

F-062 渡り鳥によるウエストナイル熱及び血液原虫の感染ルート解明とリスク評価に関する研究
 (1) 渡り鳥（シギ・チドリ類）における病原体感染に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

環境研究基盤技術ラボラトリー

生物資源研究室

桑名 貴・大沼 学

平成18～20年度合計予算額

104,650千円

(うち、平成20年度予算額

38,102千円)

※上記の合計予算額は、間接経費

22,968千円を含む

[要旨]ウエストナイル熱は長距離を移動する渡り鳥によって分布を拡大させる可能性が大きく、極東ロシア地域から我が国への分布拡大が懸念されている。そこで、ウエストナイルウイルスを媒介する蚊の活動が活発化する時期に極東ロシア地域より飛来するシギ・チドリ類を対象にウエストナイル熱のモニタリング体制の整備と実際の運用を平成18年～平成20年にかけて行った。最初に、バンダーと獣医師が共同し、これまでに別個に実施されていた鳥類の標識調査と感染症調査を連携して行う体制を整えた。次にウエストナイルウイルスの各種検査方法を比較・検討した。その結果、野外での一次スクリーニングにはウエストナイルウイルス簡易診断キット（VecTest）を、確定用の高感度検査方法として LAMP 法（栄研化学株式会社）を今回のモニタリングに導入することとした。シギ・チドリ類の捕獲調査は以下の8ヶ所で行った。北海道根室市春国岱（平成18年度～平成20年度）、北海道紋別市コムケ湖（平成18年度～平成20年度）、北海道釧路市釧路湿原（平成18年度）、北海道苫小牧市ウトナイ湖（平成18年度）、熊本県荒尾市牛水（平成18年度）、沖縄県（平成18年度～平成20年度）。また、沖縄県・NPO 法人どうぶつたちの病院に収容された傷病鳥もウイルス検査対象とした。最終的に平成18年度から平成20年度にかけて46種1,131個体をよりウイルス検査用の口腔内スワブを採取した。これらの口腔内スワブを使用して、平成18年度はウエストナイルウイルス簡易診断キット（VecTest）のみで、平成19年度と20年度についてはウイルス簡易診断キットと LAMP 法を併用してウエストナイルウイルス検査を行った。その結果、46種1,131個体すべて陰性であることを確認した。その結果、現在のところウエストナイルウイルスが国内に侵入している可能性が低いと判断した。その他に、国内におけるモニタリング体制の整備と平行して、ロシア連邦・ボロン自然保護区とタイ王国・カセサート大学との間でウエストナイルウイルスのモニタリングを連携して行う体制を整えた。

[キーワード] シギ・チドリ類、ウエストナイルウイルス、モニタリング、VecTest、LAMP 法

1. はじめに

近年、我が国でも発生をみる鳥インフルエンザについて、ガン・カモ類において、その渡りのルート上で感染状況の検査が行われている。しかし、鳥インフルエンザと同様に人獣共通伝染病であるウエストナイル熱や、特に鳥類の大量死の原因となりうる住血原虫の感染症も人間や野生動物が生活する環境の健全性を維持するためには重要である。これらの感染症は、特に長距離を移動する渡り鳥によって広範に媒介され、我が国にも進入することが懸念される。そのため地球を南北に半周する渡りを行うシギ・チドリ類の渡りの重要な中継地がある北海道、沖縄県および九州においてウエストナイルウイルスのモニタリング体制を整備することは緊急の課題である。

2. 研究目的

ウエストナイル熱は長距離を移動する渡り鳥によって分布を拡大させる可能性が大きく、極東ロシア地域から我が国への分布拡大が懸念されている。しかし、そのモニタリング体制は未整備のままである。そこで、モニタリングに関与する最適な人員構成と各種ウエストナイルウイルス検査法について検討を行い、ウエストナイルウイルスを国内に持ち込む可能性の高いシギ・チドリ類を対象に、実際にウエストナイルウイルスのモニタリングを実施することを本研究の目的とした。これに加えて海外と連携してウエストナイルウイルスのモニタリングを実施する体制を構築することを本研究の目的とした。

3. 研究方法

(1) モニタリングを実施する場合の人員構成

シギ・チドリ類を捕獲しウイルス検査用サンプルを採取する場合の人員構成は、鳥類標識調査員：1名、獣医師：1名、調査補助：1～2名とした。シギ・チドリ類の捕獲後に現場でウイルス検査用の口腔内スワブを採取する場合には、マスク、ゴム手袋、ガウンといった防護措置をとった（図1）。

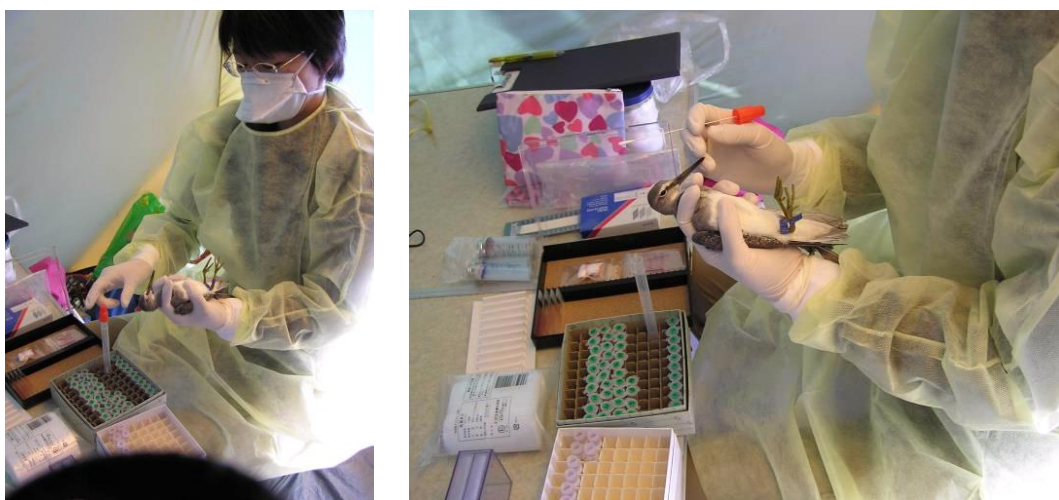


図1 捕獲したシギ・チドリ類からの口腔スワブ採取方法

(2) ウエストナイルウイルス検査方法の比較検討

通常、ウイルスを検査する場合には、サンプルからウイルスを分離・培養する方法がとられる。しかし、ウイルスを分離・培養する場合にはP3施設や熟練したスタッフが必要であるため、大規模なモニタリングを実施する場合の検査方法には適していない。そこで、大規模なモニタリングに使用可能な方法を選択するために、ウエストナイルウイルスを検出する各種手法を比較検討した(表1)。

表1 ウイルス検出方法の比較

検出手法	検出対象	検出 コピー数	検出感度 (%)	時間	専用機器	非特異 反応	熟練 要求度	処理数	合計 (スコア)
ウイルス分離	ウイルス	500 (1.0 PFU*/test) (☆☆☆)	100 (☆☆☆☆☆)	1週間 (☆)	☆	☆☆☆	☆	☆	15
VecTest	蛋白質	1.9X10 ⁷ (☆)	79 (☆)	20分 (☆☆☆☆☆)	☆☆☆☆☆ (野外科診断可)	☆	☆☆☆☆☆	☆☆☆☆☆	23
RT-PCR	RNA	500 (☆☆☆)	(<85) (☆☆)	300分 (☆☆)	☆☆☆☆	☆☆	☆☆☆	☆☆	18
リアルタイム RT-PCR	RNA	50 (☆☆☆☆☆)	85 (☆☆☆)	90分 (☆☆☆)	☆☆☆	☆☆☆	☆☆	☆☆☆	22
Loopamp法	RNA	50 (☆☆☆☆☆)	(85) (☆☆☆)	90分 (☆☆☆)	☆☆☆☆ (目視診断可)	☆☆☆	☆☆	☆☆☆	23

*PFU: Plaque-forming unit(プラック形成単位)

