

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430206

研究課題名(和文) 野外コウノトリの生理学および病理学的モニタリング手法の開発

研究課題名(英文) Development of the physiological and pathological monitoring methods for oriental white storks in the wild

研究代表者

内藤 和明(Naito, Kazuaki)

兵庫県立大学・地域資源マネジメント研究科・准教授

研究者番号：50326295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2005年から豊岡盆地において再導入が実施されているコウノトリの自動体重測定と検査のための捕獲の方法を開発し、感染症に関する基準値の解明と高病原性鳥インフルエンザへの対応策の確立、およびエネルギー代謝量の推定を行った。飼育下および野外のコウノトリの一部が薬剤耐性菌を保有していることを明らかにした。高病原性鳥インフルエンザに対する防疫マニュアルを改定し、それに基づく防疫体制を確立した。比較的活動量が少ない条件でのコウノトリのエネルギー消費量は、給餌量から計算されるエネルギー量の58.6～68.5%に相当することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The oriental white stork, *Ciconia boyciana*, has been reintroduced in Toyooka Basin since 2005. In this project, we tried to develop the methods for automatic weighting and capturing, and carried out pathological and physiological studies on oriental white storks. It was revealed that a part of in situ and ex situ storks held drug-resistant bacteria. The revised guidelines for responding to Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) on captive storks was completed and the prevention of epidemics system has established based on it. It was revealed that estimated metabolic rates of captive storks were equivalent to about 58.6-68.5 % of calculated energy from their food intake.

研究分野：保全生態学

キーワード：コウノトリ 再導入 自動体重測定 捕獲 感染症 高病原性鳥インフルエンザ 二重標識水 エネルギー代謝量

1. 研究開始当初の背景

絶滅危惧動物の保全において、個体の生理学的・病理学的な状態を把握することは、絶滅リスク低減のために不可欠と考えられる。また、特に鳥類においては、高病原性鳥インフルエンザが近年は野生鳥や家禽で連続して発生するなど、野生動物と人・畜の間で関連する感染症に対応する必要性が高まっている。国際自然保護連合 (IUCN) の専門家グループが策定した「再導入ガイドライン」や、野生動物医学会が定めた「日本産野生動物における再導入ガイドライン」では、病原体のリスクアセスメントの重要性が強調されている。本研究の対象とするコウノトリでは、国内の繁殖個体群がいったん絶滅したが、2005 年から豊岡盆地において再導入が実施され、事業の進捗に伴って 2011 年には「コウノトリ野生復帰ランドデザイン」が策定され生態学的、遺伝学および社会学的側面からの研究・実践が行われている。しかし、生理学的・病理学的側面については、飼育個体群に対する一般的な感染症対策 (防疫マニュアルの策定) 等にとどまっていた。一方、野生復帰のための環境整備と関連して、採餌環境における餌生物量の調査などが行われているが、コウノトリのエネルギー代謝量について明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本課題では次の3点について研究を進めることとした。

(1) コウノトリの健康状態をモニタリングする手法の開発

健康状態を知る最も基本的な指標である体重を、個体を捕獲せずに自動的に測定する手法を開発する。

また、給餌による誘引の場合、野外コウノトリの餌への依存が生じるため、給餌によらない誘引・捕獲方法を開発する。1 つは、餌は見えても採餌できない水槽ともう 1 つは、自らの姿が映るミラーによる方法である。後者は、なわばりを持つ小鳥類 (ジョウビタキ、キセキレイ) で知られている行動であり、同じくなわばり性のあるコウノトリにも応用してその可能性を検証する。

(2) コウノトリの感染症に関する基準値の解明と高病原性鳥インフルエンザへの対応策の確立

感染症に対するリスク管理や飼育個体群防疫の管理水準を検討するために、健康指標となる各種病原体の保有状況をモニターし基準値を解明する。また、近年の発生状況や農水省および環境省のガイドラインを踏まえて、既存の「飼育下コウノトリ高病原性鳥インフルエンザ防疫マニュアル」を改定し、新たな基準に基づいた防疫体制を確立する。

