

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02346

研究課題名(和文) 野生鳥類の非侵襲的抗体検出法を用いた鳥インフルエンザウイルス国内侵入リスク評価

研究課題名(英文) Avian influenza virus domestic invasion risk assessment using non-invasive antibody detection method for wild birds

研究代表者

伊藤 壽啓 (ITO, Toshihiro)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00176348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,500,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性鳥インフルエンザウイルスの国内侵入を早期に予測する目的で、鳥類の腸管内分泌型IgAに着目し、我が国に飛来する渡り鳥の糞便由来特異IgA抗体検出法の確立を試みた。まず、カモの糞便中のIgA抗体検出ELISA法は、簡便且つ高感度な非侵襲的抗体検出法として確立することができた。しかしながら、カモ以外の各種野鳥の糞便由来IgAを検出することを目的とした競合ELISA法は、陽性対象として用いた実験感染アヒルの糞便では一部陽性結果が得られたものの、ナベヅル及びマガンの糞便からは検出されなかった。競合ELISA法については更なる条件検討と多数の野外材料を用いた解析が今後必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高病原性鳥インフルエンザウイルスは渡り鳥によって国内に持ち込まれている可能性がある。従って、それらの鳥の免疫状態を把握することは本病の国内侵入を予測するために重要である。一般に野鳥の抗体調査では、まず野鳥を捕獲し、採血するため、多大な労力と専門技術が必要となる。そこで本研究では腸管内に分泌される糞便抗体に着目した。各種野鳥の糞便中から特異抗体が検出できれば、野鳥を捕獲することなく、極めて非侵襲的な方法で調査が可能となる。大陸から国内への野鳥の飛来を止めることはできないが、いつどのような経路でウイルスが侵入するのかを予測して、それに備えることが本病の国内発生を防ぐ最も重要な方策の一つであろう。

研究成果の概要(英文)：In order to predict the domestic invasion of highly pathogenic avian influenza virus at an early stage, we focused on the intestinal endocrine IgA of birds and attempted to establish a fecal-derived specific IgA antibody detection method for migratory birds flying to Japan. First, the IgA antibody detection ELISA method in duck feces could be established as a simple and highly sensitive non-invasive antibody detection method. However, the competitive ELISA method, which aims to detect fecal-derived IgA from various wild birds other than ducks, gave some positive results in the feces of experimentally infected ducks used as positive controls, but no antibodies were detected from feces of hooded cranes and white-fronted geese. Regarding the competitive ELISA method, further examination of conditions and analysis using a large number of field materials were considered to be necessary in the future.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：高病原性鳥インフルエンザ 野生水禽類 糞便抗体 非侵襲性 インフルエンザウイルス IgA抗体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2004 年以降、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが世界規模の大流行を引き起こし、今尚、東南アジアを中心とした国々の養鶏産業に甚大な被害を与え続けている。このウイルスは鶏やアヒルなどの家禽以外にも多くの鳥類が感受性をもつことから、とくに野鳥が家禽へのウイルス伝播や流行拡大に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。

わが国における高病原性鳥インフルエンザは 2004 年(山口県、大分県、京都府)と 2007 年(宮崎県、岡山県)にそれぞれ発生しているが、いずれも発生件数は 4 件と少数に留まっていた(農林水産省, 2004; 2008)。しかし、2010 年冬~2011 年初春にかけて H5N1 ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザの大規模な発生が起こった。2010 年 11 月の鳥根県安来市における初発例から 2011 年 3 月の千葉県千葉市における最終例までに全 9 県 24 農場での発生が確認され、最終的に総計約 183 万羽の家禽が殺処分されるという我が国で過去最大の発生となった(農林水産省, 2011)。また、当時の発生では斃死した野鳥個体からも多数のウイルスが分離された。とくに 2010 年の鳥根県安来市の初発例よりも早い時期に、北海道最北端の大沼で、シベリアから飛来した渡りガモの糞便から、本ウイルスが分離されており(Kajihara et al., 2011) これによって本ウイルスが夏季の間、野生水禽類の北方営巣地に維持されていた可能性が示唆された。

(2) このような背景から、高病原性鳥インフルエンザウイルスが渡りガモ等の野生水禽類によって国内に持ち込まれる可能性が指摘された。従って、それらのウイルス保有状況とともに、野鳥の免疫状態を把握することもまた本病の国内侵入を正確に予測するために重要な情報と考えられた。

2004 年以降、野鳥の高病原性鳥インフルエンザウイルス保有状況調査は、これまで環境省ならびに鳥取大学を含むいくつかの国内研究機関によって実施されてきたが、もう一つの疫学上重要な野鳥の抗体保有状況については、本ウイルスが度々、斃死した野鳥で確認されているにもかかわらず、その調査方法の困難さゆえに、これまでほとんど調査されてこなかった。