その結果、ウエストナイルウイルス簡易検査キット(商品名: VecTest West Nile Virus Antigen Assay)¹⁾を捕獲現場における一次スクリーニングに採用し、平成19年度より高感度にウエストナイルウイルスを検出する方法としてLAMP法(栄研化学株式会社)²⁾を採用した。これらの二つの手法を併用して、ウエストナイルウイルスのモニタリングを実施することとした(図2)。

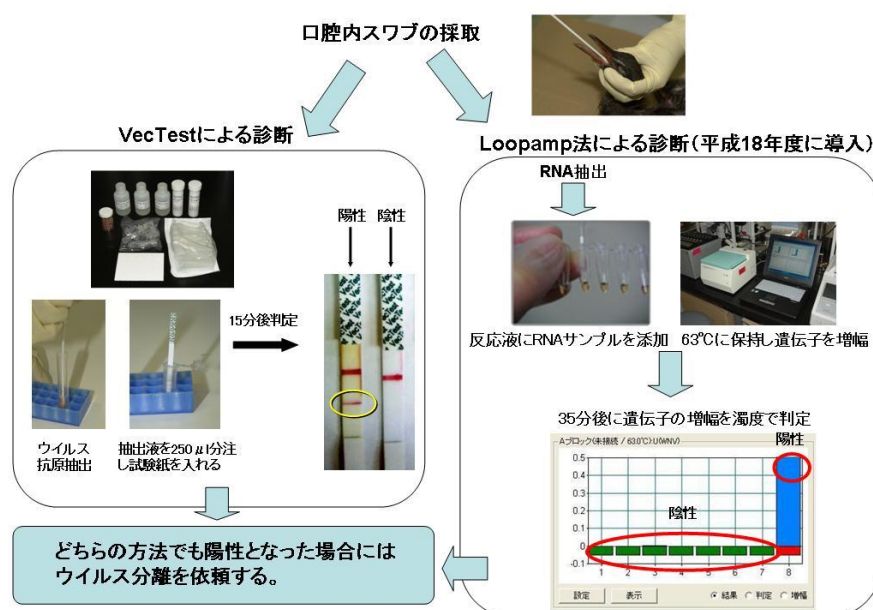


図2 VecTestとLAMP法を併用したウエストナイルウイルスの検査体制

以下に、1) ウエストナイルウイルス簡易検査キットと、2) LAMP法によるウエストナイルウイルス検査方法を示す。

1) ウエストナイルウイルス検査 (VecTestキット、図3) による検査方法

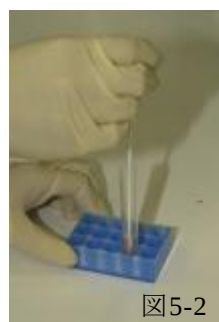
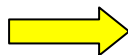


a. 口腔内スワブを採取する (図4)。

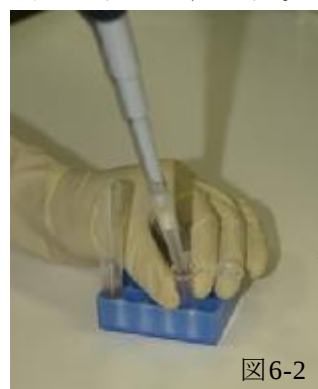
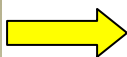
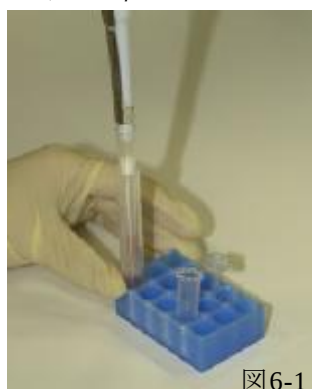


b. GRINDING SOLUTION 1ml を 5ml チューブに入れ、その中でスワブを懸濁する (図 5-1、5-2)

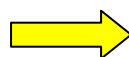
。



c.口腔内スワブ懸濁液 250 μ l を 1.5ml チューブに分注する（図 6-1、6-2）。



d.試験紙を1.5mlチューブに立て、15分後に判定（30分以降の結果は無効）（図7-1、7-2）。

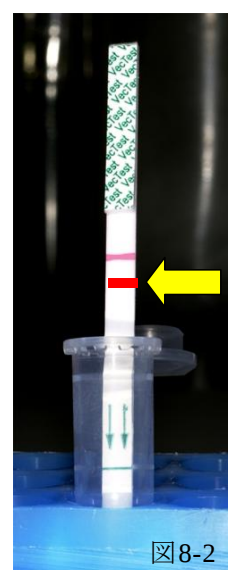


e.結果の判定方法（図8-1、8-2）。

陰性



陽性



矢印の部分に赤色のバンドが出てくる

2) LAMP法によるウエストナイルウイルス検査方法

LAMP 法（栄研化学株式会社）は、4 種類のprimer と鎖置換活性を持つDNA Polymerase を用いて反応を行う新規な等温核酸増幅法である。4 種類のプライマーのうち、2 種類のinner primer は、その3'側と5'側で標的核酸配列中の異なる2 領域を認識するプライマーで、5'側の配列はその3'側からの伸長反応で合成した相補鎖領域内にアニールするよう設定する。増幅反応は、このinner primer により生成するステムループ構造からの自己伸長反応と、ループ部分に新たにアニールしたinner primer からの鎖置換合成反応を繰り返すことで進行する。これにより、LAMP 法は用いる酵素が1 種類であるにも係わらず、等温増幅が可能である。RNAを鋳型とした場合も、あらかじめ逆転写酵素を加えることで、cDNA の合成から核酸の増幅まで（RT-LAMP反応）を1 ステップで行うことが可能であり、通常のRT-PCR法よりも約10倍の検出感度を有する。

a. ウイルス RNA 抽出方法

総排泄腔スワブ懸濁液250μlとISOGEN-LS（ニッポンジーン社） 750μlを混合した。次にこの混合液へクロロホルム200μlを添加し、12,000g 4℃ 15分間 遠心した。そして遠心後に得られた上清400μlからBIO ROBOT EZ1（QIAGEN社）とEZ1 Virus Mini Kit v2.0（QIAGEN社）を使用してRNAを抽出した。

b. LAMP法に使用する試薬および機器

Loopamp RNA増幅試薬キット（栄研化学株式会社）

2 × Reaction Mix.

Enzyme Mix.

Distilled Water

プライマーセット WNV（栄研化学株式会社）

Primer Mix. WNV（PM WNV）

Positive Control WNV（PC WNV）

Loopamp リアルタイム濁度測定装置LA-320C（栄研化学株式会社）

c. 検査手順

c-1 Loopamp RNA増幅試薬キットとプライマーセットWNV、1チューブあたり以下のように試薬を混合した。

2 × Reaction Mix. (RM) 12.5 μl

Primer Mix. WNV (PM WNV) 2.5 μl

Enzyme Mix. (EM) 1.0 μl

Distilled Water (DW) 4 μl

合 計 20.0 μl /チューブ

c-2 Loopamp 反応チューブに、(1)で調整した反応液 を20 μ l分注した。

c-3 分注した反応液にRNAサンプル溶液5 μ l を添加し全量25 μ lとした。また、陰性コントロールにはDistilled Water (DW) 5 μ l を、陽性コントロールにはPositive Control RNA (PC WNV) 5 μ l を同様に添加した。

c-4 Loopamp リアルタイム濁度測定装置LA-320Cに反応チューブをセットし、反応パラメーターを”WNV”に設定して反応を開始した。

(3) 日本国内における捕獲調査の実施

1) 個体の捕獲

シギ・チドリ類はロシア・シベリアより南下する“秋の渡り”と反対に東南アジアやオセアニア地域から北上する“春の渡り”を行うことが知られている。今年度の調査では北海道では“秋の渡り”の時期に、沖縄県と熊本県では“春の渡り”の時期に調査を実施したことになる。