(3) コウノトリのエネルギー代謝量の解明 野外個体が自活するために必要な餌量を

推定する手がかりとして、二重標識法によりコウノトリのエネルギー代謝量を測定し、餌資源量が少ないと思われる冬期を含む採餌環境の季節変化へのコウノトリの生理学的反応を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) コウノトリの健康状態をモニタリングする手法の開発

2014 年度には、飼育個体が高さ 20 ~ 30cm の台に止まるという観察から、野外個体が集まる、屋根の無いケージ内に止まり台を作製・設置し、コウノトリの反応を検証した。高さ 25cm と 50cm の 2 本を地上に固定し、自動撮影装置で計 27 日間記録した。

2015 ~ 2016 年度には、ペアを形成しているコウノトリのなわばり内の水田畦畔に体重計を設置し、野外コウノトリが歩行してその上に乗るかどうかを観察した。

2016 ~ 2017 年度には、計 26 日間において、コウノトリの捕獲を前提とした特定の場所への誘引を目的に、ドジョウが入っているが蓋付きで採餌できないようにした水槽、あるいはなわばり行動 (接近・攻撃) を解発する、自らの姿が映るミラーを使用して装置への誘引が可能か実験・観察を行った。

(2) コウノトリの感染症に関する基準値の解明と高病原性鳥インフルエンザへの対応策の確立

コウノトリとヒトとの共生を保全医学的に評価し生態学的健康の維持に役立てるため、飼育環境での病原性細菌と薬剤耐性菌保有について調査した。病原性細菌はサルモネラとキャンピロバクター、薬剤耐性菌については大腸菌を対象とした。郷公園内の個体ケージおよび検疫棟で 2014 年および 2015 年に飼育個体の糞便を採取し検体とした。細胞培養および遺伝子増幅を行い、対象となる細菌類の検出を試みた。野外環境に関しては、野外コウノトリの糞便および各種環境試料 (土壌試料、環境水、動物糞) を採取し、抗菌薬に対する薬剤耐性の指標となる、 β -ラクタマーゼ産生遺伝子の検出を遺伝子増幅により試みた。

高病原性鳥インフルエンザへの対応策を検討し、防疫対策を確立するために、従前の対策と「飼育下コウノトリ高病原性鳥インフルエンザ防疫マニュアル」(以下、防疫マニュアル)の課題を整理し、飼育施設 (郷公園) 内の体制と関係機関との連携のあり方についてまとめた。これに基づき、防疫マニュアルと対策ハンドブックを改訂、整備した。

(3) コウノトリのエネルギー代謝量の解明

コウノトリのエネルギー代謝量を求める方法として二重標識法を用いた。これは、水素と酸素の安定同位体 (^2H , ^{18}O) で標識された水 (二重標識水) を体内に投与し、その

除去率の差から二酸化炭素の生産率を推定し、エネルギー代謝量を計算する手法である。

測定プロトコルを確立するために、標識水の投与方法、投与量、および投与後の採血方法を最初に検討することとした。捕獲や採血に比較的慣れており、繁殖計画に組み込まれていない、個体ケージで飼育されている3個体を供試個体として選定し、二重標識水を投与した後の安定同位体の減衰速度を求めるために、投与から最大8日後まではほぼ48時間間隔で血液試料を得た。この試験は12月中旬から下旬にかけて行った。次に、同様の条件の個体を対象に7月下旬に夏期の試験を実施した。このときは、投与直後と48時間後の血液試料を得た。これらの試料で冬期と夏期のエネルギー代謝量を推定し比較することとした。

さらに、屋根がない開放型の広いケージで飼育され、飛翔はできないがケージ内を自由に移動できる4個体を対象に二重標識水によるエネルギー代謝量の測定を行った。この試験は9月上旬および1月下旬の2回実施し、それぞれ投与直後と48時間後の血液試料を得た。これらの試料により、飛翔以外の行動を自由に行う条件での冬期と夏期のエネルギー代謝量を推定し比較することとした。

それぞれの試験で得られた血液試料および投与に用いた二重標識水、環境水等の安定同位体濃度を計測し、既存の研究で得られている計算式を用いて、各個体のエネルギー代謝量を求めた。

4. 研究成果

(1) コウノトリの健康状態をモニタリングする手法の開発

Wi-Fiによる無線転送ができる体重計(オムロン社製 HBF-253W)を使って、屋根のないケージに設置した体重計の記録を、隣接する建物内の装置に自動転送できることを確認した。

