

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380167

研究課題名（和文） 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する陸生野鳥の感受性と伝播に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the susceptibility of terrestrial wild bird and the propagation to highly pathogenic avian influenza virus

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では野外において陸生野鳥を介した高病原性鳥インフルエンザウイルスの様々な感染経路を想定した感染実験を実施した。その結果、(1)感染した野生水禽から湖沼の水を介して陸生野鳥にウイルスが伝播する。(2)感染した陸生野鳥が鶏舎内に侵入し、鶏と接触することでウイルスが伝播する。但し、(3)陸生野鳥間では次々と感染が広がることは考えにくい等の可能性が確認された。これらの成績は鶏舎内への陸生野鳥の侵入防止対策が本病防疫上極めて重要であることを支持した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the infection experiment supposing various infection routes of highly pathogenic avian influenza virus in field was conducted. The results obtained showed that (1) the virus spreads from infected wild waterfowl to terrestrial wild bird through the water of lake, (2) the infected terrestrial wild bird invades in a henhouse, and a virus spreads by contacting with a chicken, but (3) between terrestrial wild birds, it is hard to consider a possibility that infection will spread one after another. These results support the notion that the invasion preventive measures of the terrestrial wild bird into a henhouse are very important on the epidemic prevention of highly pathogenic avian influenza avian influenza.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症、獣医学、微生物、ウイルス、鳥インフルエンザ、陸生野鳥

## 1. 研究開始当初の背景

2007年1月13日、H5N1亜型のウイルスに

よる高病原性鳥インフルエンザが宮崎県下で発生した。本亜型のウイルスの流行は2004年の山口県、大分県および京都府での発生か

ら数えて3年ぶりの発生となるが、その後2週間あまりの間に宮崎県内でさらに2例および岡山県内で1例の合計4例の発生が確認された。さらに2008年4月末から5月初旬にかけて、秋田、青森両県にまたがる十和田湖畔、ならびに北海道東部野付半島およびサロマ湖畔において斃死または衰弱した野生のオオハクチョウからH5N1亜型の高病原性ウイルスが分離された。いずれも遺伝的に近似のウイルスによる韓国での流行が先攻して発生しており、大陸からの野鳥によるウイルスの国内伝播の可能性が想定されている。

本病は2003年以降、東アジアの家禽を中心として広範な流行を繰り返しており、一部の国々では今尚終息が望めない状況にある。さらに2005年頃から本病はヨーロッパやアフリカへとその流行がさらに拡大し、今や世界的流行の様相を呈している。諸外国における本病の主たる伝播経路は貿易活動など、人為的な鳥や物資の移動であると考えられていたが、2005年にはガンやハクチョウなどの野鳥における流行がアジア・ヨーロッパ各地で報告されており、渡り鳥による媒介が懸念されるようになった。一方、本ウイルスが人に直接伝播して致死感染を引き起こすケースもまた東南アジアを中心に徐々に増え続け、WHO(世界保健機構)は人に適応した新型ウイルス出現の可能性が高まっていると警鐘を鳴らしていた。

ところが、多くの研究者の予想に反して、2009年4月、メキシコに出現した豚由来のH1N1ウイルスが瞬く間に世界中に広がり、6月にはWHOが新型インフルエンザの警戒水準をフェーズ6へ引き上げることが宣言された。全世界で死者100万人に及んだとされる1968年の香港風邪以来41年ぶりのパンデミックがついに起こったことになる。

しかしながら、豚由来のH1N1ウイルスが世界中に広がったからといって家禽のH5N1ウイルスの脅威が去った訳ではない。東南アジアを中心としたH5N1ウイルス蔓延国の状況は人の新型ウイルス出現の前後でほとんど変化していない。引き続き家禽の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する警戒は怠ってはいけない。

にもかかわらず、本ウイルス伝播に果たす野鳥や野生生物の役割、感受性、病原性等を言及した基礎データは依然として国内外ともに不足している。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重要な方策の一つであると考えられた。