手捕りまたはかすみ網を用いてシギ・チドリ類を生体捕獲した。特にかすみ網を用いる場合は、安全管理に留意した。開けた潟に張ったかすみ網が目立ちにくい夜間に、潮の干満を考慮しながら捕獲調査を行った。捕獲作業中は現場にて待機または現地の野外にテントを設営し待機した。捕獲した鳥類は安全かつ速やかに網からはずし、サンプルを採取した後に放鳥した。

2) 主要捕獲地点および調査実施期間 (図9)

北海道根室市 春国岱 (風蓮湖) :	平成 18 年 8 月 1 日～平成 18 年 8 月 22 日、 平成 19 年 7 月 27 日～平成 18 年 8 月 13 日 平成 20 年 7 月 26 日
北海道紋別市 コムケ湖 :	平成 18 年 8 月 25 日～平成 18 年 9 月 18 日 平成 19 年 8 月 24 日～平成 18 年 9 月 16 日 平成 20 年 8 月 30 日～平成 20 年 9 月 15 日
北海道釧路市 釧路湿原 :	平成 18 年 8 月 1 日～平成 18 年 11 月 30 日
北海道厚岸町 白浜 :	平成 19 年 10 月 16 日
北海道苫小牧市 ウトナイ湖 :	平成 18 年 8 月 5 日～平成 18 年 11 月 30 日
北海道えりも岬 :	平成 18 年 10 月 11 日
熊本県荒尾市 牛水 :	平成 19 年 1 月 16 日
沖縄県沖縄市 比屋根湿地 :	平成 19 年 2 月 25 日～平成 19 年 3 月 31 日 平成 20 年 2 月 25 日～平成 20 年 3 月 31 日

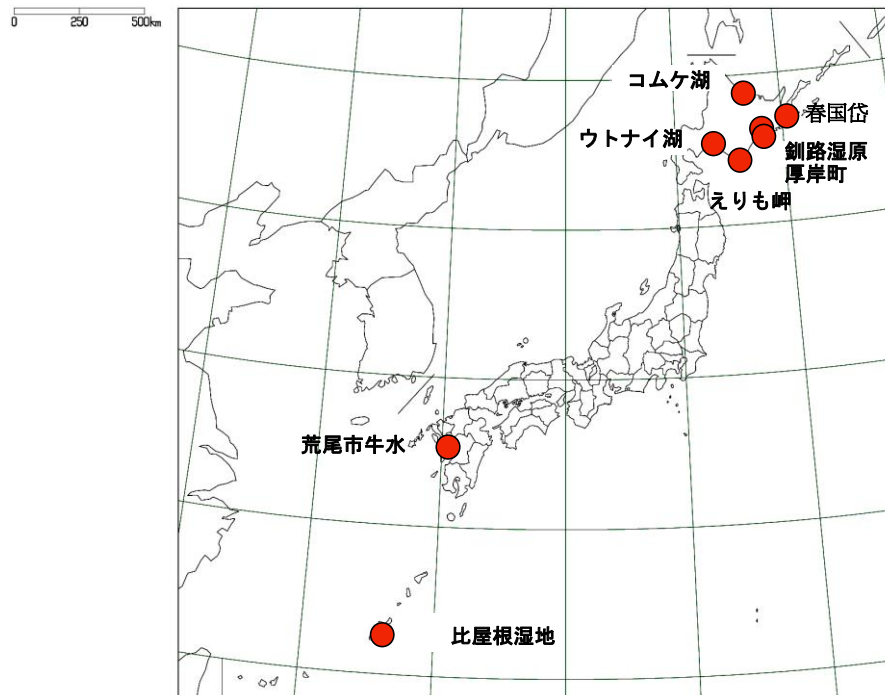


図9 捕獲調査地

3) ウエストナイルウイルス検査

捕獲したシギ・チドリ類の口腔内粘膜を、綿棒を用いて拭い取りを行いサンプルとした。北海道における捕獲調査では、保冷剤を入れた密閉容器または小型電気冷蔵庫内にてサンプルを4℃以下に保存し、現地あるいは現地にて検査できないときは猛禽類医学研究所（北海道釧路市北斗釧路湿原野生生物保護センター内）に持ち帰り、直ちに診断を行った。沖縄県と熊本県における調査ではサンプルを冷蔵指定で（独）国立環境研究所に送付し診断を行った。

（4）ロシア連邦およびタイ王国における捕獲調査

ロシア連邦・ボロン自然保護区では2007年度のコウノトリ *Ciconia boyciana* 捕獲調査に同行することとした。また、タイ王国ではカセサート大学構内で実施される予定の野鳥捕獲調査に参加することにした。

4. 結果・考察

（1）国内における捕獲調査およびウエストナイルウイルス検査結果

平成18年度から平成20年度にかけて合計1,131個体（46種）のシギ・チドリ類等を国内で捕獲した（表2）。主要な捕獲種はトウネン（322個体）、キアシシギ（270個体）、シロガシラ（67個体）、オオジシギ（65個体）およびムナグロ（58個体）であった（図10）。

これらの捕獲個体より口腔内スワブを採取し、簡易診断キット（VecTest）およびLAMP法でウイルス検査を実施したところすべて陰性であった。したがって、これまでのところウイルスを保持した状態のシギ・チドリ類は日本国内へ渡ってきている可能性は低いことが分かった。しかし、極東ロシアのウエストナイルウイルスが分布していることと、移動距離を考慮すると今後も北海道においてウエストナイルウイルスのモニタリングを継続すべきである。以下に各年度の捕獲調

査およびウイルス検査状況を示す。

表 2 平成 18 年度から平成 20 年度に捕獲されたシギ・チドリ類等

	捕獲数	北海道						熊本県	沖縄県
		コムケ湖	春国岱	釧路湿原	厚岸町白浜	えりも岬	ウトナイ湖	荒尾市牛水	沖縄本島
2006年度	428個体	170	118	3	-	1	48	23	65
2007年度	486個体	141	147	-	1	-	-	-	197
2008年度	217個体	163	48	-	-	-	-	-	6

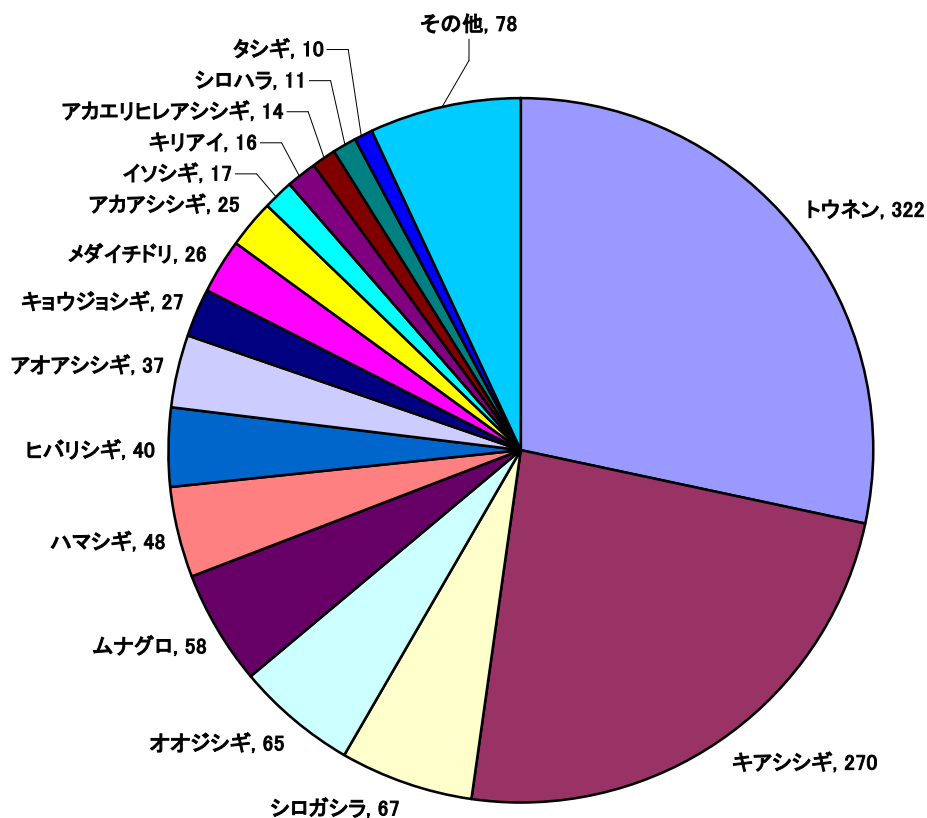


図10 捕獲されたシギ・チドリ類等の種内訳

1) 2006年度捕獲調査およびウエストナイルウイルス検査結果

平成18年8月1日～平成18年11月30日まで可能な限りかすみ網による捕獲を試みた。しかし天候や干満の状況により、鳥の行動が変化し、全く捕獲できない時もあった。なお連日調査を行うこともあったが、シギ・チドリ類の捕獲は夜間に行うため、実際には午後12時をまたいで日付が変わるが、網を開けた時点の日付を捕獲日として記録した。本調査において捕獲したシギ・チドリ