自動撮影した映像を解析した結果、屋根のないケージ内には1日に最大7~14個体の野外コウノトリが降りたが、体重の自動測定を目的に設置した止まり台に止まる個体は確認されなかった。

次に、電柱に次いでコウノトリが休息のために利用する水田畔に体重計を設置し、個体があるかどうかが観察したが有意な結果は得られなかった。

個体の捕獲方法の開発については、野外に簡易ケージやネットランチャーを設置して行う従来の方法で、餌を用いなくても誘引装置に接近する個体があることは判明したが、ドジョウの入った水槽にしても、自らの姿が写るミラーにしても、接近はするものの捕獲が可能となるほどの執着は示さなかった。

(2) コウノトリの感染症に関する基準値の解明と高病原性鳥インフルエンザへの対応策の確立

飼育個体の糞便の病原性細菌と薬剤耐性菌保有についての解析では、細菌培養および遺伝子増幅の結果、サルモネラとキャンピロバクターは検出されなかった。これは、飼育個体の日常的な健康管理が十分になされているためと思われた。一方で、コウノトリ40個体の計61糞便試料から培養法により大腸菌の検出を試みたところ、23検体(37.7%)から検出され、15検体(65.1%)が薬剤耐性を示した。そのうち3検体からは4~11種の抗生剤に対する多剤耐性を示す大腸菌が検出された。11剤耐性を示した大腸菌は、ESBL(基質拡張型-ラクタマーゼ)産生菌であった。飼育個体の試料から多剤耐性大腸菌が検出されたことは予想外の結果である。薬剤耐性菌やSBL産生菌の増加は国際的に注目される社会問題となっており、再導入が環境に与える影響を保全医学的な観点から捉える際に、飼育下での健康管理が重要な鍵となり得ることが示唆された。

野外コウノトリの糞便22検体および各種環境試料(生息地周辺11か所で採取した、土壌試料、環境水、動物糞の計20検体)から、5種類の-ラクタマーゼ産生遺伝子型(TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9)を標的にしたPCR増幅を行い-ラクタマーゼ産生遺伝子の検出を試みた結果、コウノトリの糞便からTEM型1検体とCTX-M-9型1検体が、土壌試料からTEM型2検体、環境水からTEM型1検体が検出された。日本国内でTEM型が検出されるのは稀である。コウノトリと他の野生動物を含む生息環境そしてヒトとの相互関係の中で本種の健康維持を考える、One Healthの視点に立って感染症対策について総合的に捉えることの重要性が示唆される結果となった。

兵庫県立コウノトリの郷公園が2011年に策定した防疫マニュアルの課題を整理し、改定の方角性を検討した結果、対策の組織体制、検査体制、野鳥との接触防止対策、施設消毒、感染症のモニタリングの各項目で具体的な成果が得られた。その成果に基づいて、高病原性鳥インフルエンザの発生段階(コウノトリの飼育施設から発生場所までの距離、および発生場所の数に基づいて決定)に応じた、必要な防疫対応の措置を一覧にまとめた。

2016年には前述した課題整理の結果に基づいて、防疫マニュアルを改定し、以降は実際に運用した。2015-2016年には、国内で高病原性鳥インフルエンザの発生が見られなかったが、2016年11月には国内で採取された環境試料から高病原性鳥インフルエンザウイルスが検出され、関係団体を構成員とする対策会議が開催された。その後12月にはコウノトリの飼育施設から100km以内の市町村で飼養鳥の死体から検出されたため、防疫マニュアルにしたがって、池や湿地の水抜き、靴底および自動車タイヤの消毒、屋根のないケージで飼育しているコウノトリのバックヤードへの収容等の個別の対策がとられた。

2017-2018 年にも同様に、コウノトリの飼育施設から 100km 以内の市町村で死亡した鳥から高病原性鳥インフルエンザウイルスが検出されたため各種の対策が実施された。このように、高病原性鳥インフルエンザが冬期に連続して発生している近年の状況に対して、改定された防疫マニュアルにしたがって対応する体制を確立し、安定して運用することが可能となった。

