

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580446

研究課題名(和文) ベトナムに飛来する渡り鳥の高病原性鳥インフルエンザウイルス感染の実態調査

研究課題名(英文) Surveillance on high pathogenic avian influenza viruses among migratory birds in Vietnam

研究代表者

堀田 こずえ (Hotta, Kozue)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70466192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、北部ベトナムに飛来する渡り鳥の糞便から、鳥インフルエンザウイルスの分離を行い、渡り鳥におけるH5N1亜型を含む高病原性鳥インフルエンザウイルスの自然感染状況を把握し、渡り鳥が運び、拡散させている鳥インフルエンザウイルスの実態を明らかにすることを目的とした。更に以前は、糞便だけでは渡り鳥の種の特定は難しかったが、近年、糞便に付着する渡り鳥の腸管組織からミトコンドリアDNAを抽出後、解析した遺伝子配列をデータベースに照合して種を特定する手法が報告され、本研究でも同様に種の特定を行った。

研究成果の概要(英文)：To know the prevalence of avian influenza viruses including the high pathogenic avian influenza virus H5N1 among migratory birds in the northern Vietnam, we collected feces of migratory birds from 2012 to 2014 and samples were inoculated into the chicken embryo to isolate the viruses. The isolated viruses were analyzed the sequences and determined the subtypes. About the classification of migratory birds, we extracted DNA from feces and amplified the mitochondrial DNA by PCR. Amplified mitochondrial DNA were sequenced and then searched the data bank (Consortium for the Barcode of life).

研究分野：ウイルス学

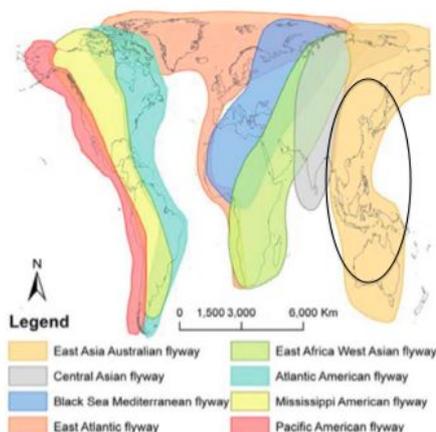
キーワード：獣医学 獣医公衆衛生学 疫学調査

### 1. 研究開始当初の背景

元来、鳥インフルエンザは、野生の水禽類(アヒル等のカモ類)を自然宿主としている。鳥インフルエンザウイルスは水禽類の腸管で増幅し、鳥の間では(水中の)糞便を介して感染するが、水禽類では感染しても宿主は発症しない。しかし、ウイルスの中には高い病原性をもたらすものがあり、2003年以降では、H5N1亜型ウイルスが有名である。日本では、2008年に秋田県の十和田湖畔などでハクチョウの死骸から高病原性のウイルスが検出された。更に2010年10月に北海道稚内市で採取された野鳥のカモの糞からも検出され、その後、島根県の養鶏場で発生し、続いて鹿児島県出水市でナベツルが感染して、大量死を起こした。これらのウイルスは、渡り鳥が日本へ運んで来たと考えられている。

ベトナムは太平洋に面して南北に長く、渡り鳥の飛行ルートとなっているアジア・オーストラリア Flyway の重要な一部である(図1)。我々は H5N1 亜型ウイルスがベトナムの家禽の中で常在化していることを報告しているが(2009-11, 基盤(C)課題番号:21580375) 外来の H5N1 亜型ウイルスの継続的な情報収集は近隣アジア諸国の H5N1 亜型流行対策の上で重要と考える。また、これまでの渡り鳥の糞便を用いた調査では、飛来している渡り鳥の種により、ある程度、野鳥種を絞り込めるが、同定とは言い難かったことが問題であった。しかし、これは、近年、データベース化された鳥のミトコンドリア DNA を用いることで、鳥種の同定を行うことが可能となり、本疫学調査でも取り入れることを試みた。

図1 渡り鳥の飛行ルート (International Wader Study Group より)



### 2. 研究の目的

本研究は、北部ベトナムに飛来する渡り鳥の糞便から、渡り鳥における H5N1 亜型ウイルスを含む高病原性鳥インフルエンザウイルス伝播の実態を明らかにすることを目的とする。更に、多種の渡り鳥が集まる場所において、糞便からではできなかった野鳥種の同

定を糞便に付着している野鳥の腸管細胞からミトコンドリア DNA を抽出、解析することで、種の同定を行うことも目的とする。

- (1) 北部ベトナムに飛来する渡り鳥を捕獲して傷つけることなく、落ちている糞便から、鳥インフルエンザウイルスの分離、ウイルス亜型の同定を行い、渡り鳥が感染している鳥インフルエンザウイルス亜型を明らかにする。
- (2) ウイルスが分離された糞便の野鳥種を糞便に含まれる鳥のミトコンドリア DNA を調べることで同定する。  
以上のことから、冬期に韓国・中国など北から越冬するためにベトナムに飛来する渡り鳥の種類と感染している鳥インフルエンザウイルス亜型が明らかになる。

### 3. 研究の方法

- (1) 2012年度から2014年度の冬期にベトナム北部 Bac Ninh 省 Dong Xuyen 公園と Nam Dinh 省 Xuan Thuy 国立公園(ラムサール条約認定公園)にて渡り鳥の糞便を採取する。

