

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12638

研究課題名(和文)トキが舞う佐渡島に鳥インフルエンザのモニタリングシステムの構築

研究課題名(英文) Wild bird monitoring for avian influenza viruses on Sado Island of flying Nipponia nippon

研究代表者

小柳 充 (OYANAGI, Mitsuru)

新潟大学・農学部・技術職員

研究者番号：70401734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：一行政や養鶏家が連携し効果的な鳥インフルエンザウイルス(AIV)の防疫対策を実施しリスク回避-

2016年11月～2017年1月期のAIVモニタリングの結果では、前半と後半の2度のAIVハイリスク期間が存在した。前半リスクの1週間後に新潟県内の2カ所の養鶏場が高病原性(HP)AIVに曝された。その後直ちに、行政と養鶏家は密に連携し効果的なAIV対策を実施した為、後半のリスクを回避でき養鶏場などでHPAIV被害が発生しなかったと考えられる。カラスもAIVに感染した野鳥の死体を食べ感染をしたと考えられる。野生復帰したトキの首巢にカラスが入り込みトキの卵を奪うなど感染リスクの上昇が懸念される。

研究成果の概要(英文)：-Execution of effective bird influenza (AIV) preventive measures and risk aversion through tie-ups between administrative bodies and poultry farms-

The results of AVI monitoring between November 2016 and January 2017 revealed that there were two AIV high risk periods- the first and second half risk periods. One week after the first half risk period, there was exposure to highly pathogenic (HP)AIV at two poultry farms within Niigata Prefecture. Following this, it is considered that due to administrative bodies and poultry farms teaming up to execute effective preventive measures and avert risk, no damage occurred due to HPAIV.

It is thought that crows may have also eaten the carcasses of wild birds infected with AIV and thus become infected themselves. An increased risk of infection is feared due to crows entering during nesting of Japanese crested ibis that have been returned to the wild and eating their eggs.

研究分野：鳥インフルエンザ

キーワード：鳥インフルエンザウイルス トキ 風評被害 カラス AIV モニタリング

1. 研究開始当初の背景

日本では毎年、野鳥から鳥インフルエンザウイルス(AIV)が検出され大きな社会問題になっている。幸い新潟県では、そのような感染事例の報告が無く放鳥されたトキが AIV に感染をする事も無く経過している。AIV の本体は RNA ウィルス (AIV-RNA) であり、8 セグメントから構成されている。研究代表者みずからが 2011 年 1 月 11 日実施した新潟市近郊における渡り鳥の糞便サンプル 69 検体から 2 検体ラインで AIV の PCR 産物が検出された。しかしながら、ウィルス量は極微量であった。

従来の調査では、放置された糞便が経時経過とともに鮮度の劣化や採取と保存方法が適切で無いために極微量のウィルスが分解され検出されないケースが多いと推察され、偽陰性の発生により正確な罹患率を算出する事ができないことが課題であった。

2. 研究の目的

(1)AIV は野鳥が佐渡島に運んでくると考えられている。野鳥は年間を通じて放鳥されたトキ集団と接触するため、佐渡島内における野鳥の AIV-RNA のサーベイを早急に実施し、トキが舞う佐渡島における AIV のモニタリングシステムを構築する。

(2)佐渡市及び新潟市近郊には、潟が多くハクチョウ、オオヒシクイなどの野鳥が飛来する。これら野鳥がどの程度 AIV 遺伝子を保有しているのか気管・腸管や糞便などからウィルスの RNA を分離し、M(Matrix)セグメントを指標として罹患率を検証する。

(3)高病原性の AIV が検出された場合、直ちにトキの野生復帰に携わる関係者に周知し、トキの AIV 防疫対策に貢献する。

3. 研究の方法

(1)風評被害を発生しない AIV のモニタリングシステムを構築

集団感染時には、莫大なウィルス量が環境中に排出される事が予想されるため、特に気を付けなければならない。野鳥からの感染については、佐渡市には渡り鳥の中継地となっている加茂湖がある。更に新潟市近郊には、佐潟、福島潟、瓢湖、鳥屋野潟などをめぐらしている野鳥の数はきわめて多く、これらを対象に AIV のモニタリングシステムの構築をする。

(2)RT-2 段階(Nested)PCR によるプライマーのデザイン

抗原亜系に関係なく幅広く鳥インフル遺伝子を検出するプライマー及び亜系の鳥インフルを検出する様々なプライマー等を Gene Bank 等のデータベースをもとに 40 セット程度合成する。特に高病原性の H5 亜型領域が解析できるプライマーのデザインをする。

(3)AIV-RNA 調査で、農作物や観光客への風評被害が発生しないように研究代表者みず

から調査を実施した。遺伝子解析も研究代表者みずから実施し、得られた情報の管理に万全を期する。行政機関との対応は、新潟県中央家畜保健衛生所を中心にして意見交換をして本研究を推進した。