類は18種340個体であった(表3)。

表3. 捕獲シギ・チドリ類一覧

場所		春国岱	コムケ湖	ウトナイ湖	釧路湿原	その他	合計
捕獲個体数		118	170	48	3	1	340
種内訳	トウネン	<i>Calidris ruficollis</i>	18	91			109
	キアシシギ	<i>Tringa brevipes</i>	94	6			100
	オオジシギ	<i>Gallinago hardwickii</i>		14	46	2	62
	アオアシシギ	<i>Tringa nebularia</i>		15			15
	メダイチドリ	<i>Charadrius mongolus</i>	1	11			12
	イソシギ	<i>Tringa hypoleucos</i>		8			8
	ヒバリシギ	<i>Calidris subminuta</i>	2	5			7
	エリマキシギ	<i>Philomachus pugnax</i>		6			6
	タシギ	<i>Gallinago gallinago</i>		4			4
	ハマシギ	<i>Calidris alpina</i>		4			4
	ヤマシギ	<i>Scolopax rusticola</i>			2	1	4
	キョウジョシギ	<i>Arenaria interpres</i>	2				2
	ソリハシシギ	<i>Xenus cinereus</i>	1	1			2
	オグロシギ	<i>Limosa limosa</i>		1			1
	コオバシギ	<i>Calidris canutus</i>		1			1
	コアオアシシギ	<i>Tringa stagnatilis</i>		1			1
	キリアイ	<i>Limicola falcinellus</i>		1			1
	コチドリ	<i>Charadrius dubius</i>		1			1

春国岱（風蓮湖）では、潟を含む湿地帯にかすみ網を設置し、捕獲を試みた。網場周辺は、多くのシギ・チドリ類が餌場として利用している。捕獲時は、鳥を誘引するためスピーカー用いて鳥の声を流した。音声は、春国岱（風蓮湖）において優先種として見られるキアシシギを主として各種シギ・チドリ類の鳴き声を構成して作成した。

コムケ湖では、潟を含む湿地帯および浅瀬のある河川流域に網を設置し、捕獲を行った(図11)。網場周辺は、昼夜とも多くのシギ・チドリ類が餌場として利用している。網にかかったシギ・チドリ類は暴れることによる体力の消耗や夜間の気温低下による低体温症が懸念され、早急に網から外す必要があった。時間とともに網場周辺は潮の干満によって水位が変化する。コムケ湖は網場が広く、網から鳥を安全に外すことができなくなる可能性があることから、誘引用の音声を使用することは控えた。

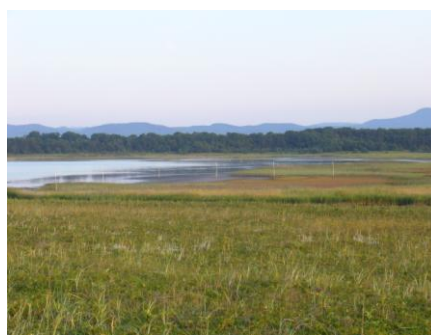


図11 コムケ湖における捕獲調査の状況

釧路湿原では、草地および河川を含む湿地帯にかすみ網を設置し、特にジシギ類を対象として夕方および朝方に捕獲作業を行った。網へ誘引するため、ヤマシギおよびオオジシギの鳴き声を用いた。

ウトナイ湖では、湿地帯にかすみ網を設置し、誘引用音声を用いてオオジシギの捕獲を行った。また傷病救護されたヤマシギ2個体よりサンプルの提供を受け、検査を実施した。

さらに調査協力者から、えりも岬にて事故死したヤマシギ1個体の提供を受け、検査を実施した。

各種のシギ・チドリ類を捕獲した春国岱（風蓮湖）およびコムケ湖において、調査月の上半旬・下半旬毎の捕獲鳥類種と数をまとめた(図12)。春国岱（風蓮湖）における秋の渡りは、7月中旬から8月中旬に見られるとの情報通り(地元有識者私信)、8月上旬に多種のシギ・チドリ類を捕獲した。春国岱（風蓮湖）において、日中の観察ではキアシシギ、ハマシギ、トウネン、メダイチドリが優先種として確認されたが、実際には音声による誘引を行ったキアシシギが多く捕獲された。コムケ湖は、日中の観察から、トウネン、ハマシギ、次いでアオアシシギ、メダイチドリ、チュウシャクシギなどが優先種として確認された。コムケ湖の捕獲網場は、潮位によって干潟の露出度が大きく異なり、特に浅い潟にて集団で採餌行動を行うトウネンが多く捕獲された。

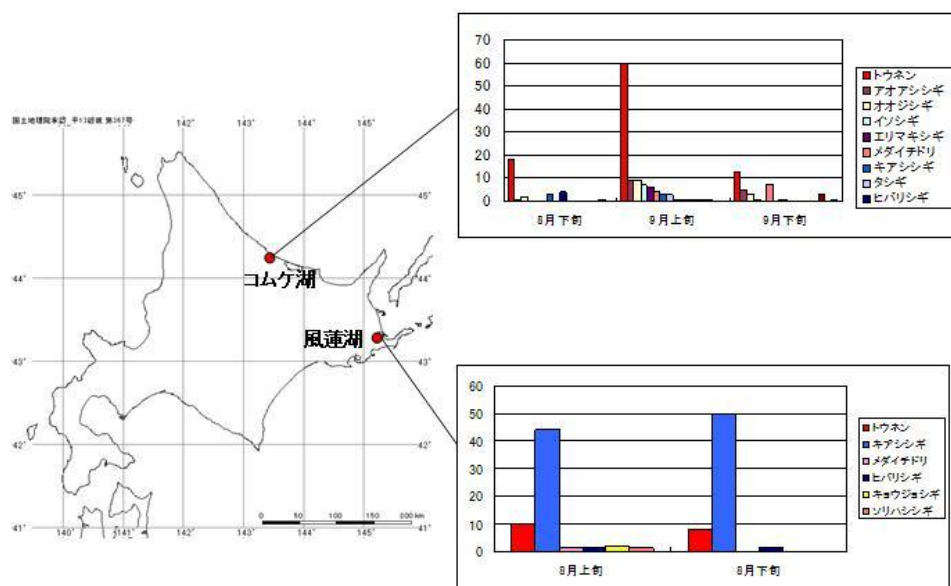


図12 コムケ湖および風蓮湖における半月別捕獲状況

沖縄県・においては平成19年2月25日～平成19年3月31日に捕獲調査を実施した。比屋根湿地において捕獲したシギ・チドリ類は9種 65個体であった(表4)。この他にウグイス(*Cettia diphone*)、カワセミ(*Alcedo atthis*)、ギンムクドリ(*Sturnus sericeus*)、ゴイサギ(*Nycticorax nycticorax*)、コガモ(*Anas crecca*)、ササゴイ(*Butorides striatus*)、シロハラ(*Turdus pallidus*)が各1個体捕獲された。沖縄県では前述した個体のほかに、平成19年1月19日豊見城においてクロツラヘラサギ(*Platalea minor*)1個体より診断用サンプルを採取した。

