

北海道道東地域の野生水鳥における鳥インフルエンザウイルスのサーベイランスとウイルス診断法の開発

ブイ・ニア・ヴォン

畜産学研究科畜産衛生学専攻食品衛生学講座（博士後期課程2年）

1. 目 的

人や動物に広く感染することが知られているA型インフルエンザウイルスの自然宿主は、水鳥であることが知られている。カモなどの水鳥は、全ての亜型のウイルスを保有しており、他の動物へのインフルエンザウイルスの供給源であることが疑われている。昨春は、北海道でH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染で死亡したオオハクチョウが発見されて、問題となった。現在、人において流行中の新型インフルエンザウイルスも鳥・人・豚のインフルエンザウイルスの遺伝子を持っていることが示されている。このようにインフルエンザウイルスは、容易に遺伝子組換え（再集合）を起し、新しいウイルスを作る傾向がある。従って、自然宿主である野生水鳥におけるサーベイランスにより鳥インフルエンザウイルスの動向・生態を把握することは、人や動物におけるインフルエンザをコントロールする上で重要である。国内でも野生水鳥におけるサーベイランスはこれまで報告があるが、北海道道東地域におけるサーベイランスは、殆ど行われていないために、この地域にシベリアやアラスカから飛来する野鳥における鳥インフルエンザウイルスの動向や生態は分っていない。本研究では、十勝地方を含む道東地域における鳥インフルエンザウイルスの動向・生態を明らかにすること、および迅速な解析のために新しい高感度・高特異性のウイルス診断法の開発を目的とする。

2. 方 法

2006～2008にかけて釧路、根室、十勝地方を含む北海道道東地域の水禽類から採集された糞便・スワブ材料を用いて発育鶏卵接種法によりウイルス分離を行った（Fig.1）。また、鳥インフルエンザウイルスのM遺伝子に特異的なリアルタイム RT-PCR 法を用いて、野外材料から直接インフルエンザAウイルス遺伝子の検出を行った。赤血球凝集試験により赤血球凝集性を示したサンプルについて、赤血球凝集抑制試験や RT-PCR 法でウイルスを同定した。分離ウイルスについては、遺伝子解析（ウイルス遺伝子の塩基配列の決定と系統樹解析）に基づく疫学的解析を行った。また、LAMP 法を用いて、鳥インフルエンザAウイルスの亜型同定法の開発を試みた。

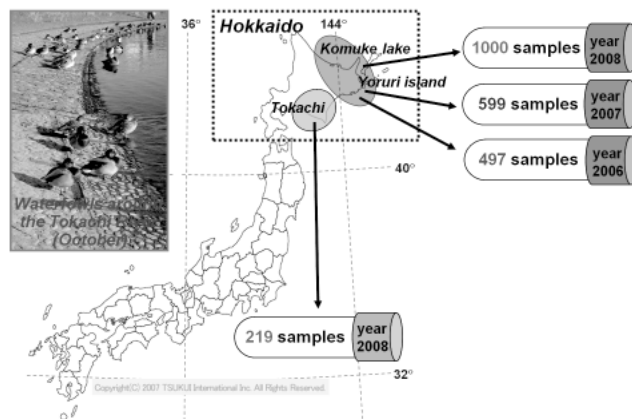


Fig. 1 Samples collected in eastern Hokkaido, Japan (Jun 2006 - Oct 2008)

3. 結 果

2006年に網走と根室地域で採取された497サンプルのサブサンプルからH4N8亜型ウイルス9株が分離された。系統樹解析からこれらは2004年にオーストラリアでRed-necked stintから分離されたA/red-necked stint/Australia/2004と遺伝子において高い相同性を示した。2007年と2008年に網走、根室地域を含む道東地方（十勝地方を除く）で採取された1599サンプルからは、ウイルスは分離されなかった。一方、2008年に十勝地方で採取された219サンプルから、鳥インフルエンザウイルスが15株、赤血球凝集性を示したが、鳥インフルエンザウイルスと同定されなかった5株のウイルスが分離された（Table 2）。鳥インフルエンザウイルスの亜型は、Table 3に示した。高病原性鳥インフルエンザウイルスであるH5やH7亜型ウイルスは分離されなかった。もっとも多く分離された亜型はH3N8亜型であった。鳥インフルエンザウイルスとは同定されなかった5株のうち、1株は鳥パラミクソウイルス4型、1株は鳥パラミクソウイルス6型、残りは鳥パラミクソウイルス1型か同定ができていない。

Table 2 Results of AIV surveillance on the Tokachi-2008 samples

Conclusion	No. of samples	%
AIV isolate	15	6.8
AIV suspect	26	11.9
Non AIV-isolate	5	2.2
Negative	173	79.1
Total	219	100.0

Table 3 Subtypes of the AIV isolated from the Tokachi-2008 samples

No.	Sample ID	Subtype	Count
1	KI0040	H3N5	1
2	KI0068	H3N6	1
3	KI0041	H3N8	8
4	KI0067		
5	KI0095		
6	KI0102		
7	KI0129		
8	KI0150		
9	KI0162		
10	KI0180		
11	KI0148	H4N2	1
12	KI0184	H4N6	2
13	KI0185		
14	KI0135	H6N5	1
15	KI0195	H6N8	1

LAMP法を用いた鳥インフルエンザAウイルスの亜型同定法は、多数の亜型株にたいする共通のLAMPプライマーの設定が難しく、亜型特異的LMAP法の開発には至らなかった。

4. 考 察

十勝を含む道東地域にはシベリアなどの繁殖地から多数のカモなどの野生水鳥（自然宿主）が飛来する。自然宿主である野生水鳥は、所謂「インフルエンザAウイルスの遺伝子プール」の役割を持っており、家きんや他の哺乳動物におけるインフルエンザAウイルスの供給源であることが強く疑われている。しかし、十勝管内を含め道東地域では、これまで鳥インフルエンザウイルスの動向・生態については、殆ど報告がなく実態はよくわかっていない。今回の研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルスであるH5やH7亜型ウイルスは分離されなかったが、他の亜型が分離されたことから、シベリアの繁殖地からインフルエンザAウイルスが日本に運ばれていることが確認された。Rufous-necked Stintから分離されたH4N8亜型ウイルスがオーストラリアで同種のred-necked stintから分離されたウイルスと遺伝学的に類似していたことは、シベリアからオーストラリアに跨る広大な地域においてウイルスが運ばれて移動していることが示唆される。今後も継続的に鳥インフルエンザウイルスのサーベイランスを行い、世界各地の鳥インフルエンザウイルスとの性状比較により、インフルエンザウイルスの生態に関する重要な知見を得ることが出来るものと思われる。

5. 学会発表

- 1) H. Ogawa, V. N. Bui, K. Imai: Surveillance of avian influenza virus (AIV) in migratory waterfowl in eastern Hokkaido, Japan. Bird Flu2009, Avian Influenza and Human Health, 2009, Oxford, UK
- 2) V. N. Bui : Surveillance of avian influenza virus (AIV) and paramyxovirus (APMV) in migratory waterfowl in eastern Hokkaido including the Tokachi district. 第43回夏季シンポジウム, 日本ウイルス学会北海道支部会, 2009

6. 謝 辞

本研究の実施にあたり、ご援助頂いた財団法人帯広畜産大学後援会に深謝致します。

キーワード：野鳥，インフルエンザ，ウイルス，サーベイランス