(4)国の天然記念物・オオヒシクイが越冬する新潟市近郊を中心に糞便採取を実施した。また、オオハクチョウ、コハクチョウの糞便も採取した。

(5)佐渡で実施している害鳥駆除で獲られたカラスなどの野鳥の気管や腸管などから AIV の有無を判定した。

(6)採取した野鳥の糞便は RNA の分解を防ぐために超低温フリーザーで保存した。

(7)野鳥の組織は 3 羽分、野鳥の糞便は 5 個分を 1 つの容器に入れ、RNA を分離・精製をした。

(8)AIV-RNA の精製には、あらかじめ RNA 全体像を簡便な RNA 電気泳動法で確認をした。

(9)AIV を分離・増殖することなく、組織や糞便などから直接 AIV-RNA を精製、Uni12 プライマーで cDNA 合成した。2 段階 PCR でウィルス遺伝子を増幅させ AIV の有無を判定した。

4. 研究成果

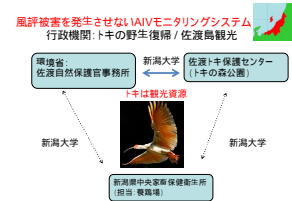
(1)野鳥を対象とした AIV のモニタリングシステムを構築

本研究の特徴は、佐渡市及び新潟市近郊の野鳥を対象とした AIV のモニタリングシステムを構築した。風評被害を発生させないために、高病原性 AIV が検出された場合の対処の方針をあらかじめしっかりと対策を講じた。具体的には、環境省トキの野生復帰検討会や佐渡トキ保護センターと密接な連携を

とりながら AIV 防疫対策に貢献した。

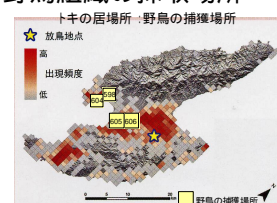
また、新潟県中央家畜保健衛生所と密接な連携をとりながら養鶏場における AIV の集団感染にも細心の注意を払い、モニタリング法を

確立した。



(2)佐渡島における野鳥組織の採取場所

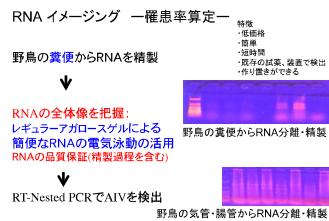
トキが採餌行動をする地域から野鳥の組織を採取した。特に重点を置いたのは、カラスの組織である。



(3)罹患率算定：RNA のイメージング

従来、野鳥の組織や糞便から分離した RNA をイメージングする事は無かった。RNA のイメージングには、非常に高価な機器が必要で使用される事は無かった。今回、研究代表

者はレギュラーアガロースゲルを用いた方法を試みた。これにより、RNAの品質管理ができ、正確な罹患率の算定が可能になった。

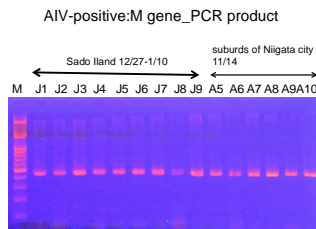


(4)高頻度罹患率：2016年11月～2017年1月期

右の表の見方：
例えば、J1 カラムは佐渡島で採取されたコガモ3羽(2017年1月3日、4日、6日)

AIV-positive:M gene_PCR product		
J1, kogamo_3	(1/3 606, 1/4 606, 1/6 598)	Sado Island
J2, kogamo_2	(1/8 606, 1/10 606)	Sado Island
J3, magamo_3	(12/27 605, 12/27 606, 12/27 605)	Sado Island
J4, magamo_3	(1/4 604, 1/4 604, 1/5 606)	Sado Island
J5, magamo_3	(1/6 604, 1/6 605, 1/7 598)	Sado Island
J6, karasu_2	(1/4 606, 1/8 606)	Sado Island
J7, karugamo_2	(1/2 598, 1/2 598)	Sado Island
J8, karugamo_2	(1/3 606, 1/7 606)	Sado Island
J9, kijibato_1 hayadori_2	(12/27 606, 12/27 606, 1/7 604)	Sado Island
A5, oohisakui_5	(11/14)	suburds of Niigata city
A6, hakuyou_5	(11/14)	suburds of Niigata city
A7, hakuyou_5	(11/14)	suburds of Niigata city
A8, hakuyou_5	(11/14)	suburds of Niigata city
A9, hakuyou_5	(11/14)	suburds of Niigata city
A10, hakuyou_5	(11/14)	suburds of Niigata city

採取された場所はそれぞれ、606、606、598である。気管および腸管からRNAを分離・精製後2段階PCR(Mセグメント領域)を実施し、AIVを検出した。A6カラムは新潟市近郊で、オオハクチョウ、コハクチョウの糞便を採取(採取日:2017年11月14日)、5個の糞便を混ぜた後、RNA分離・精製後、Mセグメントを2段階PCRでAIVを検出した。