表4 沖縄県における捕獲シギ・チドリ類一覧。

	種	捕獲個体数
ムナグロ	<i>Pluvialis fulva</i>	23
アオアシシギ	<i>Tringa nebularia</i>	19
ヒバリシギ	<i>Calidris subminuta</i>	12
タシギ	<i>Gallinago gallinago</i>	4
イソシギ	<i>Actitis hypoleucos</i>	2
キアシシギ	<i>Heteroscelus brevipes</i>	2
シマキンパラ	<i>Lonchura punctulata</i>	1
セイタカシギ	<i>Himantopus himantopus</i>	1
チュウシャクシギ	<i>Numenius phaeopus</i>	1
合計		65

熊本県においては平成 19 年 1 月 16 日に荒尾市牛水において捕獲調査を実施した。捕獲したシギ・チドリ類は 3 種 23 個体であった(表 5)。

表5 熊本県における捕獲シギ・チドリ類一覧。

	種	捕獲個体数
ハマシギ	<i>Calidris alpina</i>	16
シロチドリ	<i>Charadrius alexandrinus</i>	6
メダイチドリ	<i>Charadrius mongolus</i>	1
合計		23

捕獲したシギ・チドリ類428個体（23種）においてVecTestによるウイルス検査を実施したところ全個体陰性であった。

2) 2007年度捕獲調査およびウエストナイルウイルス検査結果

平成19年6月1日～12月28日まで各調査地において可能な限りかすみ網による捕獲を試みた。しかし天候や干満の状況により、鳥の行動が変化し、全く捕獲できない時もあった。なお連日調査を行うこともあったが、シギ・チドリ類の捕獲は夜間に行うため、実際には午後12時をまたいで日付が変わるが、網を開けた時点の日付を捕獲日として記録した。

またその他にヤマシギ1羽がWLCに保護収容された。ヤマシギは厚岸町白浜にてネットに絡網していたところを保護されたもので、治療を施したが極度の衰弱のため死亡した。

本調査において捕獲および保護収容したシギ・チドリ類は19種289個体であった。(表6)。

表6 収集シギ・チドリ類一覧

	場所	春国岱	コムケ湖	WLC	合計
	個体数	1 4 7	1 4 1	1	2 8 9
種内訳	アオアシシギ	<i>Tringa nebularia</i>	3		3
	アカエリヒレアシシギ	<i>Phalaropus lobatus</i>	1		1
	オオジシギ	<i>Gallinago hardwickii</i>	3		3
	オオソリハシシギ	<i>Limosa lapponica</i>	3		3
	キアシシギ	<i>Tringa brevipes</i>	1 2 7		1 2 7
	キョウジョシギ	<i>Arenaria interpres</i>	4		4
	キリアイ	<i>Limicola falcinellus</i>	7		7
	コアオアシシギ	<i>Tringa stagnatilis</i>	2		2
	コオバシギ	<i>Calidris canutus</i>	1		1
	サルハマシギ	<i>Calidris ferruginea</i>	1		1
	ソリハシシギ	<i>Xenus cinereus</i>	3	2	5
	ダイゼン	<i>Pluvialis squatarola</i>	1		1
	タカブシギ	<i>Tringa glareola</i>	2		2
	タシギ	<i>Gallinago gallinago</i>	1		1
	トウネン	<i>Calidris ruficollis</i>	7	8 8	9 5
	ハマシギ	<i>Calidris alpina</i>	2 1		2 1
	ヒバリシギ	<i>Calidris subminuta</i>	1	4	5
	メダイチドリ	<i>Charadrius mongolus</i>	6		6
	ヤマシギ	<i>Scolopax rusticola</i>		1	1

春国岱は、根室湾と風蓮湖の間に形成された大きな砂州である。小型の手漕ぎ船を用いて春国岱の南側に位置する潟へ渡り、湿地帯にかすみ網を設置し捕獲を試みた（図13）。捕獲場周辺は、多くのシギ・チドリ類が餌場として利用している。調査の時は、鳥を誘引するためスピーカー用いて鳥の声を流した。音声は、春国岱（風蓮湖）において優先種として見られるキアシシギを主として各種シギ・チドリ類の鳴き声を構成して使用した。



図13 春国岱調査風景

コムケ湖は、オホーツク海に面し狭い沿岸砂州で隔てられた汽水湖である。川を渡り、潟を含む湿地帯および浅瀬のある河川流域に網を設置し捕獲を行った。網場周辺は、昼夜とも多くのシギ・チドリ類が餌場として利用している。網場周辺は時間とともに潮の干満によって水位が大きく変化する。コムケ湖は網場が広く、網から鳥を安全に外すことができなくなる可能性があることから、誘引用の音声を使用することは控えた。釧路市釧路湿原野生生物保護センターにおいてもかすみ網を設置し、捕獲を試みたものの捕まらなかった。

春国岱およびコムケ湖において、調査月の月上旬・下旬毎の捕獲鳥類種と数をまとめた(図14)。春国岱における秋の渡りは、7月中旬から8月中旬と言われており、昨年の調査同様8月上旬に多数を捕獲した。春国岱において、日中の観察ではキアシシギ、ハマシギ、トウネン、メダイチドリが優先種として確認されたが、実際には音声による誘引を行ったキアシシギが多く捕獲された。コムケ湖では、日中の観察からトウネン、ハマシギ、次いでアオアシシギ、メダイチドリ、チュウシャクシギなどが優先種として確認された。他種に渡るシギ・チドリが捕獲されたが最も多かったのはトウネンであった。これは潮位によって捕獲場所の干潟の露出度が大きく異なることから、特に浅い潟にて集団で採餌を行うトウネンの特性によるものと考えられた。

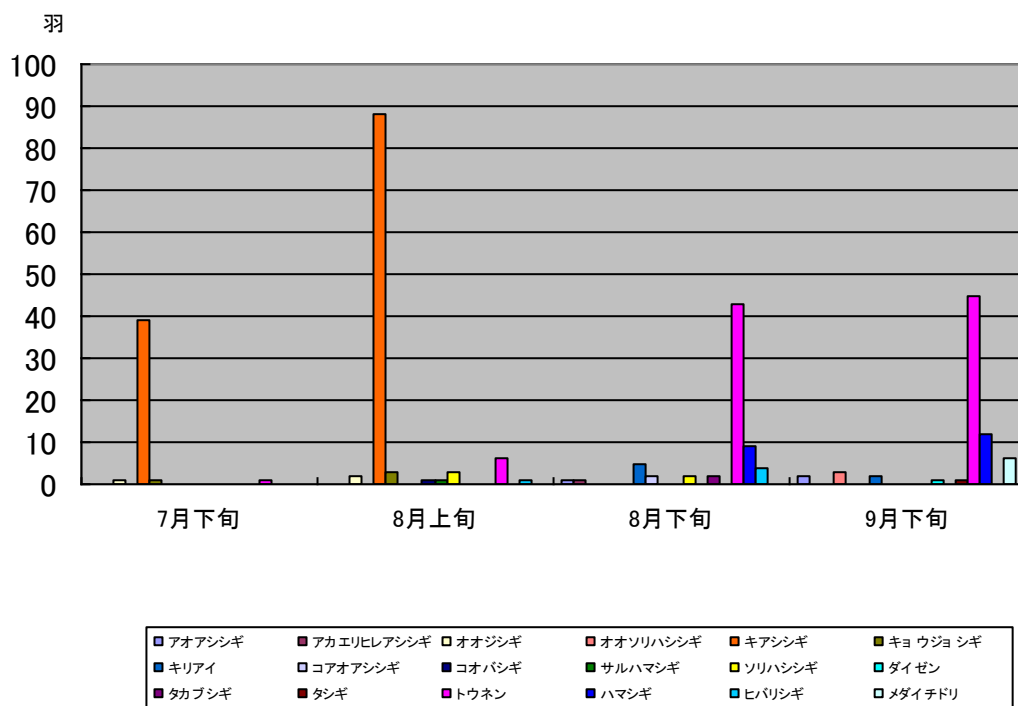


図14 半月別捕獲鳥数

沖縄県においては平成20年2月25日～平成20年3月31日に捕獲調査を実施した。比屋根湿地において捕獲した野鳥は19種191個体であった(表7)。これに加えて沖縄県・NPO法人どうぶつたちの病院が収容した傷病個体5種6個体よりウイルス検査用の口腔内スワブを採取した。その結果、合計で23種197個体よりウイルス検査用スワブを採取した。