(3) コウノトリのエネルギー代謝量の解明

飼育個体 3 個体を対象に、二重標識水投与後の水素と酸素の安定同位体 (^2H , ^{18}O) の排出率を計算したところ、投与から 8 日後まで一定の速度で安定同位体が排出されることを確認でき、また投与後初期の安定同位体濃度は投与から 2~3 時間後の試料で推定可能なことが明らかになった。この結果から、以降の試験では二重標識水の投与直前、投与 2~3 時間後、および 48 時間後の血液試料を採取し、それらの安定同位体濃度を測定してエネルギー代謝量を推定することとした。

個体ケージで飼育され比較的活動量が少ない条件でのエネルギー消費量の推定値は、3 個体の平均で冬期には $1,627\text{KJ day}^{-1}$ 、夏期には $1,530\text{KJ day}^{-1}$ となり、冬期のエネルギー消費量が夏期よりも約 6.3% 多かった。このエネルギー消費量は、給餌量から計算されるエネルギー量の 58.6~68.5% に相当し、鳥類における植物と果実を除いた一般的な消化効率とされる 75% より低い値であった。

屋根がない開放型の広いケージで飼育され、飛翔はできないがケージ内を自由に移動できる 4 個体を対象にエネルギー消費量の測定を行った結果では、平均で冬期には $1,369\text{KJ day}^{-1}$ 、夏期には $1,546\text{KJ day}^{-1}$ であり、個体が自由に移動できる開放型のケージと閉鎖型のケージで飼育されている個体のエネルギー消費量に明瞭な違いは確認されなかった。開放型ケージでは複数の個体が同所的に飼育されており、採餌量と活動量が個体毎に異なることを反映して、エネルギー消費量に個体差が生じていると考えられた。一方で、個体の体重とエネルギー消費量が比較的相関していることは確認された。以上により、活動量が比較的少ない条件下におけるコウノトリのエネルギー消費量の値とその範囲が概略明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

内藤和明 (2018) 二重標識水法による飼育下コウノトリのエネルギー消費量の推定. 野生復帰 (査読有), 6:27-32.

http://www.stork.u-hyogo.ac.jp/downloads/journal/06_05.pdf

松本令以・船越 稔・吉沢拓祥・内藤和明・大迫義人・佐川志朗・江崎保男 (2018) 兵庫県立コウノトリの郷公園の飼育コウノトリにおける高病原性鳥インフルエンザ

対策の構築. 野生復帰 (査読有), 6:39-52.

http://www.stork.u-hyogo.ac.jp/downloads/journal/06_07.pdf

内藤和明 (2017) 二重標識水法によるコウノトリのエネルギー消費量推定手法の検討. 野生復帰 (査読有), 5:23-28.

http://www.stork.u-hyogo.ac.jp/downloads/journal/05_05.pdf

沼田一三・佐藤 稔・吉沢拓祥・三橋陽子・杉原未規夫・鈴木維時・犬伏 源・堯井ゆか・江崎保男 (2016) 兵庫県立コウノトリの郷公園における高病原性鳥インフルエンザ対策に関する研究. 野生復帰 (査読有), 4:111-128.

http://www.stork.u-hyogo.ac.jp/downloads/journal/04_15.pdf

[学会発表](計 2 件)

炭山大輔・大橋裕幸・三橋陽子・内藤和明・江崎保男・大迫義人・村田浩一 飼育下コウノトリにおける薬剤耐性大腸菌保有実態. 第 22 回野生動物医学会大会. 2016 年 9 月 16~18 日

村田浩一 生態系の健康と感染症. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年 9 月 7 日, 招待講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 和明 (NAITO, Kazuaki)

兵庫県立大学・地域資源マネジメント研究科・准教授

研究者番号: 5 2 3 2 6 2 9 5

(2) 研究分担者

江崎 保男 (EZAKI, Yasuo)

兵庫県立大学・地域資源マネジメント研究科・教授

研究者番号: 1 0 2 4 4 6 9 1

大迫義人 (OHSAKO, Yoshito)

兵庫県立大学・地域資源マネジメント研究科・准教授

研究者番号: 4 0 3 2 6 2 9 4

村田 浩一 (MURATA, Koichi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号: 0 0 3 3 9 2 8 5