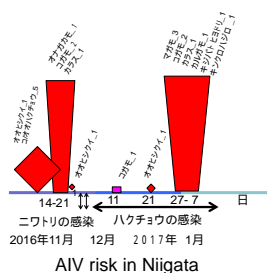


(5)2度のハイリスク期間

2016年11月期～2017年1月期の佐渡および新潟市近郊のAIVモニタリングを実施した。2017年11月中間期の前半リスクは、新潟市近郊のオオハクチョウ、コハクチョウの糞便からは高頻度でAIVが検出された。

2018年12月後半期の後半リスクは佐渡島で採取された野鳥は、高頻度でAIV感染していた。

前半と後半の2度のハイリスク期間が存在し、マガモやコガモのような水鳥のみでなく、陸鳥であるカラスまでも前半および後半の両方で、AIV感染していることが示唆された。前半のリスクよりも後半のリスクが高かった。



(6)風評被害を発生させない対策

今回のHPAIVの発生で、報道機関の報道が過熱した。直ちに、研究代表者みずから、

報道機関への正確なAIV情報提供やテレビ出演などで説明した。特に海外でのHPAIVによるヒトへの感染ならびに死亡事例と日本での養鶏環境の相違など、風評被害を発生させない事が肝要である。

【考察】

(7)背景

新潟県は全国で指折りの鶏卵生産が盛んである。2016年11月29、30日に2カ所の養鶏場で高病原性(HP)AIV(H5N6)が検出され55万羽を超えるニワトリが処分された。また、新潟市近郊では、2016年11月27日～翌年の1月12日まで、オオハクチョウ、コハクチョウの死亡個体15羽から高病原性鳥インフルエンザ(HPAIV)(H5N6)が検出され地元の観光業者などに甚大な被害を与えた。

Uni 12プライマーを用いることで、AIVを分離・増殖させる事無く、AIVを構成している8セグメントのAIV-RNA遺伝子の全てのcDNA合成が出来、様々な亜型を同定する事が可能である。

更に、一定量のAIV-RNAが得られれば、8セグメントの全てのAIV-RNA遺伝子の塩基配列を決定でき系統樹の作成など従来の流行のAIVと比較が可能であり、AIVを分離・増殖することなくデータを得る事が出来る。

(8)行政や養鶏家は密接に連携し効果的なAIV防疫対策を実施しリスク回避

2016年11月～2017年1月期のAIVモニタリングの結果では、前半と後半の2度のAIVハイリスク期間が存在した。前半のリスクは、韓国の養鶏場や国内でのHPAIVが猛威を振るっている時期とピッタリ一致した。その1週間後に新潟県内の2カ所の養鶏場がHPAIVに曝された。その後直ちに、行政と養鶏家は密に連携し効果的なAIV対策を実施した為、後半のリスクを回避でき、養鶏場などでHPAIV被害が発生しなかったと考えられる。後半のリスクは前半よりも高リスクであった。11月期以降、カラスもえさの少ない時期でAIVに感染した野鳥の死体をも食べている可能性がある。更に、カラスがトキの卵を奪うことが環境省のモニタリングの結果から報告されている。また、トキの遺伝的多様性が低いことが報告されている。野生復帰したトキの営巣にカラスが入り込みトキへの感染リスクの上昇が懸念される。後半のリスクはどこで発生したのか?新潟市近郊で発見された死亡個体15羽のオオハクチョウ、コハクチョウがHPAIVに感染した原因を究明し、今後も発生しうるHPAIVの防疫対策に努める。

(9)モニタリングデータの蓄積と活用

毎年モニタリングを実施し、データの蓄積し活用する。万が一にもHPAIVが発生した時には行政機関へ防疫対策についての意見

の具申およびモニタリングデータを提供し、AIV 防疫対策に貢献する。特に重要なことは、新潟県家畜衛生保健所と密に連携することである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4 件)

(1)小柳 充、昨シーズン新潟県内の養鶏場やハクチョウに高病原性鳥インフルエンザ発生とモニタリング、日本生態学会第 6 5 回全国大会、2018 年 3 月、札幌

(2)小柳 充、新潟市近郊におけるハクチョウの鳥インフルエンザ感染事例の原因究明について、日本鳥学会 2017 年度大会 2017 年 9 月、つくば市

(3)小柳 充、佐渡島・新潟市における鳥インフルエンザウィルスのモニタリングシステムの構築、日本生態学会第 6 4 回全国大会、2017 年 3 月、東京

(4)小柳 充、佐渡の放鳥されたトキ集団における鳥インフルエンザウィルスのリスク評価、第 6 7 回日本電気泳動学会、2016 年 8 月、釧路市

6. 研究組織

(1)研究代表者

小柳 充 (OYANAGI, Mitsuru)

新潟大学・農学部・技術職員

研究者番号：70401734