地域（ハイリスク地域）は、主に西日本および東日本の太平洋岸および北海道東部に分布していた（図 1）。ハイリスク地域を説明する環境情報として最も貢献度が高かったのは「淡水ガモの飛来数」であった。また、2016 年～2017 年の H5N6 亜型による野鳥の高病原性鳥インフルエンザ発生を受け、作成したリスクマップと野鳥から H5N6 亜型が分離された地点を比較した（大沼、未発表）。その結果、ハイリスク地域と H5N6 亜型が分離された地点の多くが一致している可能性が示されている（大沼、未発表）。

4. AIV 保有状況全国調査結果の活用事例 2 —AIV の進入経路解明—

野鳥版鳥インフルエンザリスクマップの作成によって、野鳥から AIV が分離される可能性が高い地域（ハイリスク地域）は、主に西日本および東日本の太平洋岸および北海道東部に分布していることが明らかになった。しかし、AIV が国内に進入する時期がいつなのか、AIV が分離されやすい時期が地域ごとに異なるのかは不明であった。そこで 2008 年～2015 年の全国保有状況調査のデータを利用して、全国レベルでの AIV 陽性率の時系列変化を明らかにした。また、地域別（北海道、東北、北陸、関東甲信、東海、近畿、中国、四国、九州）の陽性率の時系列変化を観察するとともに、陽性率の変化と国内への飛来ルート（カムチャツカ半島経由、サハリン経由、日本海経由および朝鮮半島経由）との関連性を検討した。

2008 年 10 月～2015 年 5 月に全国 52 か所で採取したカモ類の糞便 19,407 サンプルより RNA を抽出し、RT-LAMP 法を使用して、A 型インフルエンザウイルス遺伝子の検出を試みた。次にウイルス遺伝子の陽性率の時系列変化の傾向を観察した¹³⁾。19,407 サンプル中、陽性となったのは 352 サンプルであった（陽性率 1.8%）。渡り時期別に陽性率を集計したところ、秋の渡りの時期（10 月～11 月）は 3.5%、越冬期（12 月～1 月）は 1.3%、春の渡りの時期は 0.6% となった（図 2）。このように、陽性率は秋から翌年

図 1 野鳥版鳥インフルエンザリスクマップ。赤色部分ほど「渡り鳥を含む野鳥」から鳥インフルエンザウイルスが検出される可能性が高いことを示している。Moriguchi ら (2013) の図を一部改変。

かけて急激に低下していることから、国内においてカモ類の個体間では、AIV の感染が起こりにくいと考えられる。また、陽性率が最高値を示す秋の渡りの時期において、中部から西日本にかけて、陽性率が全国平均より高い値を示す地域が認められた。これは AIV が朝鮮半島や日本海経由で飛来するカモ類によって主に国内へ持ち込まれている可能性を示唆するものであると考えられた (図 2)。

5. AIV 保有状況全国調査結果の活用事例 3 —AIV を日本国内へ持ち込んでいる鳥類種の判定—

野鳥から AIV が分離される可能性が高い地域 (ハイリスク地域) は、主に西日本および東日本の太平洋岸および北海道東部に分布していることが明らかになった。また、ウイルスは秋に朝鮮半島や日本海経由で主に西日本へ飛来する淡水カモ類によって国内へ持ち込まれている可能性が示唆された。次に遺伝子検査陽性となった糞便 352 サンプルについて、DNA バーコーディングによる種判別を実施し、どの鳥類種が国内へウイルスを持ち込んでいるのか調査した¹³⁾。DNA バーコーディングとは、ある生物の種が不明であった場合、DNA 配列を基準に種を判別する方法である。種差の大きい DNA 配列をターゲットに PCR を実施し、PCR 産物のシーケンスを行う。鳥類では、ミト

コンドリア DNA・COI 遺伝子の配列が主に種判別に利用されている¹⁴⁾。

糞便 352 サンプルについて、DNA バーコーディングによる種判別を実施した結果、211 サンプルについて種判別が成功した。内訳は、マガモ (*Anas platyrhynchos*) あるいはカルガモ (*A. zonorhynchos*) : 115 サンプル (52.0%)、オナガガモ (*A. acuta*) : 61 サンプル (27.6%)、コガモ (*A. crecca*) : 26 サンプル (11.8%)、ヒドリガモ (*A. Penelope*) : 15 サンプル (6.8%)、その他 : 4 サンプル (1.8%) であった (図 3)。マガモとカルガモはミトコンドリア DNA・COI 遺伝子のハプロタイプを両種間で共有しているため、マガモとカルガモは DNA バーコーディングによって種判別を行うことは出来ない。しかし、環境省が毎年実施しているガンカモ類の生息調査結果¹⁵⁾によると、国内に飛来、越冬するカモ類の中で観察数が最大値となるものはマガモである。報告されているマガモの観察数は、毎年 30~40 万羽で、この数はカルガモやオナガガモのほぼ倍となっている。この飛来状況を考慮すると、主にマガモが国内に AIV を運んできている可能性が高いと考えられる。また、オナガガモは標識調査結果により北米大陸との往来が確認されている。そのため、オナガガモは、ユーラシア系統に加え、北米系統の HPAIV を国内持ち込む可能性がある。

図 2 糞便サンプルの鳥インフルエンザウイルス遺伝子陽性率時系列変化 (RT-LAMP 陽性率)。下図は陽性率が全国平均より高かった地域を示す。

図 3 鳥インフルエンザウイルス遺伝子陽性となった糞便に関する種判別で検出された鳥類種。
A: マガモ (*Anas platyrhynchos*) (▼) とカルガモ (*A. zonorhynchos*) (▽)。B: オナガガモ (*A. acuta*)。C: コガモ (*A. crecca*)。D: ヒドリガモ (*A. Penelope*)。

6. まとめ

国内では2004年、2007年、2008年、2010年～2011年、2014年～2015年、2016年～2017年に死亡した野鳥からHPAIVが分離されていた。HPAIVが分離された死亡野鳥の中には、絶滅危惧種も含まれている。従って、高病原性鳥インフルエンザが原因となり絶滅危惧種の個体数減少が発生する可能性がある。つまり、高病原性鳥インフルエンザは養鶏産業への経済的な被害をもたらすばかりではなく、生物多様性へも影響を与えかねない感染症となっている。そのため、環境省は2008年より野鳥を対象としたAIVの保有状況について全国調査を実施している。国立環境研究所は遺伝子検査機関としてこの全国調査に参加するとともに、この保有状況調査結果を解析し、AIVの生態学的研究を行ってきた。これまでのところ、AIVは、秋にマガモやオナガガモによって西日本へ最初に持ち込まれている可能性が高いことが示唆されている。

引用文献

- 1) Tanimura, N. *et al.* : Pathology of fatal highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection in large-billed crows (*Corvus macrorhynchos*) during the 2004 outbreak in Japan, *Vet. Pathol.*, **43**, 500–509, 2006.
- 2) Shivakoti, S. *et al.* : Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a mountain hawk eagle in Japan, *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 459–463, 2010.
- 3) Okamatsu, M. *et al.* : Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008, *Virus Genes.*, **41**, 351–357, 2010.
- 4) Sakoda, Y. *et al.* : Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in the 2010–2011 winter season in Japan, *J. Gen. Virol.*, **93**, 541–550, 2012.
- 5) Ozawa, M. *et al.* : Genetic diversity of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses at a single overwintering site of migratory birds in Japan, 2014/15, *Euro. Surveill.*, **21**, 20, 2015.
- 6) Okamatsu, M. *et al.* : Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A (H5N6), Japan, November 2016, *Emerg. Infect. Dis.*, **23**, 691–695, 2017.
- 7) 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室編：レッドデータブック2014–2 鳥類, ぎょうせい, 2014.
- 8) Liu, J. *et al.* : Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds, *Science*, **309**, 1206, 2005.
- 9) Shivakoti, S. *et al.* : Development of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens, *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 519–523, 2010.
- 10) Yoshida, H. *et al.* : Evaluation of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds, *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 753–758, 2011.
- 11) Phillips, S.J. *et al.* : Maximum entropy modeling of species geographic distributions, *Ecol. Model.*, **190**, 231–259, 2006.
- 12) Moriguchi, S. *et al.* : Potential risk map for avian influenza A virus invading Japan, *Divers. Distrib.*, **19**, 78–85, 2013.
- 13) Onuma, M. *et al.* : Characterizing the temporal patterns of avian influenza virus introduction into Japan by migratory birds, *J. Vet. Med. Sci.*, **79**, 943–951, 2017.
- 14) Hebert, P.D. *et al.* : Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. Biol. Sci.*, **270**, 313–321, 2003.
- 15) 環境省：ガンカモ類の生息調査, <http://www.biodic.go.jp/gankamo/seikabutu/index.html>