北海道で捕獲したシギ・チドリ類289個体、沖縄県で捕獲したシギ・チドリ類197個体、合計486個体についてVecTestおよびLAMP法を用いてウイルス検査を実施したところ全個体陰性であった。

3) 2008年度捕獲調査およびウエストナイルウイルス検査結果

平成20年6月1日～12月26日まで各調査地において可能な限りかすみ網による捕獲を試みた。しかし天候や干満の状況により、鳥の行動が変化し、全く捕獲できない時もあった。なお連日調査を行うこともあったが、シギ・チドリ類の捕獲は夜間に行うため実際には午後12時をまたいで日付が変わるが、便宜上、網を開けた期間を捕獲日として記録した。捕獲地の春国岱は、根室湾と風蓮湖の間に形成された大きな砂州である。小型の手漕ぎ船を用いて春国岱の南側に位置する潟へ渡り、湿地帯にかすみ網を設置し捕獲を試みた。捕獲場周辺は、多くのシギ・チドリ類が餌場として利用している。調査の時は、鳥を誘引するためスピーカー用いて鳥の声を流した。音声は、春国岱（風蓮湖）において優先種として見られるキアシシギを主として各種シギ・チドリ類の鳴き声を構成して使用した。調査期間中、計5種48羽を捕獲した。

最も多く捕獲したのは、キアシシギ(n=38)であり、次いでトウネン(n=14)、その他はオオソリハシシギ、オオメダイチドリ、キョウジョシギ、それぞれ1羽であった(表3)。全ての個体から、ウエストナイル熱診断用のスワブサンプルを採取した。

コムケ湖はオホーツク海に面し狭い沿岸砂州で隔てられた汽水湖である。川を渡り、潟を含む湿地帯および浅瀬のある河川流域に網を設置し捕獲を行った。網場周辺は、昼夜とも多くのシギ・チドリ類が餌場として利用している。網場周辺は時間とともに潮の干満によって水位が大きく変化する。コムケ湖は網場が広く、網から鳥を安全に外すことができなくなる可能性があることから、誘引用の音声を使用することは控えた。調査期間中、18種163羽を捕獲した。最も多かったのはトウネン(n=104)であり、次いでアカエリヒレアシシギ(n=13)、キリアイ(n=8)、ハマシギ(n=7)、メダイチドリ(n=7)、キアシシギ(n=6)、イソシギ(n=3)、ヒバリシギ(n=3)、アオアシシギ(n=2)、コオバシギ(n=2)で、その他はエリマキシギ、オジロトウネン、キョウジョシギ、コチドリ、ソリハシシギ、タカブシギ、タシギ1羽ずつ捕獲した。またシギ・チドリ類ではないが、カワセミも1羽捕獲されたため、採材した(表3)。また、これらには前述の通り、再捕獲個体から重複したサンプルが含まれている。

釧路市釧路湿原野生生物保護センターにおいてもかすみ網を設置し、捕獲を試みたものの捕まらなかった。

捕獲した鳥類は総計20種となり、サンプルを採材した鳥は計211羽であった。各場所の捕獲した数の内訳は以下のとおりである(表8)。

表7 沖縄県における捕獲鳥類一覧

種名	捕獲数
アオアシシギ <i>Tringa nebularia</i>	1
アカアシシギ <i>Tringa totanus</i>	25
イソシギ <i>Tringa hypoleucos</i>	4
ウグイス <i>Cettia diphone</i>	3
カルガモ <i>Anas poecilorhyncha</i>	1
カワセミ <i>Alcedo atthis</i>	1
キアシシギ <i>Tringa brevipes</i>	3
キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	1
キョウジョシギ <i>Arenaria interpres</i>	19
コガモ <i>Anas crecca</i>	1
コチドリ <i>Charadrius dubius</i>	2
ササゴイ <i>Butorides striatus</i>	1
シロガシラ <i>Pycnonotus sinensis</i>	67
シロチドリ <i>Charadrius alexandrinus</i>	1
シロハラ <i>Turdus pallidus</i>	11
ツバメチドリ <i>Glareola maldivarum</i>	1
チュウシャクシギ <i>Numenius phaeopus</i>	1
チュウジシギ <i>Gallinago megala</i>	1
バン <i>Gallinula chloropus</i>	1
ヒバリシギ <i>Calidris subminuta</i>	13
ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	5
ムナグロ <i>Pluvialis dominica</i>	32
メジロ <i>Zosterops japonica</i>	2
合計	197

表8 各地における捕獲鳥数

収集地			網走市 コムケ湖	根室市 春国岱	計
個体数			163	48	211
種内訳	アオアシシギ	<i>Tringa nebularia</i>	2		2
	アカエリヒレアシシギ	<i>Phalaropus lobatus</i>	13		13
	イソシギ	<i>Tringa hypoleucos</i>	3		3
	エリマキシギ	<i>Philomachus pugnax</i>	1		1
	オオソリハシシギ	<i>Limosa lapponica</i>		1	1
	オオメダイチドリ	<i>Charadrius leschenaultii</i>		1	1
	オジロトウネン	<i>Calidris temminckii</i>	1		1
	カワセミ	<i>Alcedo atthis</i>	1		1
	キアシシギ	<i>Tringa brevipes</i>	6	31	37
	キョウジョシギ	<i>Arenaria interpres</i>	1	1	2
	キリアイ	<i>Limicola falcinellus</i>	8		8
	コオバシギ	<i>Calidris canutus</i>	2		2
	コチドリ	<i>Charadrius dubius</i>	1		1
	ソリハシシギ	<i>Xenus cinereus</i>	1		1
	タカブシギ	<i>Tringa glareola</i>	1		1
	タシギ	<i>Gallinago gallinago</i>	1		1
	トウネン	<i>Calidris ruficollis</i>	104	14	118
	ハマシギ	<i>Calidris alpina</i>	7		7
	ヒバリシギ	<i>Calidris subminuta</i>	3		3
	メダイチドリ	<i>Charadrius mongolus</i>	7		7

沖縄県においてはNPO法人どうぶつたちの病院に保護収容されたムナグロ（3個体）、オバシギ（1個体）、キアシシギ（1個体）、セイタカシギ（1個体）からウイルス検査用サンプルを採取した。

北海道で捕獲したシギ・チドリ類211個体、沖縄県で捕獲したシギ・チドリ類6個体、合計217個体についてVecTestおよびおよびLAMP法を用いてウイルス検査を実施したところ全個体陰性であった。

（２）ロシア連邦およびタイ王国における捕獲調査およびウエストナイルウイルス検査結果

平成18年度にロシア連邦およびタイ王国にもモニタリング地点を設定した。ロシア連邦・ボロンスキー自然保護区ではコウノトリ(*Ciconia boyciana*)17個体より口腔内スワブを採取し、VecTestによる検査を実施した(図15)。その結果、全個体陰性であることを確認した。



図15 ロシア連邦・ボロン自然保護区で調査対象となったコウノトリのヒナ。

また、ボロンスキー自然保護区より情報提供を受けたところ、2006年から2007年の間にアジサシ（1個体）、カワウ（1個体）、セグロカモメ（2個体）、マガモ（3個体）でウエストナイルウイルス抗体が検出され、セグロカモメ（1個体）およびヨシガモ（1個体）でウエストナイルウイルスの遺伝子が検出されていることが分かった。そのため、ボロンスキー自然保護区内においてもウエストナイルウイルスが分布している可能性が高いことが分かった。