一般に野鳥を対象としたこれまでの血清疫学調査では、まず野鳥を捕獲して、採血するため、多大な労力と専門的な技術が必要となる。とくに希少種や技術的に捕獲が困難な鳥種の場合には不可能となるケースも多い。そこで本研究では、腸管で局所的に分泌される IgA に着目した。糞便内に含まれる IgA (Coproantibody) は、ヒトのロタウイルスやノロウイルス感染症では、血清抗体よりも高精度に検出されることが報告されている(Barbara et al., 1992; Mori et al., 2003)。また動物の感染症に対する Coproantibody に関しても、牛のコロナウイルス(Woode et al., 1987)や犬のパルボウイルス(Rice et al., 1982)等でわずかに検出例の報告はあるが、野鳥の鳥インフルエンザウイルスに対する Coproantibody の検出について言及した報告は国内外を通じて皆無である。

もし、各種野生鳥類の糞便中から、高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する特異 IgA 抗体が検出できれば、野鳥を捕獲することなく、極めて非侵襲的な抗体検査による疫学調査が可能となる。それぞれの糞便材料の個体識別は出来ないものの、比較的容易に多数のサンプルを集めることが可能となり、集団としての抗体陽性率の推移をより正確に把握することができると考えられる。

大陸から国内への野鳥の飛来を止めることは不可能であり、ウイルスがそれによって運搬されてくる可能性が否定できない以上、いかなる時期にどのような経路でウイルスが侵入するかを予測して、それに備えることが本病の国内発生を防ぐ重要な方策の一つであると考えられる。本研究によって野鳥の糞便による抗体保有状況調査が実現されれば、本ウイルスの国内侵入のより確かな予測が可能となろう。また、我が国に飛来する希少種野鳥の保護の観点からも、この手法をナベヅルやマガンなどの糞便に応用し、それらの種の免疫レベルを追跡調査することで、本病の流行リスクを評価することが可能となるものと期待される。

## 2. 研究の目的

上述のように、高病原性鳥インフルエンザウイルスが冬の渡り鳥であるカモ等の野生水禽類によって国内に持ち込まれている可能性が指摘されている。したがって、それらの鳥のウイルス保有状況とともに、免疫状態の把握もまた本病の国内侵入を予測するために重要な情報と考えられる。しかし、国内野鳥を対象とした本病の血清疫学調査を実施するためには、まず対象となる野鳥を捕獲し、採血をする必要がある。それには多くの労力と特殊な技術を必要とし、とくに希少種や捕獲が困難な鳥種の調査には適さない。そこで、本研究ではまず、鳥類の腸管内の分泌型 IgA に着目し、糞便から、本ウイルスに対する特異 IgA 抗体を検出するという極めて非侵襲的な方法を確立する。その手法を用いて、国内野鳥の抗体保有状況を調査し、今後の本ウイルスの国内侵入の予測に資することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 野鳥血清

野生水禽の血清疫学調査では2012年11月から2013年3月にかけて(財)山階鳥類研究所が埼玉県で捕獲した127羽(オナガガモ:69羽、マガモ:19羽、キンクロハジロ:15羽、ハシビロガモ:15羽、ヒドリガモ:3羽、コガモ:2羽、ホシハジロ:2羽、オカヨシガモ:2羽)、2月に福岡県で捕獲した19羽(ヒドリガモ:15羽、キンクロハジロ:4羽)、千葉県で捕獲した14羽(オナガガモ)、及び2月から3月にかけて宮崎県で捕獲した17羽(マガモ:15羽、オナガガモ:2羽)の合計177羽の血清を用いた。

#### (2) 糞便材料

鳥インフルエンザウイルスに対する特異的なIgA抗体を検出する目的で、2012年12月及び2018年12月に鳥取県内で採取されたカモ及びコハクチョウの糞便計151検体を用いた。

