

# 渡り鳥が保有するインフルエンザウイルスの調査（第1報）

中村 雅子・東方 美保・川畑 光政・浅田 恒夫

Surveillance of Influenza Virus of the Migratory Bird in Fukui Prefecture

Masako NAKAMURA, Miho TOHO, Mitsumasa KAWABATA, Tsuneo ASADA

## 1 はじめに

H5N1 亜型インフルエンザウイルスによる高病原性鳥インフルエンザは、2003 年以來アジア各地で猛威をふるい、現在はアフリカやヨーロッパ諸国にも拡大している<sup>1)</sup>。

A 型インフルエンザウイルスはヒトを含む哺乳類や鳥類に広く分布し、なかでも水禽とくにカモが、自然宿主として現在知られているすべての亜型のウイルスを保有している<sup>2)</sup>。鳥における高病原性 H5N1 亜型インフルエンザウイルスの感染拡大には渡り鳥が関与していることが知られており<sup>3)</sup>、このウイルスのわが国への侵入を防ぐためには渡り鳥による持ち込みをいち早くとらえる監視体制が必要である。

福井県では、北潟湖、三方五湖、あわら市大堤、日野川などがカモ類の飛来地となっている<sup>4)</sup>。我々はこれらの場所において、平成 13 年度から渡り鳥が保有するインフルエンザウイルスの調査を行っているので、これまでの結果を報告する。

## 2 材料と方法

### 2. 1 調査期間

平成 13 年度から平成 18 年度までの冬期間

### 2. 2 材料

福井県の北潟湖、三方五湖などの渡り鳥の飛来地で採取したマガモを主としたカモなどの糞 572 検体（内訳は表 1）。

表1 採取した検体

年度	検体種類	採取地点	検体数
平成13年度	カモ	三方五湖	16
	カモ	鴨池	7
平成14年度	カモ	北潟湖	49
	カモ	三方五湖	29
	カモ	坂井町	8
平成15年度	カモ	北潟湖	82
	カモ	三方五湖	21
	マガン	坂井町	9
平成16年度	カモ	北潟湖	96
平成17年度	カモ	北潟湖	114
平成18年度	カモ	北潟湖	73
	カモ	三方五湖	68
	計		572

### 2. 3 検査方法

#### 2. 3. 1 ウイルス分離

「インフルエンザライブラリー実施要領（厚生労働省）」に従った。

新鮮な糞を 3 倍量の処置液に採取し、接種時まで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存しておいた。接種時には解凍してよく攪拌した後遠心（3,000ppm, 20 分）し、その上清 0.15ml を 9~10 日齢の発育鶏卵の漿尿膜腔内に接種した。34 $^{\circ}\text{C}$  2 日間培養し、1 夜冷蔵庫に置いた後、漿尿液を回収した。

得られた漿尿液につき、まず 0.5% ニワトリ赤血球および 0.75% モルモット赤血球を用いて HA（赤血球凝集）試験を行った。

次に HA 陽性の検体につき、迅速診断キットを用いて A 型インフルエンザの確認を行った。迅速診断キットは、平成 12~14 年度はディレクティジェン FluA（日本ベクトン）、平成 15~16 年度はキャピリア FluA,B（アルフレッサファーマ）、平成 17~18 年度はエスプラインインフルエンザ A&B-N（富士レビオ）を用いた。

#### 2. 3. 2 ウイルスの同定

QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて遺伝子を抽出し、RT-PCR 法で A/M、AH1、AH3、AH5 および AH7 の各遺伝子の検出を行った。RT-PCR 法は国立感染症研究所の病原体検査マニュアルに記載された方法に準じ、AccessQuick RT-PCR System（Promega）を用いた one-step 法で行った。