これまで高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する野鳥の感受性に関する研究報告は米国のSwayneらのグループが1997年香港で流行したH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する各種鳥類の感染実験結果を報告したものがある。しかし、この実験成績も後に同じ高病原性ウイルスであっても、各種野鳥に対する感受性はウイルス株によって大きく異なることが明らかとなり、野鳥に対して病原性を強めた現在のH5ウイルスに対してはそのまま適応できない可能性が高い。また、OIE(国際獣疫事務局)の報告によれば、死亡野鳥からの分離報告はアジア、ヨーロッパ各地で数多く存在するが、それらの鳥類からのウイルス排泄量や排泄期間等、ウイルス伝播に関わる観点からの報告は極めて少ない。

一方、マウスを鳥インフルエンザウイルスの人への感染モデル動物として、これまで宿主域や病原性に関する研究が数多く実施されてきたが、養鶏場内に多く認められる住家性ネズミ(クマネズミ、ドブネズミ、ハツカネズミ等)をウイルス伝播者という観点から実験した報告はない。1980年代に高病原性鳥インフルエンザ発生農場で捕獲されたネズミからウイルスが分離された例が報告されているにすぎない。

以上のように、本研究のごとく感染経路、感染源としての野鳥、野生動物の可能性を実験により評価しようとする試みは国内外を問わず、これまでほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の2項目で各々実験成績を得ることを目的として企画された。

(1) 大陸特に朝鮮半島を経由して我が国に飛来する野鳥(渡り鳥)あるいは鶏舎内に直接侵入する種を野外調査により特定する。

(2) 候補となる野鳥の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性およびウイルス伝搬者としての可能性を感染実験により評価する。

(3) ウイルスの鶏舎内侵入経路としての留鳥あるいは野生動物へのウイルス伝播の可能性を感染実験により評価する。

本研究の最終目的は感染実験によって高病原性鳥インフルエンザウイルスの長距離運搬者あるいは国内侵入経路としての渡り鳥の可能性を評価すること、また鶏舎内への

ウイルス侵入経路としての野生動物媒介の可能性を評価することにより、今後の高病原性鳥インフルエンザの国内発生予防対策確立のための一助とすることである。

### 3. 研究の方法

高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染経路は海外から国内へのウイルス侵入と鶏舎内へのウイルス伝播の2つに分けて考える必要があるが、各農場のバイオセキュリティ対策によって遮断可能な経路は後者であることから、本研究ではその可能性について具体的に複数の経路を想定し、その実験モデルをそれぞれ組み立てて評価する。

想定される経路としては野生水禽類（カモやハクチョウ等の渡り鳥）が直接鶏舎内に侵入することは極めて考えにくいことから、

(1) 感染した水禽類の糞便（又は糞便汚染水）から留鳥が感染し、鶏舎内に持ち込む経路。

(2) 感染した水禽類の糞便（又は糞便汚染水）から野生動物が感染し、鶏舎内に持ち込む経路。

(3) 野生動物が感染野鳥を捕食することで感染し、鶏舎内に持ち込む経路。

(4) 留鳥や野生動物が接触によって機械的にウイルスを鶏舎内に持ち込む経路。

(5) 陸生の渡り鳥（小鳥類）が直接鶏舎内に侵入し、ウイルスを持ち込む経路などが想定される。

これらを実験するためにそれぞれ感染実験を実施する。

具体的な実験計画は以下の通りである。

(平成 22 年度)

(1) 朝鮮半島あるいは中国東北部に生息する野生鳥類のうち、日本に飛来する渡り鳥を文献により調査し、生息地、渡りの時期、個体数、習性等の情報を入手して、ウイルス伝播の可能性のある鳥種を絞り込む。

(2) その中で捕獲ならびに飼養が可能な鳥種（環境省による許可が前提）を 5～10 種選別する。

(3) さらにその中で鶏舎内に直接侵入する可能性について情報を入手するとともに、国内の養鶏場を周辺の自然環境も含めて調査し、その実態を確認する。

(4) 選別した野鳥を捕獲し、餌付けを含めて飼育ボックスでの飼養を試行する。

(5) 飼養が可能であることが確認できた野鳥については、P3 実験室内の飼育ボックスで H5N1 ウイルス [京都株、茨城株、宮崎株および鳥取大学において野生水禽類から分離された低病原性ウイルスを鶏雛の気嚢継代によって強毒化させた人工変異株 (Ito et al., J. Virol., 2001) の 4 株] を接種し、致死率、感染率、症状、ウイルス排泄量、ウイルス排泄期間、各臓器ウイルス価を明らかにする。

(6) 接種実験によって高病原性鳥インフルエンザウイルスに感受性のあることが明らかとなった野鳥については、野鳥同士の同居感染、あるいは野鳥から鶏への同居感染が成立するか否かについてケージ内に衝立てを設置した飼育ボックスを用いて実験する。

(7) 異なるウイルス株間で野鳥に対する感受性に相違のある株のウイルス遺伝子を比較し、感受性の相違に関与する遺伝子部位を特定する。また、その部位の機能的意義を考察する。

(8) 得られた成績を総括し、陸生の渡り鳥（小鳥類）による鶏舎内への直接ウイルス伝播の可能性を評価する。

(平成 23-24 年度)

(1) 留鳥（ハシブトガラス、ドバト、スズメ）を捕獲し、飼育ボックスでの飼養を試行する。

(2) 飼養が可能であることが確認できた留鳥について、P3 実験室内の飼育ボックスで H5N1 ウイルスを接種し、致死率、感染率、症状、ウイルス排泄量、ウイルス排泄期間、各臓器ウイルス価を明らかにする。

(3) 感染アヒルの（ウイルスを含む）糞便を飼育ケージ内へ投入、あるいは糞便で汚染された飲み水を与えることにより、留鳥が糞便を介してウイルスに感染するか否かを確認する。

(4) 留鳥同士の同居感染、あるいは留鳥から鶏への同居感染が成立するか否かについてケージ内に衝立てを設置した飼育ボック

スを用いて実験する。

(5) 異なるウイルス株間で留鳥に対する感受性に相違のある株のウイルス遺伝子を比較し、感受性の相違に関与する遺伝子部位を特定する。また、その部位の機能的意義を考察する。

(6) 得られた成績を総括し、留鳥による鶏舎内へのウイルス伝播の可能性を評価する。

(7) ウイルス株による感受性の相違と各ウイルス遺伝子の比較から、感受性に関与するウイルス側の因子を推定する。

(8) 以上の成績を取りまとめ、最も可能性の高い侵入経路を推定するとともに、その経路を遮断するために有効な具体的なバイオセキュリティ対策を模索する。

#### 4. 研究成果

高病原性鳥インフルエンザウイルスの鶏舎内への侵入経路として、上記の可能性を評価するために平成 22 年度は以下の実験成績を得た。

(1) 平成 21 年度冬季に H5N1 ウイルスによる高病原性鳥インフルエンザの国内発生が続発し、10 種を越える野鳥の死亡個体からもウイルスが分離されたが、それらは水禽類もしくは猛禽類で陸生小鳥類（スズメ、シロハラなどを含む）からウイルスは分離されなかった。

(2) 捕獲が比較的容易で養鶏場近くにも生息する鳥種として、オオジュリン、ヒヨドリ、スズメ、シロハラ、オオヨシキリの 5 種を選択した。さらにハトおよびカラスも養鶏場敷地内でよく見かける留鳥であることからこれらも感受性試験の対象に加えることとした。

(3) (2) で選択した 5 種の野鳥については飼育ボックス内での飼養を試みた結果から、何れも感染実験の実施期間である約 2 週間の飼育が可能であると判断された。

(4) 死亡直後のシロハラ感染個体を鶏のケージ内に入れ、その後鶏へのウイルス伝播が成立するか否かを調べた。しかし、その後の観察において症状の変化や血中抗体の上昇も認められず、伝播は不成立と判断された。

平成 23 年度に得られた成績は以下の通りである。

(1) 感染アヒルの糞便（1g 当たり約  $10^6$  EID<sub>50</sub> の H5N1 ウイルスを含む）を飼育ケージ内へ投入し、そこでドバトを 10 日間飼育したが、感染は成立しなかった。

(2) 感染アヒルの糞便で汚染された飲み水（1ml 当たり約  $10^5$  EID<sub>50</sub> のウイルスを含む）をスズメに与えた場合、用いた 2 羽とも死亡した。