タイ王国・カセサート大学構内では20種40個体と種不明2個体、合計42個体の野鳥を捕獲しウイルス検査用の口腔内スワブを採取した（表9）。これらのサンプルを使用して簡易診断キットを使用して検査を実施したところ、1個体（White-thorated kingfisher、*Halcyon smyrnensis*）で陽性反応が見られた。この検体をRT-PCR法およびLAMP法で再検査したところ陰性であった。

表9 タイ王国・カセサート大学における捕獲鳥類一覧

種名		捕獲数
Asian koel	<i>Eudynamys scolopacea</i>	2
Asian Pied Starling	<i>Sturnus contra</i>	1
Black drongo	<i>Dicrurus macrocerus</i>	3
Black-capped kingfisher	<i>Halcyon pileata</i>	1
Blue-winged pitta	<i>Pitta moluccensis</i>	1
Brahminy Kite	<i>Haliastur indus</i>	1
Fulvous-breasted woodpecker	<i>Dendrocopos macei</i>	1
Indian Scops-Owl	<i>Otus bakkamoena</i>	1
Japanese sparrowhawk	<i>Accipiter gularis</i>	2
Peaceful dove	<i>Geopelia striata</i>	3
Red collared dove	<i>Streptopelia tranquebarica</i>	2
Rock pigeon	<i>Columba livia</i>	5
Sooty-headed bulbul	<i>Pycnonotus aurigaster</i>	1
Spotted dove	<i>Streptopelia chinensis</i>	5
Streak-eared bulbul	<i>Pycnonotus blanfordi</i>	4
The oriental magpie robin	<i>Copsychus saularis</i>	1
Tree Sparrow	<i>Passer montanus</i>	1
White-breasted waterhen	<i>Amaurornis phoenicurus</i>	1
White-thorated kingfisher	<i>Halcyon smyrnensis</i>	3
White-vented myna	<i>Acridotheres grandis</i>	1
unknown	unknown	2
合計		42

5. 本研究により得られた成果

（1）科学的意義

体制構築の面では、今回のプロジェクトでバンダーと獣医師が共同してモニタリングを試行し、これまでに別個に実施されていた鳥類の標識調査と感染症調査を連携して行う体制が構築できた。このような体制を渡り鳥の重要な中継地である北海道および沖縄県で順次構築し、定着させていくことによって、ウエストナイル熱ウイルスのモニタリング体制を全国規模で展開していくためのモデルケースとなった。

大規模なモニタリングを実施する場合の効率的な検査方法についても検討することができた。VecTest は種によって疑陽性反応が観察されやすいことが報告されている。しかしながら、今回対

象としたシギ・チドリ類では診断が困難な疑陽性反応は観察されなかった。したがって、VecTest はシギ・チドリ類を対象にウエストナイルウイルスのモニタリングを実施する場合に有用な診断キットであることが確認された。また、平成 19 年度より導入した LAMP 法は検体中に 50 コピーのウイルスが存在すれば検出可能である。国内において高感度検出法によるウエストナイルウイルスのモニタリング体制を構築したことは、ウエストナイルウイルスの疫学調査・研究をするうえで非常に意義がある。

平成 18 年度から平成 20 年度かけて合計 1,131 個体（46 種）のシギ・チドリ類等を捕獲し、すべて陰性であることを確認した。そのため、これまでのところウイルスを保持した状態のシギ・チドリ類は日本国内へ渡ってきている可能性は低いことが分かった。しかし、極東ロシアのウエストナイルウイルスが分布していることと、移動距離を考慮すると今後も北海道においてウエストナイルウイルスのモニタリングを継続すべきである。特に北海道で捕獲を実施したコムケ湖と春国岱（風蓮湖）においては全捕獲数の 69.9%にあたる 787 個体の捕獲に成功している。そのため、両地域ともウエストナイル熱の効率的なモニタリング地区であるといえる。

（２）地球環境政策への貢献

シギ・チドリ類を対象として現場での安全性を確保しながら如何に精度の高い感染症検査を行うかのモデルを提供し、我が国へのウエストナイル熱ウイルス（WNV）侵入に備えたモニタリング体制の構築を行うことは、鳥インフルエンザのモニタリングとは異なる知見とノウハウを蓄積することとなる。この点で、将来 WNV 侵入が起こった際に迅速に我が国の生態系への影響を最小限にするための対策を立案することが可能となる上に、社会的安全性を確保する上でも重要な知見・技術となる。

6. 引用文献

- 1) W.B. Stone, J.C. Okoniewski, J.E. Therrien, L.D. Kramer, E.B. Kauffman and M.E. Eidson: Emerging infectious diseases, 10, 12, 2175-2181(2004) “VecTest as diagnostic and surveillance tool for West Nile virus in dead birds”
- 2) Parida M., Posadas M., Inoue S., Hasebe F., and Morita K.. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. J.Clin. Microbiol. Vol.42: 257-263,2004.

7. 国際共同研究等の状況

2007年6月22日から6月28日までロシア連邦・ボロン自然保護区においてコウノトリの捕獲調査を日露共同で実施した際、日本側が提供した診断キットによってトリインフルエンザウイルスとウエストナイルウイルスの検査を実施した。また、ロシア側からはこれまでに実施したトリインフルエンザウイルスとウエストナイルウイルスのモニタリング結果に関する情報提供があった。そして、日露間でトリインフルエンザウイルスおよびウエストナイルウイルスのモニタリングに関する情報交換を今後も継続することに合意した。また、タイ王国・カセサート大学とも共同でウエストナイルウイルスのモニタリングを実施できる体制が構築できた。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上发表

<論文(査読あり)>

- 1) Murata, K., Asumi Tamada, Yoko Ichikawa, Mio Hagihara, Yukita Sato, Hiroshi Nakamura, Masahiko Nakamura, Takaaki Sakanakura and Mitsuhiko Asakawa. 2007. Geographical Distribution and Seasonality of the Prevalence of *Leucocytozoon lovati* in Japanese Rock Ptarmigans (*Lagopus mutus japonicus*) found in the Alpine Regions of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 171-176.
- 2) 村田浩一、佐藤雪太、津田良夫、沢辺京子、齋藤慶輔、渡邊有希子、浅川満彦、大沼 学、桑名 貴. 2007. シギ・チドリ類の血液原虫感染を指標とした節足動物媒介性感染症のモニタリング. 獣医寄生虫学会誌, 6(1) : 42.
- 3) Murata, S., Chang, K-S., Yamamoto, Y., Okada, T., Lee, S-I., Konnai, S., Onuma, M., Osa, Y., Asakawa, M., and Ohashi, K. 2007. Detection of the Marek's disease virus genome from feather tips of wild geese in Japan and the Far East region of Russia. *Arch. Virol.*,152(8):1523-1526..
- 4) 大沼 学、大島由子、久田裕子、岡本 実、上林亜紀子、志村良治、齋藤慶輔、村田浩一、桑名 貴、浅川満彦. 2007. 北海道産希少鳥類を対象にした寄生原虫類に関する疫学および病理学的検討. 獣医寄生虫学会誌, 6(1) : 27.
- 5) 吉野智生、国藤泰輔、渡辺竜己、久木田優美、前田秋彦、萩原克郎、村田浩一、大沼 学、桑名 貴、浅川満彦. 2007. 輸入牧草に混入北海道内でその死体が発見されたホシムクドリ *Sturnus vulgaris* の記録. 北海道獣医師会誌, 51: 68-70.
- 6) 大沼学、桑名貴. 2007 : ウエストナイル熱の野鳥への影響と野生鳥類モニタリング全国環境研会誌、32,4,173-177
- 7) 村田浩一、佐藤雪太、津田良夫、沢辺京子、齋藤慶輔、渡邊有希子、浅川満彦、大沼 学、桑名 貴: 2008 シギ・チドリ類の血液原虫感染を指標とした節足動物媒介感染症モニタリング. 日獣寄生虫会誌 6: 42,.
- 8) T. Yoshino T, M. Onuma, T. Nagamine, M. Inaba, T. Kawashima, K. Murata, K. Kawakami, T. Kuwana, and M. Asakawa: (2008) "First record of the genus *Heterakis*(Nematoda: Heterakidae) obtained from two scarce avian species, Japaneserock ptarmigan (*Lagopus mutus japonicus*) and Okinawa rails (*Gallirallus okinawae*),in Japan" *Jpn. J. Nematol.*, 38 (2), 89-92.
- 9) M. Asakawa, M. Onuma, T. Yoshino, K. Aizawa, H. Sasaki, A. Maeda, M. Ssaito, N. Kato, T. Morita, K. Murata, T. Kuwana: (2008) "Risk Assessment of Japanese Avian Infectious Diseases Performed by the Wild Animal Medical Center (WAMC), Rakuno Gakuen University, Japan" *J. Vet. Epidemiol.*: 12, 25-26.
- 10) 吉野智生・長 雄一・遠藤大二・金子正美・高田雅之・田村 豊・大沼 学・桑名 貴・浅川満彦(2008) "野生鳥類の寄生蠕虫類を対象にした地理情報システム (GIS) を用いた空間疫学的解析の一例": 日本生物地理学会報, 63, 217-222
- 11) C. Zhao, M. Onuma, M. Asakawa and T. Kuwana: (2009) "Preliminary studies on developing a nested PCR assay for molecular diagnosis and identification of nematode (*Heterakis isolonche*) and trematode (*Glaphyrostomum* sp.) in Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*)" *Vet Parasitol.*, in press