亜型の同定および詳細な解析は国立感染症研究所に依頼した。

#### 2. 3. 3 病原性の確認

分離された H5N2 亜型と H7N7 亜型のウイルスについて、病原性の確認を遺伝子検査およびバイオアッセイ（トリプシン依存性試験・孵化鶏卵法）により行った。

トリプシン依存性試験では、6well プレートに作製した MDCK 単層培養細胞に分離ウイルス（ $\times 10^5$ ）を各 800  $\mu\text{l}$  接種し、維持液にトリプシン（10  $\mu\text{g/ml}$ ）を添加した場合としない場合とで CPE の状態および HA 価を比較した。

また、孵化鶏卵法では、分離ウイルス（ $\times 10^5$ ）を 9 日卵各 4 個に 0.1ml 接種し、34 $^{\circ}\text{C}$ 、60hr 以上培養して鶏胚の生死を観察した。

遺伝子検査は国立感染症研究所において行った。

## 3 結果および考察

3. 1 ウイルス分離

検査した 572 検体中、34 検体が HA(+)となった。このうち迅速診断キットで陽性となったのは平成 14 年度に 1 検体、平成 16 年度に 6 検体、平成 17 年度に 3 検体、平成 18 年度に 3 検体の合計 13 検体であり、これらから 15 株の A 型インフルエンザウイルスが分離された。インフルエンザウイルスが分離されたのはいずれも北潟湖で採取したカモの検体であった (表 2)。

3. 2 分離株の同定

試験結果をまとめて表 3 に示した。

分離された 15 株のインフルエンザウイルスはすべて RT-PCR 法で A/M 遺伝子が確認された。H1 遺伝子が確認されたのは 1 株 (A/duck/福井/1/2002)、H5 遺伝子が確認されたのは 4 株 (A/duck/福井/1/2006、A/duck/福井/2/2006、A/duck/福井/3/2006 および A/duck/福井/4/2006) であった。

表2 HA陽性検体

年度	検体番号	検体種類	採取地点	HA価	inf(A)キット	ウイルス株名
平成14年度	11	カモ	北潟湖	4	(-)	
	14	カモ	北潟湖	128	(-)	
	18	カモ	北潟湖	128	(-)	
	21	カモ	北潟湖	1	(-)	
	23	カモ	三方五湖	16	(-)	
	45	カモ	北潟湖	64	(-)	
	49	カモ	北潟湖	16	(-)	
	52	カモ	北潟湖	4	(-)	
	58	カモ	北潟湖	8	(-)	
	72	カモ	北潟湖	256	(+)	A/duck/福井/1/2002
85	カモ	坂井町	2	(-)		
平成15年度	55	カモ	北潟湖	64	(-)	
	87	カモ	北潟湖	16	(-)	
	98	カモ	北潟湖	256	(-)	
	3	カモ	北潟湖	128	(-)	
	13	カモ	北潟湖	8	(-)	
	28	カモ	北潟湖	2	(-)	
平成16年度	38	カモ	北潟湖	8	(+)	A/duck/福井/1/2004
	41	カモ	北潟湖	32	(+)	A/duck/福井/2/2004
	42	カモ	北潟湖	32	(+)	A/duck/福井/3/2004
	46	カモ	北潟湖	64	(+)	A/duck/福井/4/2004
	68	カモ	北潟湖	16	(+)	A/duck/福井/5/2004
	88	カモ	北潟湖	16	(+)	A/duck/福井/6/2004
平成17年度	29	カモ	北潟湖	1024	(-)	
	32	カモ	北潟湖	16	(-)	
	35	カモ	北潟湖	4	(-)	
	37	カモ	北潟湖	4	(-)	
	42	カモ	北潟湖	128	(+)	A/duck/福井/1/2005
	58	カモ	北潟湖	64	(+)	A/duck/福井/2b/2005 A/duck/福井/2c/2005
平成18年度	69	カモ	北潟湖	256	(+)	A/duck/福井/3/2005
	21	カモ	北潟湖	16	(+)	A/duck/福井/1/2006 A/duck/福井/4/2006
	38	カモ	北潟湖	64	(+)	A/duck/福井/2/2006
	46	カモ	北潟湖	16	(+)	A/duck/福井/3/2006
79	カモ	北潟湖	32	(-)		
合計	34検体 (inf(A) 陽性 13、陰性 21)					