(3) スズメから鶏への同居感染が成立するか否かについてケージ内に衝立てを設置した飼育ボックスを用いて実験した結果、鶏への感染は成立しなかった。

(4) スズメに対する感受性に相違のあるクマタカ株とオオハクチョウ株の HA 遺伝子を比較した結果、少なく 33 個のアミノ酸の相違が認められた。その中にはレセプター結合部位近傍のアミノ酸も含まれていた。

平成 24 年度に得られた成績は以下の通りである。

高病原性鳥インフルエンザウイルスの伝播に果たす野鳥や野生生物の役割を明らかにする目的で、スズメの代替種（ジュウシマツ）を用いて以下の通り、予想される感染経路の実証実験を行った。

(1) 感染野生水禽類の生息する湖の水を介して陸生野鳥が感染する経路を想定して、ウイルスを含む飲水実験を実施したところ、 $10^5$  および  $10^4$  EID<sub>50</sub>/ml のウイルスを含む水を飲水として与えた群は 4 日目までに全羽死亡したが、 $10^3$  EID<sub>50</sub>/ml ウイルスを飲水した群は観察期間中全羽生存した。

表 1. ウイルス汚染飲水による伝播試験

群	観察羽数（死亡/有症/健康）					抗体価*2
	1*1	2	3	4	5-12	
$10^5$	0/0/6	0/0/6	4/1/1	6/0/0	—*3	—
$10^4$	0/0/6	0/0/6	0/2/4	6/0/0	—	—
$10^3$	0/0/6	0/0/6	0/0/6	0/0/6	0/0/6	<4

\*1: 感染後日数を示す。

\*2: HI 価 1 : n を示す。

\*3: 試験実施不可

(2) 陸生野鳥同士の水平伝播を想定して、同居感染実験を実施したところ、 $10^7$ EID<sub>50</sub>/mlのウイルスを接種した群は4日目までに7羽中5羽が死亡し、同居群は5日目に6羽中2羽が死亡したが、残りは観察期間中生存した。

表2. 同居感染実験

群	観察羽数 (死亡/有症/健康)					抗体価 <sup>*2</sup>
	1-2 <sup>*1</sup>	3	4	5	6-12	
接種						
群A	0/0/3	1/1/1	1/1/0	0/0/1	0/0/1	<4
同居						
群A	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	<4
接種						
群B	0/0/4	2/1/1	1/0/1	0/0/1	0/0/1	<4
同居						
群B	0/0/3	0/0/3	0/0/3	2/0/1	0/0/1	<4

\*1:感染後日数を示す。

\*2:HI価 1 : nを示す。

(3) 鶏舎内に侵入した陸生野鳥から鶏への直接伝播を想定して、両者の同居感染実験を実施したところ、 $10^7$ EID<sub>50</sub>/mlのウイルスを接種したジュウシマツは5日目までに8羽すべて死亡したが、同居させた鶏は4日目までに4羽中2羽が死亡した。

表3. 鶏と小鳥との同居感染実験

群	観察羽数 (死亡/有症/健康)					抗体価 <sup>*2</sup>
	1-2 <sup>*1</sup>	3	4	5	6-12	
接種						
小鳥群	0/0/8	3/2/3	2/2/1	3/0/0	- <sup>*3</sup>	-
同居						
鶏群	0/0/4	1/1/2	1/0/2	0/0/2	0/0/2	<4

\*1:感染後日数を示す。

\*2:HI価 1 : nを示す。

\*3:試験実施不可

(4) すべての実験を通じて、死亡した鳥からはいずれもウイルスが回収された。一方、生存した鳥では約2週後の血清中に接種ウイルスに対する抗体価は認められず、感染が成立していないことが確認された。

以上の実験成績および昨年度までの成績を総合し、以下の点が明らかとなった。

(1) 感染した野生水禽が糞便とともにウイルスを排泄している湖沼の水を介して、スズメ等の陸生野鳥が感染する可能性が考えられる。

(2) 感染した陸生野鳥が鶏舎内に侵入し、鶏と接触(エサや水を共有)した場合にウイルスが伝播する可能性が考えられる。しかし、

(3) 陸生野鳥の間で次々と感染が広がる可能性は考えにくい。

以上、本研究成績は鶏舎内への陸生野鳥の侵入防止対策が本病防疫上極めて重要であることを示している。

## 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)

[雑誌論文] (計 10 件)

①Soda, K., Ito, H., Usui, T., Nagai, Y., Ozaki, H., Yamaguchi, T., and Ito, T. (2013) Incursion and Spread of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses among Wild Birds in 2010- 11 Winter in Japan. 75 (印刷中)

②Soda, K., Usui, T., Uno, Y., Yoneda, K., Yamaguchi, T., and Ito, T. (2013) Pathogenicity of an H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated in the 2010-2011 Winter in Japan to Mandarin Ducks. J. Vet. Med. Sci. 75 (印刷中)

③Uno, Y., Usui, T., Soda, K., Fujimoto, Y., Takeuchi, T., Ito, H., Ito, T., and Yamaguchi, T. (2013) The Pathogenicity and Host Immune Response Associated with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in Quail. J. Vet. Med. Sci. 75:451-457.

④Hotta K, Takakuwa H, Le QM, Phuong SL, Murase T, Ono E, Ito T, Otsuki K, Yamashiro T. (2012) Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from Ducks in Hanoi, Vietnam. Virus Res. 163: 448-453.

⑤Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A, Kida H. (2012) Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in

Japan. J. Gen. Virol. 93:541-550.

⑥ Yamada S, Shinya K, Takada A, Ito T, Suzuki T, Suzuki Y, Le QM, Ebina M, Kasai N, Kida H, Horimoto T, Rivallier P, Chen LM, Donis RO, Kawaoka Y. (2012) Adaptation of a duck influenza A virus in quail. J. Virol. 86:1411-1420

⑦ Horimoto T, Maeda K, Murakami S, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Sashika M, Ito T, Suzuki K, Yokoyama M, Kawaoka Y. (2011) Highly pathogenic avian influenza virus infection in feral raccoons, Japan. Emerg. Infectious Dis. 17:714-717

⑧ Fujimoto Y, Ito H, Shivakoti S, Nakamori J, Tsunekuni R, Otsuki K, Ito T. (2010) Avian Influenza Virus and Paramyxovirus Isolation from Migratory Waterfowl and Shorebirds in San-In District of Western Japan from 2001 to 2008. J. Vet. Med. Sci. 72:963-967

⑨ Shivakoti, S., Ito, H., Otsuki, K., and Ito, T. (2010) Characterization of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated from a Mountain Hawk Eagle in Japan. J. Vet. Med. Sci. 72: 459-463

⑩ Fujimoto, Y., Ito, H., Shinya, K., Yamaguchi, T., Usui, T., Murase, T., Ozaki, H., Ono, E., Takakuwa, H., Otsuki, K., and Ito, T. (2010) Susceptibility of two species of wild terrestrial birds to infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype. Avian Pathology, 39:95-98

[学会発表] (計5件)

① 伊藤壽啓. 高病原性鳥インフルエンザの国内発生と野鳥との関わり. 鳥インフルエンザ公開シンポジウム. 2012年10月27日. 宮崎市.

② 伊藤壽啓. 高病原性鳥インフルエンザ流行. 第153回日本獣医学会学術集会微生物分科会シンポジウム. 2012年3月28日. 大宮市.

③ 伊藤壽啓. 日本での鳥インフルエンザの現状. 平成23年度日本獣医師会獣医学術文学会年次大会文部科学省科研費市民公開シン

ポジウム. 2012年2月5日. 札幌市.

④ 伊藤壽啓. 野鳥における高病原性鳥インフルエンザウイルス疫学調査について. 第151回日本獣医学会学術集会特別企画日本野生動物医学会シンポジウム. 2011年9月20日. 大阪市.

⑤ 伊藤壽啓. 鳥インフルエンザの疫学と対策. 平成22年度全国鶏病技術研修会. 2010年10月15日. 出雲市.

## 6. 研究組織

### (1) 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