#### (3) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)競合法

##### 競合抗体

本研究では競合抗体として以下のモノクローナル抗体を使用した。

##### ・H5HAに対するモノクローナル抗体

抗 A/duck/Pennsylvania/10218/1984(H5N2) A310/39

抗 A/duck/Pennsylvania/10218/1984(H5N2) 64/1

抗 A/duck/Pennsylvania/10218/1984(H5N2) 25/2

操作方法: ウイルス抗原をELISAプレートの各ウェルに50 $\mu$ Lずつ加え、4 または室温で2時間静置した。プレートの液を取り除いた後、各ウェルに100 $\mu$ LのBSA<sub>10</sub>を加え、室温で1時間または4で一晩静置した。プレートをPBSTで4回洗浄し、原液から4倍階段希釈したサンプルを1希釈につき2ウェル用い、それぞれ50 $\mu$ L加え、室温で1時間静置した。プレートをPBSTで4回洗浄し、競合抗体を各ウェルに50 $\mu$ L加え、室温で1時間静置した。PBSTで4回洗浄し、標識2次抗体を各ウェルに50 $\mu$ L加え、室温で1時間静置した。PBSTで4回洗浄し、基質を各ウェルに100 $\mu$ L加え、室温で15~30分静置後、各ウェルの吸光度(OD)を405nmのフィルターを用いて分光光度計で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ELISA法によるカモ糞便中のH5亜型鳥インフルエンザウイルスに対するIgA抗体の検出

野鳥種をカモに限定し、カモのIgAに対する2次抗体を用いることで、ELISAによるカモの糞便中の鳥インフルエンザウイルスに対するIgA抗体の検出を試みた。アイガモの感染実験で得られた感染7日目、10日目及び14日目の感染アイガモの糞便から抽出したIgA抗体を用いてH5ウイルスに対するELISAを行った。その結果、図1に示した通り、いずれの個体(A、B及びC)においても感染前の糞便(プレA、プレB及びプレC)より、高いOD値を示す傾向が認められた。しかしながら、それらの値は特異的な反応であることの基準値として計算されたカットオフ値を超えておらず、いずれも陰性と判定された。

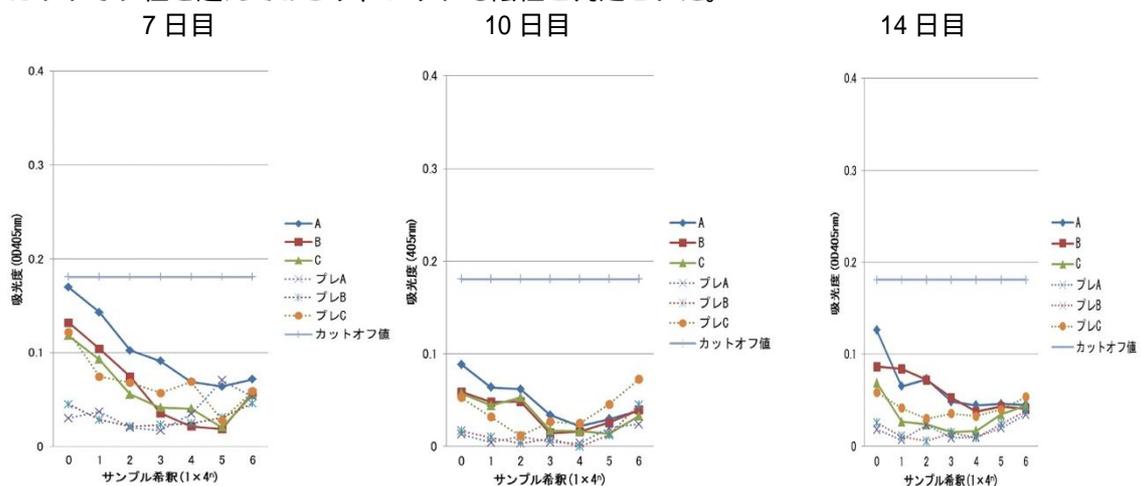


図1. カモの糞便由来抗H5HA特異IgA抗体の検出(ELISA法)

#### (2) ELISA法によるカモ糞便中のH3亜型鳥インフルエンザウイルスに対するIgA抗体の検出

同様にELISA法によるH3ウイルス感染アイガモの糞便中のIgA抗体の検出を試みた。その結果、7日目及び14日目の糞便において、カットオフ値を超える特異抗体が検出された(図2)。

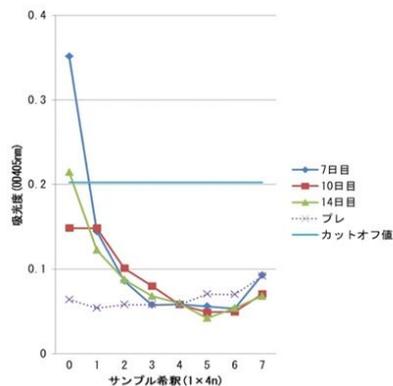


図 2.カモの糞便由来抗 H3HA 特異 IgA 抗体の検出 (ELISA 法)

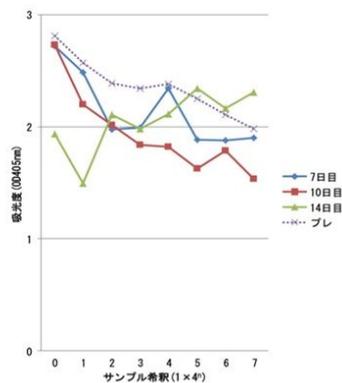


図 4.野鳥の糞便由来抗 H3HA 特異 IgA 抗体の検出 (競合 ELISA 法)

( 3 ) 競合 ELISA(Competitive-ELISA;C-ELISA)法による野鳥糞便中の H5 ウイルスに対する IgA 抗体の検出

各種野鳥の糞便中の IgA 抗体を検出するために、それぞれの宿主の 2 次抗体を必要としない競合 ELISA 法の確立を試みた。まず、使用する抗原及び競合抗体の至適濃度を決定した。H5 ウイルス抗原 (1 μg/50 μL~0.0016 μg/50 μL) 及び競合抗体として用いる抗 H5HA モノクローナル抗体の各希釈液(100 x 4<sup>1</sup>~100 x 4<sup>8</sup>倍希釈)を用いて、ELISA を行った結果、最高 OD 値が得られる最小抗原濃度は、0.04 μg/50 μL、最高 OD 値が得られる最小抗体希釈倍率は 25,600 倍であった。

この条件下で感染 7 日目、10 日目及び 14 日目の感染アイガモの糞便から抽出した IgA 抗体を用いて H5 ウイルスに対する競合 ELISA を行った。いずれの個体 (A、B 及び C) においても感染前の糞便 (プレ A、プレ B 及びプレ C) と同程度の OD 値であり、H5HA に対する特異抗体は検出されなかった(図 3)。

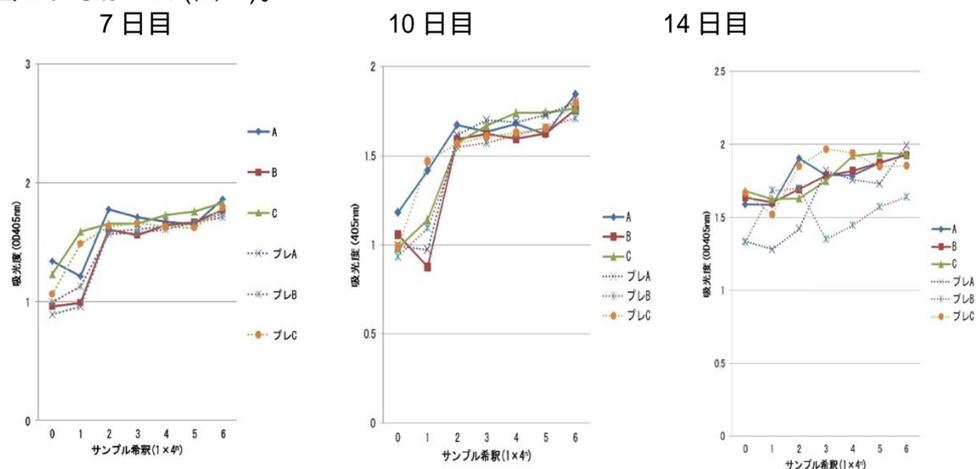


図 3. 野鳥の糞便由来抗 H5HA 特異 IgA 抗体の検出 (競合 ELISA 法)

( 4 ) 競合 ELISA(C-ELISA)法による野鳥糞便中の H3 ウイルスに対する IgA 抗体の検出

同様に H3 ウイルス抗原 (1 μg/50 μL~0.0016 μg/50 μL) 及び競合抗体として用いる抗 H3HA モノクローナル抗体の各希釈液(100 x 4<sup>1</sup>~100 x 4<sup>8</sup>倍希釈)を用いて、ELISA を行った結果、最高 OD 値が得られる最小抗原濃度は、0.2 μg/50 μL、最高 OD 値が得られる最小抗体希釈倍率は 25,600 倍であった。

この条件下で感染 7 日目、10 日目及び 14 日目の H3 ウイルス感染アイガモの糞便から抽出した IgA 抗体を用いて H3 ウイルスに対する競合 ELISA を行った。その結果、いずれの試料においても感染前の糞便試料と同程度の OD 値しか検出されず、H3HA に対する特異抗体は検出されなかった。

( 5 ) 野外サンプルへの応用

以上のように ELISA によって、野生カモの糞便中の鳥インフルエンザウイルスに対する特異 IgA 抗体が検出可能であることが明らかになったので、その方法を用いて実際に 2012 年及び 2018 年に、鳥取県東部で採取された野生水禽の糞便を用いて、ELISA を行った。その結果、合計 151 検体中、2 検体で陽性 (OD 値 1.54 及び 1.12) が認められ、本法の野外サンプルへの応用が可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------