国立感染症研究所では、HA 亜型を HI 試験で、NA 亜型は遺伝子配列の比較で同定した。

図 1 には RT-PCR 法の結果の一例を、表 4 には HI 試験の結果の一例を示す。

3. 3 病原性の確認

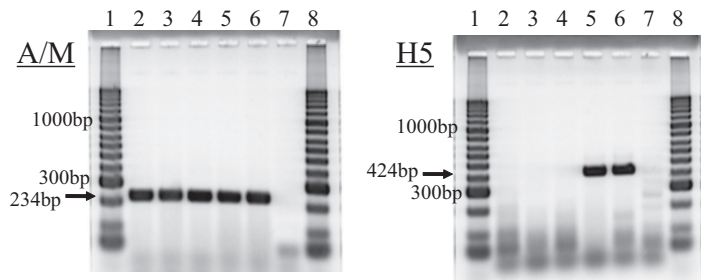
H5 亜型と H7 亜型については、強毒株が存在することから病原性の確認試験を行った。

国立感染症研究所で実施した遺伝子検査では、2004 年に分離された H7 亜型 6 株と 2006 年に分離された H5 型 4 株すべてについて、HA 開裂部位のアミノ酸配列は弱毒型であることが確認された。

当センターでは、このうちの H7 亜型 1 株と H5 型 4 株についてバイオアッセイ (トリプシン依存性試験と孵化鶏卵法) を行った。

表3 ウイルスの同定

ウイルス株名	迅速診断キット	RT-PCR				亜型
		A/M	H1	H3	H5	
A/duck/福井/1/2002	A(+)	+	+	-	-	H1N1
A/duck/福井/1/2004	A(+)	+	-	-	-	H7N7
A/duck/福井/2/2004	A(+)	+	-	-	-	H7N7
A/duck/福井/3/2004	A(+)	+	-	-	-	H7N7
A/duck/福井/4/2004	A(+)	+	-	-	-	H7N7
A/duck/福井/5/2004	A(+)	+	-	-	-	H7N7
A/duck/福井/6/2004	A(+)	+	-	-	-	H7N7
A/duck/福井/1/2005	A(+)	+	-	-	-	H11N2
A/duck/福井/2b/2005	A(+)	+	-	-	-	H4N1
A/duck/福井/2c/2005						H4N6
A/duck/福井/3/2005	A(+)	+	-	-	-	H9N1
A/duck/福井/1/2006	A(+)	+	-	-	+	H5N2
A/duck/福井/4/2006	A(+)	+	-	-	+	H5N2
A/duck/福井/2/2006	A(+)	+	-	-	+	H5N2
A/duck/福井/3/2006	A(+)	+	-	-	+	H5N2



Lane1,8 : HyperLadder II、  
Lane2 : A/duck/福井/1/2002(H1N1)、  
Lane3 : A/duck/福井/1/2004(H7N7)、  
Lane4 : A/duck/福井/1/2005(H11N2)、  
Lane5 : A/duck/福井/1/2006(H5N2)、  
Lane6 : P.C.、Lane7 : N.C.

図1 A/M遺伝子、H5遺伝子のRT-PCR

表4 抗インフルエンザ血清を用いたHI試験

Goat serum	Virus			
	A/duck/福井/1/2005	A/duck/福井/2b/2005	A/duck/福井/2c/2005	A/duck/福井/3/2005
H1* A/duck/Barvaria/2/77	<10			<10
H1* A/duck/Alberta/35/76		10	<10	
H2 A/duck/HongKong/278/78	<10	<10	<10	<10
H3 A/duck/Ukrina/1/63	<10	<10	<10	<10
H4 A/duck/HongKong/365/78	<10	<b>640</b>	<b>640</b>	<10
H5 A/duck/HongKong/820/80	<10	<10	<10	<10
H6 A/duck/HongKong/716/79	<10	<10	<10	20
H7 A/duck/HongKong/293/78	<10	<10	<10	<10
H8 A/turkey/Ontario/6118/67	<10	<10	<10	<10
H9 A/duck/HongKong/702/79	10	<10	<10	<b>320</b>
H10 A/duck/HongKong/560/79	<10	<10	<10	<10
H11 A/duck/England/1/56	<b>320</b>	<10	20	<10
H12 A/duck/Alberta/60/76	<10	<10	<10	<10
H13 A/gull/Maryland/704/77	<10	<10	<10	10
H14 A/mallard/Gurjev/263/82	<10	<10	<10	<10
H15 A/duck/Australia/341/83	<10	<10	<10	<10

\* Rabbit serum

トリプシン依存性試験の結果を表5に示した。トリプシンを添加した培養系ではH5亜型は2~3日目からCPEが現れ、7日目にはHA価16~64に上昇した。H7亜型は5日目からCPEが現れ、HA価は7日目まで4となった。これに対し、トリプシンを添加しない培養系ではH5亜型、H7亜型ともに1週間後でもCPEは現れず、HA試験も陰性であり、ウイルスが増殖しなかったことが確認された。

孵化鶏卵法では、表6に示すとおり、供試したH5亜型・H7亜型ともに一部の例外を除き、60時間以上の鶏卵の生存を確認した。(いずれも試験後に糞尿液にはウイルスが増殖していることを確認してある。)

表5 トリプシン依存性試験

	HA価(7日後)	
	trypsin(+)	trypsin(-)
A/duck/福井/1/2004(H7N7)	4	-
A/duck/福井/1/2006(H5N2)	16	-
A/duck/福井/2/2006(H5N2)	16	-
A/duck/福井/3/2006(H5N2)	64	-
A/duck/福井/4/2006(H5N2)	64	-

表6 孵化鶏卵への接種による病原性の確認試験

	死亡卵/接種卵(個) (60hr後)
A/duck/福井/1/2004(H7N7)	0/4
A/duck/福井/1/2006(H5N2)	0/4
A/duck/福井/2/2006(H5N2)	0/4
A/duck/福井/3/2006(H5N2)	0/4
A/duck/福井/4/2006(H5N2)	1/4

以上のことからこれらの分離株はいずれも弱毒型であることが確認された。

#### 4 まとめ

平成13年度から平成18年度まで、福井県内の渡り鳥の飛来地にて採取したカモなどの糞を検体としてインフルエンザウイルスの分離を行った。その結果、北潟湖で採取した検体からH1N1, H7N7(弱毒型), H11N2, H4N1, H4N6, H9N1, H5N2(弱毒型)などのウイルスが検出された。

本研究は、平成13年度から17年度までは厚生労働省の「新型インフルエンザウイルス系統調査・保存事業」として、また平成18年度からは、国立感染症研究所が行う科学技術振興調整費「野鳥由来ウイルスの生態解明とゲノム解析—国内に飛来する水鳥における鳥インフルエンザの生態調査—」研究班における協力研究者として行った。

#### 参考文献

- 1) WHO : H5N1 avian influenza: timeline of major events 17 July 2007 , [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/timeline\\_07july17.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/timeline_07july17.pdf)
- 2) 谷口清州 : 鳥インフルエンザの世界的現状, 医学のあゆみ, **218**, 821-825(2006)
- 3) 小田切孝人 : 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザと新型インフルエンザに備えた事前準備と国際協力, ウイルス, **56**, 77-84(2006)
- 4) 平成18年度ガンカモ科鳥類生息調査報告書, 福井県自然保護センター(2007)