図2 北部ベトナム地図



- (2) 検体を抗生物質添加 PBS に溶き、10日齢ニワトリ有精卵へ接種し、48時間後に漿尿液を回収し、HA 試験を行う。HA 試験陽性の検体は簡易インフルエンザ kit を用いて判定し、その後、PCR 法およびシーケンス解析によりインフルエンザウイルス亜型を特定する。

- (3) インフルエンザウイルスが分離された糞便検体から DNA を抽出し、ミトコンドリア COI 領域を PCR 法にて増幅後、シーケンス解析をして遺伝子配列を決定する。シーケンスの解析結果をカナダ、ゲルフ大学が主幹となって行っている DNA バーコーディング法でデータベース (Consortium for the Barcode of Life) を使用して、ウイルスが分離された糞便から、ウイルスを排出した渡り鳥の種を同定する。

#### 4. 研究成果

(1) 2012年度から2013年度の3年間に北部ベトナムで採取した渡り鳥の糞便は、Nam Dinh 省 Xuan Thuy 国立公園が760検体、Bac Ninh 省 Dong Xuyen 公園が177検体であった(表1)。2012年度のみ Bac Ninh 省 Dong Xuyen 公園にて、検体採取を行ったが、飛来している渡り鳥の殆どがサギ類であったため、2013年度以降、Bac Ninh 省 Dong Xuyen 公園での採取を中止した。理由として、これまで鳥インフルエンザウイルスの分離数はサギ類よりカモ類からの報告が圧倒的に多いためである。937検体中、鳥インフルエンザウイルスが分離された検体数は、20検体(2.1%)であった。Nam Dinh 省 Xuan Thuy 国立公園から、2012年度3検体、2013年度7検体、2014年度10検体で、Bac Ninh 省 Dong Xuyen 公園から分離されたウイルスはなかった。また、Nam Dinh 省 Xuan Thuy 国立公園の陽性率は、2.6%(20/760)となる。

表1 検体採取場所と検体数

年度	場所	陽性検体数 / 検体数
2012	Nam Dinh	3/364
	Bac Ninh	0/177
2013	Nam Dinh	7/249
2014	Nam Dinh	10/147
合計		20/937

(2) 分離されたウイルスの亜型を遺伝子解析により調べた結果、2012年度は、H3N6 亜型1株、H4N6 亜型2株で、翌2013年度は、H7N7 亜型7株となった(表2)。最終年度の2014年度は、H3N8 亜型1株、H4N6 亜型9株であった。また、全ての分離株のHA開裂部位は、低病原性を示した。本研究期間中、中国において、2013年3月末から低病原性鳥インフルエンザウイルス H7N9 亜型のヒト感染例が報告され、その後死亡者も多く報告された。本研究で分離された H7N7 亜型株をシーケンスした結果、中国で報告された H7 遺伝子とは異なる配列であった。本事例では、新規ウイルスのベトナムへの侵入は未確認となった。しかし、家禽には低病原性だがヒトの命を奪うウイルスの出現は、容易に渡り鳥が運べることになり、渡り鳥が運ぶ鳥インフルエンザウイルスを常に監視することが大切であることを再認識させられた。

表2 分離亜型と野鳥種の同定

年度	亜型	株数	野鳥種
2012	H3N6	1	Anas querquedula
	H4N6	2	カモ目カモ科マガモ属シマアジ
2013	H7N7	7	Anas crecca カモ目カモ科マガモ属コガモ
2014	H3N8	1	未同定
	H4N6	9	

(3) 最後に、ウイルスが分離された糞便に付着している野鳥の腸管細胞から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 内 COI 領域のシーケンスを行い、データベースと照合して、ウイルスを排出した野鳥種を同定した(表2)。2012年度は、H3N6 亜型1株、H4N6 亜型2株ともカモ目カモ科マガモ属シマアジと同定した。2013年度の H7N7 亜型7株は、カモ目カモ科マガモ属コガモと同定することができた。本手法を用いることで、渡り鳥を捕獲して傷つけることも無く、糞便だけの調査では、不確実だった野鳥種の同定も簡易に行えることが証明できた。

#### 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 2件)

- Hotta K**, **Takakuwa H**, Yabuta T, Ung TT, Usui T, Nguyen HL, Le TT, Le MQ, Yamaguchi T, Otsuki K, **Ito T**, Murase T, Yamashiro T. Antibody survey on avian influenza viruses using egg yolks of ducks in Hanoi between 2010 and 2012. *Vet Microbiol.* 2013 Sep 27;166(1-2):179-83 査読有  
DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.05.029
- Hotta K**, **Takakuwa H**, Le QM, Phuong SL, Murase T, Ono E, **Ito T**, Otsuki K, Yamashiro T. Isolation and characterization of H6N1 and H9N2 avian influenza viruses from Ducks in Hanoi, Vietnam. *Virus Res.* 2012 Feb;163(2):448-53 査読有  
DOI: 10.1016/j.virusres.2011.11.004

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

堀田 こずえ (HOTTA Kozue)  
東京大学・大学院農学生命科学研究  
科・助教  
研究者番号：70466192

### (2) 研究分担者

伊藤 壽啓 (ITO Toshihiro)  
鳥取大学・農学部・獣医学科・教授  
研究者番号：00176348

### (3) 連携研究者

高桑 弘樹 (TAKAKUWA  
Hiroki)  
京都産業大学・総合生命科学部・教  
授  
研究者番号：20449507