- 1 2) T. Yoshino, S. Nakamura, D. Endoh, M. Onuma, Y. Osa, H. Teraoka, F. Tenora, V. Barus, T. Kuwana and M. Asakawa: (2009) "A helminthological survey in the waterfowls including Ardeidae, Rallidae and Scolopacidae of Hokkaido, Japan" J. Yamashina, in press
- 1 3) T. Yoshino, Shingaki T, Onuma M, Kinjo T, Yanai T, Fukushi H, Kuwana T, M. Asakawa: (2009) "Parasitic helminths and arthropods of the Crested Serpent Eagle, *Spilornis cheela perplexus* Swann, 1922 from the Yaeyama Archipelago, Okinawa, Japan" J. Yamashina, in press

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 大沼 学、吉野智生、渡邊秀明、大島由子、岡本 実、志村良治、渡辺有希子、齋藤慶輔、桑名 貴、村田浩一、谷山弘行、浅川満彦: (2008) "飼育施設あるいは野外において斃死した希少野生鳥類の寄生蠕虫類：その保有状況の最近事例のまとめ" 獣医寄生虫学会誌, 6(2) : 86
- 2) 吉野智生・相澤空見子・渡邊秀明・大沼 学・桑名 貴・村田浩一・浅川満彦: (2008) "酪農学園大学野生動物医学センターで登録された獣医鳥類学標本（第3報）" 酪農学園大学紀要(自然科学編), 33, 1-12
- 3) 浅川満彦、堀上敦子、和田みどり、相澤空見子、渡邊秀明、吉野智生、岡本実、大沼学、村田浩一、桑名 貴: (2008) "北海道オホーツク海沿岸で大量死したハシボソミズナギドリ (*Puffinus tenuirostris*) の剖検－特に寄生虫学的な所見を中心として" 獣医寄生虫学会誌, 7(1), 21
- 4) 吉野智生・藤本 智・小林伸行・前田秋彦・前田潤子・大沼 学・桑名 貴・村田浩一・浅川満彦: (2009) "帯広市内で発見されたハシブトガラス *Corvus macrorhynchos* 白化個体死体のウイルス学的検査および剖検記録" 北海道獣医師会誌, 53, 165-167

(2) 口頭発表（学会）

- 1) 浅川満彦、大沼 学、吉野智生、佐々木 均、前田秋彦、長嶺 隆、天野洋祐、斉藤美加、加藤智子、盛田 徹、村田浩一、桑名 貴. 2007. 酪農学園大学野生動物医学センターWAMCにおける野鳥病原体感染のリスク評価研究（概要紹介）. 第13回日本野生動物医学学会大会(2007年9月6～9日,岩手大学).
- 2) 大沼 学、吉野智生、渡邊秀明、大島由子、岡本 実、志村良治、渡辺有希子、齋藤慶輔、桑名 貴、村田浩一、谷山弘行、浅川満彦. 2007. 飼育施設あるいは野外において斃死した希少野生鳥類の寄生蠕虫類：その保有状況の最近事例のまとめ. 第144回日本獣医学会学術集会(2007年9月、酪農学園大学).
- 3) 吉野智生、長雄一、高田雅之、金子正美、遠藤大二、大沼学、桑名貴、村田浩一、田村豊、浅川満彦. 2007. 北海道内で生息・飛来が記録された水鳥類の線虫類概要とその宿主-寄生体関係の空間疫学的な解析と今後の方向性. 第13回日本野生動物医学学会大会(2007年9月,岩手大学).
- 4) Asakawa, M., Onuma, M., Murata, K., Kuwana, T. 2007. Viral and parasitic disease monitoring program of Japanese avian species performed by the Wild Animal Medical Center (WAMC), Rakuno Gakuen University WDA (Wildlife Disease Association) Austrasia Annual Conference 2007. (Perth Zoo, Sep. 2007).
- 5) 浅川満彦、大沼 学、吉野智生、相澤空見子、佐々木 均、前田秋彦、斉藤美加、加藤智子、

- 盛田 徹、村田浩一、桑名 貴. 2008. 酪農学園大学野生動物医学センターWAMC を拠点とした野鳥病原体感染リスク評価研究の概要. 第24回獣疫学会学術集会. (2008年3月、麻布大学).
- 6) 浅川満彦、大沼 学、吉野智生、相澤空見子、佐々木 均、前田秋彦、斉藤美加、加藤智子、盛田 徹、村田浩一、桑名 貴: 第24回獣疫学会学術集会(2008)"酪農学園大学野生動物医学センターWAMCを拠点とした野鳥病原体感染リスク評価研究の概要"
- 7) 浅川満彦・吉野智生・渡辺秀明・岡本実・大沼学・村田浩一・桑名貴: 日本寄生虫学会第77回大会(2008)"北海道内同一箇所で見つかった海鳥類死体の剖検時に得られた寄生蠕虫類の概要"
- 8) Asakawa, M., Manabu Onuma, Koichi Murata, Takashi Kuwana: 3rd International Meeting on Asian Zoo/Wildlife Medicine and Conservation (2008) "An overview of viral and parasitic disease monitoring program of Japanese avian species performed by the Wild Animal Medical Center (WAMC), Rakuno Gakuen University between 2006 and 2007"
- 9) Asakawa, M., M Onuma, K Murata, T Kuwana: 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria (2008)"An overview of viral and parasitic disease monitoring program of Japanese avian species performed by the Wild Animal Medical Center (WAMC), Rakuno Gakuen University between 2006 and 2007"
- 10) 吉野智生、遠藤大二、大沼 学、長 雄一、寺岡宏樹、桑名 貴、浅川満彦: 第14回日本野生動物医学会大会(2008)"北海道産サギ科およびクイナ科鳥類から得られた寄生蠕虫類とその疫学および生態学的特色"
- 11) Chen Zhao、大沼 学、浅川満彦、桑名貴: 第14回日本野生動物医学会大会(2008) "ヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) の消化管内寄生虫の遺伝子診断法に関する研究"
- 12) Asakawa, M., M Onuma, K Murata, T Kuwana: Ann. Conf. of Wildlife Disease Association (Australasian Sec) (2008) "Postmortem examinations of carcasses of sea birds found in Hokkaido, Japan, between 2004 and 2007 and its pathobiological overview"
- 13) Asakawa M, Onuma M, Murata K, Kuwana T 36th Ann Meet. Pacific Seabird Group (2009) "Postmortem Examination of Carcasses of Seabirds Found in Hokkaido, Japan, Between 2004 and 2008: Its Pathobiological Overview"

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし