

課題名 D-0907 渡り鳥による希少鳥類に対する新興感染症リスク評価に関する研究

課題代表者名 桑名 貴(近畿大学先端技術総合研究所)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 114,567千円(うち23年度 34,243千円)

予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) 渡り鳥の移動経路と感染症伝播との関係究明に関する研究(東京大学農学部)
- (2) 希少鳥類への渡り鳥による感染症リスク解析研究(近畿大学先端技術総合研究所)
- (3) 超小型の野鳥位置探査システムの開発・改良研究(株式会社コア関西カンパニー)
- (4) 渡り鳥での新興感染症病原体に対する抗体反応性解析・評価に関する研究(琉球大学医学部)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

一般に、絶滅危惧鳥類は生態系の中で既に生息基盤が弱く、個体数も少なくなっていることも併せて繁殖能が低く、追加的外圧によって容易に絶滅する恐れがある。そのために、多種多様な鳥類で大量死を引き起こすウエストナイル熱が一旦野性鳥類に広がると、ウイルスを媒介する野外の吸血昆虫を減少させることが非常に困難であるために、生態系への多大な影響は避けられない。

既に、平成18年度～20年度に実施して来た「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(FY2006～FY2008)」では、①我が国を渡りのルートとするカモ類が、過去にウエストナイル熱ウイルス(WNV)に感染したことを示すWNV抗体を保有していた。カモ類の渡りルートでWNV汚染されている唯一の地域は極東ロシアのため、当該地域で吸血昆虫を介した感染が起こっていることが明確となった。ただし、我が国へのカモ類の渡りの時期が、国内で吸血昆虫(蚊)が発生するピークと一致していない冬期であるために、我が国へのWNV搬入の担い手となる可能性は低い。これに反して、②旅鳥として夏期に極東ロシアからシギ・チドリ類が飛来する渡りの時期は、吸血昆虫が我が国の湖沼近辺で大量発生するピークと完全に一致することも明らかになってきた。

上記の①、②の成果から、夏期に北方(繁殖地)から飛来してシギ・チドリ類がWNV侵入の媒体となる可能性が極めて高いとの結果を得るに至っている。

このような背景から、WNV汚染地区の詳細と汚染状況の究明が必要となってきた(図1)。また、これらガンカモと同じ極東ロシア地域で同じニッチを共有し、吸血昆虫を媒体としてWNV曝露を受けているシギ・チドリについての血清学的疫学調査を行うと共に、カモ類及びシギ・チドリの具体的な渡りの経路の解明が急務となっている。同時に、WNVに対して我が国のどの絶滅危惧鳥類の感受性が高いかを、開発してきた鳥類細胞培養系を用いて検討・評価し、緊急時に優先的に対策を講じるべき絶滅危惧鳥類種を予め決定しておく必要性が高くなっている。

2. 研究開発目的

絶滅危惧鳥類への新興感染症による絶滅危機を予測・回避するために、侵入が危惧されているウエストナイル熱の感染経路を予測すると共に、絶滅危惧鳥類種への危険度を評価することを目的とする。

本研究で開発する超小型GPS位置測定システムを用いて、ウエストナイル熱ウイルス(WNV)に対する抗体を持つ当年生まれの渡り鳥が極東ロシアのどの地域を帰巢地とするかをカモ類、シギ・チドリ類で調査することによって、極東ロシア地域の中でWNVの常在汚染地点を特定する。また、WNVを媒介する吸血昆虫の極東ロシアでの発生時期と繁殖期が一致し、日本への飛来時期が日本の吸血昆虫発生時期とが一致しているシギ・チドリ類での

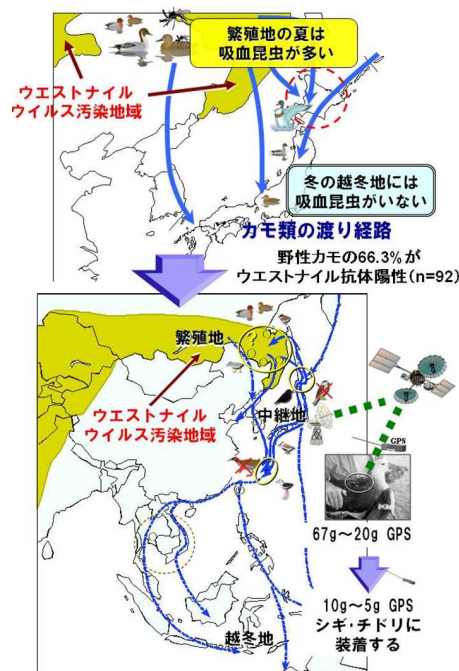


図1 研究の背景

WNV感染状況を調査する。加えて、我が国に侵入した際に絶滅危惧鳥類(シマフクロウ、オジロワシ、タ
ンチョウ、ヤンバルクイナ等の絶滅危惧鳥類種)のどの種に致命的な被害が生じるのかを細胞培養系を用いた
感染実験によって明らかにする。

3. 研究開発の方法

(1) 渡り鳥の移動経路と感染症伝播との関係究明に関する研究

- 1) カモ類の渡り経路追跡: ウエストナイル熱ウイルスへの抗体をもつことがある渡り鳥が東アジアでどのような渡り経路をもっているのかを明らかにする段階の一つとして、2011年1月に宮城県北部の伊豆沼(北緯38.72度、東経141.09度)でアルゴシステム用送信機(Microwave社製 PTT-100、5gタイプ: 詳細は昨年度報告を参照)を装着したオナガガモ3羽のうち、2011年4月以降も送信機の位置情報を得ることができた2羽を対象に、渡り経路を追跡した。
- 2) シギ類への送信機装着と移動追跡: オナガガモと同様に、ウエストナイル熱ウイルスへの抗体をもつことがある渡り鳥が東アジアでどのような渡り経路をもっているのかを明らかにするため、シギ・チドリ類を対象とした捕獲作業を2011年9月12日から14日にかけて、北海道紋別市南東に位置するコムケ湖(北緯44.27度、東経143.47度)で実施した。本研究プロジェクトで(株)コアが開発した新型送信機(約11g、54 x 20 x 14.3 mm)をチュウシャクシギ2羽とオオソリハシシギ1羽に装着した。装着は、表面を加工したテフロンリボンもちい、ランドセルのように背負わせる形で行った。これらに加えて、関連の情報を保管するために渡り鳥の飛行経路解明のための情報収集を学術論文、報告書、インターネット情報から行った。

(2) 希少鳥類への渡り鳥による感染症リスク解析研究

渡り鳥の捕獲は北海道のコムケ湖(シギ・チドリ類)と宮城県・伊豆沼(カモ類)で実施した。ウイルス抗原の検出はウエストナイル熱ウイルス簡易検査キット(商品名: VecTest West Nile Virus Antigen Assay)を使用した。ウイルス遺伝子の検出はLAMP法(栄研化学株式会社)で実施した。抗WNV抗体検出は間接酵素抗体法(間接ELISA法)で実施した。また、培養細胞を活用したウエストナイル熱ウイルス感受性試験を琉球大学(サブテーマ4)と共同で実施した。加えてウエストナイル熱ウイルスの感受性を規定しているOAS遺伝子がコードするアミノ酸配列と死亡率との関連を調べた。

(3) 超小型の野鳥位置探査システムの開発・改良研究

現状のアルゴ送信機は5g~10g程度のものが存在するが、アルゴ衛星から得られる情報はその測位方法の原理上、最善でも150m、場合によっては数km~数十kmの誤差が含まれる。この誤差は、地球規模の行動範囲を考えた場合には許容されるが、局所的な行動圏の考察には障害となる。当然、そのアルゴ衛星の欠点を補うGPSシステムも考案されてはいるが、①最軽量でも20g(機能が増えれば60g程度)のものしか存在しないために、中型以下の鳥類の行動を追跡することは至難であり、②軽量であることのみを追求した場合、動作電力の確保が難しく、GPS端末から中継基地への送信が不十分となり、さらに③高額(数十万円)で、手軽に入手できるものではないという問題が存在する。そこで、技術面の要因に起因するこれらの諸問題を解決するために、システムの構成要素であるGPSモジュール、GPSアンテナ、タイマー、電源、そして筐体等すべてについて新たに設計を行い、システム全体の小型・軽量化と省電力化を図った。そして、長期使用に耐え、かつ使い捨て可能で安価な野鳥位置探査システムの開発と改良を行なった。

平成21年度においては、小型・軽量化するために必要な技術的項目を明らかにすることを目標とし、①世界的・永続的な通信経路を確保するために世界的に実績のあるアルゴ衛星の使用、②アルゴ送信機のアンテナの効率化・小型化、③低電力消費・高性能GPSモジュールの最適化設計とスタンバイ機能、④長寿命電源を確保するための太陽電池・キャパシタを使用した電源装置とタイムスケジューリング機能、そして⑤耐久性・防水性のある軽量ハウジングを目的とした立体造形での筐体設計それぞれについて検討を行った。

平成22年度は、上記仕様の実現に向けて、①アルゴ送信機の構築とアナログ制御からデジタル制御への移行、②GPSモジュールの低消費化と最適化、③最先端太陽電池とキャパシタを使用した制御機能付電源装置の構築、④アルゴ送信機、GPSモジュール、CPU制御装置の一体化基板の構築⑤立体造形での軽量筐体の構築を行い、小型・軽量化を推し進めた。

平成23年度(研究終了時)は、①デジタル制御のアルゴ送信機の完成、②最先端太陽電池とキャパシタを使用した制御機能付電源装置の完成、③筐体の完成を行い、超軽量・小型GPSシステムを完成し、小・中型のシギ・チドリに装着し、システムの改良を図った。

(4) 渡り鳥での新興感染症病原体に対する抗体反応解析・評価に関する研究

- 1) 日本の湖沼等で捕獲されたシギ・チドリ類から得られた血液サンプルのウエストナイル熱ウイルスに対する抗体測定
 - a. 抗体測定に供された血液サンプル: 2011年8月と9月に北海道東部コムケ湖で捕獲されたシギ・チドリ類から採血された血液材料110検体について検討した。

b. 抗体測定の方法：微量サンプルに適応したマイクロ・フォーカス減少法による中和試験でウエストナイル熱ウイルス(WNV)2株と日本脳炎ウイルス(JEV)1株に対する中和抗体を測定した。

2) 鳥類由来細胞へのWNV遺伝子RNA導入試験

a. WNV遺伝子RNAの調整：WNV(NY株)感染ヒトスジシマカ由来C6/36細胞、および感染培養上清のエタノール沈殿物をDNase-IおよびプロテアーゼK存在下で溶解し、核酸吸着カラムを用いてRNA画分を精製した。

b. 精製WNV遺伝子RNAの評価：精製したRNAを階段希釈し、リポフェクトアミンとの複合体とした後にハムスター腎由来BHK-21およびアフリカミドリザル腎由来Vero細胞に遺伝子導入した。RNAやリポフェクトアミンの希釈、細胞の培養には遺伝子導入用無血清培養液を用いた。RNA-リポフェクトアミン複合体を添加した後、吸着のために6時間静置し、その後増殖用培養液に置換して培養した。遺伝子導入を試みた細胞は約24時間の培養の後、培養上清は子孫ウイルス検出、細胞はウイルス蛋白合成の確認に供した。子孫ウイルス検出はマイクロプレートに培養したBHK-21細胞に遺伝子導入細胞の培養上清を接種してウイルス感染細胞のフォーカスを免疫染色で可視化して検討した。遺伝子導入細胞内におけるウイルス蛋白合成はアルコール固定した細胞の免疫染色で細胞内における抗原(ウイルス蛋白)の蓄積の有無で判定した。

c. トリ由来細胞へのWNV-RNAの導入：bの実験で、感染培養上清より感染細胞から精製したRNA画分の方がウイルス抗原、子孫ウイルス産生がともに高いことが確認されたので、トリ由来細胞への遺伝子導入には感染細胞から精製したRNA画分のみを用いた。24穴プレート2枚に培養したヤンバルクイナ、ニワトリ、カラス、およびハト由来細胞に実験bで最も導入効率の高かった希釈倍数でWNV-RNAを導入した。1枚のプレートは遺伝子導入後約24時間で培養上清を回収し、細胞はアルコールで固定した。培養上清は子孫ウイルスの産生、固定した細胞は免疫染色によるウイルス抗原(蛋白)合成の確認に供した。残りのプレートは培養を継続し、長期間のウイルス産生とウイルス抗原発現の確認に用いた。

4. 結果及び考察

(1) 渡り鳥の移動経路と感染症伝播との関係究明に関する研究

1) カモ類の渡り経路追跡：2010年1月に送信機を装着したオナガガモのうち、雄1羽の渡りを繁殖地であるロシア北東部まで追跡した(図2)。この個体は2010年6月中旬にロシア北東部インディギルカ川上流域まで移動し、そこで7月中旬まで滞在した後さらに北上し、8月中旬まで同川中流域を利用した。残り7羽のうち4羽は4月末-5月末まで追跡でき、北海道までの移動を確認した。それ以外の3羽の移動は、越冬地周辺しか確認できなかった。

2011年1月に送信機を装着した3羽のうち、1羽の渡りを繁殖後の滞在地と考えられるロシアのカムチャッカ半島北東部まで追跡した(図3)。この個体は2011年6月末に繁殖地と考えられるカムチャッカ中部まで移動し、そこで7月中旬まで滞在した。その後、北北東へ移動し、10月下旬まで滞在した。残り2羽のうち1羽は4月上旬まで追跡でき、北海道までの移動を確認した。

2) シギ類への送信機装着と移動追跡：北海道紋別市の南東約10kmに位置するコムケ湖の干潟で捕獲されたチュウシャクシギ雌(体重 440g)、同性別不明(315g)、オオソリハシシギ雌(320g)の3羽に、本プロジェクト用に開発された新型GPS送信機3台を装着した。これらの送信機からの位置情報が得られた期間は、最短2日間(オオソリハシシギ ID111285)、最長3日間で(チュウシャクシギ ID111289)、送信機はその時点で機能停止した。追跡できた長距離移動は、コムケ湖から宮城県南部東海岸への約800kmのチュウシャクシギの移動だった(ID111284)。1羽のみの情報ではあるものの、チュウシャクシギは渡り期間の2日間にこのような長距離移動することが示された(図4)。

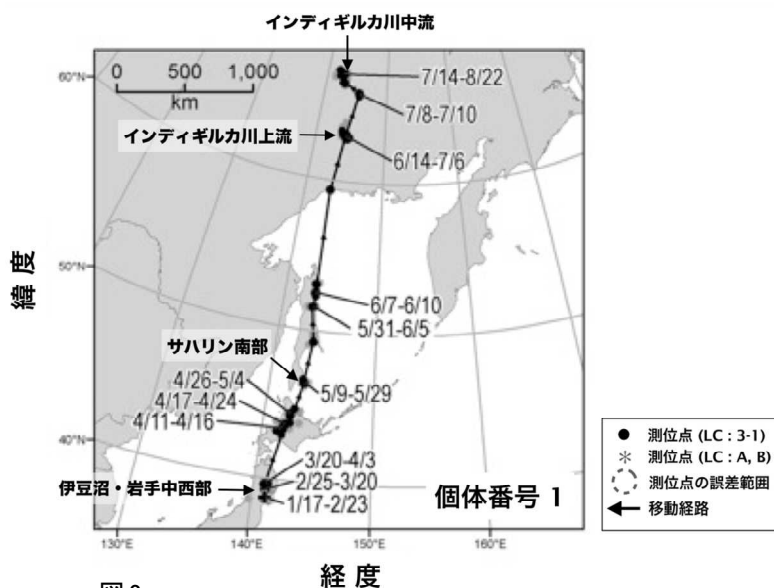


図2

2010年1月に宮城県伊豆沼で人工衛星用送信機を装着し繁殖地までの追跡に成功したオナガガモ雄(個体番号1)の移動経路

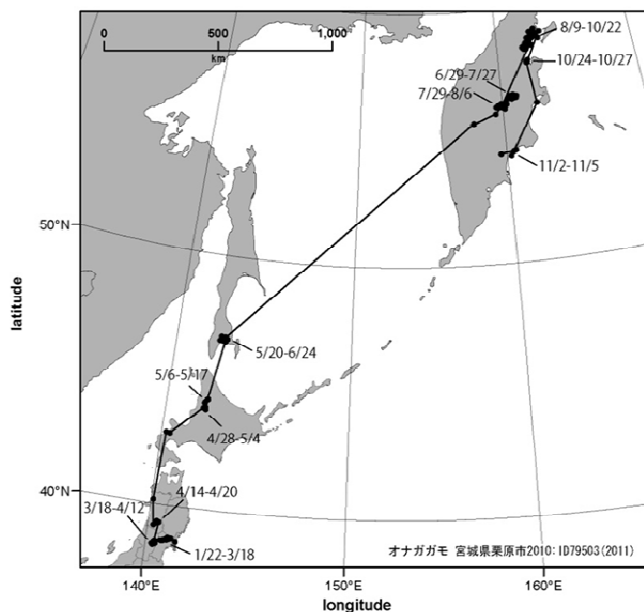


図3.
既存アルゴス用送信機で追跡したオナガガモ雄
(ID79503)の移動経路(2011年1月から11月)

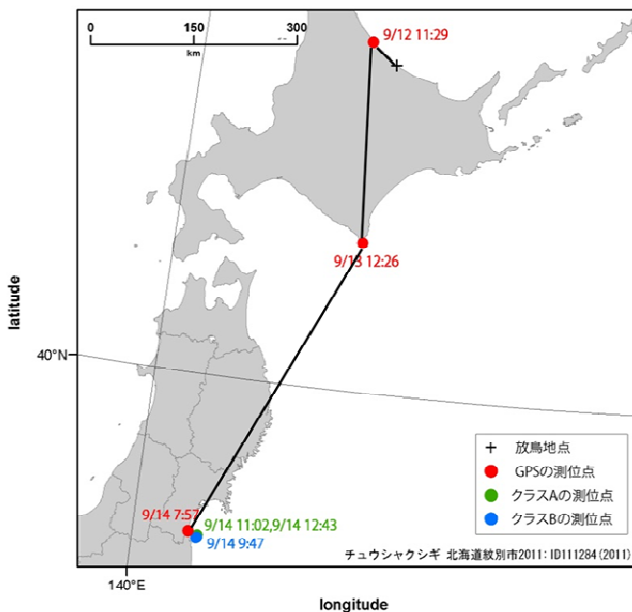


図4.
新型GPS送信機(重量約11g)で追跡したチュウシ
ヤクシギ雌(ID111284)の移動経路(2011年9月)

(2) 希少鳥類への渡り鳥による感染症リスク解析研究

ウエストナイル熱ウイルス(WNV)がすでに分布している極東ロシアで繁殖し、日本へ飛来する渡り鳥(シギ・チドリ類およびカモ類)についてWNVの感染状況をウイルス抗原、ウイルス遺伝子および抗WNV抗体検出を指標にモニタリングを実施した。また、WNVの感受性を規定しているOAS遺伝子の塩基配列と死亡率の関連性を検討・評価した。加えて、鳥類の培養細胞を使用した感染実験でWNVの鳥類感受性を評価できるのか検討した。

渡り鳥の捕獲は北海道のコムケ湖、沖縄県比屋根湿地(以上、シギ・チドリ類)および宮城県・伊豆沼(カモ類)で実施した結果、シギ・チドリ類29種793個体を捕獲した。加えて伊豆沼ではオナガガモ3個体を捕獲した。捕獲した全個体より口腔内スワブを採取し、ウイルス抗原とウイルス遺伝子の検査用サンプルとした。血液可能と判断したシギ・チドリ類27種301個体とオナガガモ3個体より採取した血液から血漿を分離し、抗体検査用サンプルとした。ウイルス抗原の検出はウエストナイル熱ウイルス簡易検査キット(VecTest)を使用した。また、ウイルス遺伝子の検出はLAMP法(栄研化学株式会社)で実施した。抗WNV抗体検出は間接酵素抗体法(間接ELISA法)で実施した。その結果、全個体がウイルス抗原およびウイルス抗体陰性であった。

上記に加えて、培養細胞を活用したWNV感受性試験を琉球大学(サブテーマ4)と共同で実施した。最初にモデル鳥類としてハシブトガラス、ニワトリ、ドバトを対象に感染実験を行ったところ、細胞障害については鳥類種間で大きな差が認められなかった。一方、絶滅危惧種のヤンバルクイナについて同様の感染実験を行ったところ、細胞障害が全く現れなかった。

(3) 超小型の野鳥位置探査システムの開発・改良研究

完成した超小型の野鳥位置探査システムの軽量モデルの外観を図5に、装着実験を通じ、改良を行なった、エポキシ樹脂を充填した強化モデルの概観を図6に記す。

両モデルの仕様を表1に示す。

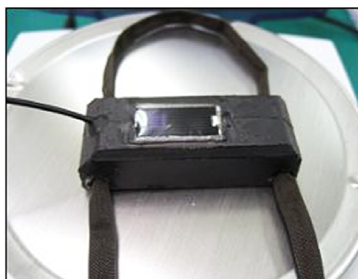


図5

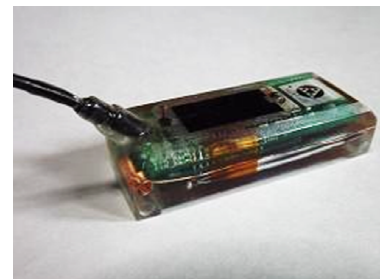


図6

| Specification | Lightweight model | Strengthening model |
|---------------------------|--|---------------------|
| ARGOS Operating frequency | 401.650MHz±8KHz | - |
| Modulation | Tri Phase PSK ±1.1Rad ±0.1Rad | - |
| Output Power | 200-500mW | - |
| Uplink data rate | 400bps | - |
| GPS Sensitivity | -165dbm/Tracking, -148dbm/Acquisition | - |
| Accuracy | < 3.0m CEP (50%) | - |
| Solar Supply voltage | Voltage Max 2.2V, Power Max 59.0mW | - |
| Capacitor | Voltage Max 2.7V , Capacitance Max 4.8F | - |
| Package / Waterproofing | Epoxy Case | Epoxy Resin |
| Dimension | 54mm×20mm×14mm | - |
| Weight | 11.3g | 16.75 -18.5g |
| Operating Temperature | -30℃～70℃ | - |
| Transmitting Interval | 1 Day～ | - |
| Data Num | Past 3 times | - |
| Positioning | 1 Fix per Day | - |
| Data | Latitude, longitude, time | - |

表1 軽量モデル及び強度強化モデルの仕様

(4) 渡り鳥での新興感染症病原体に対する抗体反応解析・評価に関する研究

1) 湖沼等で捕獲されたシギ・チドリ類から得られた血液サンプルのウエストナイル熱ウイルスに対する抗体測定
調査期間に捕獲した何れの渡り鳥の血液サンプルからもWNVもしくはJEVに対する中和抗体は検出されなかった。調査で捕獲されたシギ・チドリ類はWNVに感染していないことが確認され、これまでの調査結果と併せて調査期間に捕獲地へWNV感染の既往を有するシギ・チドリ類は飛来していないと示唆された。

2) トリ由来培養細胞へのWNV遺伝子RNAの導入試験

WNV-RNAを導入したニワトリ、カラス、ハト由来の細胞は遺伝子導入から約24時間後には細胞内にウイルス特異抗原が蓄積し、子孫ウイルスが培養細胞に放出されることが確認された。一方、ヤンバルクイナ由来細胞ではウイルス特異抗原と子孫ウイルスの両方の産生が認められなかった。遺伝子導入から一週間の継続した培養でも前者の3種類の細胞は僅かにしか生残していないにもかかわらず、培養液中に感染価が認められた。ところが、ヤンバルクイナ細胞はほとんどが生残しており、培養液の感染性ウイルス、ウイルス特異抗原を蓄積する細胞ともに全く認められなかった(図7)。

この結果はヤンバルクイナ細胞表面のウイルスレセプターの有無を示すものではないが、遺伝子導入細胞内にウイルス抗原が蓄積していなかったことから、ウイルスRNAからウイルス蛋白の翻訳(合成)、あるいは翻訳されたポリ蛋白が個々の蛋白に開裂するプロセスに制限がかかっている可能性がある。

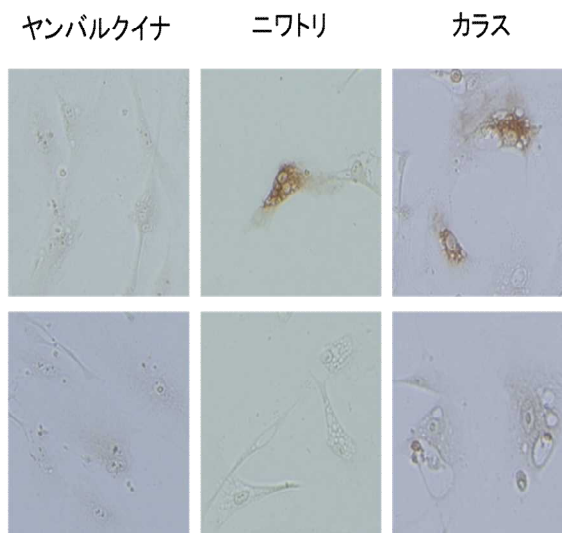


図7 ヤンバルクイナ細胞ではWNV及びWNV特異抗原が検出できない(7日後)

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

1) 渡り鳥の移動経路と感染症伝播との関連究明に関する研究： 極東ロシア地域から飛来する渡り鳥(シギ類)

の移動経路の追跡を連続的に3個体で行ったことで、開発機器を用いて今まで連続的な移動経路を追跡できなかったシギ・チドリへの渡りルートの科学的解明が可能となる。

- 2) 希少鳥類への渡り鳥による感染症リスク解析研究：捕獲したシギ・チドリ、コガモによるWNV検査は全て陰性であったものの、シギ・チドリ類での感染症モニタリングモデルを確立した。今後のより大規模な学術調査・モニタリングを行う際に必用となる貴重なノウハウを提供できる。
- 3) 超小型の野鳥位置探査システムの開発・改良研究：約11gの開発機器をサブテマ1に提供してシギの移動経路追跡をした。その後、強度改善を行って重量は約17gとなったが、世界最軽量機器を開発したことにより、従前は不可能であった中・小型鳥類の行動研究に大きな貢献が期待できる。
- 4) 渡り鳥での新興感染症病原体に対する抗体反応性解析・評価に関する研究：サブテマ2提供の血清の抗体反応性検査のために、鳥類細胞での感染実験評価法を開発できたことで、新規の感染感受性試験研究の道が開拓できた。また、沖縄に生息する希少鳥類ヤンバルクイナ由来細胞を用いたウイルス感受性試験ではウイルス抗原の産生のみならず、ウイルスの増殖までもが完全に制限されることを始めて証明したことは科学的意義が大きい。本来、WNVは宿主域が広く、特に生態系内での感染環成立に鳥類が重要な働きをしていると考えられているが、その鳥類の中でヤンバルクイナに由来する細胞がWNVの増殖を完全に制限していることは学術的に重要な結果である。

(2) 環境政策への貢献

小型鳥類に装着することが可能な超小型GPSの活用により、多種にわたる野生鳥獣の生態が解明でき、野生鳥獣(絶滅危惧種、希少種、害獣)の生態解明や行動予測等がより正確に行えるようになり、生物多様性保全に大きく貢献できる。

また、培養細胞によるWNVへの感受性評価によって個体への感染実験ができない希少鳥種に対するWNVの病原性を評価できれば、特定の希少種で大量死が起こる可能性が高いか否かが事前に推測可能。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

特に記載すべき事項はない

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) K. ARAI: "Ultralight Position Transmitter for Migratory Birds Tracking CTX641-010A GPS PTT -Argos Platform Transmitter Terminal with GPS-". The 7th International Meeting on Cryophoenix Project, Phuket, Thailand. (2012).

7. 研究者略歴

課題代表者: 桑名 貴

1950年生まれ。熊本大学大学院医学研究科修了、医学博士。熊本大学医学部助手、講師、国立水俣病総合研究センター病理室長、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長、同ラボラトリー長を経て現在、アラブ首長国連邦大統領府 International Institute of Avian Conservation Science所長、近畿大学先端技術総合研究所客員教授

主要参画研究者

(1): 樋口広芳

1948年生まれ、東京大学大学院農学系研究科博士課程修了、農学博士。東京大学農学部助手、米国ミシガン大学動物学博物館客員研究員、日本野鳥の会研究センター所長を経て、現在、東京大学大学院農学生命科学研究科教授

(2) 1): 桑名 貴 (課題代表者に同じ)

2): 三谷匡

1962年生まれ、京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了、農学博士(京都大学)。明治乳業(株)ヘルスサイエンス研究所研究員、国立小児病院小児医療研究センター研究員、徳島大学分子酵素学研究センター助手を経て現在、近畿大学先端技術総合研究所教授

(3): 松浦功哲

1956年生まれ、大阪電気通信大学応用電子工学部卒業、現在、株式会社コア関西カンパニー理事、Gソリューション統括部部長

(4) 1): 只野昌之

1953生まれ、大阪工業大学応用化学科卒業、医学博士。琉球大学医学部助手、米国 NIH 研究員を経て現在、琉球大学大学院医学研究科准教授

2) 齋藤美加

1962生まれ、北海道大学獣医部卒業、医学博士。現在琉球大学医学部助手

D-0907 渡り鳥による希少鳥類に対する新興感染症リスク評価に関する研究**(1) 渡り鳥の移動経路と感染症伝播との関係究明に関する研究**

東京大学 農学生命科学研究科 生物多様性科学研究室 樋口広芳
藤田 剛

〈研究協力者〉

東京大学 農学生命科学研究科 生物多様性科学研究室 土方直哉
酒井すみれ

平成21～23年度累計予算額：17,400千円

(うち、平成23年度予算額：4,500千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 日本への侵入が危惧されているウエストナイル熱ウイルス(WNV)の感染経路を予測し、絶滅危惧鳥類への感染リスクなどを評価することは、日本の生物多様性保全上の重要課題である。本サブテーマでは、WNV への抗体をもつ渡り鳥の東アジアにおける渡り経路を明らかにするため、超小型 GPS 位置測定システムを用い、WNV 感染域である極東ロシアを繁殖地ないし渡り中継地として利用することが知られているカモ類とシギ・チドリ類の渡り経路を調べることを目的とする。その第1段階として、カモ類の重要な越冬地である宮城県伊豆沼周辺で、2010年1月にオナガガモ8羽、2011年1月に同3羽にアルゴス用送信機を装着して長距離移動を追跡した。2010年に装着した送信機は、North Star社製 12g タイプ、2011年の送信機は、Microwave社製 5g タイプである。その次の段階として2011年9月に、シギ・チドリ類の重要な渡り中継地である北海道コムケ湖で、チュウシャクシギ2羽とオオソリハシシギ1羽にコア社製新型 GPS 送信機 (重量約11g) を装着した。伊豆沼でアルゴス用送信機を装着したオナガガモ11羽のうち、越冬地から繁殖地まで追跡できたのは2羽 (19%)、越冬地から北海道以北の中継地まで追跡できたのは5羽 (45%) で、得られた位置データ数は1羽あたり283.7(±326.4SD)、平均追跡日数は110.8日 (±76.2SD) だった。一方、コムケ湖で新型 GPS 送信機を装着したシギ類3羽のうち、チュウシャクシギ1羽が2日後に宮城県南部へ移動していることを確認したが、すぐに送信停止したため、そこが中継地かどうかは不明である。残り2羽は装着地周辺までしか移動追跡できなかった。得られた位置データ数は1羽あたり6.3(±3.2SD)、平均追跡期間は 3.0(±1.0SD) 日だった。

[キーワード] ウエストナイル熱、衛星追跡、オナガガモ、感染範囲予測、シギ・チドリ類

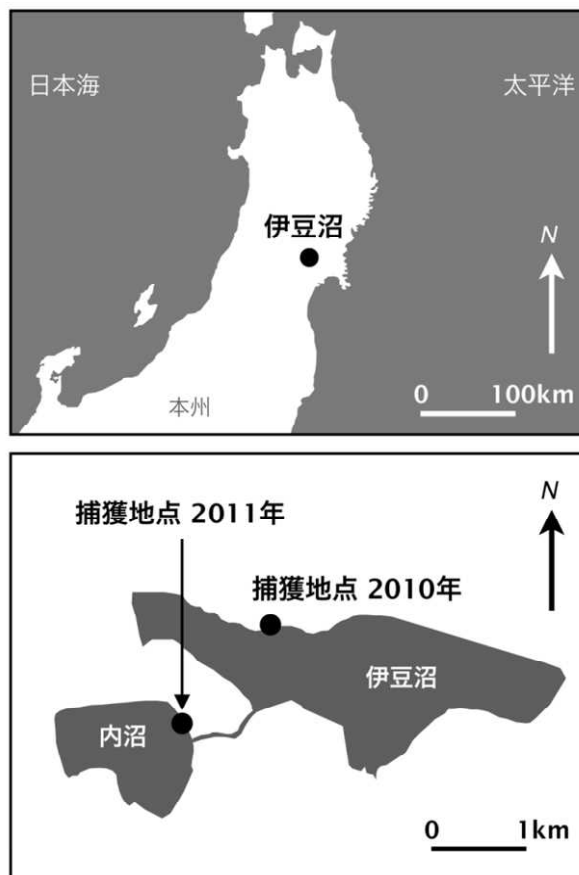
1. はじめに

新興・再興感染症は、生息地の大規模変化や狩猟などと並び、絶滅危惧鳥類への脅威として注目されている。中でもウエストナイル熱ウイルス(以下 WNV)の感染域拡大は、世界的にも注目を集めており、例えば、北米ではアラスカ等を除くほぼ全域に広がり、アメリカガラス *Corvus brachyrhynchos* や クーパーハイタカ *Accipiter cooperi*、希少種のカリフォルニアコンドル *Gymnogyps californianus* やカナダヅル *Grus canadensis* をはじめ多くの鳥類が感染していることや、WNVの媒介には蚊が関与することなどが報告されている(例えば Anderson et al. 1999、Wunschmann et al. 2004、Chang et al. 2007、Olsen et al. 2009)。東アジアでは、すでにロシア極東まで WNV が広がっていることが分かっており(Telnovol et al. 2006)、日本にも侵入する可能性は高いと考えられる。この WNV に限らず、感染症などによる死亡率の増加は、とくに個体数の少ない絶滅危惧種などでは深刻な問題となる。致死率がそれほど高くない場合でも、悪天候や捕食者が局地的に集中するなど、他のリスクと偶然重なることで絶滅が生じる可能性も高い。したがって、このWNV の感染経路予測やさまざまな絶滅危惧鳥類へのリスクを評価することは、日本の生物多様性を保全する上でも重要な意味をもつ。

2. 研究開発目的

本サブテーマの最終目標は、新しく開発された超小型 GPS 送信機を用いて、日本を越冬地や渡り中継地として利用するカモ類やシギ・チドリ類の移動経路を解明し、日本への侵入が懸念されている WNV の感染経路を予想することである。日本で越冬するカモ類の多くは、WNV 感染域である極東ロシアを繁殖地ないし渡り中継地として利用することが知られている(例えば Yamaguchi et al. 2008)。また、抗 WNV 抗体陽性率も高いとされている(例えば Centers for Disease Control and Prevention 2008)。日本を渡り中継地などとして利用するシギ・チドリ類の抗 WNV 抗体陽性個体は、現時点では見つかっていないが(サブテーマ2および4の報告を参照)、これらの鳥はカモ類同様に極東ロシアを繁殖地や中継地として利用だけでなく、WNV の媒介者である蚊の密度がもっとも高い7-9月に日本に滞在する。このため、カを通して極東ロシアから運んだ WNV を日本に生息する絶滅危惧鳥類に伝播させる可能性が懸念される。

本サブテーマでは、この目的への第1段階として、国内におけるカモ類の重要な越冬地である



図(1)-1. 人工衛星用送信機装着のためにオナガガモを捕獲した位置

宮城県北部の伊豆沼周辺で越冬するオナガガモ *Anas acuta* を対象とし、2010年1月および2011年1月にアルゴス用送信機を装着し、移動経路の解明を目指した。オナガガモは、日本の人口密集地帯を含む広い地域で越冬する個体数の非常に多いカモ類であり(環境省生物多様性センター2008)、極東ロシアを渡り中継地や繁殖地として利用する可能性が高い。また、その次の段階として 2011



図(1)-2. 無双網を用いたオナガガモ捕獲の様子

年9月に、シギ・チドリ類の重要な渡り中継地である北海道東部のコムケ湖で、チュウシャクシギ *Numenius phaeopus* とオオソリハシシギ *Limosa lapponica* にコア社製新型 GPS 送信機を装着し、オナガガモ同様、移動経路の解明を目指した。これらシギ類は、WNV 媒介者であるカの活動が活発だと予想される8月から9月にかけて、WNV 感染域の極東ロシアおよび日本の渡り中継地を利用している可能性が高い。

これらシギ類は、WNV 媒介者であるカ

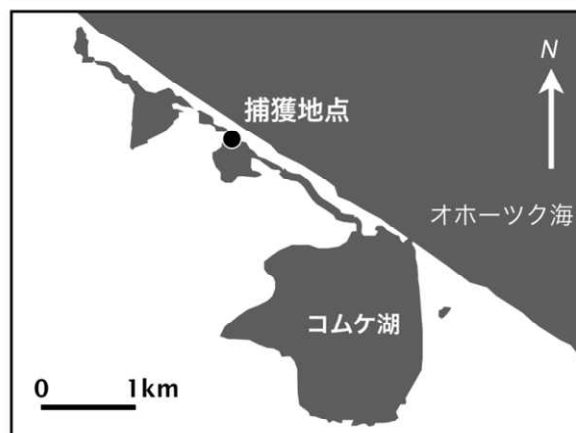
3. 研究開発方法

(1) 捕獲

1) オナガガモ：2010年の捕獲は、宮城県伊豆沼湖岸(北緯38.72度、東経141.09度、図(1)-1)で1月17日に実施し、2011年の捕獲は、伊豆沼の南西約 1km に位置する内沼東北湖岸(北緯38.70度、東経141.08度、図(1)-1)で1月22日に行った。2010年1月の捕獲には無双網を用いた(図(1)-2)。2011年1月の捕獲は、目標羽数が3羽と少なかったことと、捕獲時の鳥の事故等を考慮し、食パンの給餌を行いつつ1羽ずつ手捕りで捕獲した。

2) シギ類：捕獲は、北海道東部のコムケ湖(北緯44.27度、東経143.47度、図(1)-3)で2011年9月10-12日に実施した。捕獲にはかすみ網を用いた。対象種であるチュウシャクシギやオオソリハシシギが利用する可能性の高い干潟部にかすみ網を設置した(図(1)-4)。対象種を引き寄せるため、チュウシャクシギ等の音声をかすみ網のそばで再生し続けるとともに、網のそばにチュウシャクシギを模した葦製の模型を3体設置した。

(2) 送信機と装着法



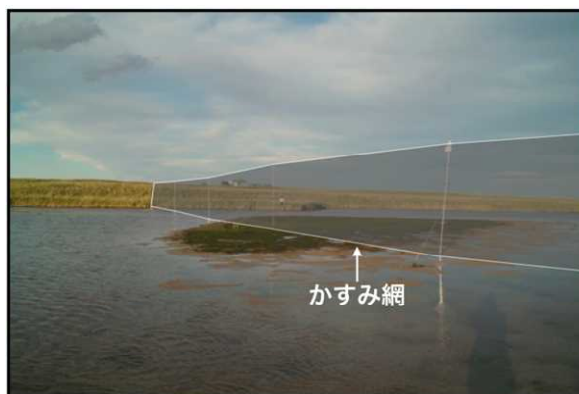
図(1)-3. 人工衛星用送信機装着のためにシギ類を捕獲した位置

1) **オナガガモ**：2010年にオナガガモへ装着した人工衛星用送信機は、North Star Science and Technology 社製 Solar Birdborne PTT の 12g タイプである(図(1)-5上)。2011年に装着した送信機は、Microwave 社製 PTT-100 5g タイプで太陽電池を搭載している。どちらも、アルゴス情報収集・測位システムによって、送信機の位置測定とデータ受信を行う。装着には兩年ともテフロンリボンを用いた。このリボンは、幅が約 5 mm で表面がテフロン加工されており、動物の皮膚を傷つけにくくなっている。このリボンを用い、ランドセル式に送信機を背負わせた。この際、送信機とカモの体の間には、翼を広げた状態で 5-8mm の隙間を空け、カモの飛翔に影響がないようにした。

装着作業は、兩年とも同じ作業小屋で行った。この小屋は、2010年の捕獲場所から約 500m、2011年の捕獲場所から約2km 離れている。感染症対策として、作業に関わる人員はすべて薄いゴム手袋、雨具、長靴等を身につけ、他の用具も使用后十分に消毒を行った。送信機を装着したカモは、速やかに放鳥するため作業小屋から約 500m 離れた伊豆沼湖岸で放鳥した。

2) **シギ類**：チュウシャクシギとオオソリハシシギに装着した新型 GPS 送信機は、本研究プロジェクトのために開発された(株)コア製で、重量は約11g、長さ 5.4cm、幅 2.0cm、高さ 1.43cm である (図(1)-6)。本体の大きさは長さ 5.4cm、幅 2.0cm、高さ 1.43cmである。装着には、上述したオナガガモなどの装着で成功例の多いテフロンリボンを用いた。このリボンは、幅が約5mm で表面がテフロン加工されており、動物の皮膚を傷つけにくくなっている。このリボンを用い、ランドセル式に送信機を背負わせた。この際、送信機とシギの体の間には、翼を広げた状態で約5mm の隙間を空け、シギの飛翔に影響がないようにした。

装着作業は、捕獲場所から約 100m 離れた場所にある作業小屋で行った。感染症対策として、装着時作業に関わる人員は薄いゴム手袋、雨具、長靴等を身につけ、他の用具も使用后十分に消毒を行った。送信機を装着したシギは、速やかに放鳥するため作業小屋から約 100m 離れた海岸で放鳥した。



図(1)-4. シギ類捕獲のために設置したかすみ網



図(1)-5.送信機を装着したオナガガモ
(上:2010年, 下:2011年)

4. 結果及び考察

(1) 装着個体

1) オナガガモ

2010年の捕獲は、1月17日午後3時に実施、約50羽のオナガガモを捕獲、このうち、体重が重い個体を雌雄4羽ずつ選び、人工衛星用送信機を装着した(表(1)-1)。2011年は1月22日午後1時から3時に捕獲を実施、4羽のオナガガモを捕獲、体重の重い3羽に送信機を装着した(表(1)-2)。

2) シギ類

2011年9月10日から12日にかけて終日捕獲を試み、チュウシャクシギは11日3時と16時、オオソリハシシギは12日3時に捕獲した。この3羽すべてに人工衛星用送信機を装着した(表(1)-3)。



図(1)-6. 送信機を装着したチュウシャクシギ

(2) 2010年に捕獲したオナガガモの移動

送信機を装着したオナガガモ8羽から得られた測位点数は合計2006、そのうち測定誤差の小さいロケーションクラス3(以下 LC3、誤差 150m 以下)が108、LC2(誤差 300-150m)が304、LC1(誤差 1km-300m)が437、LC0(LC3-1より誤差が大きく、約70%の測位点が真の位置から10km 以内に得られることが分かっている)が346、それ以下の精度の測位点数が775だった。個体ごとの測位点数は、8羽のうち5羽は100以上の測位点が得られており、そのうち1羽の雄から976地点のデータが得られた(表(1)-4；個体番号1、雄、以下個体1とする)。

越冬地から繁殖地までの渡りを完全に追跡できたのは雄の個体1のみだった(図(1)-7)。残り7羽のうち4羽(個体4、6、7、8)は渡り中継地と考えられる北海道まで追跡できた(図(1)-8a、b、c、d)。別の2羽は中継地と考えられる本州北部、1羽は越冬地滞在中に受信が途絶えた。これらの移動が WNV 感染パターンに直接関わるかは不明だが、長い期間にわたる個体の長距離移動と局所的移動の詳細が分かるため、WNV 感染の可能性が高い地域内、およびそれらの地域からの感染域拡大予想の基礎資料になると考えられる。

表(1)-1. 2010年1月に衛星用送信機を装着したオナガガモ8羽の性や年齢、体重などの特徴

| 個体番号 | 性別 | 年齢 | 自然翼長 (mm) | フショ長 (mm) | 体重 (g) | 送信機 ID |
|------|----|----|-----------|-----------|--------|--------|
| 1 | 雄 | 成鳥 | 275 | 49.5 | 880 | 96534 |
| 2 | 雄 | 成鳥 | 281 | 50.4 | 1060 | 96535 |
| 3 | 雄 | 成鳥 | 268 | 48.6 | 970 | 96536 |
| 4 | 雄 | 成鳥 | 265 | 48.7 | 840 | 96537 |
| 5 | 雌 | 不明 | 257 | 48.1 | 740 | 96538 |
| 6 | 雌 | 成鳥 | 245 | 41.4 | 850 | 97626 |
| 7 | 雌 | 成鳥 | 246 | 43.5 | 850 | 97627 |
| 8 | 雌 | 成鳥 | 260 | 44.5 | 820 | 97628 |

表(1)-2. 2011年1月に衛星用送信機を装着したオナガガモ3羽の性や年齢、体重などの特徴

| 個体番号 | 性別 | 年齢 | 自然翼長 (mm) | フショ長 (mm) | 体重 (g) | 送信機 ID |
|------|----|----|-----------|-----------|--------|--------|
| 9 | 雄 | 成鳥 | 255 | 39.0 | 900 | 79503 |
| 10 | 雄 | 成鳥 | 281 | 38.0 | 1065 | 79691 |
| 11 | 雄 | 成鳥 | 275 | 43.0 | 1045 | 79692 |

表(1)-3. 2011年2月に新型アルゴスGPS送信機を装着したシギ類3羽の種や性や年齢、体重などの特徴

| 種 | 個体記号 | 性別 | 年齢 | 体重 (g) | 送信機 ID |
|----------|------|----|----|--------|--------|
| チュウシャクシギ | A | 雌 | 成鳥 | 440 | 111284 |
| チュウシャクシギ | B | 雄? | 成鳥 | 315 | 111289 |
| オオソリハシシギ | C | 雌 | 成鳥 | 320 | 111285 |

表(1)-4. 2010年1月に衛星用送信機を装着したオナガガモの測位点数。最終的に受信の途切れた日までの値を示す。LCは測位点の精度を示す基準。数値の場合、値が大きいほど精度が高い(誤差範囲の詳細等は本文参照)。

LCが数値 (LC 0-3) の方がアルファベット (LC A,B) よりも精度が高い。アルファベットの場合、AがBよりも精度が高い。

| 個体番号 | 性別 | 送信機 ID | LC 0-3 | LC A, B | 合計 | 装着日 | 測位最終日 |
|------|----|--------|--------|---------|--------|-------|-------|
| 1 | 雄 | 96534 | 628 | 348 | 976 | 1月17日 | 8月22日 |
| 2 | 雄 | 96535 | 7 | 7 | 14 | 1月17日 | 2月4日 |
| 3 | 雄 | 96536 | 33 | 32 | 65 | 1月17日 | 4月14日 |
| 4 | 雄 | 96537 | 154 | 99 | 253 | 1月17日 | 5月22日 |
| 5 | 雌 | 96538 | 35 | 27 | 62 | 1月17日 | 2月15日 |
| 6 | 雌 | 97626 | 92 | 90 | 182 | 1月17日 | 5月15日 |
| 7 | 雌 | 97627 | 80 | 50 | 130 | 1月17日 | 4月24日 |
| 8 | 雌 | 97628 | 203 | 122 | 325 | 1月17日 | 5月29日 |
| 平均 | | | 154.00 | 96.88 | 250.88 | | |
| SD | | | 202.42 | 108.96 | 310.99 | | |

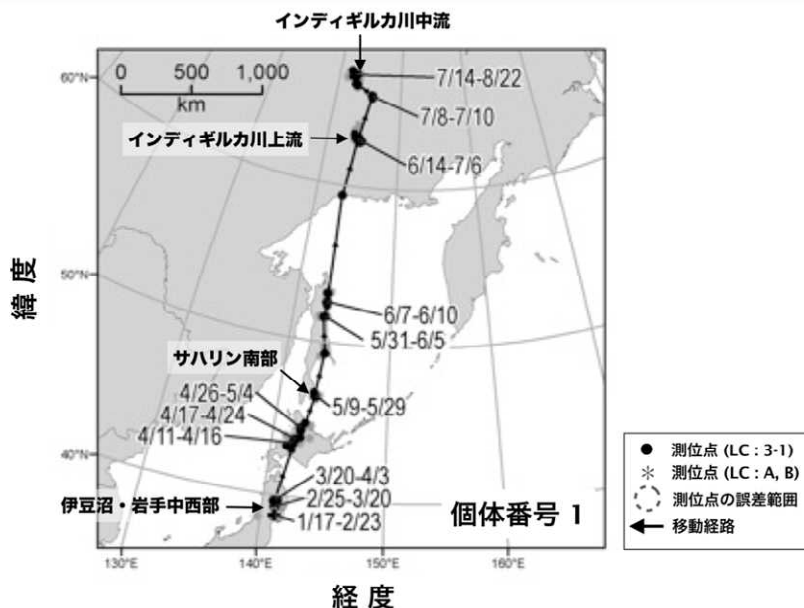
1) 2010年の長距離移動

最初に、北海道以北の中継地や繁殖地までの追跡に成功した5羽(個体1、4、6-8)の長距離移動の概要について述べる。

a. 個体番号1 (図(1)-7)

追跡期間は2010年1月17日から8月22日で、越冬地から繁殖地までの移動経路が明らかになったと考えられる。越冬地から繁殖地への移動経路はほぼ直線状だった。2月23日まで越冬地周辺に滞在した後、岩手県中西部へ移動し、そこに4月初めまで滞在した。その後、4月4日から5月7日まで北

海道をゆっくりと北上して、5月9日にロシアのサハリン南部へ移動、そこに5月29日まで滞在し



図(1)-7. 2010年1月に宮城県伊豆沼で人工衛星用送信機を装着し繁殖地までの追跡に成功したオナガガモ雄(個体番号1)の移動経路。

た後、5月31日にサハリン北部へ移動した。6月14日にロシア本土のインディギルカ川上流域へ移動し、7月6日まで滞在した後、7月14日にインディギルカ川中流域へ到着、8月22日まで滞在したことが確認された。

b. 個体番号4 (図(1)-8a)

追跡期間は2010年1月17日から5月22日で、越冬地から北海道およびその周辺にある中継地までの移動経路が明らかになった。この個体は、北上と南下を2度繰り返す複雑な移動を示した。3月3日まで越冬地周辺に滞在した後、一度津軽半島南部まで北上して4月12日から16日まで滞在した。その後一度南下し、4月17日から5月2日まで秋田県南東部に滞在した。その後、今度は北東へ移動し5月5日に択捉島まで移動してから南西へ戻り、北海道根室半島の西で5月6日から22日まで滞在したことが確認されている。

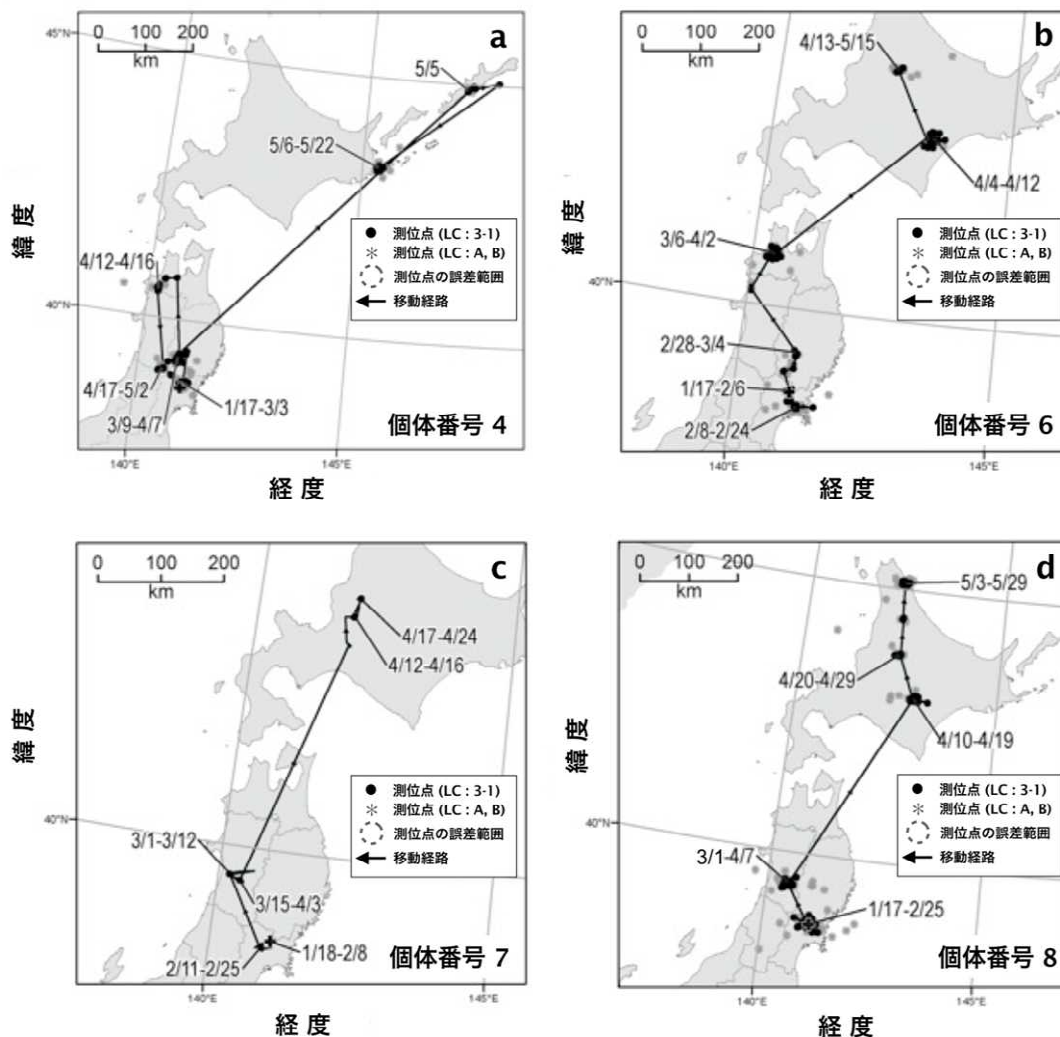
c. 個体番号 6 (図(1)-8b)

追跡期間は2010年1月17日から5月15日で、越冬地から北海道の中継地までの移動経路が明らかになった。この個体は2月6日まで伊豆沼周辺に滞在した後、一度少し南下し宮城県牡鹿半島周辺に2月24日まで滞在した。その後2月28日までに岩手県中西部に移動し3月4日まで滞在、そして3月6日から4月2日まで津軽半島南部を利用した。4月4日には北海道中川郡幕別町周辺に到着し12日まで滞在後、4月13日には旭川周辺へ北上し5月15日までそこに滞在したことが確認されている。

d. 個体番号 7 (図(1)-8c)

追跡期間は2010年1月17日から4月24日で、越冬地から北海道の中継地までの移動経路が明らかになった。この個体は2月8日まで伊豆沼周辺に滞在した後、2月11日までに少し南西へ移動、25日まで滞在した。その後、3月1日には秋田県中部へ移動し4月3日までその周辺を利用していた。4月12日までに北海道中部の空知郡奈井江町周辺へ移動、そこから4月24日まで小刻みに北上を続け

たことが確認されている。



図(1)-8. 2010年1月に宮城県伊豆沼で人工衛星用送信機を装着し、北海道までの追跡ができたオナガガモ4羽 (個体番号4、6、7、8)の移動経路。

e. 個体番号 8 (図(1)-8d)

追跡期間は2010年1月17日から5月29日で、越冬地から北海道の中継地までの移動経路が明らかになった。この個体は2月25日まで伊豆沼周辺に滞在した後、3月1日まで秋田県中部へ移動し、4月7日まで滞在した。その後、4月10日までに北海道上川郡清水町周辺へ移動、19日まで滞在した後、北上して4月20日に旭川へ移動した。そこに29日まで滞在した後、さらに北上して北海道北部のクッチャロ湖周辺へ移動、5月29日まで滞在したことが確認されている。

2) 2010年に繁殖地までの追跡に成功した個体1の局所移動

局所的な移動は、長距離移動してきた感染個体が滞在中にどの範囲を移動するのかに関係しており、各滞在地での感染範囲の予測のための基礎資料になると考えられる。ここでは、上述のように越冬地から繁殖地までの移動がすべて追跡できた個体1に注目し、越冬地、中継地、繁殖地に

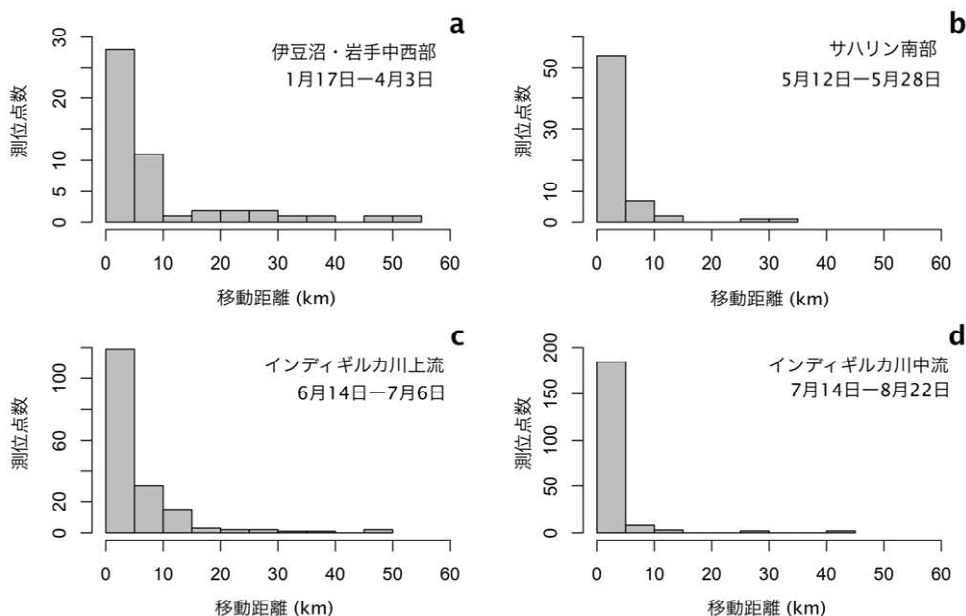
滞在中、どれくらいの距離の移動を繰り返していたかを解析した。

個体1が越冬地から繁殖地までの渡り中に利用した場所の中で、2週間以上の滞在中が認められ、かつ測位点数が50以上得られた場所として、伊豆沼・岩手中西部、ロシアのサハリン南部、インディギルカ川上流、同中流の4か所(図(1)-7)を選び、滞在中に連続して得られた測位点間の距離を測定した。このうち、岩手中西部は捕獲地点の伊豆沼から約50km北に位置し、厳密には伊豆沼と別の地点であるが、伊豆沼での測位点数が多くなかったため、これら2か所を同じ場所とみなし、2月23日の2か所間の50kmにわたる移動は集計から外した。

これら4か所の中で、湿地周辺に農地や人家が存在する可能性がより高くなると考えられる範囲、5km以上の移動割合がもっとも高かったのは越冬地の伊豆沼・岩手西南部で、50サンプルのうち22サンプル(44%)が5km以上の移動だった(図(1)-9a)。中継地のサハリン南部では、5km以上の中距離移動の割合は低く、66サンプル中11サンプル(16.7%；図(1)-9b)、繁殖地に滞在したインディギルカ川上流では、サハリンよりやや割合が高く175サンプル中56サンプル(32%；図(1)-9c)だった。そして、もっとも北に位置するインディギルカ川中流の滞在地では5km以上の移動がもっとも少なく、全199サンプルのうちわずか15サンプル(0.8%；図(1)-9d)だった。ここに滞在した7月後半から8月はオナガガモが完全換羽する時期と考えられ、そのため移動距離が短かった可能性がある。

(3) 2011年に捕獲したオナガガモの移動

2011年1月に人工衛星用送信機を装着したオナガガモ3羽から、得られた測位点数は合計1114、そのうち測定誤差の小さいロケーションクラス3 (以下 LC3、誤差 150m 以下)が34、LC2 (誤差 300-150m)が74、LC1 (誤差 1km-300m)が224、LC0(LC3-1より誤差が大きく、約70%の測位点が真の位置から10km 以内に得られることが分かっている)が312、それ以下の精度の測位点数が470だった(表(1)-5)。



図(1)-9. 2010年1月に宮城県伊豆沼で捕獲したオナガガモ雄(個体番号1)が越冬地(伊豆沼・岩手中西部 a)、中継地(サハリン南部 b)、繁殖地(インディギルカ川上流 c、同中流 d)に滞在中の移動距離。各滞在地の位置は図(1)-7を参照。

表(1)-5. 2011年1月に衛星用送信機を装着したオナガガモの測位点数。最終的に受信の途切れた日までの値を示す。LCは測位点の精度を示す基準。数値の場合、値が大きいほど精度が高い(誤差範囲の詳細等は本文参照)。LCが数値の方がアルファベットよりも精度が高い。アルファベットの場合、AがBよりも精度が高い。

| 個体番号 | 性別 | 送信機 ID | LC 0-3 | LC A, B | 合計 | 装着日 | 測位最終日 |
|------|----|--------|--------|---------|--------|-------|-------|
| 9 | 雄 | 79503 | 511 | 347 | 858 | 1月22日 | 11月5日 |
| 10 | 雄 | 79691 | 82 | 74 | 156 | 1月22日 | 4月4日 |
| 11 | 雄 | 79692 | 51 | 49 | 100 | 1月22日 | 3月16日 |
| 平均 | | | 214.67 | 156.67 | 371.33 | | |
| SD | | | 257.10 | 165.31 | 422.39 | | |

個体ごとの測位点数は、3羽とも100以上の測位点を得られており、そのうち1羽の雄から858地点のデータが得られた(表(1)-5；個体番号9、雄、以下個体9とする)。

1) 2011年の長距離移動

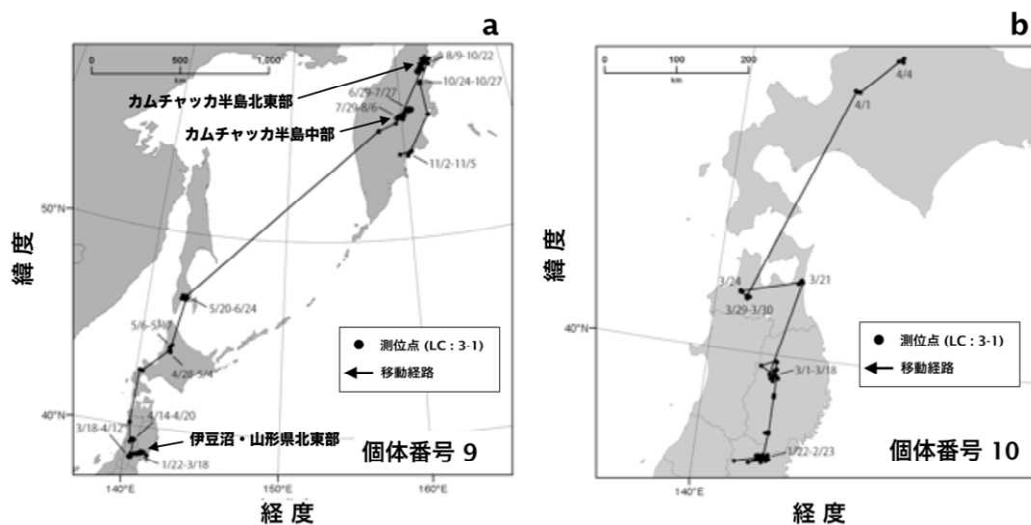
最初に、北海道以北の中継地や繁殖地までの追跡に成功した2羽(個体9、10)の長距離移動の概要について述べる。

a. 個体番号9 (図(1)-10a)

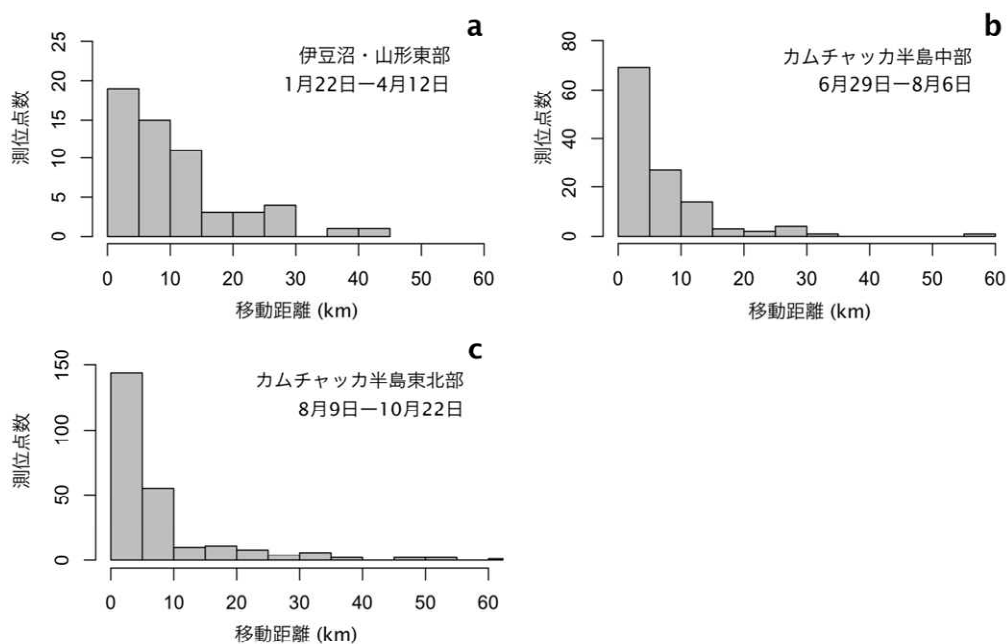
追跡期間は2011年1月22日から11月5日で、越冬地から繁殖地までの移動経路、および、繁殖後の南下移動の一部が明らかになったと考えられる。越冬地から繁殖地への移動経路は、3月18日に越冬地を出発したのち、ゆっくりと西南西へ移動し山形県北東部で4月12日まで滞在、その後北へ向かい、秋田県北東沿岸、北海道南東部の尻別川河口付近、同中北部の雨竜郡幌加内町付近を経由して、5月20日にサハリン南部に到着した。そこで6月24日まで滞在したのち、北東へ進路を変え、カムチャッカ半島中部に6月29日に到着、その周辺に8月6日まで滞在した。その後、北北東方向へ移動し、8月9日に同半島北東沿岸に到着後2か月以上にわたり滞在したのち、10月22日に東海岸沿いに南方向へ移動を開始、11月2日に約500km南の同半島中部西岸まで移動し、11月5日まで滞在を確認した時点で受信が途切れた。

b. 個体番号10 (図(1)-10b)

追跡期間は2011年1月22日から4月4日で、越冬地から北海道にある中継地までの移動経路が明らかになった。この個体は、2月23日まで宮城県北部に滞在したのち、約100km程度北上して3月1日に岩手県中西部へ移動した。そこに3月18日まで滞在したあと、3月21日に下北半島南部を経て津軽半島南部に3月24日から30日まで滞在、その後北東へ移動し、4月4日に北海道中北部の上川郡当麻町付近までの移動が確認されたのち、受信が途絶えた。



図(1)-10. 2011年1月に宮城県伊豆沼で人工衛星用送信機を装着し、繁殖期後の移動まで追跡できたオナガガモ雄 (a: 個体番号9)、北海道にある中継地まで追跡できた同雄 (b: 個体番号10)の移動状況。



図(1)-11. 2011年1月に宮城県伊豆沼で捕獲したオナガガモ雄(個体番号9)が越冬地(伊豆沼・山形東部 a)、繁殖地(カムチャッカ半島中部 b)、繁殖期後(カムチャッカ半島北東部 c)に滞在中の移動距離。各滞在地の位置は図(1)-10aを参照。

2) 2011年に繁殖地までの追跡に成功した個体9の局所移動

(3) - 2) で述べたように、局所的な移動は、長距離移動してきた感染個体が越冬地や渡り中継地、繁殖地などに滞在するあいだにどの範囲を移動するのかに関係しており、各滞在地での感染範囲予測の基礎資料になると考えられる。

2011年に繁殖地までの渡り追跡に成功した個体9が越冬地から繁殖地までの渡り中に利用した場所の中で、2週間以上の滞在が認められ、かつ測位点数が50以上得られた場所として、伊豆沼・山形県東部、ロシアのカムチャッカ半島中部、同北東部の3か所(図(1)-10)を選び、滞在期間中に連続して得られた測位点間の距離を測定した。このうち、山形県東部は捕獲地点の伊豆沼から約50km西に位置し、厳密には伊豆沼と別の地点であるが、伊豆沼での測位点数が多くなかったため、これら2か所を同じ場所とみなした。

これら3か所の中で、5km以上の中距離移動の割合がもっとも高かったのは、2010年の個体1と同様に越冬地周辺(伊豆沼・山形東部)で、57サンプルのうち38サンプル(66.7%)が5km以上の移動だった(図(1)-11a)。また、繁殖地のカムチャッカ半島中部と繁殖後に滞在した同半島北東部でも、2010年の個体1よりも5km以上の中距離移動の割合が比較的高く、中部が121サンプル中66サンプル(54.5% ; 図(1)-11b)、北東部が245サンプル中105サンプル(42.9% ; 図(1)-9c)だった。

(4) 2011年秋に捕獲したシギ類の移動

2011年9月に新型 GPS 送信機を装着したシギ類3羽から、得られた測位点数は合計19、そのうち GPS による測位点が 6、アルゴシステムによる測位点で測定誤差の小さいロケーションクラス3 (以下 LC3、誤差 150m 以下)、LC2 (誤差 300-150m)、LC1 (誤差 1km-300m)、LC0(LC3-1より誤差が大きく、約70%の測位点が真の位置から10km 以内に得られることが分かっている)はいずれもデータが得られておらず、それ以下の精度の測位点数が13だった(表(1)-6)。個体ごとの測位点数は、最大がチュウシャクシギ(個体記号 B)の10、最小がオオソリハシシギ(個体記号 C)の4だった。

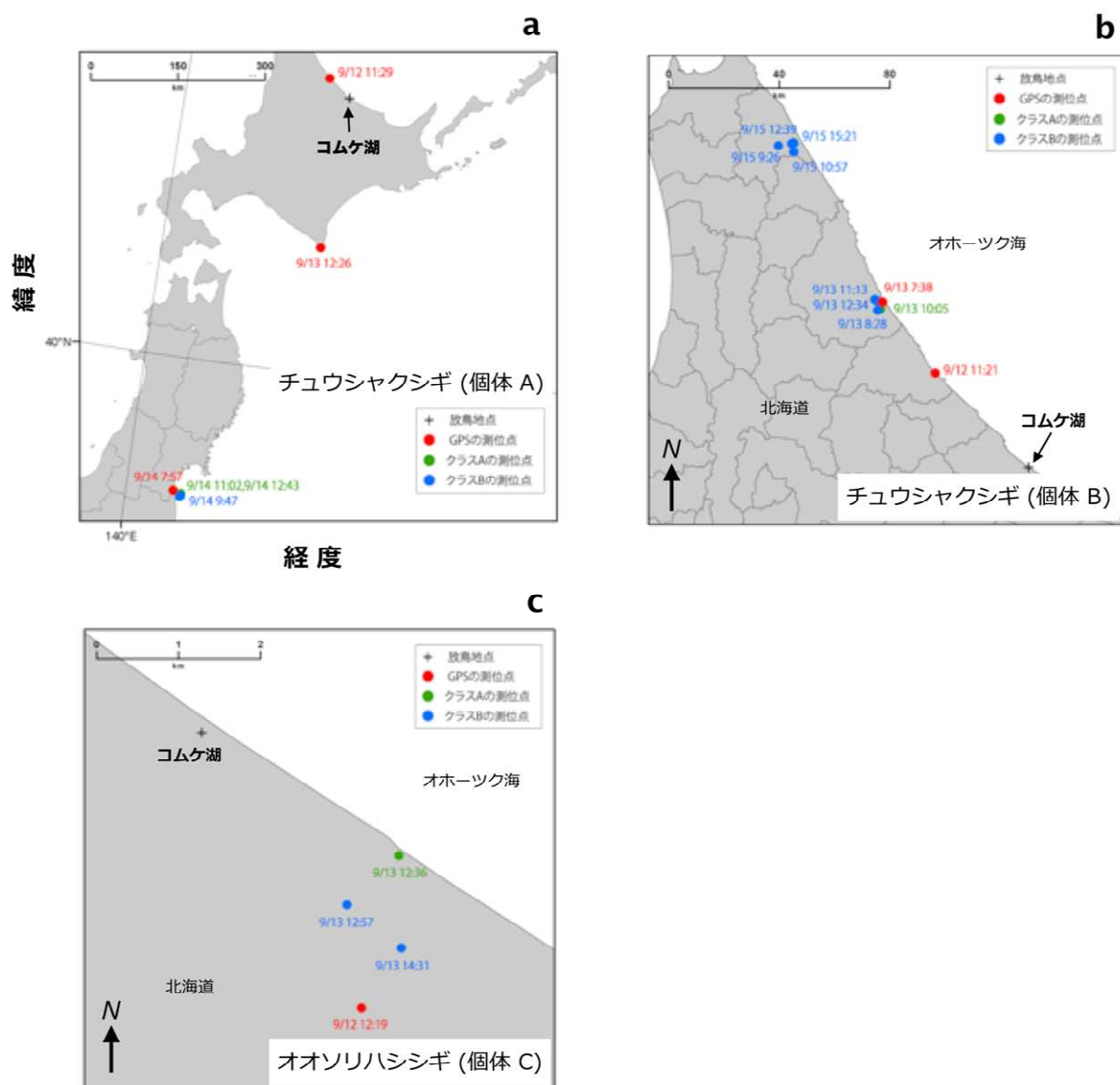
表(1)-6. 2011年9月に新型 GPS 送信機を装着したシギ類の測位点数。最終的に受信の途切れた日までの値を示す。LCはアルゴシステムによる測位点の精度を示す基準。LCが数値の方がアルファベットよりも精度が高い。数値の場合、値が大きいほど精度が高い。アルファベットの場合、AがBよりも精度が高い。誤差範囲の詳細は本文参照。

| 種 | 個体記号 | 性別 | 送信機 ID | LC 0-3 | LC A, B | GPS | 合計 | 装着日 | 測位最終日 |
|----------|------|----|--------|--------|---------|-----|------|-------|-------|
| チュウシャクシギ | A | 雌 | 111284 | 0 | 2 | 3 | 5 | 9月11日 | 9月14日 |
| チュウシャクシギ | B | 雄? | 111289 | 0 | 8 | 2 | 10 | 9月11日 | 9月15日 |
| オオソリハシシギ | C | 雌 | 111285 | 0 | 3 | 1 | 4 | 9月12日 | 9月13日 |
| | 平均 | | | 0.00 | 4.33 | | 6.33 | | |
| | SD | | | 0.00 | 3.21 | | 3.21 | | |

最長でも5日しか追跡できず、かつ測位点数も少ないため、限られた情報であるが、今回の試みで明らかになった移動状況を個体ごとに説明する。

a. チュウシャクシギ(個体記号A、図(1)-12a)

データが得られた期間は2011年9月11日から14日の4日間だった。測位精度の高い GPS データを見ると、9月12日の11時29分に捕獲地点の北西約 50km の北海道東北沿岸に移動したのち、13日12時26分に同襟裳岬に到着、その後14日の7時57分に宮城県南部の沿岸にまで移動した。



図(1)-12. 2011年9月に北海道コムケ湖で新型 GPS送信機を装着したチュウシャクシギ2羽 (個体AとB)とオオソリハシシギ1羽(個体C)の移動状況

b.チュウシャクシギ(個体記号B、図(1)-12b)

データが得られた期間は2011年9月11日から15日の5日間だった。測位精度の高い GPS データを見ると、9月12日の11時21分に捕獲地点コムケ湖の北西約 30km の北海道東北沿岸に移動したことが分かった。

c.オオソリハシシギ(個体記号C、図(1)-12c)

データが得られた期間は2011年9月11日から15日の5日間だった。測位精度の高い GPS データを見ると、9月12日の12時19分に捕獲地点コムケ湖の南東約 4km へ移動したことが分かった。

以上をまとめると、今回開発された新型 GPS 送信機の小型化により、チュウシャクシギとオオソリハシシギに送信機を装着するところまでは実施できた。しかし、装着後最長で5日間しか測

位データが得られず、測位精度が信頼できるデータは、GPS によるデータが3個体で計6地点のみで、WNV感染リスクを評価するために十分なシギ類の移動状況の解明はできなかった。

(5) 渡り鳥の飛行経路を解明するための情報収集

本研究課題の中心となるシギ・チドリ類など、WNV を保有する可能性のある個体についての情報が入手できなかったため、それを補完するために渡り鳥の飛行経路を解明するための情報収集を行なった。収集した情報は、1) 東アジアにおける渡り鳥の飛行経路、2) 日本国内における渡り鳥の移動経路と利用環境、の2点である。1) では、WNV の伝播にとくにかかわりそうな鳥類を主対象として、これまでに明らかになってきている、あるいは推定されている飛行経路について述べる。2) では、本研究課題の中心となっているシギ・チドリ類の国内の移動経路と環境利用について、観察記録などを中心に述べる。

情報は学術論文、報告書、インターネット情報などから得た。

1) 東アジアにおける渡り鳥の飛行経路

日本とのかかわりを重視した上で渡り鳥の飛行経路を考えたとき、WNV の伝播に関連して重要となる鳥類は、シギ・チドリ類、カモ類、カラス類であると考えられる。そこで、この3グループについてこれまでにわかっている東アジアの渡り経路を総括的に調査した。

シギ・チドリ類については、東アジアオーストラリア地域の渡り経路（フライウェイ）としてまとめられている。ロシア北部やアラスカのツンドラ地帯、あるいはロシア東部の湿地で繁殖した鳥が、中国東部から東南アジアを経てオーストラリアの東海岸や西海岸に渡る経路である（「シギ・チドリ類ネットワーク」より：<http://www.chidori.jp/shorebirds/migrate.htm>）。この渡り経路については、大部分が足環標識の回収・観察および足に付けた色標識（フラッグ）の観察などによって調べられている。とくに色標識にもとづく情報はかなりな量にのぼっており、貴重な資料となっている。ただし、渡りの経路あるいは渡りの実態を明らかにするにはまだ不十分で、地域と地域をきちんとつなぐ情報にはなっていない。

衛星を利用した渡りの追跡調査は、ホウロクシギ *Numenius madagascariensis* で実施されている（Driscoll & Ueta 2002）。ホウロクシギは、カムチャッカからアムール川中流域にかけての湿原で繁殖し、東南アジアからオーストラリアにかけての干潟で越冬する。オーストラリア東部のブリスベンで捕獲され、送信機を装着されたホウロクシギは、春の北上のさい、オーストラリアから中国東海岸や日本の四国や台湾まで、太平洋を一気に越えて渡った。到着地はロシアの南東部などだった。日本に立ち寄った例では、オーストラリア東海岸の越冬地を出発したのが3月4ないし5日、日本の四国に到着したのが3月21日だった。

カモ類では、マガモ *Anas platyrhynchos* などの渡り経路が衛星追跡によって明らかになっている（e.g., Yamguchi et al. 2008）。マガモは北海道から九州までの広い範囲から追跡されているが、大部分の個体は日本海を直接越えてロシア東部にまで渡っている。これらのカモ類では、渡り経路上に多くの個体が長期間滞在する中継地のあることがわかっている。また、そのいくつかでは、そこから放射状に経路が拡散することもわかっている。北海道東部のサロマ湖や風連湖、サハリン南部、ロシア東部のアムール川の河口などが、そうした中継地とみなされる。こうした中継地の存在は、ウイルスの拡散とかかわる可能性がある。

カラス類では、ミヤマガラス *Corvus frugilegus*の渡りが衛星追跡されている(東京大学 2007)。2006年に追跡された例では、秋田県西部の大潟村から出発した鳥は、春、日本海を越えてロシア東南部に到着したのち、アムール川の中流域、ブラゴベシェンスク近郊にまで渡っている。秋には、その逆の経路をたどって秋田の越冬地に到着している。ミヤマガラスは、留鳥性のハシブトガラスやハシボソガラスとともに行動することがあるため、蚊の発生と結びつきやすい牛舎や豚舎、養鶏場などとかかわる可能性がある。

2) 日本国内における渡り鳥の移動経路と利用環境

日本国内に WNV が持ち込まれ、伝播されるシナリオを想定すると、本研究課題で重視しているシギ・チドリ類による伝播が考えられる。シギ・チドリ類は、すでに NWV が広がっていると考えられるロシア東部などに繁殖分布し、あるいは渡りの時期にそうした地域を広く通過してくるからである。また、ほかの渡り鳥と比べると日本に渡来する時期が8月から9月と早く、この時期は日本で蚊がまだ活動している時期でもあるからである。

日本国内のシギ・チドリ類の渡り経路については、具体的なことは十分にわかっていない。これまでの観察情報などを総合すると、沿岸部を利用する鳥は、北海道から太平洋沿岸に位置するいくつかの干潟などを移動し、沖縄方面へと移動していくものと思われる。あるいは、ロシアや中国などの北方域から国内の個々の干潟などに直接渡来し、国内のほかの場所をほとんど経由せずに東南アジア方面に南下していくものもあるようだ。また、朝鮮半島西岸から九州西岸を経て、沖縄へと南下してくるものもあると予想される。

一方、内陸部の湿地を利用するツルシギ *Tringa erythropus*、タカブシギ *T. glareola*、ヒバリシギ *Calidris subminuta*、タシギ *Gallinago gallinago*などは、近年の自然湿地の大規模な埋め立てにより、水田を重要な生息地としているようである。これらの鳥では、特定の重要生息地があるというよりも、国内の水田を広く利用している可能性がある。ただし、現在、シギ・チドリ類が渡りの途中で立ち寄る水田の生息地は、過去の湿地の分布、ないしは過去の渡り経路と関係している可能性もある。過去の土地利用をふくめて種ごとの環境選択について線形混合モデルのモデル選択を行なった結果によると、キアシシギ *Tringa brevipes*では農地の局所水田率が正、周辺5kmの水田割合が正、周辺2kmの内水域割合が正に関係していた(西川 2011)。タシギでは、農地の局所水田率が負、周辺3kmの内水面割合が正、過去の周辺1kmの葦原割合が負に関係していた。チュウシャクシギ *Numenius phaeopus* では、周辺1kmの水田割合が負、過去の周辺1kmの湿地割合、水田割合が正に関係していた。こうした環境特性にもとづいて、それぞれの種は渡り途中の生息地を選択しているものと考えられる。

国内での WNV の伝播について考えると、蚊との接触がより多く、また人家付近であるという点から、沿岸部の干潟などよりむしろ内陸湿地、とりわけ水田を生息地とするシギ・チドリ類の移動に今後注目する必要があるかもしれない。

(6) 成果のまとめと小型 GPS 送信機改良への提言

オナガガモを対象とした移動追跡では、宮城県伊豆沼周辺の越冬地で、2009年度と2010年度1月に計11羽の個体に Argos 送信機を装着し、2羽の渡りを越冬地から繁殖地まで、5羽の渡りを北海道以北の中継地まで追跡することができた。繁殖地まで追跡できた2羽のうち、2010年に送信機

を装着した雄(個体1)は、北海道中北部、サハリンを経てほぼ直線上に北上し、インディギルカ川の上・中流域で繁殖期にあたると思われる6-7月を過ごし、その後も8月下旬まで滞在したことが明らかになった。もう1羽の2010年1月に送信機を装着した雄(個体9)は、やはり北海道中北部とサハリン南部まで北上したのち北東へ向かい、繁殖期と考えられる6-7月はカムチャッカ半島中部に滞在し、その後、同半島北東部沿岸域で10月下旬まで滞在したことが分かった。さらに、これら繁殖地までの渡り追跡に成功した個体を対象とし、越冬地や中継地、繁殖地など滞在地内での渡り以外の移動様式について解析したところ、越冬地周辺では5km以上の中距離移動の割合が高いこと、それに比べて中継地や繁殖地などでは、中距離移動の割合が比較的小さいが、個体差が見られることなどが明らかになった。

一方、WNV を保有している可能性のあるシギ類を対象とした移動追跡では、新型 GPS 送信機の装着とその後2-5日間の移動情報収集を、3羽という限られた個体数であるが実施した。その結果、チュシヤクシギが、北海道東北沿岸のコムケ湖から宮城県南東岸までの約700kmを2日以内というごく短期間で移動している可能性が示唆された。しかし、今回得られた結果は信頼性のある測位点数は3羽合計で6点しかなく、シギ類の長距離移動や滞在地での局所移動が WNV 感染拡大にどう関係するかを検討することはできなかった。

文献等の情報をもとに、WNV の感染拡大に関わる可能性が高い鳥として、シギ類とカモ類、およびカラス類が考えられ、とくにWNV が広がっていると考えられるロシア東部などに繁殖分布し、あるいは渡りの時期にそうした地域を広く通過してくるシギ類が、関わる可能性が高いと考えられた。シギ類が主に利用する生息地は沿岸域の干潟と内陸域の水田地域である。国内でのWNV の伝播について考えると、蚊との接触がより多く、また人家付近であるという点から、沿岸部の干潟などよりむしろ内陸湿地、とりわけ水田を生息地とするシギ類の移動に今後注目する必要があると考えられた。

新型 GPS 送信機を装着したシギ類の羽数が3羽と少なかったのは、新型 GPS 送信機の完成が2011年8月末で、日本国内のシギ類捕獲適期を過ぎていたためである。

最後に、今回の結果を踏まえ、今後、新型 GPS 送信機を WNV 保有の可能性が高いシギ類等の移動追跡に使用可能な形にするための対策案を以下にまとめる。

- (a) 筐体とアンテナの強度を増した上で、10g 以下への軽量化を行う
- (b) 飼育個体を対象とした装着実験を、1週間程度の短期だけでなく実際の装着期間を想定した2-3か月以上の長期間行い、送信機本体と装着具の劣化、シギへの影響を調べ、明らかになった問題点の対策を講じる
- (c) 野外個体を対象とした予備的な装着と追跡の試みを、想定される複数種を対象に行い、その後の測位データの取得状況等をもとに、明らかになった問題点の対策を講じる

上記の手続きを経て新型 GPS 送信機の改良が進み、本州以南で春の渡り時期(4月中旬から5月中旬)から、日本国内と国外の繁殖地までの移動、そして繁殖終了後、再び国外の中継地を経て日本国内を南下する時期の移動様式が明らかにできれば、シギ類の渡りが WNV の感染拡大のリスクにどう関わるのか、有効な情報を得ることができると考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

日本で越冬するカモ類を対象に、WNV の感染経路解明に注目した移動経路解析は、まだほとんど行われていない。WNV 感染の可能性の高い夏から秋にかけての移動パターンは、2羽しか得られなかったが、同様の調査が、カモ類による東アジアでの WNV 感染経路の解明に有効であるという可能性を示すことができたと考えられる。日本を渡り時期に利用するシギ類が、日本での WNV 感染拡大に関わる可能性が高いことを文献情報に基づき整理するとともに、初めて、日本を利用する中型シギ類の衛星追跡を試みた。今回は十分な結果を得ることができなかったが、シギ類の渡り追跡により有効な小型 GPS 送信機開発にむけ、いくつかの具体的対策を整理した。これらを踏まえた送信機開発が進むことで、今後、不明な点の多かった日本周辺のシギ類の渡り経路解明や、シギ類の渡りと WNV 感染拡大の関係が明らかになると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

今回の成果をもとに、カモ類の長距離の渡りおよび局所移動を通して WNV の感染拡大が懸念される地域等を、その危険度の大きさごとに示すための基礎情報を得ることができた。これらは、WNV 感染拡大予想、およびそれら感染症リスクも踏まえた地球環境政策への提言や、広報と普及に役立てられると考えられる。一方、シギ類については、カモ類よりも感染拡大に関係する可能性の高いことを文献情報等から整理することはできたが、実際の移動経路解明は、今後の可能性を示すにとどまった。今回の結果と経緯を踏まえ、シギ類の渡り経路解明の重要性を強調することで、感染症拡大リスクを踏まえた地球環境政策策定に貢献できると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

- ・ 国際共同研究企画名 : ハチクマの渡り経路選択と環境利用
- ・ 協力案件名 : 外国人客員研究員との共同研究
- ・ カウンターパート氏名 : Syartinilia
- ・ 所属 : ボゴール農科大学
- ・ 国名 : インドネシア
- ・ 参加・連携状況 : 2010年2月1日より、同年4月30日まで、東京大学の外国人客員研究員として招聘。2011年2月19日から2月28日まで、インドネシアの南カリマンタンおよび西ジャワで共同野外調査を実施。
- ・ 国際的な位置づけ : 日本と東南アジアとの間を行き来する長距離移動性渡り鳥ハチクマの保全に向けて、渡り経路の決まり方や、利用する環境の特性などを明らかにする。結果は渡り経路上にある国々の関連機関に送り、保全にかかわる資料として利用してもらう予定。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（2）口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない

（4）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

（6）その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Tirrell S, Wakem EM, French RA, Garmendia AE, Van Kruiningen HJ. 1999. Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 286, 2331-33.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. 2008. West Nile virus activity: United States, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57, 720-23.
- 3) Chang GJ, Davis BS, Stringfield C, Lutz C. 2007. Prospective immunization of the endangered California condors (*Gymnogyps californianus*) protects this species from lethal West Nile virus infection. *Vaccine* 25, 2325-30.
- 4) Driscoll PV, Ueta M. 2002. The migration route and behaviour of Eastern Curlews *Numenius madagascariensis*. *Ibis* 144 (on line), E119-E130.
- 5) 環境省生物多様性センター. 2008. ガン・カモ類の生息調査報告書(第40回). 環境省生物多様性センター.
- 6) 西川雄太. 2011. 水田を利用するシギ・チドリ類の景観スケールでの生息環境選択. 東京大学フィールド科学専修卒業論文.
- 7) Olsen GH, Miller KJ, Docherty DE, Bochsler VS, Sileo L. 2009. Pathogenicity of west nile virus and response to vaccination in sandhill cranes (*Grus canadensis*) using a killed vaccine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40, 263-71.

- 8) Ternovol VA, Protopopoval EV, Surmach SG, Gazetdinov MV, Zolotych SI, Shestopalov AM, Pavlenko EV, Leonova GN, Loktev VB. 2006. The genotyping of the West Nile virus in birds in the far eastern region of Russia in 2002-2004. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiia i virusologiia* 4, 30-5.
- 9) 東京大学. 2007. 野鳥由来ウイルスの生態解明とゲノム解析：海外からの飛来ルート解明に関する研究. 「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」報告書.
- 10) Yamaguchi N, Hiraoka E, Fujita M, Hijikata N, Ueta M, Takagi K, Konno S, Okuyama M, Watanabe Y, Osa Y, Morishita E, Tokita K, Umada K, Fujita G, Higuchi H. 2008. Spring migration routes of mallards *Anas platyrhynchos* that winter in Japan, determined from satellite telemetry. *Zoological Science* 25, 875-81.
- 11) Wunschmann A, Shivers J, Bender J, Carroll L, Fuller F, Saggese M, van Wettere R, a Redig P. 2004. Pathologic findings in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*) and Cooper's hawks (*Accipiter cooperi*) naturally infected with West Nile virus. *Avian Diseases* 48, 570-80.

(2) 希少鳥類への渡り鳥による感染症リスク解析研究

近畿大学 先端技術総合研究所
独立行政法人 国立環境研究所

桑名 貴
久米 博（平成21、22年度）
大沼 学（平成21、22年度）

〈研究協力者〉

猛禽類医学研究所
ロシア・ボロンスキ自然保護区
独立行政法人 国立環境研究所

齋藤慶輔
コチュエルガ・マルガリータ
サビツカ・エディタ
根上泰子
三谷 匡

近畿大学 先端技術総合研究所

平成21～23年度累計予算額：51,597千円
（うち、平成23年度予算額：15,699千円）
予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 既にウエストナイル熱ウイルス（WNV）が分布している極東ロシアで繁殖し、日本へ飛来する渡り鳥（シギ・チドリ類およびカモ類）についてWNVの感染状況をウイルス抗原、ウイルス遺伝子および抗WNV抗体検出を指標にモニタリングを実施した。また、WNVの感受性を規定しているOas遺伝子の塩基配列と死亡率の間に関連性があるのか評価した。加えて、鳥類の培養細胞を使用した感染実験でWNVの鳥類感受性を評価できるのか検討した。渡り鳥の捕獲は北海道のコムケ湖、沖縄県比屋根湿地（以上、シギ・チドリ類）および宮城県・伊豆沼（カモ類）で実施した結果、シギ・チドリ類29種793個体を捕獲した。捕獲した全個体より口腔内スワブを採取し、WNV抗原とWNV遺伝子の検査用サンプルとした。血液はシギ・チドリ類27種301個体とオナガガモ3個体より採取した。採取した血液から血漿を分離し、抗体検査用サンプルとした。WNV抗原の検出はWNV簡易検査キットを使用した。ウイルス遺伝子の検出はLAMP法で実施した。抗WNV抗体検出は間接酵素抗体法（間接ELISA法）で実施した。その結果、全個体がウイルス抗原およびウイルス抗体陰性であった。WNVの感受性を規定しているOas遺伝子の配列とウイルス感染時の死亡率との関連を調べた結果、遺伝子配列と死亡率の関連性は認められなかった。加えて、培養細胞を活用したWNV感受性試験を琉球大学（サブテーマ4）と共同で実施した。モデル鳥類（ハシブトガラス、ニワトリ、ドバト）を対象に感染実験を行ったところ、細胞障害については鳥類種間で大きな差が認められなかった。一方、絶滅危惧種のヤンバルクイナでは、細胞への感染が全く現れなかった。

[キーワード] 渡り鳥、ウエストナイル熱ウイルス、Oas遺伝子、培養細胞、感染実験

1. はじめに

一般に、絶滅危惧鳥類は生態系の中で既に生息基盤が弱く、個体数も少なくなっていることも併せて繁殖能が低く、追加的外圧によって容易に絶滅する恐れがある。そのために、多種多様な鳥類で大量死を引き起こすウエストナイル熱ウイルス（WNV）が一旦野性鳥類に広がると、ウイルスを媒介する野外の吸血昆虫を減少させることが非常に困難であるために、生態系への多大な影響は避けられない。

既に、平成18年度～20年度に実施して来た先行研究「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(FY2006～FY2008)」の中で、①我が国を渡りのルートとするカモ類がWNVに対する抗体を高率（50～80%）に保有している事実を突き止めた。抗体を持つことは過去にWNVに感染した確証である。カモ類の渡りルートでWNV汚染されている唯一の地域は極東ロシアのため、当該地域のいずれかで吸血昆虫を介した感染が起こっていることが明確となった。ただし、我が国へのカモ類の渡りの時期が、国内で吸血昆虫（蚊）が発生するピークと一致していない冬期であるために、我が国へのWNV搬入の担い手となる可能性は低い。これに反して、②旅鳥として夏期に極東ロシアからシギ・チドリ類が飛来する渡りの時期は、吸血昆虫が我が国の湖沼近辺で大量発生するピークと完全に一致することも明らかにしてきた。①、②の成果から、夏期に北方（繁殖地）から飛来してシギ・チドリ類が国内へWNVを持ち込む可能性が極めて高いとの結果を得るに至っている。そのため、シギ・チドリについての国内へのWNV分布拡大を早期に検知するためにWNV疫学調査を行う必要がある。また、WNVが国内に侵入した場合、WNVで大量死が発生し絶滅リスクが高まる希少鳥類を予測できれば重点的な防疫措置が可能である。しかし、現時点では大量死発生を起こす鳥類種を予測する手法がないため、培養細胞による感染実験とOas遺伝子の遺伝子配列情報からWNVで死亡率が高くなる希少鳥類を推定し、絶滅の危険性が高く優先的に対策をとるべき種を予測するための手法開発を行う。

2. 研究開発目的

ガン・カモ類は鳥インフルエンザの感染ルートとして注目を浴びている。しかし、我が国への侵入が懸念され、鳥類種の大量死の原因となるウエストナイル熱ウイルス（WNV）の感染ルート解明のためには、むしろガン・カモ類以外の渡り鳥（シギ・チドリ類等）の疫学的調査を行うことが、その渡りの中継地域に棲息する鳥類を始めとした生物多様性を保全するために緊急の課題である。更に、国内で最初に感染する可能性が高い鳥類種でのリスク評価のために、モデル鳥類種(幾つかの絶滅危惧鳥類)での感染調査を行うことが緊急の課題である。

我が国の生態系、特に絶滅危惧鳥類への新興感染症による絶滅危機を予測・回避するために、WNVがすでに分布している極東ロシアで繁殖し、日本へ飛来する渡り鳥（シギ・チドリ類およびカモ類）についてウイルス抗原、ウイルス遺伝子および抗WNV抗体検出を指標にWNVの感染状況を明らかにする。具体的には地球規模で渡りを行うシギ・チドリ類を対象に、WNVの疫学調査を、繁殖地（シベリア地域）および渡りにおける重要な中継地である北海道で実施する。

上記のように、地球を南北に半周する渡りをするシギ、チドリ類を対象にしたWNVのモニタリング体制整備により、関係する国々の診断方法が標準化されモニタリング情報を共有しやすくなる。これにより、渡りのルートに沿った国内及び海外における野生鳥類の大量死の発生を事前に

警告できる体制が確立することによって、国内の絶滅危惧野生鳥類の保全、及び希少鳥類の生息域内外保全に貢献することができる。

また、培養細胞による感染実験とOas遺伝子の遺伝子配列情報からWNVで死亡率が高くなる希少鳥類を推定し、絶滅の危険性が高く優先的に対策をとるべき種を予測するための手法開発を行う。

3. 研究開発方法

(1) ウイルス抗原、ウイルス遺伝子および抗WNV抗体検査用サンプルの採取

国内の湖沼および湿地において手捕り、またはかすみ網等を用いてシギ・チドリ類を捕獲する。かすみ網を用いる場合は、付近に必ず待機し、捕獲した鳥類を安全かつ速やかに網からはずす。なお、かすみ網等は、標識調査のため使用許可を既得している鳥類標識調査者が取り扱いを行う。捕獲した鳥類は、ウエストナイル熱ウイルス検査用の試料を採取後、放鳥する。

本研究では主に北海道のコムケ湖と沖縄県の比屋根湿地でシギ・チドリ類の生体捕獲を実施した。かすみ網は標識調査のため使用許可を既得している鳥類標識調査者(バンダー)が取り扱い、設置中は近辺に待機した。特に北海道紋別市コムケ湖(44°16'N/143°29'E)はオホーツク海と砂州(海浜草原)で区切られ、大きく3つの水域に分かれる。湖内に広がる干潟に多くのシギ・チドリ類が集まること、また20年以上現地にて標識調査を行っている研究者の協力を得られることから、調査場所に選定した(図(2)-1)。

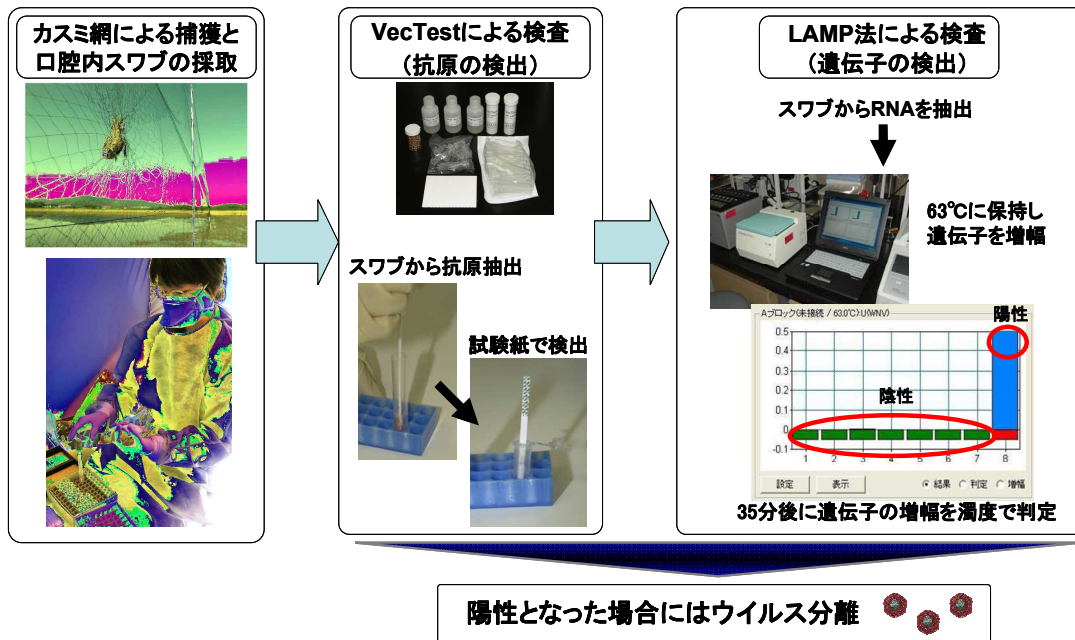


図(2)-1 捕獲調査地(北海道紋別市コムケ湖)

捕獲は、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行った。天候や気温を考慮し、30分～2時間おきにかすみ網の見回りをを行い、網にかかった鳥類は安全かつ速やかにはずし、検査用サンプルを採取した後に放鳥した。捕獲したシギ・チドリ類からは検査用サンプルとして、①口腔内粘膜を綿棒で拭き取ったもの（口腔内スワブ）と②頸静脈より血液を採取した。このとき採血に伴う個体への負担を考慮し、特に体重が軽い鳥種では採血を行わなかった。シギ・チドリ類に加えて、宮城県・伊豆沼でカモ類の捕獲を試みた。

（２）ウイルス抗原とウイルス遺伝子の検査

既に我々が先行研究で確立した手順でウエストナイル熱ウイルスの検出を試みた（図(2)-2）。まず、国内の湖沼および湿地において捕獲したシギ・チドリ類の口腔内から粘膜の拭き取りを行う。得られたサンプルでウエストナイル熱簡易検査キット（商品名:VecTest West Nile Virus Antigen Assay）を使用したウエストナイル熱ウイルスの検査（捕獲現場における一次スクリーニング）を行う。検査結果はデジタルカメラによって画像ファイルに保存する。また、高感度にウエストナイル熱ウイルスを検出する方法としてLAMP法（栄研化学株式会社）を採用した。これらの二つの手法を併用して、ウエストナイル熱ウイルスのモニタリングを実施することによって確定検出検査を行った。また、国内の湖沼および湿地において捕獲したシギ・チドリ類の翼下静脈または頸静脈から血液を採取しEDTA処理を施し、抗体検査の試料として冷蔵状態で琉球大学（サブテマ4）に送付した。

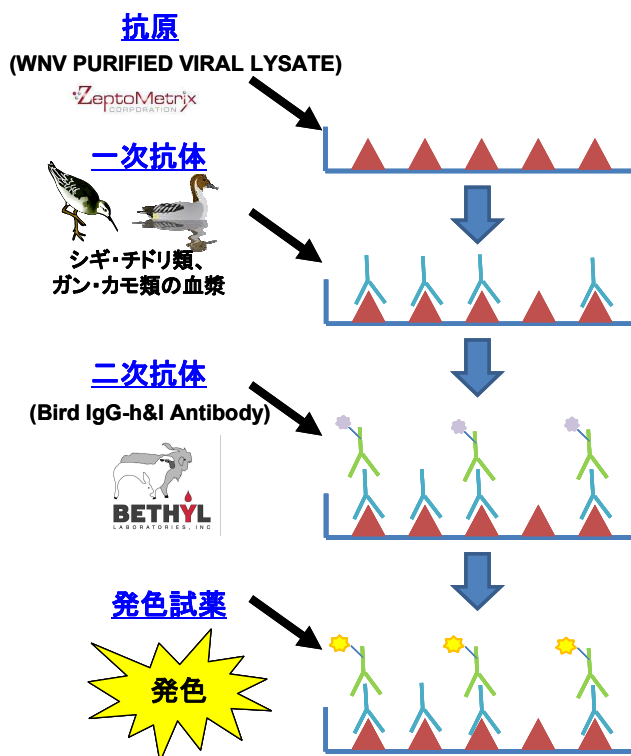


図(2)-2 ウイルス抗原検査とウイルス遺伝子検査の流れ

(3) 抗WNV抗体を検査

本研究で開発した間接酵素抗体法(間接ELISA法)により抗WNV抗体を検出した。検出方法の概要は以下のとおりである。

抗原としてWNV lysateを96ウェルマイクロプレートにコーティングし、二次抗体としてHorseradish peroxidase-conjugated Bird IgG-heavy and light chain antibody (Bethyl Laboratories、 Inc.、 Montgomery、 TX、 USA) を用いた(図(2)-3)。また、日本脳炎ウイルス(JEV)とWNVは抗原性が類似しているため、抗WNV抗体が陽性となった検体については同様の方法で抗JEV 間接ELISA法を実施した。被検検体はすべて100倍希釈して用いた。450nmで吸光度を測定し、抗原陽性及び陰性のOD値の比(P/N値)が2以上の値を示した場合を陽性とした。



図(2)-3

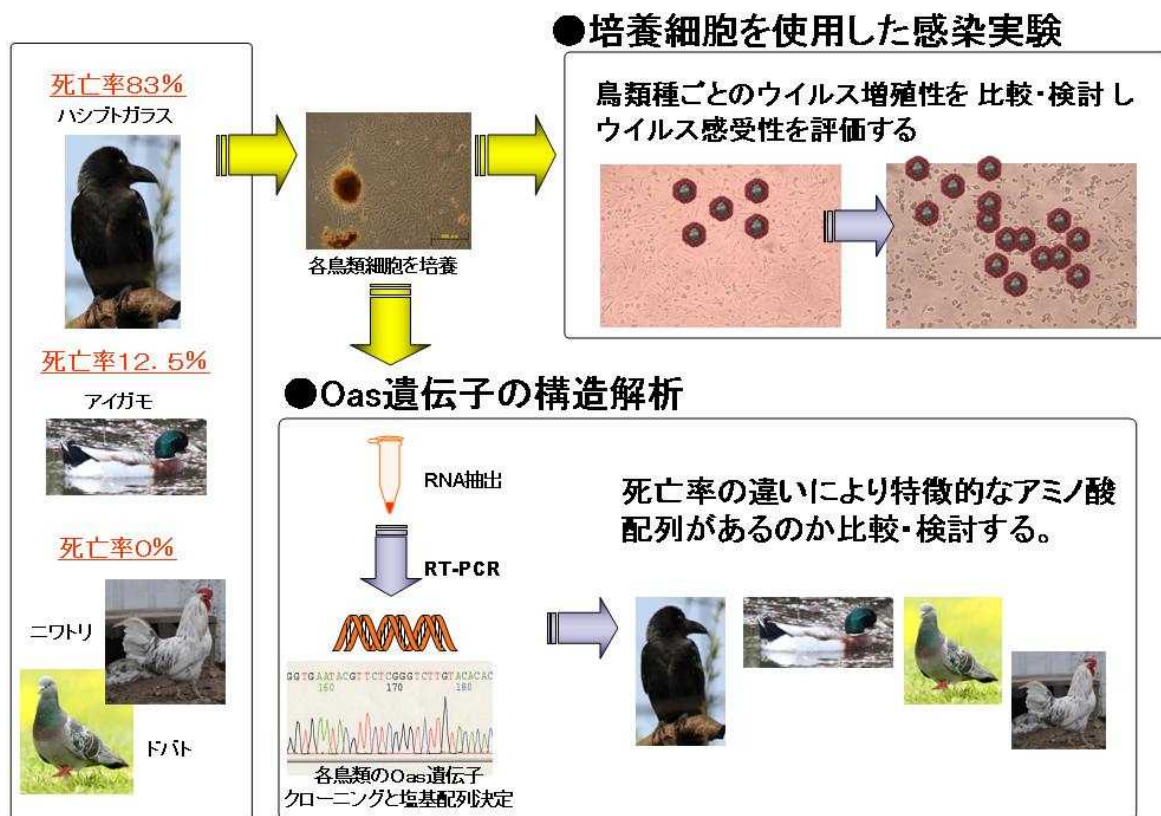
間接酵素抗体法による抗WNV抗体の検出原理

(4) 培養細胞を使用した鳥類のWNV感受性評価

生体感染実験によって死亡率が既知であるハシブトガラス(死亡率83%)、ニワトリ(死亡率0%)、ドバト(死亡率0%)の胚体組織を使用して線維芽細胞を培養した。また、絶滅危惧種であるヤンバルクイナの皮膚組織を使用して線維芽細胞を培養した。これらの線維芽細胞にWNVを感染させ、細胞の形態変化を経時的に観察した。(図(2)-4上部参照)

(5) モデル鳥類を使用したOas遺伝子と死亡率との関連性評価

ハシブトガラス(死亡率83%)、アイガモ(死亡率12.5%)、ニワトリ(死亡率0%)およびドバト(死亡率0%)の胚体組織あるいは皮膚組織より線維芽細胞を培養した。その線維芽細胞にPoly(I:C)を作用させ抗ウイルス状態としてRNAを抽出した。そのRNAより5'RACE法および3'RACE法によって各鳥類のOas遺伝子をクローニングした。(図(2)-4下部参照)



図(2)-4 培養細胞を使用したWNV感受性評価法の開発

(6) 鳥類追跡用発信器の装着試験

サブテーマ3(株)コアが試作した鳥類追跡用発信器の装着実験を行う際に、北海道を含む国内湖沼および湿地において捕獲したシギ・チドリ類に発信器を装着する発信器を装着するシギ・チドリ類の体重は試作機重量の20倍以上とした。

4. 結果及び考察

(1) ウイルス抗原、ウイルス遺伝子および抗 WNV 抗体検査用サンプルの採取

本研究期間中にシギ・チドリ類33種1,134個体を捕獲した。最も捕獲できた鳥類種はトウネンであった(各年度ともに60%以上)。捕獲した全個体より口腔内スワブを採取し、ウイルス抗原とウイルス遺伝子の検査用サンプルとした。血液はシギ・チドリ類31種481個体より採取した。採取した血液から血漿を分離し、抗体検査用サンプルとした。加えて伊豆沼のオナガガモ3個体からも同様に試料採取した。

シギ・チドリ類の生体捕獲は環境省より学術許可を得て、かすみ網を用いて行った(図(2)-5、(2)-6)。かすみ網は標識調査のため使用許可を既得している鳥類標識調査者(バンダー)が取扱い、設置中は現場に待機した。捕獲調査は、設置し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行った。天候や気温状況を鑑み、30分~1時間おきの定期的な見回りを行うことで、捕獲鳥の安全確保に努めた。かすみ網にかかった鳥は、作業に習熟した鳥類標識調査者が取り外し、通気性のある籠に収容しサンプルを採取した後に放鳥した。

最終年度となる平成23年度の調査はサブテーマ3が担当する新型GPS機器の試作装置の完成の時期と中型・大型のシギ・チドリ類の捕獲可能性を勘案・検討して、捕獲地を北海道紋別市コムケ湖として捕獲および機器装着に重点を置き、計18種160検体を採取した(表(2)-1、図(2)-7)。シギ・チドリ類は、アオアシシギ、アカアシシギ、イソシギ、ウズラシギ、エリマキシギ、オオジシギ、オオソリハシシギ、オバシギ、キアシシギ、キリアイ、コオバシギ、ソリハシシギ、チュウシャクシギ、トウネン、ハマシギ、ヒバリシギ、メダイチドリらが捕獲された(図(2)-8)。またシギ・チドリ類以外の鳥種として、コガモが捕獲された。

同一標識個体が異なる日に再捕獲されることが2例(①トウネン、足環番号2AD44308、サンプル番号50および149 ②ヒバリシギ、足環番号2AD44318、サンプル番号52および67)あったが、野外生活中にウイルスに感染した可能性も考えられることからサンプル採取を行った。

捕獲した鳥種は、コムケ湖で観察されるシギ・チドリ類の種構成を反映しており、今回最も多く捕獲されたのはトウネン(n=85)、次いでキリアイ(n=16)、ヒバリシギ(n=16)といった小型シギであった。

今回、体重が100 g以上となる中型シギは、アオアシシギ(n=6)、アカアシシギ(n=1)、エリマキシギ(n=1)、オオジシギ(n=3)、オバシギ(n=1)、キアシシギ(n=1)、コオバシギ(n=1)が捕獲された。

また体重が200 g以上となる大型シギは、オオソリハシシギ(n=4)、チュウシャクシギ(n=2)が捕獲された。発信機の装着には大型シギの捕獲が必要なため、過去の調査から有用性が確認されている同種の声を用いた誘引方法に加え、草でデコイを作成し網場への誘引を試みた。特にチュウシャクシギは、スピーカーの声に対し、鳴いて応答するなど顕著な反応を示し、スピーカーおよびデコイの側へ舞い降りる反応が観察された。網場近くに降りた後は、人が接近して網方向へ飛び立たせ、捕獲した。



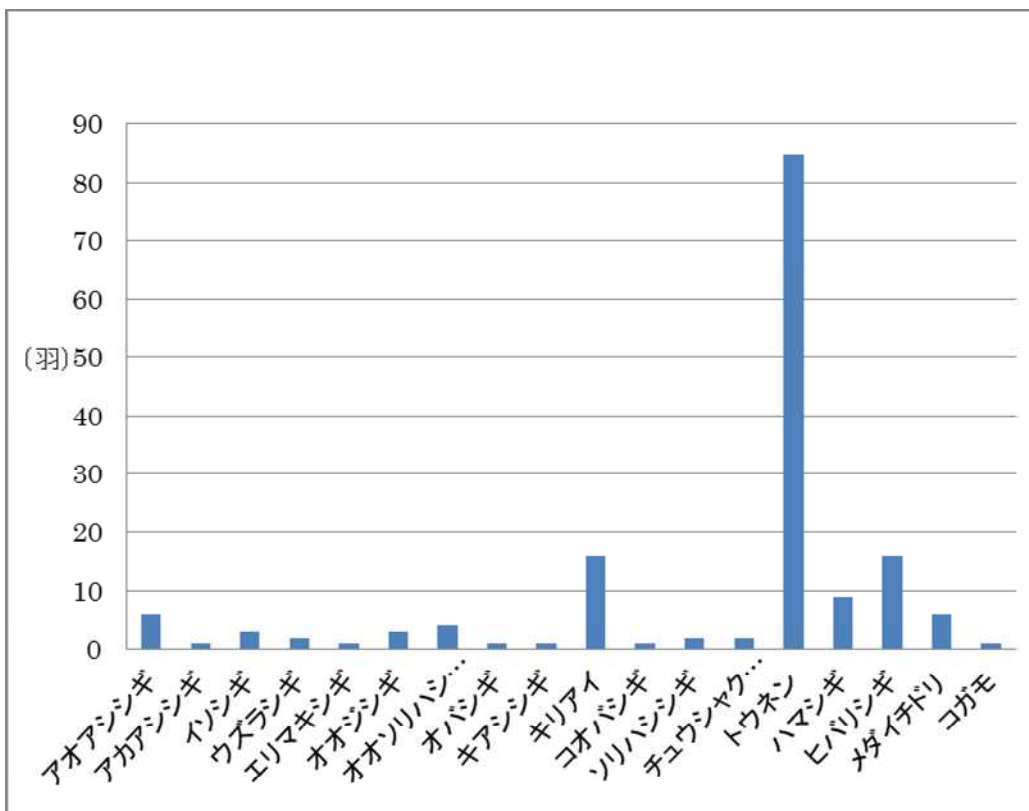
図(2)-5 カスミ網の設置(閉網時)



図(2)-6 カスミ網の設置(開網時)

| 種名 | 学名 | 捕獲数 |
|----------|------------------------------|-----|
| アオアシシギ | <i>Tringa nebularia</i> | 6 |
| アカアシシギ | <i>Tringa totanus</i> | 1 |
| イソシギ | <i>Tringa hypoleucos</i> | 3 |
| ウズラシギ | <i>Calidris acuminata</i> | 2 |
| エリマキシギ | <i>Philomachus pugnax</i> | 1 |
| オオジシギ | <i>Gallinago hardwickii</i> | 3 |
| オオソリハシシギ | <i>Limosa lapponica</i> | 4 |
| オバシギ | <i>Calidris tenuirostris</i> | 1 |
| キアシシギ | <i>Tringa brevipes</i> | 1 |
| キリアイ | <i>Limicola falcinellus</i> | 16 |
| コオバシギ | <i>Calidris canutus</i> | 1 |
| ソリハシシギ | <i>Xenus cinereus</i> | 2 |
| チュウシャクシギ | <i>Numenius phaeopus</i> | 2 |
| トウネン | <i>Calidris ruficollis</i> | 85 |
| ハマシギ | <i>Calidris alpina</i> | 9 |
| ヒバリシギ | <i>Calidris subminuta</i> | 16 |
| メダイチドリ | <i>Charadrius mongolus</i> | 6 |
| コガモ | <i>Anas crecca</i> | 3 |
| 計 | 18種 | 160 |

表(2)-1 H23年度の捕獲鳥類一覧



図(2)-7 H23年度の鳥類種別捕獲羽数



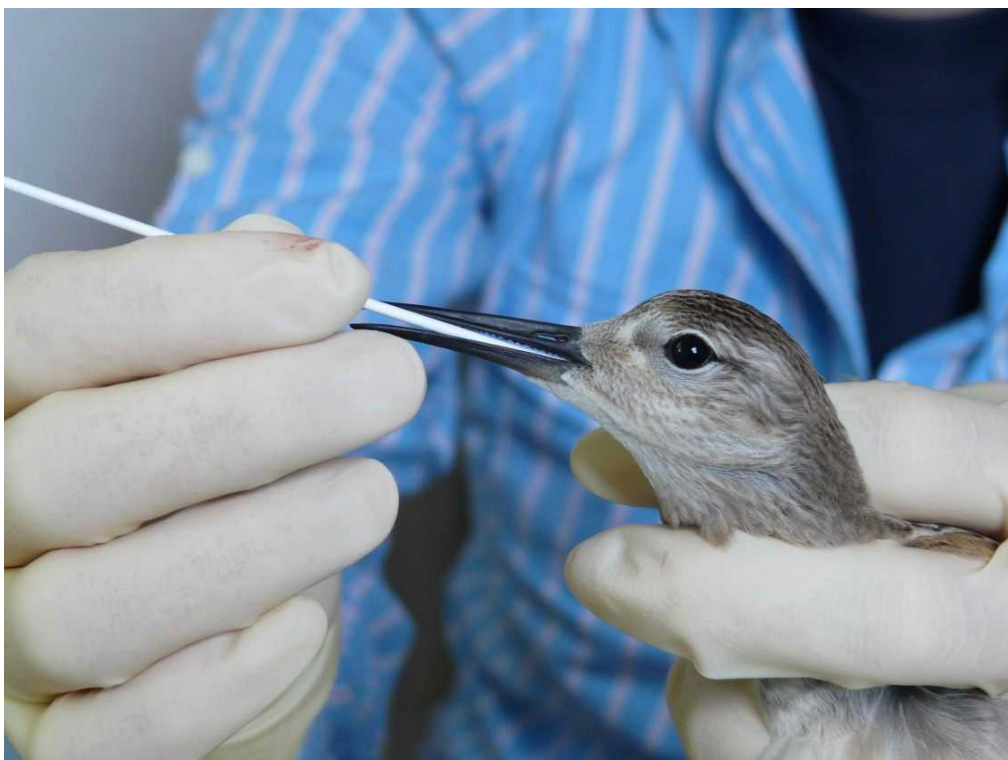
図(2)-8 捕獲鳥を安全な籠内に保管する

(2) ウイルス抗原とウイルス遺伝子の検査

ウイルス抗原、ウイルス遺伝子、及び抗WNV抗体の検出の結果、伊豆沼のオナガガモ（サブテマ1で既存GPS装着個体）から採取した各試料に加えて、シギ・チドリ類の全個体がウイルス抗原およびウイルス抗体陰性であった。

捕獲した鳥類の口腔内または気管の粘膜を綿棒で拭いとり、ウエストナイル熱ウイルスの検査試料とした。採取作業は、感染症予防の知識および経験が豊富な獣医師が行った(図(2)-9)。調査地においては、保冷剤を入れた密閉容器または小型電気冷蔵庫を用いて、サンプルを4℃以下に保存するよう努め、検査はウエストナイル熱簡易検査キット(商品名:VecTest West Nile Virus Antigen Assay)を使用した。キットによる判定結果は、デジタルカメラで撮影し記録した。160検体の簡易検査を行ったところ、いずれも陰性であった(資料(2)-1)。

さらに確定検査のため、栄研化学が開発したLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP法)を用いた遺伝子検査を行った(図(2)-10)。LAMP法は標的遺伝子の6つの領域に対し4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して遺伝子、プライマー、鎖置換型DNA合成酵素、基質等を一定温度で反応させる方法で、反応から検出までの工程を1ステップで行うことができる遺伝子増幅法である。増幅効率が高く、DNAを15分から1時間で109~1010倍に増幅し、極めて高い特異性から増幅産物の有無で目的とする標的遺伝子配列の有無を判定することが可能である。160検体のLAMP法検査を行ったところ、いずれも陰性であった(資料(2)-2)。



図(2)-9 捕獲した鳥から口腔内スワブを採取する



図(2)-10 スワブ検体の遺伝子抽出作業
(北海道釧路湿原野生動物保護事務所敷地内新設トレーラー実験施設)

(3) 抗WNV抗体検査及び血液試料の採取

平成21年度及び平成23年度に採取検査した血液試料の全てが抗WNV抗体陰性であった。また、伊豆沼で採取したオナガガモ3個体の血液試料についても同様に抗WNV抗体陰性であった。

最終年度の平成23年度は血液試料の採取を本研究班で行い、抗体検査をサブテーマ4の琉球大学で行った結果(サブテーマ4の結果を参照)、いずれも抗WNV抗体陰性であった。

また捕獲した鳥類のうち、個体の健康上、血液採取に問題ないと判断した111個体において、頸静脈または内側中足静脈から獣医師が血液を採取して血液試料とした(図(2)-11)。採取した血液はEDTA処理を施した後、冷蔵保存した。保存血液は近畿大学の指示に従い、琉球大学に冷蔵で送付した(表(2)-2)。



図(2)-11 頸静脈からの採血

| 種名 | 採取血液数 |
|----------|-------|
| アオアシシギ | 6 |
| アカアシシギ | 1 |
| イソシギ | 3 |
| ウズラシギ | 2 |
| エリマキシギ | 1 |
| オオジシギ | 3 |
| オオソリハシシギ | 3 |
| オバシギ | 1 |
| キアシシギ | 1 |
| キリアイ | 13 |
| コオバシギ | 1 |
| ソリハシシギ | 2 |
| チュウシャクシギ | 1 |
| トウネン | 44 |
| ハマシギ | 9 |
| ヒバリシギ | 13 |
| メダイチドリ | 6 |
| コガモ | 1 |
| 計 | 111 |

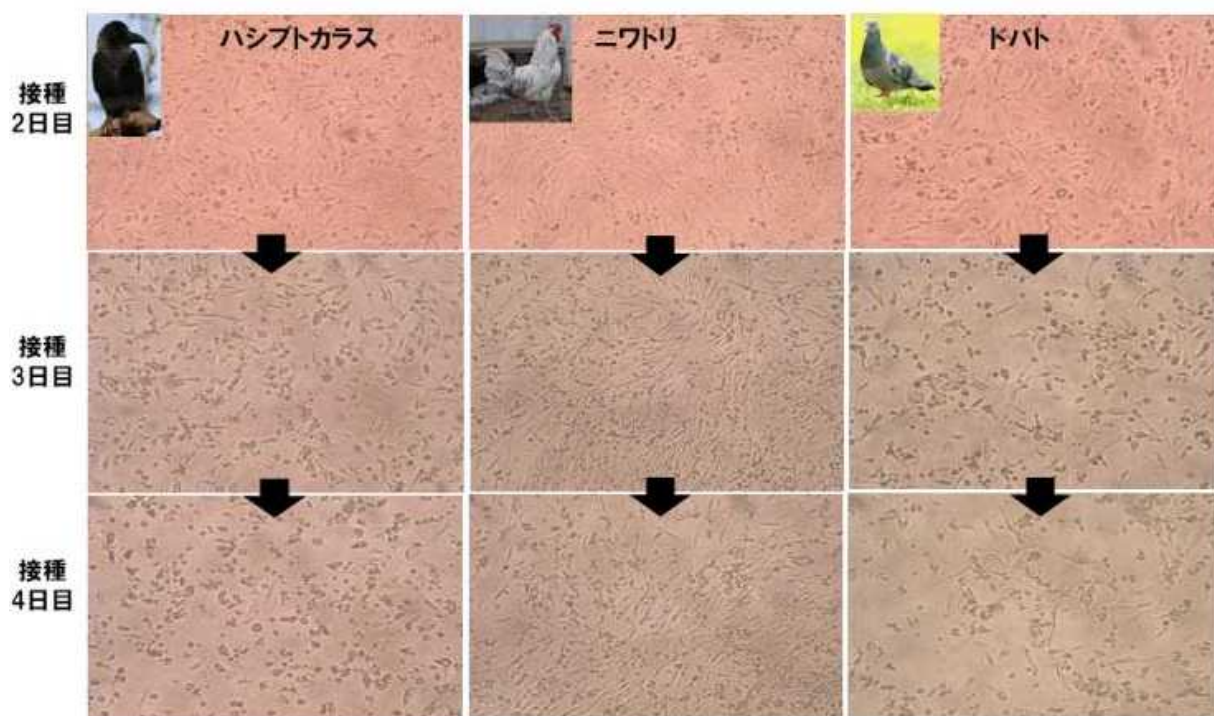
表(2)-2 採取血液試料一覧

(4) 培養細胞を活用したWNV感受性評価

死亡率が既知のハシブトガラス、ニワトリ、ドバトを対象に培養細胞で感染実験を行ったところ、個体死亡率を反映した細胞障害が認められたものの、感染ウイルス濃度が高すぎたために細胞障害によって鳥類種の死亡率を予想することが確実にできるほどではないという結果を得た。更に濃度の低いウイルス感染実験が必要と考えられる(図(2)-12)。

一方、絶滅危惧種のヤンバルクイナについて同様の感染実験を行ったところ、細胞障害が全く現れなかった。種としてのヤンバルクイナがWNVに感染した事例は無い(日本国内にWNVが侵入していない)ため、早急な結論はできないものの、感染の機会があっても全く体内でWNVが増殖しない鳥類種が存在する可能性を示唆している。これに関しては死亡しない他の普通種などを用いた個体感染研究データを待つ必要がある。この様に、予想できなかった今回の結果はWNVが培養細胞に与える影響に鳥類種差があるということを示しており、他の希少鳥類種においても培

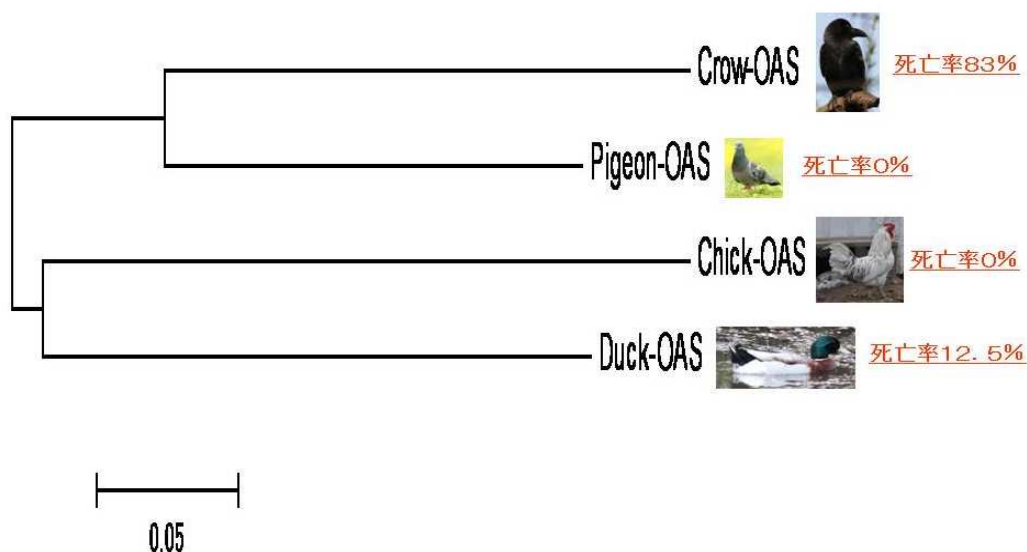
養細胞によりウイルス感受性評価が実施できる可能性を示すものである(サブテーマ4の結果考察参照)。



図(2)-12 死亡率が既知のモデル鳥類の細胞を使用したWNV感染実験結果

(5) モデル鳥類を使用したOas遺伝子と死亡率との関連性評価結果

ウエストナイル熱ウイルスの鳥類感受性を規定するOas遺伝子がコードするアミノ酸配列とウイルス感染時の死亡率との関連を調べた結果、アミノ酸配列と死亡率の関連性は無かった(図(2)-13)。したがって、Oas遺伝子が規定するアミノ酸配列によって鳥類の感受性を評価するのは困難であるという結果を得た。



図(2)-13 近隣接合法によるモデル鳥類Oasアミノ酸配列の系統樹

(6) 鳥類追跡用発信器の装着試験

鳥類追跡用発信機(以下、発信機とする)が提供された後、装着を請け負った東京大学の研究者らが2011年9月10日～12日にコムケ湖を訪れた。その期間中に捕獲した大型シギのうち、発信機重量が体重の4%以内となったオオソリハシシギ1個体、チュウシャクシギ2個体にハーネスを用いて、個体の背側に発信機を装着した(図(2)-14、(2)-15、(2)-16、(2)-17)。



図(2)-14 サブテマ3より提供された発信機



図(2)-15 発信機装着作業



図(2)-16 発信機装着後の個体



図(2)-17 放鳥後の発信機装着個体

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

個体感染実験に代わって希少鳥類種を含む鳥類種の培養細胞を用いてWNVに対する感染性感受性評価法の可能性を示すことができたことによって、今後各種の新興感染症もしくは再興感染症に対する抵抗性評価法を開発できる可能性を示すことができた。

(2) 環境政策への貢献

今後、培養細胞によってWNVの感受性を鳥類種ごとに評価できるようになると個体への感染実験ができない希少鳥種に対するWNVの病原性を評価することが可能となる。したがって、今後の研究結果から実際に大量死が起きる可能性が高い希少種を明確にすることが期待できる。WNVによる大量死が危惧されると判断された希少鳥類の中で、飼育下にあるものにはワクチン接種や飼育施設のカの防除といった具体的な対策を指示可能となる。

6. 国際共同研究等の状況

- ・ 国際共同研究企画名 : 二国間共通の希少鳥類保全に関する共同研究
- ・ 協力案件名 : 二国間科学技術協力協定に基づく共同研究「Evaluation of Genetic Diversity and Cell Preservation of Rare Birds」
- ・ カウンターパート氏名 : Kocherga Margarita
- ・ 所属 : Bolonski State Nature Reserve (Agency of the Federal Government of Russia)
- ・ 国名 : ロシア連邦
- ・ 参加・連携状況 : 2003年度より2011年度に至るまでロシア国内で野生鳥類におけるWNVの感染状況調査を共同で行うと共に、技術研修のために各年度2回の頻度で技術研修のための招へいを行って研究技術の標準化を行った。
- ・ 国際的な位置づけ : 日本と極東ロシアに共通する希少鳥類種の保全のために最新の手法を共通化するとともに、共同してWNV感染状況の調査と研究使用する希少種細胞の採取・保存を行うことで、両国で共通する希少鳥類種の保全研究と人材育成を行う。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

特に記載すべき事項はない

< その他誌上発表 (査読なし) >

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表 (学会等)

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

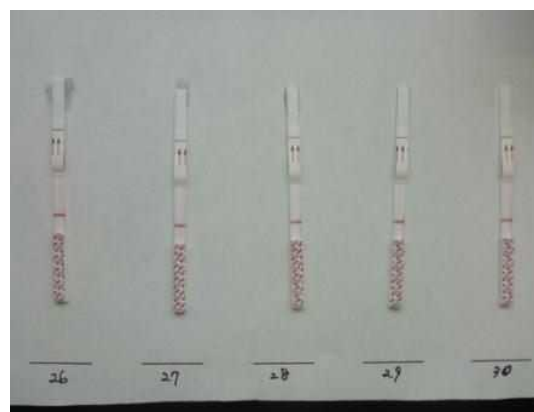
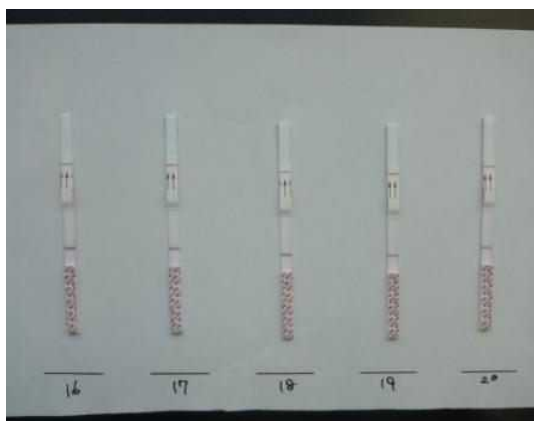
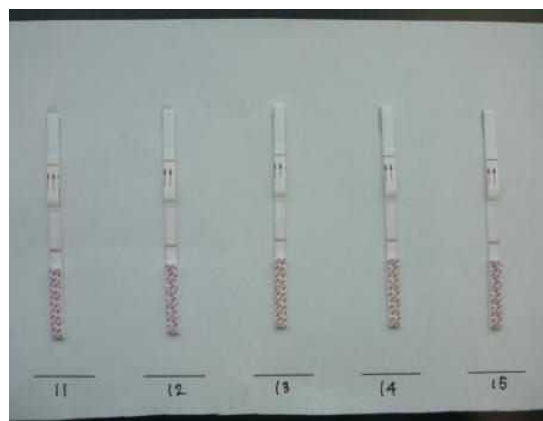
(6) その他

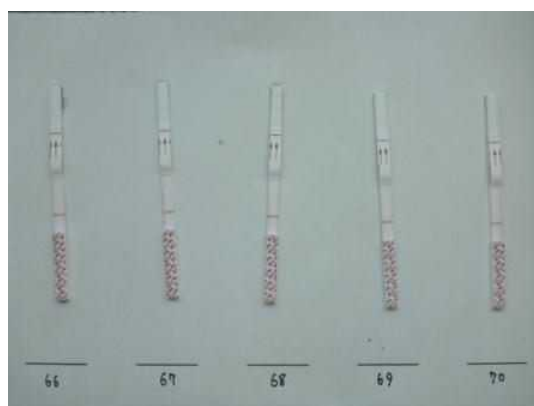
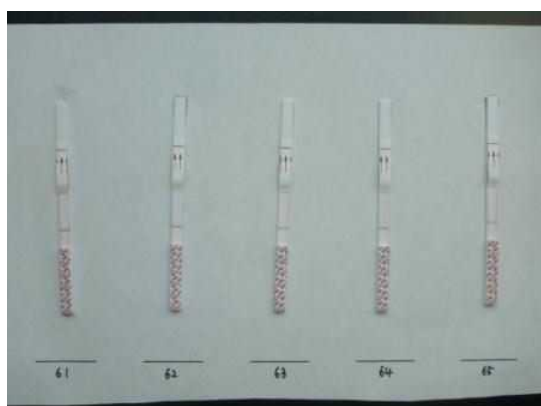
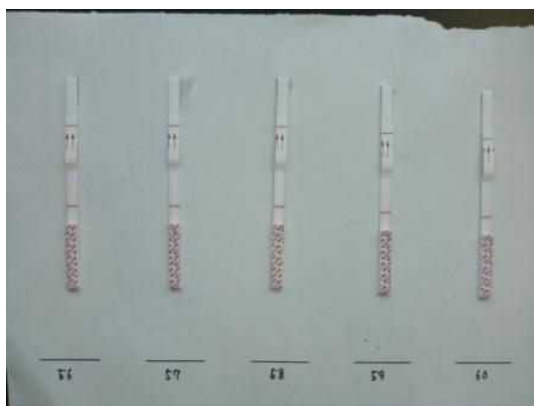
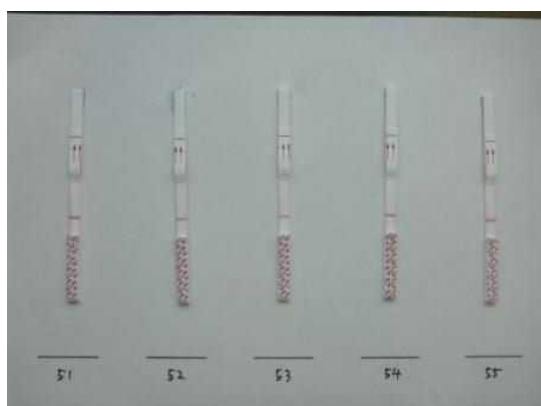
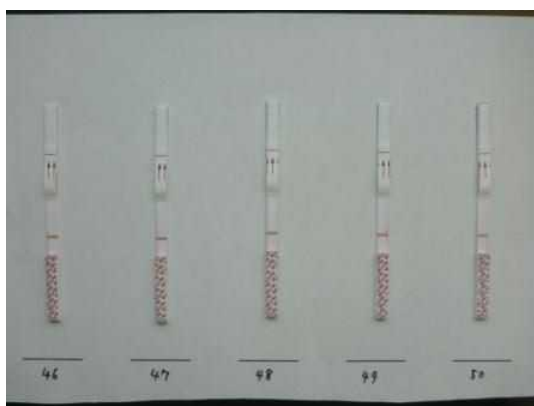
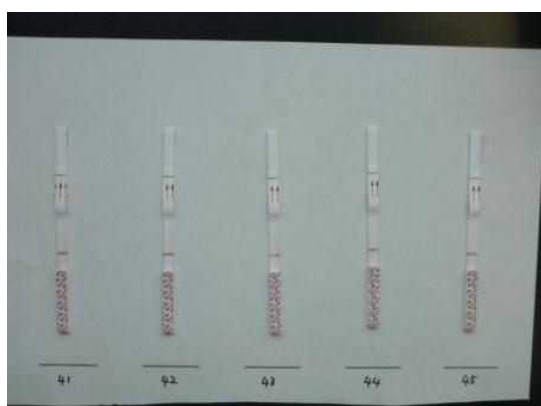
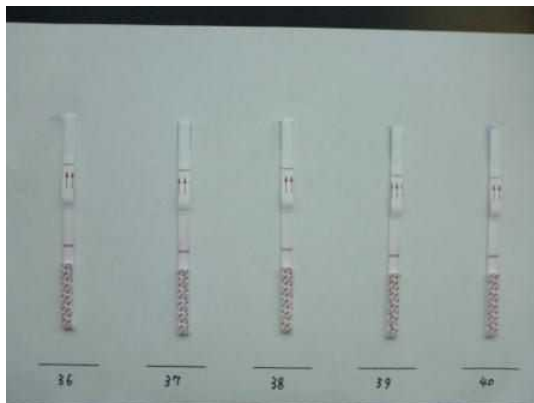
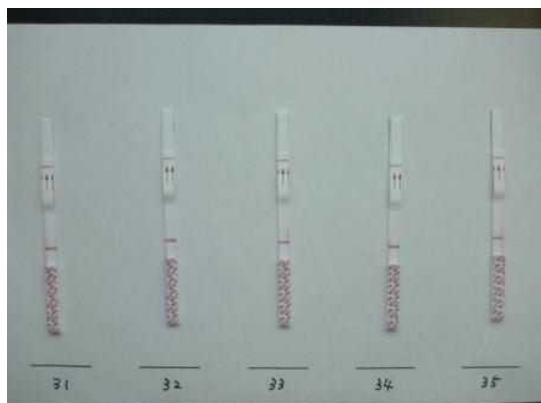
特に記載すべき事項はない

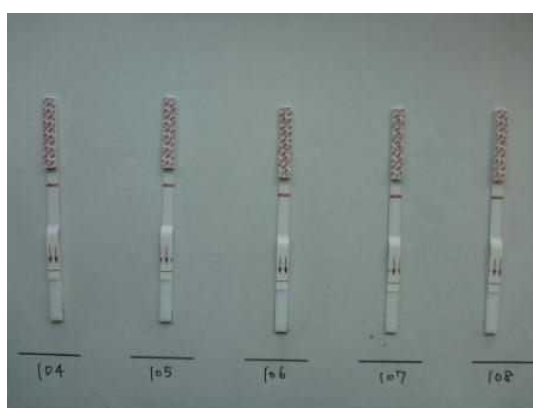
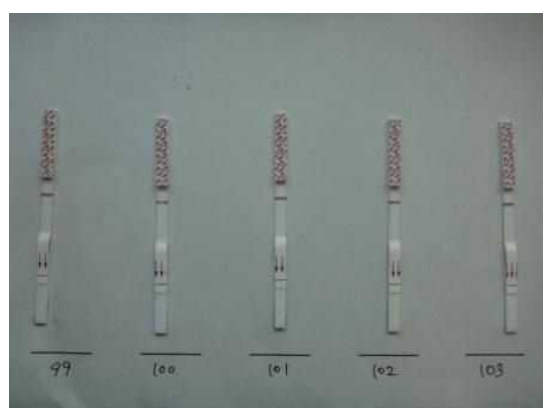
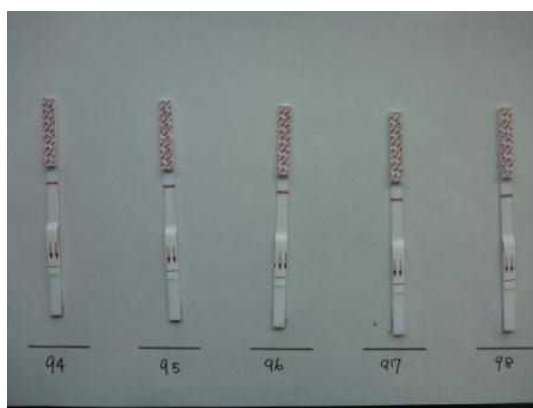
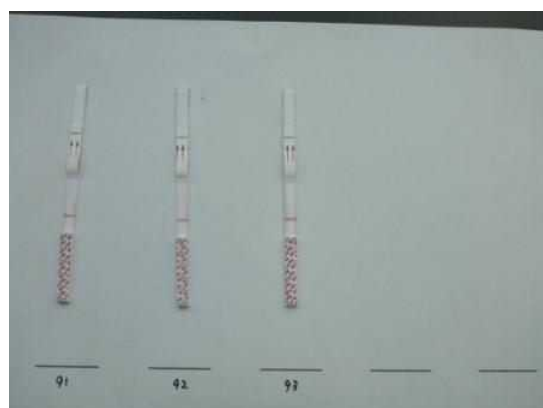
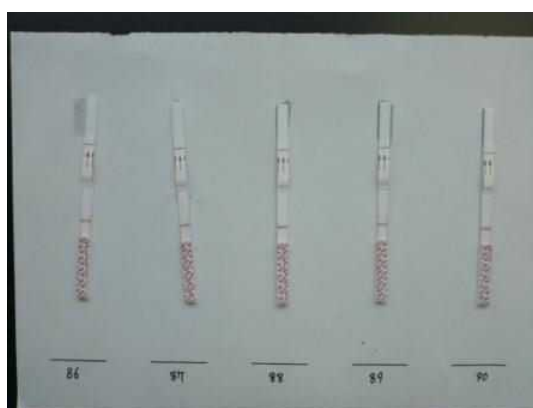
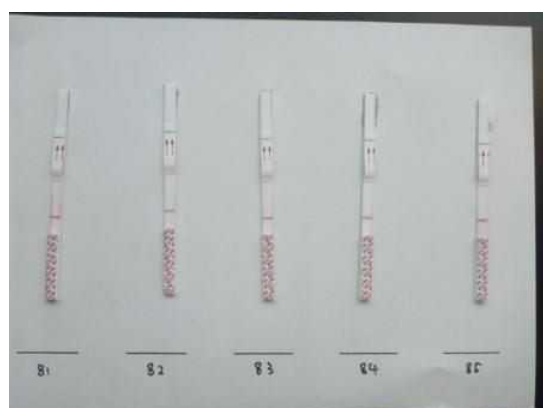
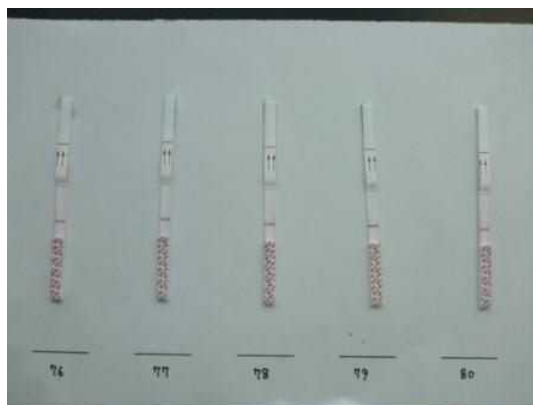
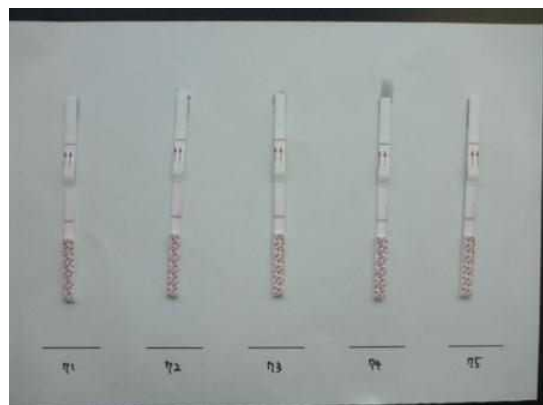
8. 引用文献

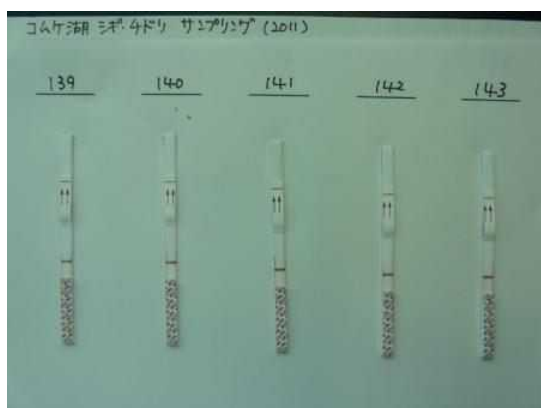
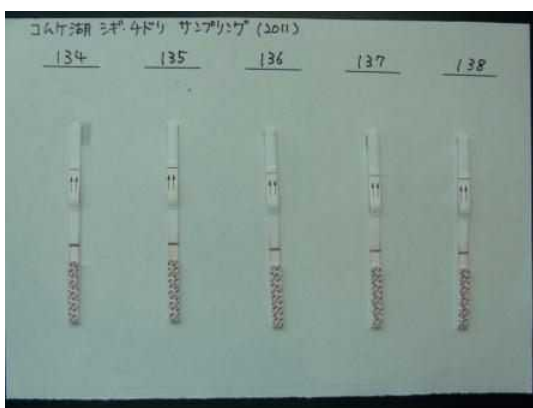
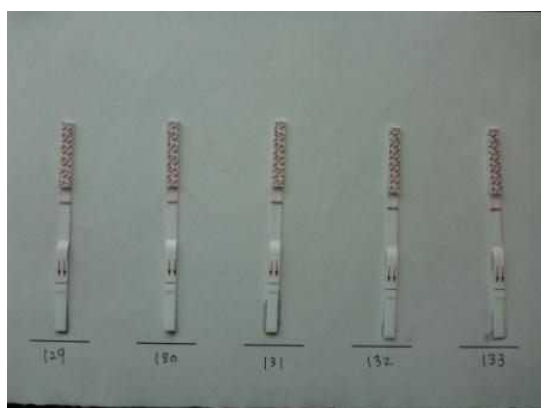
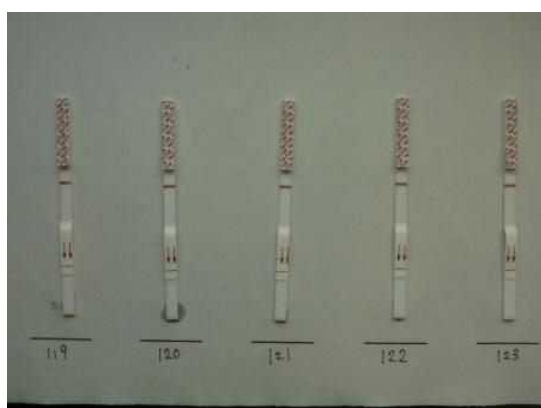
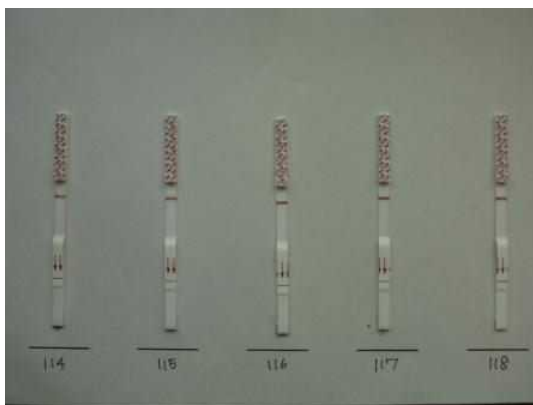
なし

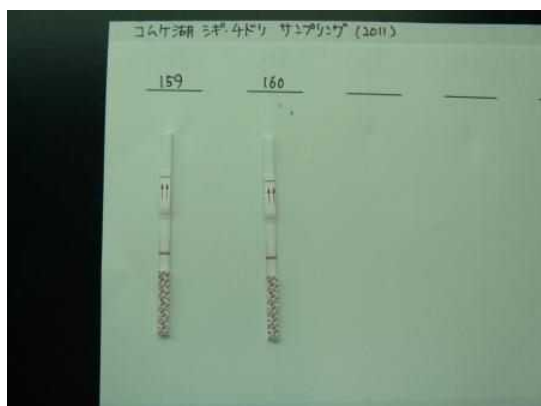
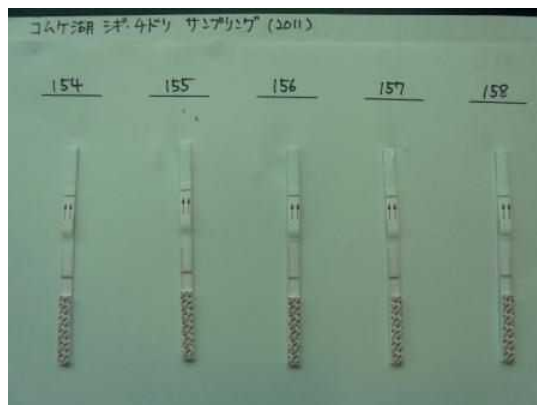
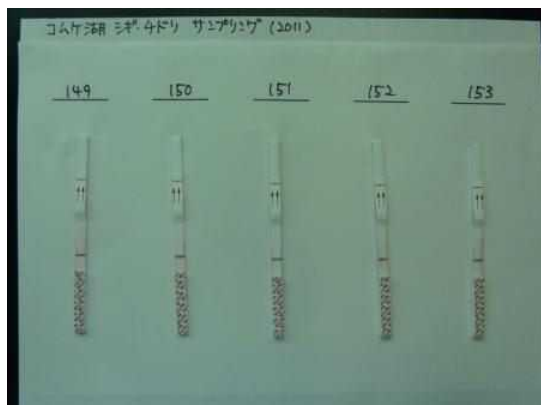
資料(2)-1 ウエストナイル熱ウイルス簡易検査結果写真



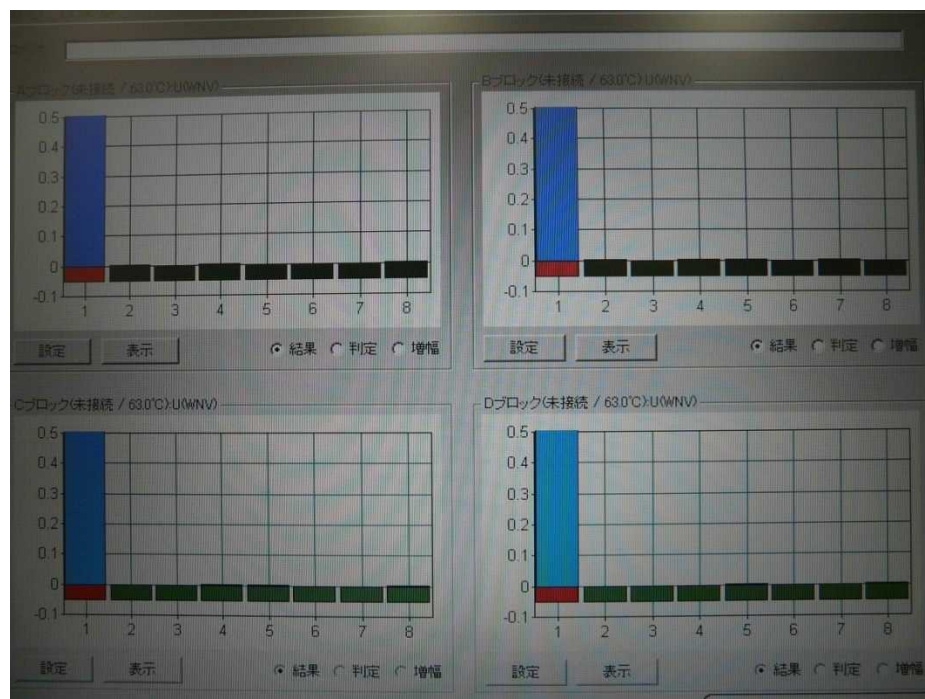




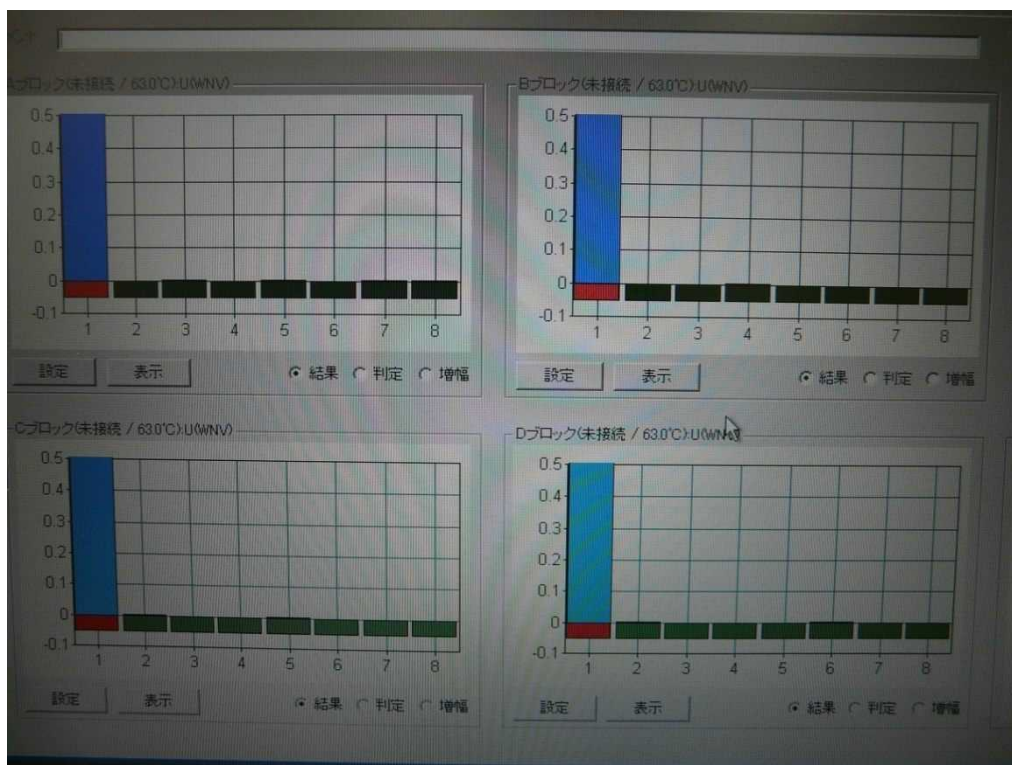




資料(2)-2 LAMP 法検査結果写真



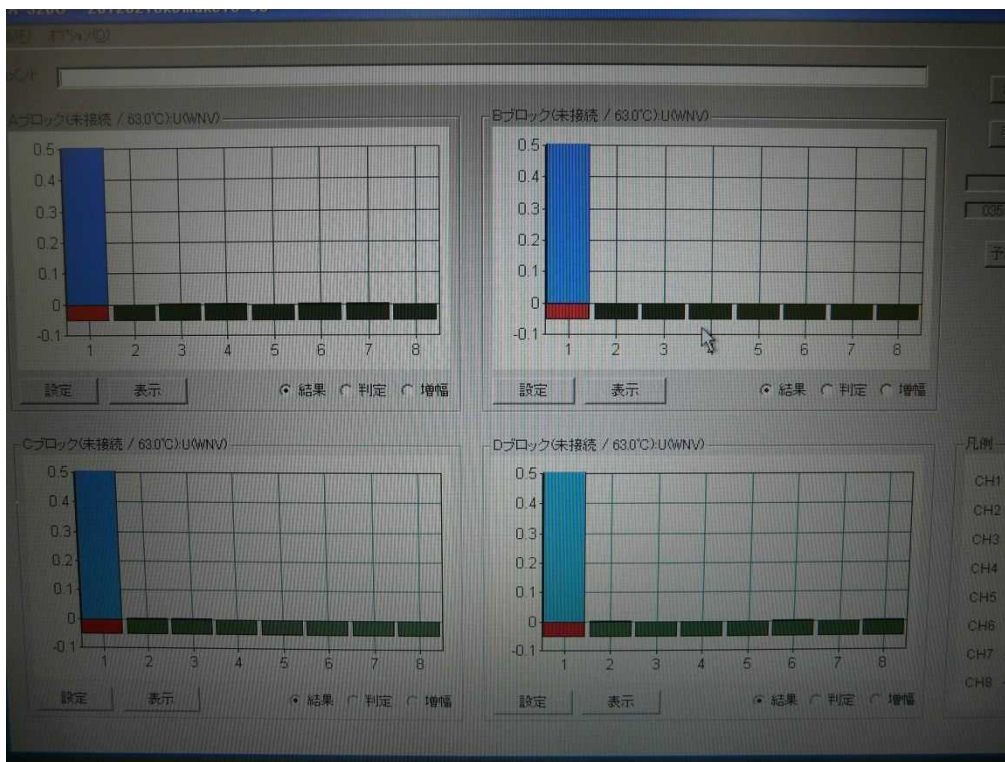
| A ブロック | | | B ブロック | | |
|--------|-------------|-------|--------|-------------|----------|
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 2AD44277 | トウネン | 3 | 2AD44283 | トウネン |
| 4 | 2AD44278 | トウネン | 4 | 2AD44284 | トウネン |
| 5 | 2AD44279 | トウネン | 5 | 2AD44285 | トウネン |
| 6 | 2AD44280 | トウネン | 6 | 2AD44286 | トウネン |
| 7 | 2AD44281 | トウネン | 7 | 6A30521 | オオジシギ |
| 8 | 2AD44282 | トウネン | 8 | 7A04499 | オオソリハシシギ |
| C ブロック | | | D ブロック | | |
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 2AD44287 | トウネン | 3 | 2AD44291 | トウネン |
| 4 | 2AD44288 | トウネン | 4 | 2AD44292 | トウネン |
| 5 | 2AD44289 | トウネン | 5 | 2AD44293 | トウネン |
| 6 | 6A30522 | オオジシギ | 6 | 2AD44294 | トウネン |
| 7 | 3E31338 | ハマシギ | 7 | 2AD44295 | ヒバリシギ |
| 8 | 2AD44290 | トウネン | 8 | 7A04500 | オオソリハシシギ |



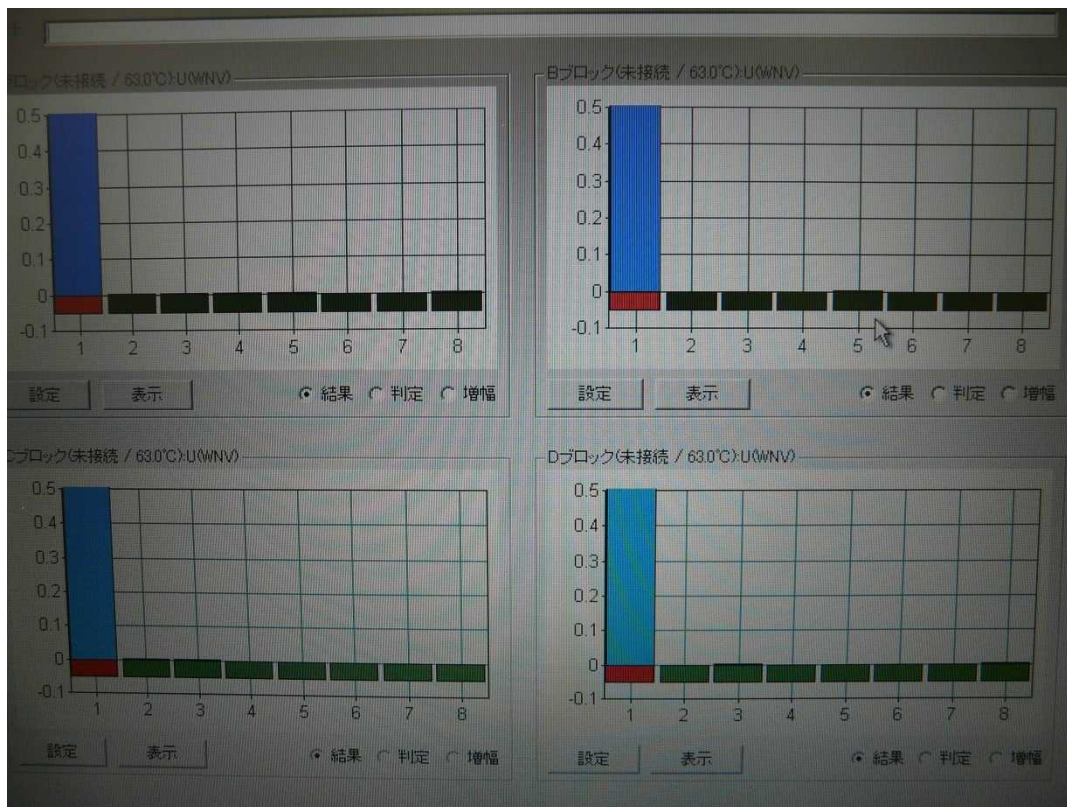
| A ブロック | | | B ブロック | | |
|--------|-------------|--------|--------|-------------|------|
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 4A20996 | コオバシギ | 3 | no ring | トウネン |
| 4 | 3E31339 | キリアイ | 4 | 3E31344 | キリアイ |
| 5 | 3E31340 | キリアイ | 5 | 3E31345 | キリアイ |
| 6 | 3E31341 | キリアイ | 6 | 3E31346 | キリアイ |
| 7 | 3E31342 | キリアイ | 7 | 3E31347 | キリアイ |
| 8 | 3E31343 | キリアイ | 8 | 3E31348 | キリアイ |
| C ブロック | | | D ブロック | | |
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 4A20997 | メダイチドリ | 3 | 2AD44301 | トウネン |
| 4 | 2AD44296 | ヒバリシギ | 4 | 2AD44302 | トウネン |
| 5 | 2AD44297 | トウネン | 5 | 2AD44303 | トウネン |
| 6 | 2AD44298 | トウネン | 6 | 2AD44304 | トウネン |
| 7 | 2AD44299 | トウネン | 7 | 2AD44305 | トウネン |
| 8 | 2AD44300 | トウネン | 8 | 2AD44306 | トウネン |



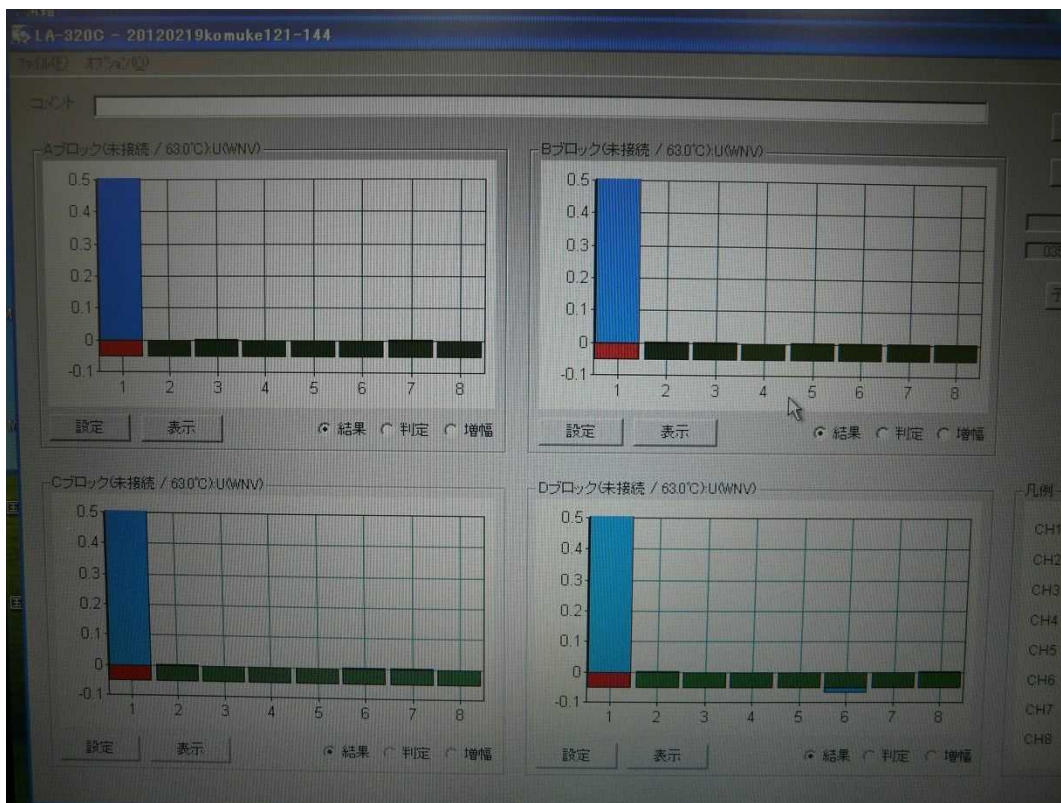
| A ブロック | | | B ブロック | | |
|--------|-------------|--------|--------|-------------|--------|
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 2AD44307 | トウネン | 3 | 2AD44320 | トウネン |
| 4 | 2AD44308 | トウネン | 4 | 2AD44321 | トウネン |
| 5 | 4A20998 | ソリハシシギ | 5 | 2AD44322 | トウネン |
| 6 | 2AD44318 | ヒバリシギ | 6 | 2AD44323 | トウネン |
| 7 | 4A20999 | メダイチドリ | 7 | 2AD44324 | トウネン |
| 8 | 2AD44319 | トウネン | 8 | 2AD44325 | トウネン |
| C ブロック | | | D ブロック | | |
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 3E31349 | ハマシギ | 3 | 2AD44318 | ヒバリシギ |
| 4 | 2AD44330 | トウネン | 4 | 4A21000 | メダイチドリ |
| 5 | 2AD44331 | トウネン | 5 | 4C85701 | ウズラシギ |
| 6 | 2AD44332 | トウネン | 6 | 2AD44344 | ヒバリシギ |
| 7 | 2AD44333 | トウネン | 7 | 2AD44345 | ヒバリシギ |
| 8 | 2AD44335 | トウネン | 8 | 2AD44346 | ヒバリシギ |



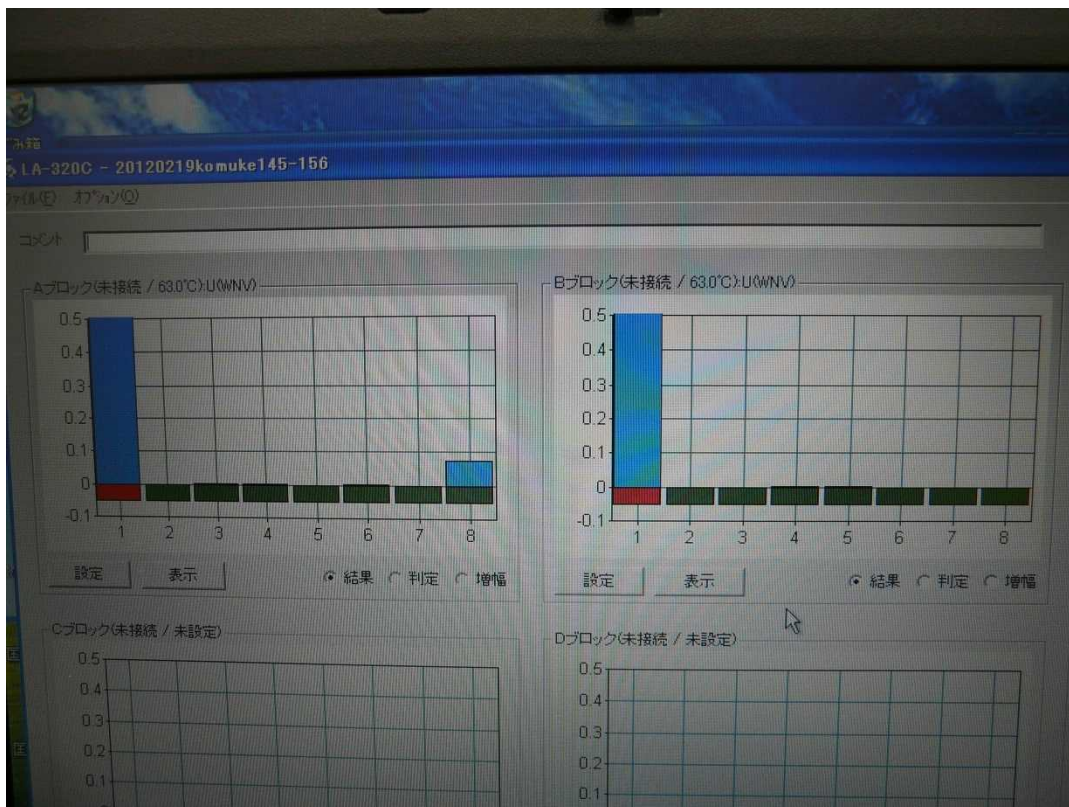
| Aブロック | | Bブロック | |
|-------|-------------|-------|-------------|
| 1 | ポジティブコントロール | 1 | ポジティブコントロール |
| 2 | ネガティブコントロール | 2 | ネガティブコントロール |
| 3 | 4C85702 | 3 | 3E31351 |
| | イソシギ | | ハマシギ |
| 4 | 2AD44340 | 4 | 2AD44376 |
| | トウネン | | トウネン |
| 5 | 4C85703 | 5 | 2AD44377 |
| | ソリハシシギ | | トウネン |
| 6 | 2AD44370 | 6 | 2AD44378 |
| | ヒバリシギ | | トウネン |
| 7 | 2AD44371 | 7 | 4C85704 |
| | ヒバリシギ | | メダイチドリ |
| 8 | 3E31350 | 8 | 2AD44380 |
| | キリアイ | | トウネン |
| Cブロック | | Dブロック | |
| 1 | ポジティブコントロール | 1 | ポジティブコントロール |
| 2 | ネガティブコントロール | 2 | ネガティブコントロール |
| 3 | 2AD44381 | 3 | 2AD44387 |
| | トウネン | | トウネン |
| 4 | 2AD44382 | 4 | 7A04881 |
| | トウネン | | アオアシシギ |
| 5 | 2AD44383 | 5 | 3E31352 |
| | ヒバリシギ | | キリアイ |
| 6 | 4C85705 | 6 | 3E31357 |
| | ウズラシギ | | ハマシギ |
| 7 | 2AD44385 | 7 | 3E31356 |
| | トウネン | | ハマシギ |
| 8 | 2AD44386 | 8 | 4C85707 |
| | トウネン | | メダイチドリ |



| A ブロック | | B ブロック | |
|--------|---------------------|--------|--------------------|
| 1 | ポジティブコントロール | 1 | ポジティブコントロール |
| 2 | ネガティブコントロール | 2 | ネガティブコントロール |
| 3 | 4C85706 メダイチドリ | 3 | 2AD44428 トウネン |
| 4 | 7A04882 アオアシシギ | 4 | 2AD44431 トウネン |
| 5 | 7A04883 アオアシシギ | 5 | 2AD44425 トウネン |
| 6 | 2AD44432 トウネン | 6 | 2AD44426 トウネン |
| 7 | 2AD44423 トウネン | 7 | 2AD44429 トウネン |
| 8 | 2AD44430 トウネン | 8 | 2AD44418 トウネン |
| C ブロック | | D ブロック | |
| 1 | ポジティブコントロール | 1 | ポジティブコントロール |
| 2 | ネガティブコントロール | 2 | ネガティブコントロール |
| 3 | 2AD44415 トウネン | 3 | 2AD44417 トウネン |
| 4 | 2AD44416 トウネン | 4 | 2AD44421 トウネン |
| 5 | 2AD44412 トウネン | 5 | 3E31355 キリアイ |
| 6 | 2AD44413 トウネン | 6 | 3E31353 キリアイ |
| 7 | 2AD44420 トウネン | 7 | 3E31354 キリアイ |
| 8 | 2AD44414 トウネン | 8 | 2AD44422 トウネン |



| A ブロック | | | B ブロック | | |
|--------|-------------|-------|--------|-------------|--------|
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 2AD44427 | トウネン | 3 | 2AD44436 | ヒバリシギ |
| 4 | 2AD44419 | ヒバリシギ | 4 | 5C39149 | エリマキシギ |
| 5 | 2AD44424 | ヒバリシギ | 5 | 2AD44437 | ヒバリシギ |
| 6 | 2AD44433 | トウネン | 6 | 2AD44438 | ヒバリシギ |
| 7 | 2AD44434 | トウネン | 7 | 2AD44439 | トウネン |
| 8 | 2AD44435 | トウネン | 8 | 2AD44440 | トウネン |
| C ブロック | | | D ブロック | | |
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 2AD44441 | トウネン | 3 | 2AE54154 | トウネン |
| 4 | 3E31364 | ハマシギ | 4 | 3E31362 | キリアイ |
| 5 | 3E31365 | ハマシギ | 5 | 7A04884 | アオアシシギ |
| 6 | 2AD44451 | トウネン | 6 | 7A04885 | アオアシシギ |
| 7 | 2AD44450 | トウネン | 7 | 8A29707 | コガモ |
| 8 | 2AD44449 | トウネン | 8 | 3E31366 | ハマシギ |



| A ブロック | | | B ブロック | | |
|--------|-------------|-------|--------|-------------|----------|
| 1 | ポジティブコントロール | | 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | | 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | 3E31367 | イソシギ | 3 | 5C39150 | オバシギ |
| 4 | 3E31368 | イソシギ | 4 | 7A04886 | アオアシシギ |
| 5 | 2AD44452 | トウネン | 5 | 3E31369 | ハマシギ |
| 6 | 2AD44361 | トウネン | 6 | 8A29708 | チュウシャクシギ |
| 7 | 2AD44308 | トウネン | 7 | 8A29709 | チュウシャクシギ |
| 8 | 2AD44453 | ヒバリシギ | 8 | 7A04887 | オオソリハシシギ |



Aブロック

| | | |
|---|-------------|----------|
| 1 | ポジティブコントロール | |
| 2 | ネガティブコントロール | |
| 3 | ネガティブコントロール | |
| 4 | ネガティブコントロール | |
| 5 | 7A04888 | オオソリハシシギ |
| 6 | 5C11966 | キアシシギ |
| 7 | 6A30524 | オオジシギ |
| 8 | 5C11968 | アカアシシギ |

(3) 超小型の野鳥位置探査システムの開発・改良研究

株式会社コア 関西カンパニー

| | |
|-------------|------|
| Gソリューション統括部 | 松浦功哲 |
| Gソリューション統括部 | 新井 圭 |
| マイコンシステム部 | 河野昌史 |

〈研究協力者〉

株式会社コア 関西カンパニー

| | |
|-------------|------|
| エンベデッドシステム部 | 小野 進 |
| Gソリューション統括部 | 古株 学 |

平成21～23年度累計予算額：35,000千円

(うち、平成23年度予算額：11,000千円)

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 我が国の生態系、特に絶滅危惧鳥類への新興感染症による絶滅危機を予測・回避するために、侵入が危惧されているウエストナイル熱ウイルス（WNV）の感染経路を予測すると共に、絶滅危惧鳥類種への危険度を評価することは、我が国の生物多様性保全を考える上で重要な課題である。本研究では、ウエストナイル熱ウイルス（WNV）抗体を持つ中・小型シギ・チドリ類に注目し、これらの鳥類の飛行ルートを解明するために必要な超小型GPS位置測定システムの開発を行なった。その際、GPS位置測定システムの構成要素である、GPS受信機モジュール、GPSアンテナ、タイマー、電源、そして筐体のすべてについて新たに設計を行った。その結果、アルゴス衛星による位置情報獲得機能も有し、小型・軽量で、さらには動作電力も少ないGPS位置測定システムの開発に成功した。

【キーワード】 ウエストナイル熱ウイルス、GPS、ルート解明、アルゴス送信機

1. はじめに

我が国の生態系、特に絶滅危惧鳥類への新興感染症による絶滅危機を予測・回避するために、侵入が危惧されているWNVの感染経路を予測すると共に、絶滅危惧鳥類種への危険度を評価することは我が国の生物多様性保全を考える上で重要な課題である。

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、WNV抗体を持つ体重100g程度のシギ・チドリ類を含む鳥類に装着でき、その渡りルートの解明を可能とする、超軽量・小型GPS位置測定システムの開発を行なう。鳥の自由な行動を妨げない重量は、鳥の体重の1/10と言われているため、最終的なシステム重量は10gを目指す。このシステムは、従来のような鳥を再捕獲しデータを回収するためのメモリは搭載せず、そのかわり全地球的な行動追跡を可能とするアルゴス衛星への位置情報送信機能を備えてい

ることを特徴とする。アルゴス衛星はCNES(仏：フランス国立宇宙研究センター)・NASA(米：アメリカ航空宇宙局)・NOAA(米：アメリカ海洋大気圏局)により開発、CLS(仏：CNES子会社)により運用・管理されている地球環境に関するデータを収集するシステムで、海洋・気象観測や野生動物の研究など、様々な目的で世界中の科学者や研究者に利用されている。

3. 研究開発方法最善

アルゴス送信機は5g～10g程度のもので現状で存在するが、アルゴス衛星から得られる位置情報には、その測位方法の原理上、最善でも150m、場合によっては数km～数十kmの誤差が含まれる。この誤差は、地球規模の行動範囲を考えた場合には許容されるが、局所的な行動圏の考察には障害となる。このアルゴス測位手法の欠点を補うGPSシステムも考案されてはいるが、①最軽量でも20g（機能が増えれば60g程度）のものしか存在しないために、中型以下の鳥類の行動を追跡することは至難であり、②軽量であることのみを追求した場合、動作電力の確保が難しいために、GPS端末から中継基地への送信が不十分となり、さらに③高額（数十万円）で、手軽に入手できるものではないという問題が存在する。そこで、これらの諸問題を解決し、アルゴス衛星を用いた測位機能を有する超小型のGPS位置測定システムを実現するために、GPS受信機モジュール、GPSアンテナ、タイマー、電源、そして筐体等すべてについて技術要因を再検討し、システム全体の小型・軽量化と省電力化を図った。

平成21年度においては、小型・軽量化するために必要な技術的項目を明らかにすることを目標とし、①全地球的・永続的な通信経路を確保するためのアルゴス衛星の使用、②アルゴス送信機のアンテナの効率化・小型化、③低電力消費・高性能GPS受信機モジュールの最適化設計とスタンバイ機能の追加、④長寿命電源を確保するための太陽電池とキャパシタを組み合わせた電源とタイムスケジューリング機能の開発、そして⑤耐久性・防水性のある軽量ハウジングのための立体造形による筐体設計について検討を行った。

平成22年度は、上記特徴の実現に向けて、①アルゴス送信機の構築とアナログ制御からデジタル制御への移行、②GPS受信機モジュールの低消費化と最適化、③高効率太陽電池とキャパシタを使用した制御機能付電源装置の創作、④アルゴス送信機、GPS受信機モジュール、ならびにCPU制御装置の一体化基板の創作、⑤立体造形手法を用いた軽量筐体の構築を行い、小型・軽量化を推し進めた。

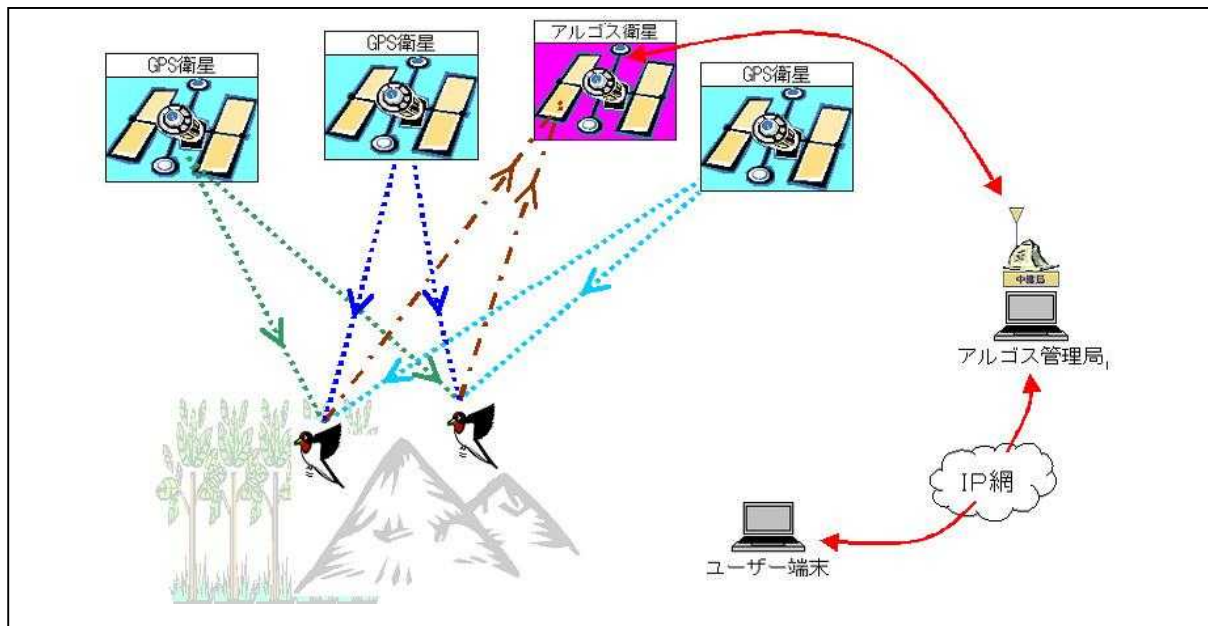
平成23年度（研究終了時）は、①デジタル制御のアルゴス送信機、②高効率太陽電池と薄膜キャパシタを使用した制御機能付電源装置、③軽量筐体を完成させ、それらを組み合わせた超軽量・小型GPS位置測定システムを試作し、実際に小・中型のシギ・チドリに装着する試みを行った。そして、その装着試行によって得られた情報に基づいて、システムの改良を図った。

4. 結果及び考察

(1) アルゴス送信機のシステム構成

1) システムの全体構成

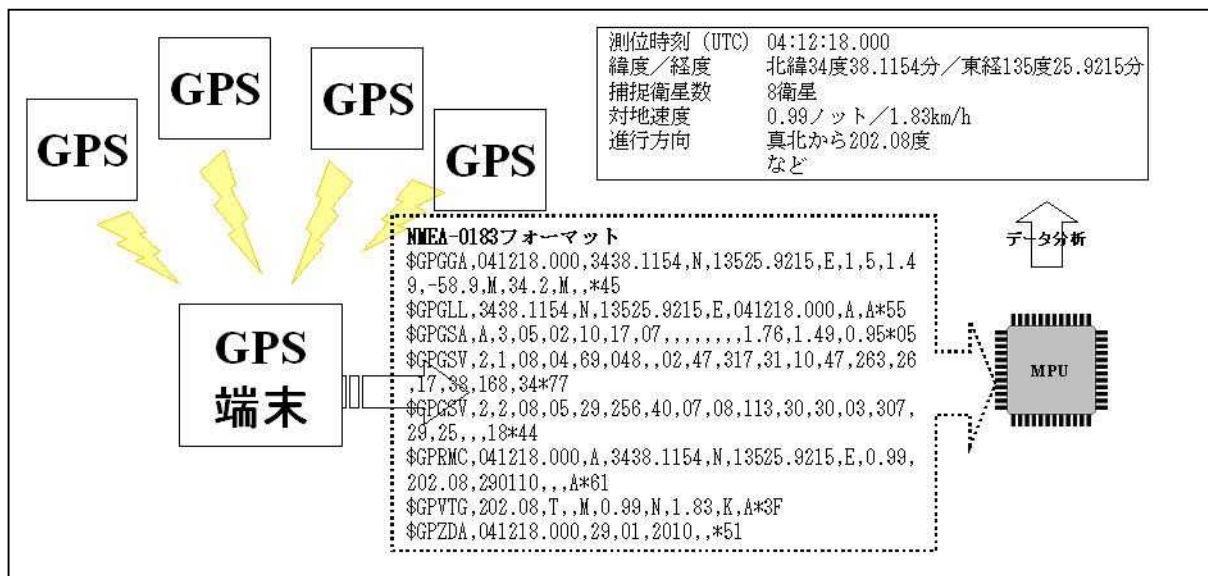
位置情報はGPSにより取得し、得られた結果をアルゴス衛星に送信した後、管理局を通しユーザーへ提供する(図(3)-1)。



図(3)-1 システムの全体構成

2) 位置情報の特定

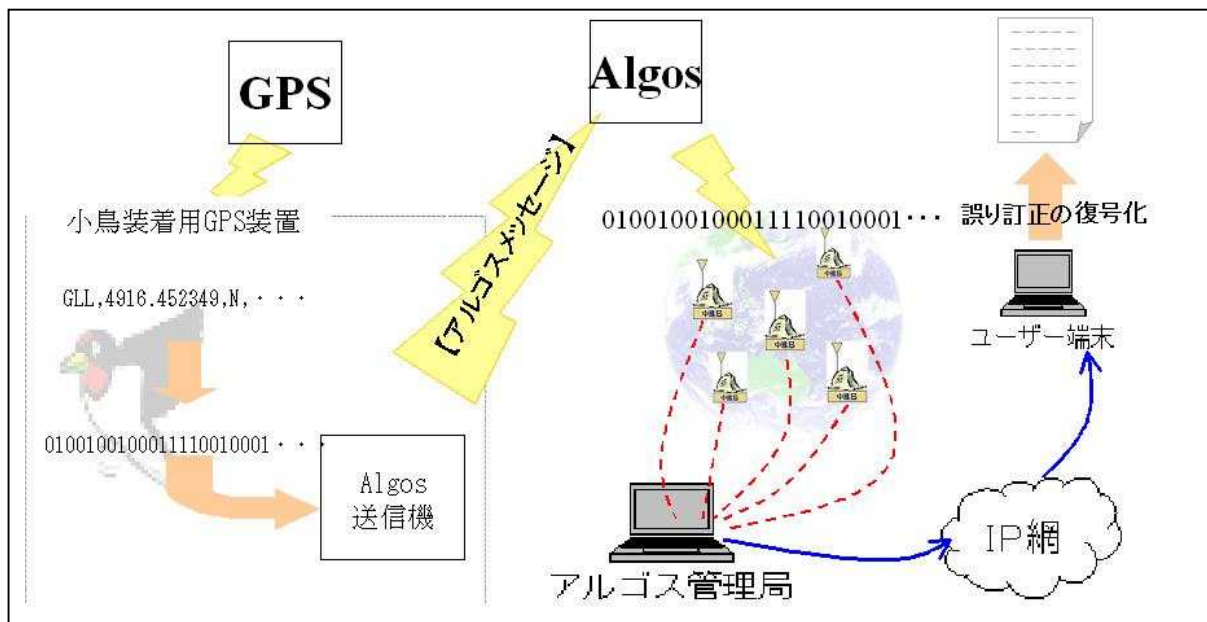
GPSの電波を受信し、GPS(モジュール)から得られたNMEA-0183データから測位時刻、緯度・経度、ならびに高度を抽出し、MPU内メモリへ測位データとして格納する(図(3)-2)。



図(3)-2 位置情報の特定法

3) 位置情報の取得と送信

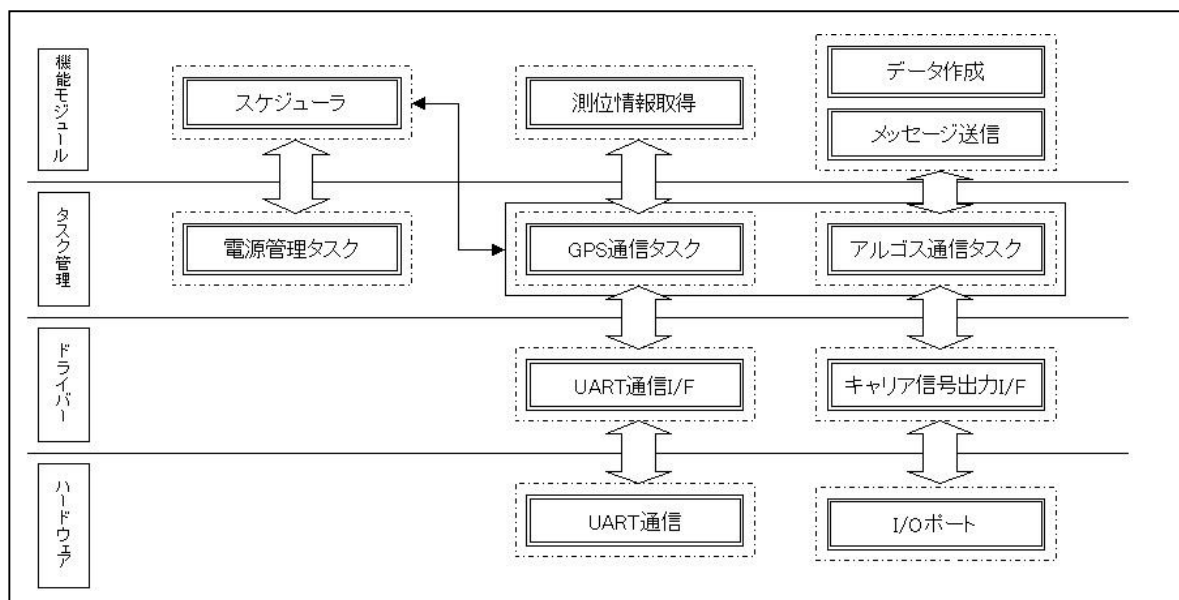
MPU内メモリに格納された測位データを、誤り訂正により、符号化を行なう。その後、あらかじめ設定されたスケジュールに従ってアルゴス衛星へ送信する。アルゴス管理局より、配信されたデータをインターネット経由で、ユーザーが取り出す。そのデータを複合する(図(3)-3)。



図(3)-3 位置情報の取得と送信

4) アルゴス送信機のタスク構成

端末はスケジューラ、電源管理タスク、GPS通信タスク、アルゴス通信タスクから構成され(図(3)-4)、OSなしで動作する。内蔵RTC、またはGPSより得られた時刻によりスケジューリング動作を行なう。通常はスタンバイモードで動作し消費電力を抑える。



図(3)-4 アルゴス送信機のタスク構成概念図

(2) GPSモジュールの最適化と低消費化

GPSモジュールは弊社製品のCL631-020Bを元に改良点を検討した。CL631-020Bの外観と仕様を、それぞれ図(3)-5と表(3)-1に記す。課題として、感度性能の向上、小型化、軽量化を挙げ、以下の

開発を行なった。

1) CL641-030Aの開発

CL641-030Aの外観と仕様を、それぞれ図(3)-5と表(3)-1に記す。CL631-020BからCL641-030Aの改良点は以下のとおり。

a. GPSコアモジュールの置き換え

感度性能の向上、低消費電力化、モジュールの小型化を測るためGPSコアモジュールの置き換えを行なった。改良された点は以下のとおり。

i. 感度性能

- ・アクエジション感度 -146dbm → -148dbm
- ・トラッキング感度 -158dbm → -165dbm

ii. 消費電力

- ・アクエジション時消費電力 80mA未満 → 50mA未満
- ・トラッキング時消費電力 60mA未満 → 40mA未満

iii. サイズ

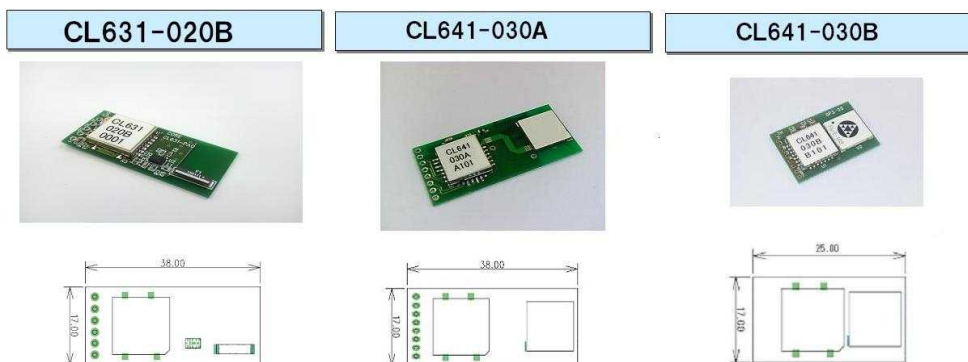
- ・38mm×17mm×5mm → 38mm×17mm×4mm

b. LNA回路（低雑音増幅回路）の削除

LNA回路は当初チップアンテナの感度向上目的で組み込んでいた。しかしながら、信号の増幅のメリットはあるが、ノイズの発生源ともなるため、全体の利得のバランスを考え、アンテナを指向性の広いものに変えるとともに、50Ωの伝送路の最適化を行ないLNA回路を削除した。

| | CL631-020B Rev.2 | CL641-030A | L641-030 B |
|---------------|------------------|---------------------|---------------------|
| サイズ | 38mm×17mm×5mm | 38mm×17mm×4mm | 25mm×17mm×4mm |
| 重さ | 2.3g | 2.5g | 1.5g |
| 電源 | 本体 DC 3.0V | 本体 DC 3.0-4.2 V | 本体 DC 3.0-4.2 V |
| | バックアップ用 1.2V | バックアップ用 DC 2.0-4.2V | バックアップ用 DC 2.0-4.2V |
| 周波数 | L1帯周波数 (C/Aコード) | L1帯周波数 (C/Aコード) | L1帯周波数 (C/Aコード) |
| チャンネル | 32チャンネル独立方式 | 66チャンネル独立方式 | 66チャンネル独立方式 |
| アンテナ | ユニットに実装 | ユニットに実装 | ユニットに実装 |
| 通信ポート | シリアル、 0-3.0V | シリアル、 0-3.3V | シリアル、 0-3.3V |
| 通信方式 | NMEA0183, オリジナル | NMEA0183, オリジナル | NMEA0183, オリジナル |
| 測地データ | WGS84 | WGS84 | WGS84 |
| 測位精度 | 3m未満 | 3m未満 | 3m未満 |
| GPS感度 | トラッキング -158dBm | トラッキング -165dBm | トラッキング -165dBm |
| | アクイジション -146dBm | アクイジション -148dBm | アクイジション -148dBm |
| 衛星捕捉時間 (TTFF) | コールドスタート36秒 | コールドスタート35秒 | コールドスタート35秒 |
| | ホットスタート1秒 | ホットスタート1.5秒 | ホットスタート1.5秒 |
| | ウォームスタート33秒 | ウォームスタート34秒 | ウォームスタート34秒 |
| 衛星再補足時間 | 1秒未満 | 1秒未満 | 1秒未満 |
| 消費電力 | 80mA未満 | 50mA未満 | 50mA未満 |

表(3)-1 アルゴスGPSシステム仕様比較表



図(3)-5 GPSモジュールの外観比較

2) CL641-030Bの開発

CL641-030Bの外観と仕様を、それぞれ図(3)-5と表(3)-1に記す。CL641-030AからCL641-030Bの改良点は以下のとおり。

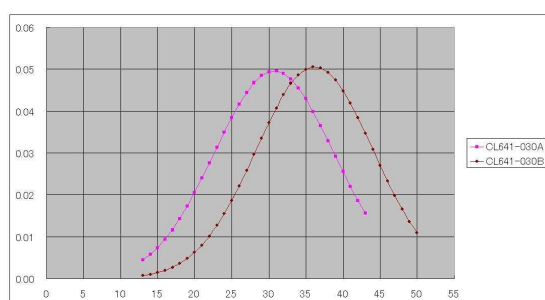
a. 50Ωの伝送路の削除による小型化

CL641-030Aはアンテナの特性に従い、通常の方法で、最適化された50Ωの伝送路を設計し実装した。しかしながら、さらに小型化、軽量化するために、この50Ωの伝送路の削除を検討した。

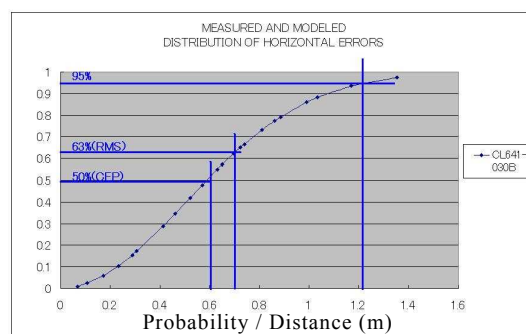
改良された点は以下のとおり。

- i) サイズ 38mm×17mm×4mm → 25mm×17mm×4mm
- ii) 重量 2.5g → 1.5g
- iii) S/N比 平均31db → 平均36db

50Ωの伝送路の削除により結果的にノイズを拾う伝送路がなくなったことでS/N比が向上したと考えられる。結果を図(3)-6に示す。



図(3)-6 小型化に伴う特性の改善



図(3)-7 測位精度

3) 測位精度

CL641-030Bによる定点（静的）測位精度を表(3)-2に記す。また、測位結果から得た測位の確率と距離の関係を図(3)-7に示す。測定は、弊社屋上で比較の見晴らしのよい場所に固定し行なった。信号強度は -120dbm～-130dbmに相当となる。

| 確率 | 計測値 | | 2DRMS(1.2m)モデル値 | |
|------------|-------------|-------------|-----------------|--------|
| | 距離(m) | 距離(m) | 距離(m) | 確率 (%) |
| RMS(63%) | 0.725113321 | 0.717225795 | | 63% |
| Mean(平均) | 0.569920016 | 0.625514805 | | 55% |
| CEP (50%) | 0.632967773 | 0.591220302 | | 50% |
| 2DRMS(95%) | 1.353980226 | 1.211572868 | | 95% |

表(3)-2 CL641-030Bによる定点（静的）測位精度

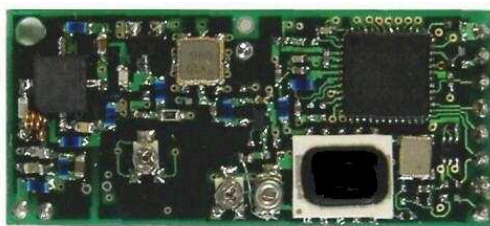
- ※ RMS：真値からの距離を二乗平均して平方根をとったもの (Root Mean Square)。
- ※ 2DRMS：RMSの2倍値。位置精度の誤差の目安。95%がこの範囲に入る。
- ※ Probability：統計確率
- ※ Distance(m)：距離

(3) デジタル制御のアルゴス送信機の開発

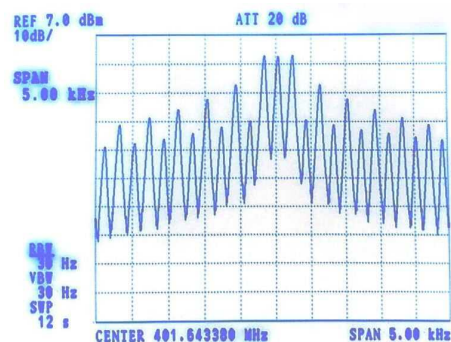
4) アナログ制御送信機開発

アルゴス送信機の仕様であるTri Phase PSKはキャリア信号を含んだ0度、+63度、-63度の三位相偏移変調の仕様となっており、通常商用ではない変調方式となっている。この変調方式に合わせて開発した送信機は、位相角（0度、+63度、-63度）と位相角の変化率（オーバーシュート、アンダーシュート等）の調整を、3.3Vの電圧を基準として、回路中の可変コンデンサと可変抵抗で電圧を上下させる調整することで行なうアナログ方式の調整回路となっている。

試作したアナログ制御送信機の外観を図(3)-8に、測定した変調スペクトルを図(3)-9に、仕様を表(3)-3に示す。



図(3)-8 試作制御送信機の外観



図(3)-9 変調スペクトル測定値

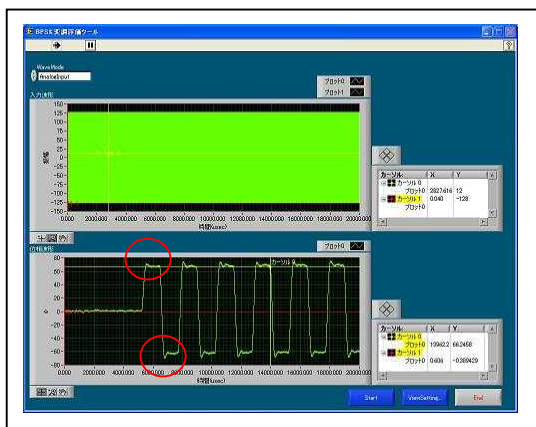
| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| ARGOS Operating frequency | 401.650MHz±8KHz, |
| Modulation | Tri Phase PSK ±1.1Rad ±0.1Rad |
| Output Power | 500mW |
| Uplink data rate | 400bps |

表(3)-3 アナログ制御送信機の仕様

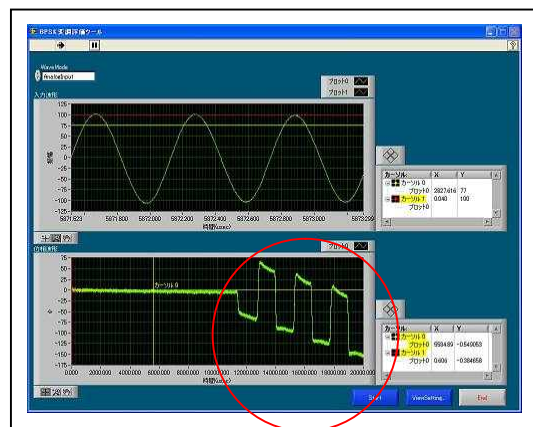
5) アナログ制御送信機の問題点

上記の電圧調整は機器による計測を行いながら手作業で行う必要があるが、3つの位相角は、密接に相関して変化するため、複数のパラメータを調整しつつ、それらの最適値を探すことは時間

のかかる作業であった。



図(3)-10 送信出力への電圧影響



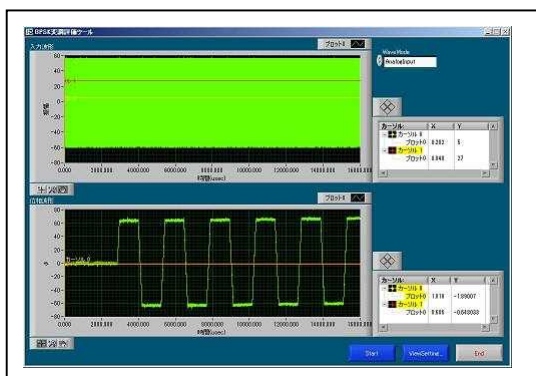
図(3)-11 変調スペクトルのずれ

さらに、このアナログ方式の調整回路は個体差が顕著である上に、供給電圧の変動の影響も受けやすいため、上記最適値探索作業を回路ごとに何回も行なう必要があった。(3)-10の赤マル内に見られるオーバーシュート、アンダーシュートの発生は、図(3)-11の赤マル内に示す位相のずれが起こっていることを意味しているが、この発生を極力抑えるために、最も注意して調整を要する部分となる。また、小型化を最優先としたため、回路の集積率が必然的に高くなり、部品交換等が非常に困難であった。

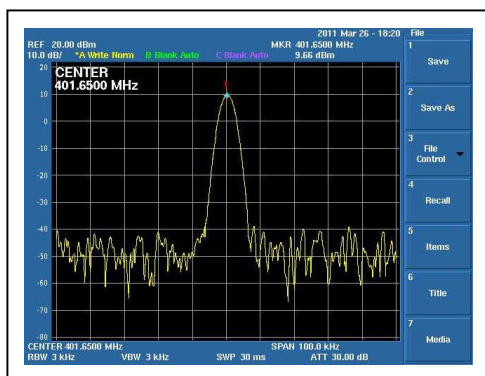
6) デジタル制御送信機開発

アナログ制御におけるこれらの問題を解決するため、デジタル制御（ソフトウェア制御）によって変調が可能なデジタル制御送信機の開発を新たに行なった。位相変調は、汎用のFSK

（Frequency Shift Keying/周波数偏移変調）変調器を用いて、一定時間周波数をシフトし、63度の位相角が生じた時点で周波数をシフト前の周波数に戻すことにより、この位相角を得たキャリアの生成を行う。位相を進めるにはプラス方向への周波数シフト、遅らせるにはマイナス方向の周波数シフトで実現できるが、その制御をソフトウェアによって行うことにした。すなわち、単位時間あたりにシフトさせるべき周波数と、そのシフト時間を組み合わせることで目的の位相角を生成させる仕組みになっている。本方式で出力した送信出力波形を図(3)-12に、測定した変調スペクトルを図(3)-13に示す。



図(3)-12 送信出力の安定

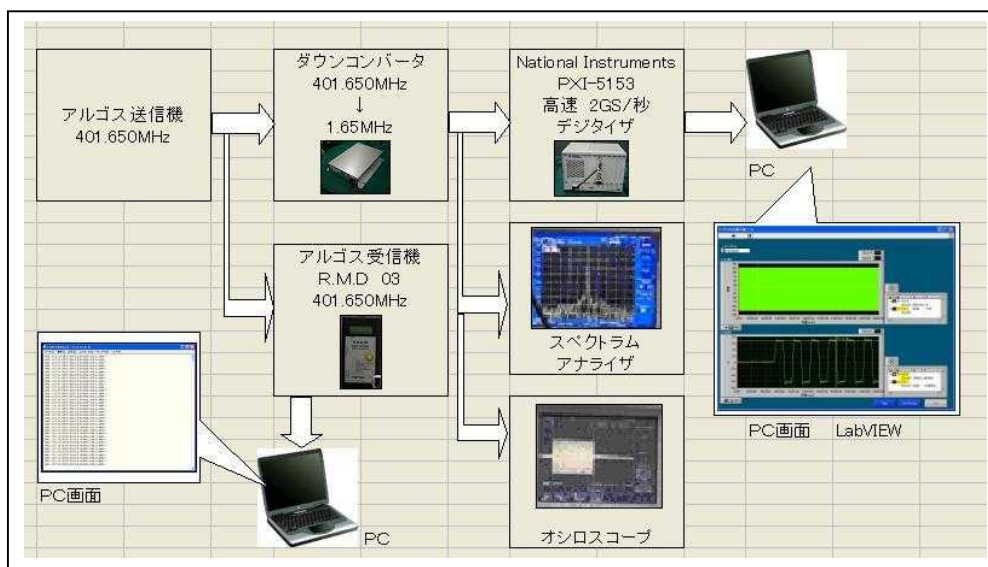


図(3)-13 測定変調スペクトル

アナログ制御で出ていたオーバーシュートとアンダーシュートがほとんど見られず、(3)-10の赤マル内に見られるオーバーシュート、アンダーシュートの発生がなく、波形も安定していることがわかる。本方式を用いることにより、アナログ周辺回路が不要となり、電圧、温度変化による位相角の誤差を少なく出来るとともに、高品質、安定化が可能となった。

7) 電波信号計測解析機器の作製

通常、電波変調の特性を確認するためにはスペクトラムアナライザ、オシロスコープ等を使用するが、本開発で採用する三位相偏移変調の解析を行なえる機器が市販品に無かった。そこで、汎用高速デジタイザ（National Instruments PXI-5153）を使用し、新たに作製したダウンコンバータ（401.650MHz->1.65MHz）と解析用ソフトウェア（National Instruments Labview）との組み合わせによる三位相偏移変調の信号計測解析機器を用いて解析を行なった。図(3)-14にこの信号計測解析機器の概要を示す。



図(3)-14 電波信号計測解析機器の概要

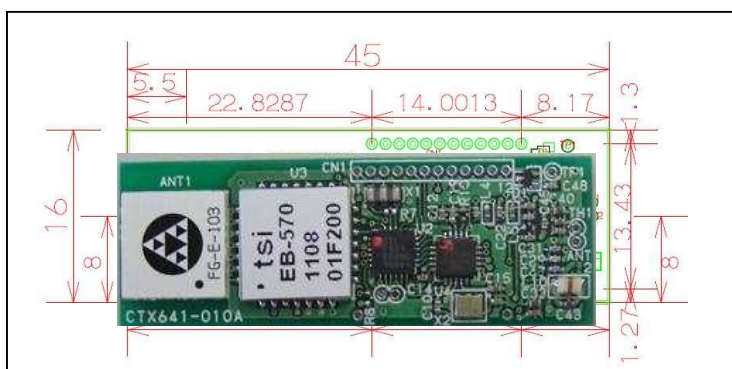
※PXI-5153及び、LabIEWはNational Instrumentsの商品。

8) 送信機の認証

アルゴス送信機として使用するためにはCLS(仏：アルゴスの運用会社、フランス国立宇宙研究センター子会社)において機能・性能試験を受け、CLS及びCNES(仏：フランス国立宇宙研究センター)の両機関の認証を受ける必要があるが、2011年7月22付けで認証を得ることが出来た。

9) 送信機基板の外観

新たに開発したデジタル制御送信機の外観とサイズを図(3)-15に記す。



図(3)-15 開発した送信基板外観

(4) 高効率太陽電池とキャパシタを使用した制御機能付電源装置の開

1) 太陽電池

太陽電池はSHARP製の2cm×2cmの既存品を元にカスタマイズを行なった。各太陽電池の仕様を表(3)-4に、既存品を図(3)-16、カスタマイズ品を図(3)-17に記す。

| | 既存品 | カスタマイズ品 |
|--------|-------------|---------------|
| サイズ | 2 cm × 2 cm | 2 cm × 1 cm |
| 変換効率 | 26% | 26% |
| 開放電圧 | 2.34 V | 2.58 V (典型値) |
| 短絡電流 | 53.2 mA | 27.5 mA (典型値) |
| 最大動作電圧 | 2.05 V | 2.25 V |
| 最大動作電流 | 51.5 mA | 26.5 mA |
| 最大出力 | 105.6 mW | 59 mW |

表(3)-4 太陽電池仕様 ※シャープ株式会社提供。



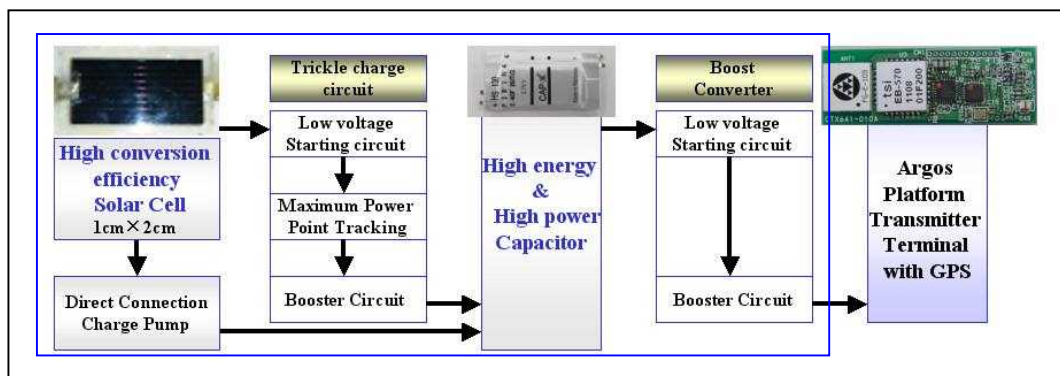
図(3)-16 既存規格品



図(3)-17 特注品

2) 制御機能付電源回路

高効率太陽電池から得られる電力を、最大電力点制御を行ないながらキャパシタへ充電、その電力を使用し送信機を駆動する電源回路を新たに設計した。その構成を図(3)-18に示す。また、各ブロックの機能を以下に記す。図(3)-18の青線内が電源回路部分となる。



図(3)-18 電源ブロック図

a. 太陽電池(High conversion efficiency Solar Cell)

前掲1)のカスタマイズ品(2cm×1cm)を使用する。

b. トリクルチャージサーキット (Trickle charge circuit)

前段のDC/DCコンバータはトリクルチャージを行なう機能で構成される。

i. 低起動電圧回路

太陽電池は低電圧、高インピーダンスのため、初期起動時、最終段の昇圧コンバータを完全に駆動するだけの出力を持つことは難しい。そのため最低限の起動部を駆動した後、以降の機能を立ち上げる。駆動入力の範囲は250mV～5.0Vである。太陽電池からの出力を1.4V、2.2Vまで段階的に立ち上げる。

ii. 最大電力点制御回路

低起動電圧回路によって、起動部が立ち上がった後、最大電力点制御回路(以下「MPPC」という。)により、太陽電池の発電量が最大になるように調整される。本回路では最大動作電圧は2.3Vに設定しており、太陽電池の電圧がこれより下回る場合は電流を減らし、上回った場合は電流を増加させることによって、この最大動作電圧を保つ。

iii. 昇圧コンバータ出力回路

MPPCにより調整された出力を3.0Vまで昇圧しキャパシタの充電を行なう。

c. ダイレクトコネクションチャージポンプ(Direct Connection Charge Pump)

前段のDC/DCコンバータは、僅かながら起動に際し電圧を必要とする。それを補うために太陽電池からキャパシタへダイレクトに充電を行なう。

d. キャパシタ(High energy & High power Capacitor)

薄型で容量が2.40Fのキャパシタを並列で2個使用する。耐圧は2.75Vである。

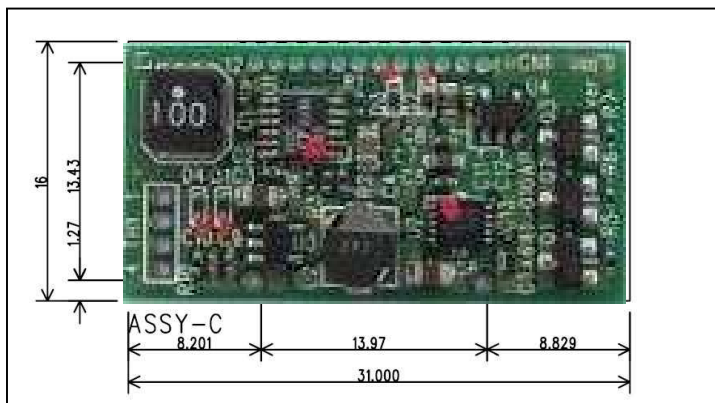
e. ブーストコンバータ(Boost Converter)

後段のDC/DCコンバータは、キャパシタの蓄電電圧によって、アルゴス送信機、GPS受信機モ

ジュール、MPUを駆動するための電圧3.3Vまで昇圧する。

3) 電源回路外観

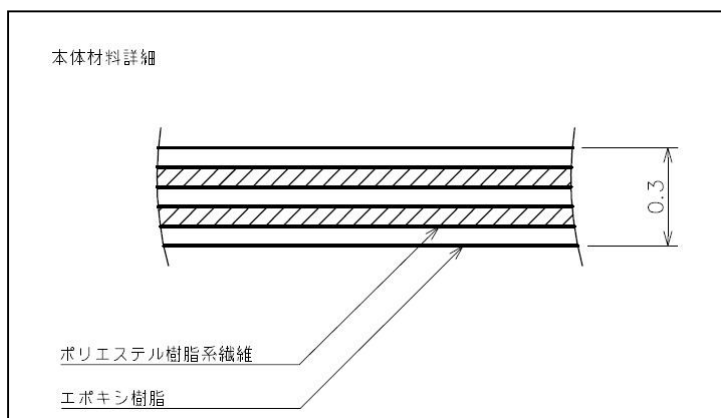
新たに作製した電源回路基板の外観とサイズを図(3)-19に記す。



図(3)-19 電源回路基板の外観

(5) 筐体の再構築

当初、1次試作と2次試作においては、軽量化を考慮し、金型なしで、設計データから作成可能な3D造形を選択し、材質をポリアミド（ナイロン11）で設計を行なった。しかしながら、強度の面から不十分と判断し、材質をポリエステル樹脂系繊維とエポキシ樹脂に変更し、さらに5層の構造とした。また成型は金型を使用し、片面の開いた箱型を二つ合わせる形で作成した。5層の構造を図(3)-20に、作成した筐体を図(3)-21に記す。



図(3)-20 筐体の5層構造概念図

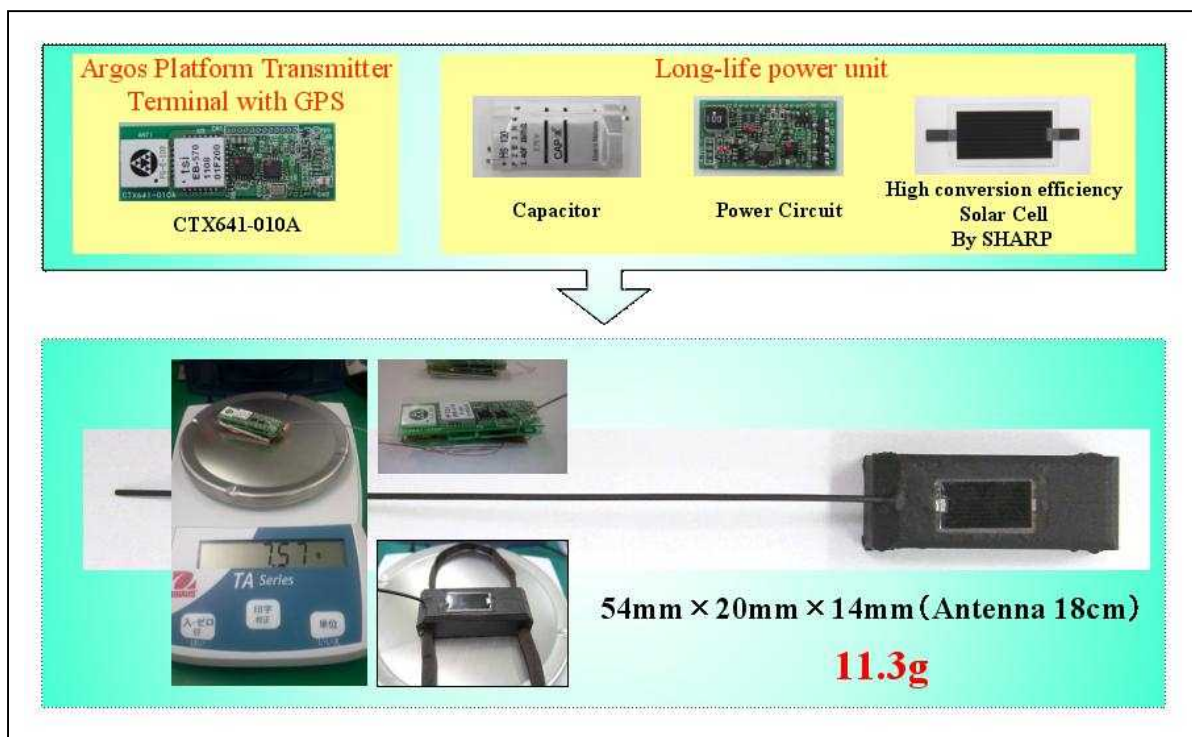


図(3)-21 作成した筐体

(6) 超軽量・小型GPS位置測定システムの完成

CPU・GPS一体型アルゴス送信機と、電源回路の構成部品であるキャパシタ、制御機能付電源回路、そして太陽電池を合わせるとその重量が7.57gとなった。そしてこれらを筐体に納めたところ

ろ、総重量は平均11.3gとなった。太陽電池部分は、透明度の高いエポキシ樹脂を使用し、コーティングを行なった。このようにして超軽量・小型GPS位置測定システムを完成させた。各部品と外観、及び重量を図(3)-22に記す。



図(3)-22 完成した小型GPS位置測定システム

(7) 鳥への装着

サブテーマ1（東京大学）、サブテーマ2（近畿大学）の捕獲作業のもと、シギへの装着を行なった。その概要を以下に記す。また取り付けの様子を図(3)-23に記す。

1) 装着

場所：北海道紋別市コムケ湖

装着日時：2012年9月11日－12日

装着種：チュウシャクシギ2羽、オオソリハシシギ1羽

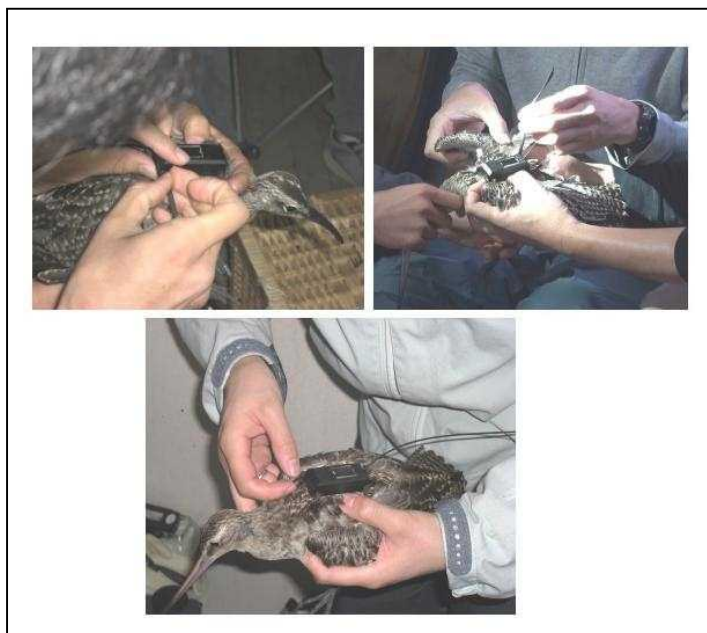
放鳥日時：2012年9月12日

2) 結果

2011年9月13日－15日にわたり、取り付けした3羽から合計25個のGPSデータを含むアルゴスメッセージの取得に成功したが、その後は未取得状態となっており、現在（2012年2月29日）3羽とも所在不明という状態となっている。

| 装着種 | 取得データ数 | 取得開始日 | 最終取得日 |
|----------|--------|------------|------------|
| チュウシャクシギ | 4 | 2011年9月14日 | 2011年9月14日 |
| オオソリハシシギ | 9 | 2011年9月13日 | 2011年9月13日 |
| チュウシャクシギ | 12 | 2011年9月13日 | 2011年9月15日 |

表(3)-5 装着個体データ

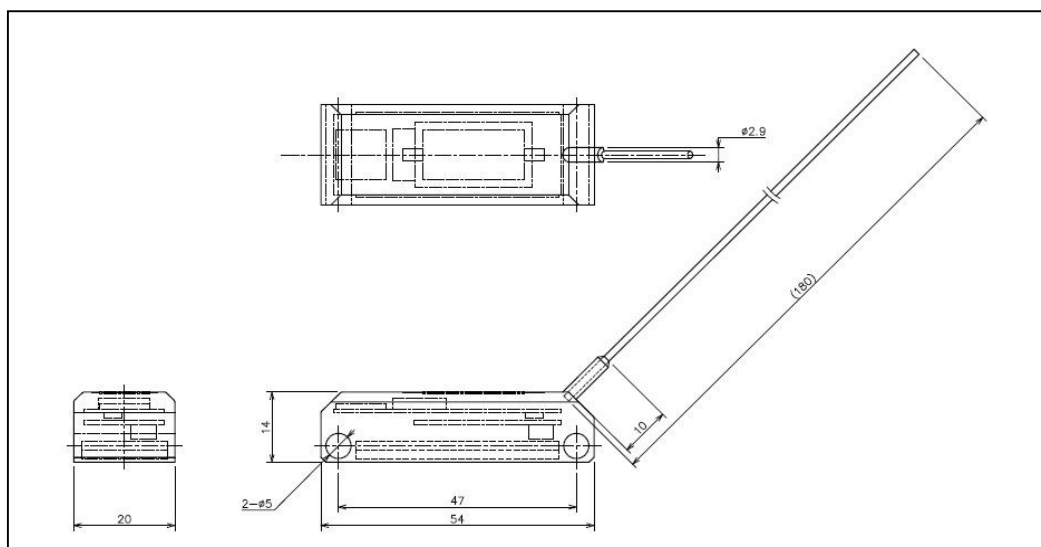


図(3)-23 機器装着の実際

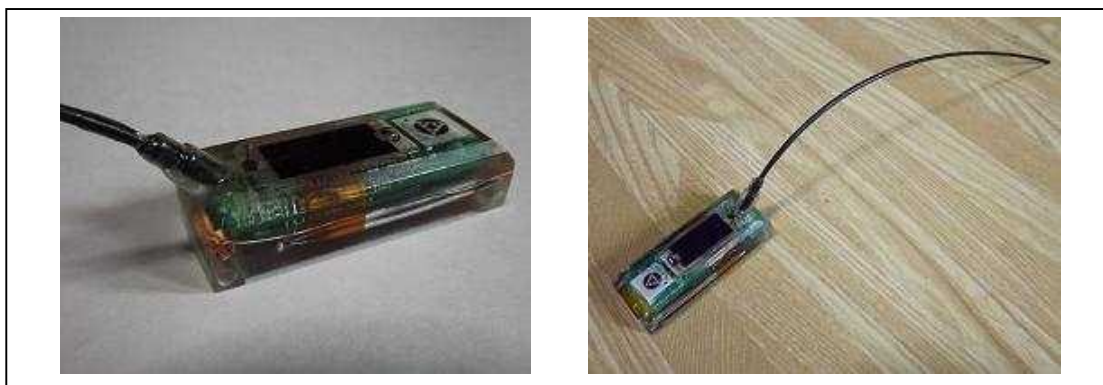
(8) 強化版送信機

上記(5)のように装着した3羽ともその行方を追跡できなくなったことの原因は、筐体強度の問題である可能性が高いため、送信機の筐体及びアンテナの取り付け口に関し再度検討を行った。

その検討に基づいて、筐体の素材をエポキシ樹脂とし、充填タイプのものを作製した。また、アンテナ部は筐体から突出する根元を補強し、抜けない構造にした。完成した改良機の大きさを図(3)-24に、その外観を図(3)-25に、仕様を表(3)-6に記す。



図(3)-24 強化版送信機の各部分長



図(3)-25 強化版送信機の外観

| Specification | | |
|-------------------------|---------------------|---|
| ARGOS | Operating frequency | 401.650MHz±8KHz |
| | Modulation | Tri Phase PSK ±1.1Rad ±0.1Rad |
| | Output Power | 200-500mW |
| Uplink data rate | | 400bps |
| GPS | Sensitivity | -165dbm/Tracking,-148dbm/Acquisition |
| | Accuracy | < 3.0m CEP(50%) |
| Supply voltage | Solar | Voltage Max 2.2V , Power Max 59.0mW |
| | Capacitor | Voltage Max 2.7V , Capacitance Max 4.8F |
| Package / Waterproofing | | Epoxy Resin |
| Dimension | | 54mm×20mm×14mm |
| Weight | | 16.75g -18.5g (Strengthening type) |
| Operating Temperature | | -30℃～70℃ |
| Transmitting | Interval | 1 Day ~ |
| | Data | Past 3 times |
| Num | | |
| Positioning | | 1 Fix per Day |
| Data | | Latitude, longitude, time |

表(3)-6 完成した機器の仕様

(9) 消費電力とシステム重量に関する今後に向けた検討

1) 現状における送信動作

現在の送信動作はその成功率を優先し、以下(図(3)-26)のように行っている。

- A. 起動：充電完了となるまで充電を行なう（1時間程度）
- B. GPS受信：充電完了後GPS信号の受信を行なう。（60秒間）
- C. 充電待機：送信に必要な電力が得られるまで充電を行なう。（最大120秒）
- D. 送信：テストモードはCの後2分間隔で5回送信を行なう。通常動作モードは、設定時間（衛星到達予想時間）到達後2分間隔で5回送信を行なう。
- E. 以降D.を繰り返す。

電力は十分得られるものと仮定し、稼動時間を8時から16時の8時間とすると、1日のGPS受信回数は1回、最大約240回、同一データを送信するようになっている。



図(3)-26 完成機の送信動作

2) GPS受信優先の動作

一方、GPS受信回数を優先すると、その動作は以下（図(3)-27）の通りとなる。

- A. 起動：充電完了となるまで充電を行なう（1時間程度）
- B. GPS受信：充電完了後GPS信号の受信を行なう。（60秒間）
- C. 充電待機：送信に必要な電力が得られるまで充電を行なう。（最大120秒）
- D. 送信：2分間隔で5回送信を行なう。
- E. 以降B.~D.（以下1サイクル）を繰り返す（13分）。

電力は十分得られるものと仮定し、稼動時間を8時から16時の8時間とすると、1サイクル13分で1日の最大GPS受信回数は36回、同一データを5回ずつ送信することとなる。



図(3)-27 GPS受信回数を優先した場合の送信動作

3) 1次電池の場合の動作可能日数と加算重量

a 動作必要電力

GPS受信を1回（60秒）とアルゴス送信を2分間隔で5回を1サイクルと考えた場合の必要電流を表(3)-7に示した。

| | 電流 (mA) | 回数 | 動作時間 (秒) | 動作時間 (時間) | 消費電流 (mA@3V) | 消費電流 (mA@1.5V) |
|------|------------|----|-------------|--------------|-----------------|-------------------|
| GPS | 64.825 | 1 | 60 | 0.01666 | 1.08 | 2.16 |
| アルゴス | 726.025 | 5 | 0.84 | 0.00023 | 0.847 | 1.694 |
| 待機 | 0.006 | 5 | 119.16 | 0.0331 | 0.004 | 0.008 |
| 合計 | | | | | 1.931 | 3.862 |

表(3)-7 動作必要電力測定値

b 電池電力を考慮した場合の動作可能回数

一般的なアルカリ電池の容量と、1サイクルに必要な電流から計算した動作可能回数は表(3)-8の通りとなる。

| 電池 (1.5V) | 重量 (参考値※) | 電流 (mA/H)(参考値) | 本数 | 動作可能回数 |
|-----------|--------------|-------------------|----|-------------|
| アルカリ単3 | 24g | 2000 | 1 | 517.8663905 |
| アルカリ単4 | 13g | 750 | 1 | 194.1998964 |

表(3)-8 電池電力を使用した場合の動作可能回数（計算値）

c. 動作可能回数と加算重量

上記a、bより、使用可能な動作日数、及び加算重量は表(3)-9の通りとなる。

| 電池 | アルカリ単3 | アルカリ単4 |
|---------------|--------|--------|
| 加算重量 | 24g | 13g |
| 1サイクルの1日の動作回数 | 使用可能日数 | 使用可能日数 |
| 1 | 517 | 194 |
| 2 | 258 | 97 |
| 3 | 172 | 64 |
| 4 | 129 | 48 |
| 5 | 103 | 38 |

表(3)-9 動作可能回数と加算重量（計算値）

4) 考察

本課題においては、重量を最優先にして、出来るだけの長期使用を目的としたシステムの構築を目指したが、10-20g程度の重量の増加で、一定期間の使用目的であれば、より多くのGPSデータの取得が可能であり、また、GPSデータのログ保存機能の追加などを行えば、より多くの生態調査のシステムに使用可能な追跡装置の構築を図ることが可能である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究で開発した超小型GPSシステムは当初目的の総重量より遙かに軽量なものとなった。また、既存機器と比較して測定頻度を犠牲にした反面、半永久的に作動可能な仕様となっている。そのために、これまで困難であった中・小型鳥類（シギ・チドリ）の移動と渡りの長期に渡る経路解明が、本研究によって開発された超小型GPSシステムによって実現する可能性が生まれた。更に、長期間にわたる継続的な野生動物の行動を追跡できる本機器を活用すれば幼鳥の時機に装

着して、性成熟期並びに生涯にわたる個体行動追跡も可能となる。

(2) 環境政策への貢献

本研究は小型鳥類に装着することが可能な超小型GPSの開発を第一目標としているが、このGPSの活用によって、鳥類以外にも多種にわたる野生鳥獣の生態も解明できるようになると考えられる。それらの研究成果を総合的に検討すると、野生鳥獣（絶滅危惧種、希少種、害獣）の生態解明や行動予測等がより正確に行えるようになり、生物多様性保全に大きく貢献できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

特に記載すべき事項はない。

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<その他の誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

1) K. ARAI: "Ultralight Position Transmitter For Migratory Birds Tracking CTX641-010A GPS PTT-Argos Platform Transmitter Terminal with GPS-", The 7th Inter. Meeting on Cryophoenix Project (2012).

(3) 出願特許

1) 松浦功哲他：株式会社コア；「送信装置」、特願2011-158638、2011年7月20日

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

1) 電波新聞（2012年6月17日、組込み特別版「Data Communication」、4頁）

(6) その他

- 1) 組込み業界総合技術展 関西 Embedded Technology West 2010 出展
- 2) 組込み業界総合技術展 Embedded Technology 2010 出展

- 3) 組込み業界総合技術展 関西 Embedded Technology West 2011 出展
- 4) 日本航海学会 GPS/GNSS 研究会 GPS/GNSS シンポジウム 2011 出展
- 5) 組込み業界総合技術展 Embedded Technology 2011 出展

8. 引用文献

なし

(4) 渡り鳥での新興感染症病原体に対する抗体反応解析・評価に関する研究

琉球大学大学院 医学研究科 微生物学・腫瘍学講座

只野昌之
齋藤美加

平成21～23年度累計予算額：10,570千円

(うち、平成23年度予算額：3,044千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 2009年から2011年の研究期間に北海道と沖縄で捕獲されたシギ・チドリ類484個体、宮城県で捕獲されたオナガガモ12個体および北海道で歩哨動物として飼育されたアイガモ36個体から得られた血液材料532検体についてウエストナイル熱ウイルス(WNV)および日本脳炎ウイルス(JEV)に対する中和抗体を測定した。いずれの検体からも両ウイルスに対する中和抗体が検出されなかった。これらの結果から、媒介昆虫が吸血行動を行う季節に渡ってくるシギ・チドリ類がWNVに感染している可能性を示唆する証拠は認められなかった。また、2010年度の研究でニワトリ、カラス、ハトおよびヤンバルクイナのそれぞれ1個体から採取された初代培養細胞でWNVの増殖を検討したところ、ニワトリ、カラス、およびハトに由来する各々の細胞ではWNVが効率的に増殖したのに対して、WNVを接種したヤンバルクイナ由来細胞からは子孫ウイルスの産生のみならずウイルス抗原の発現も認められなかった。そこで、2011年度はヤンバルクイナ由来細胞にWNVのRNAを直接導入し、抗原や子孫ウイルスが産生するか否かを検討した。ニワトリ、カラス、およびハト由来の細胞へウイルスRNAを直接導入した場合、ウイルス接種と同様にウイルス抗原と子孫ウイルスの産生が認められたが、ヤンバルクイナ由来細胞では何れの産生も認められなかった。これらの結果から沖縄本島に生息する希少鳥類ヤンバルクイナのWNV感受性は極めて低いことが示唆された。

[キーワード] ウエストナイル熱ウイルス、新興感染症、人獣共通感染症、渡り鳥、希少鳥類

1. はじめに

WNVは新大陸には存在しないとされていたが、1999年にニューヨークに侵入したのを起点に、鳥類と蚊類の間で自然環を形成して北アメリカ大陸に定着して南米に分布を拡大しつつある。北米大陸におけるアウトブレイクの経験から、本ウイルスは鳥類に強い病原性を持ち、ヒトやウマに対しても脳炎などの重篤な症状をひきおこす公衆衛生学上重要な人獣共通の病原ウイルスであることが認識された。本ウイルスの日本への侵入は未だ確認されていないが、いったん侵入すれば北米同様に自然環が容易に形成され定着してしまうことが危惧される。ウイルスの自然環で鳥類は重要な増幅動物であり、長距離を移動できる渡鳥は侵淫地からのウイルスの運び屋となり得る。日本に飛来してきた水鳥にWNVに対する抗体が検出されたという報告がある。しかし、調査された水鳥は蚊類が吸血活動しない冬期に捕獲されたもので、その陽性率も極めて低かった。そ

れに対して、蚊類が吸血活動する春から秋の時期にWNV侵淫地から日本に飛来する渡り鳥、たとえばシギやチドリ類のWNV感染状況を知ることは非常に重要である。しかし、これらの鳥類は体格が小さいために抗体測定に供するに十分な量の血液材料を採取することは困難である。また、WNV同様に鳥類に感染するといわれる日本脳炎ウイルスは日本や韓国、中国、東南アジア、オーストラリアまで広く分布し、それらの地域を移動もしくは生息する鳥類も感染している可能性を否定出来ない。WNVとJEVは抗原性が近く、両者の感染を区別するには高い特異性の抗体検査法が求められる。また、北米における流行の経験から、鳥類におけるWNV感染は種によって比較的マイルドな感染と致死的な感染となる。WNVが日本に侵入して自然環を形成してしまった場合、絶滅に瀕しているような希少鳥類に対するWNVの病原性を前もって知っておくことは対策を行う上で重要である。

2. 研究開発目的

本研究では(1)日本に飛来するシギ・チドリ類を捕獲し、それらから得られる微量血液材料について、最も特異性が高い抗体測定法である中和試験で抗体測定を行い、捕獲された鳥類のWNV感染状況を明らかにする。加えて、シギ・チドリ類が飛来する北海道で飼育されたアイガモの血液材料についても同様の抗体測定を行い、ウイルス侵入および循環についても検討する。次に、(2)鳥類由来初代培養細胞におけるWNV増殖について解析し、由来する鳥類個体に対するウイルスの病原性の指標となり得るか否かを検討する。

3. 研究開発方法

(1) 鳥類の血清材料

2009年から2011年の3年間に北海道東部で捕獲されたシギ・チドリ類 (2009年：152個体、2010年：145個体、2011年：110個体)から血液材料が得られた。さらに、2010年には沖縄県に飛来したシギチドリ類77個体からも血液材料が採取された。宮城県では2010年と2011年にオナガガモ(8および4個体)からも検体が取られた。加えて、北海道にて歩哨動物として飼育されたアイガモからも検体が供された。全ての検体は採取後に冷凍され、琉球大学に搬送された後も中和試験に供するまで-20℃で保存された。

(2) 血液材料の前処理

全ての血液材料は10倍希釈した後に56℃で30分間の熱非働化処理を行い、遠心上清を中和試験に用いた。

(3) 陽性コントロール血清の作製

サブテマ2にて市販の精製WNV可溶性抗原および日本脳炎ワクチンをニワトリに接種して得られた抗血清を陽性コントロール血清とした。また、接種前のニワトリから得られた血清を陰性コントロール血清とした。

(4) 間接免疫染色法によるフォーカスアッセイ

細胞培養用の24もしくは96ウエルマイクロプレートに培養した細胞に被検ウイルス材料を接種し、24～30時間培養した後に細胞を固定・免疫染色して、顕微鏡下でウイルス感染細胞のフォーカスを観察・計数した。

(5) 中和試験

前処理した被検血清とウイルス液を等量混合し、室温で90分間の反応の後に96ウェルマイクロプレートに培養したBHK-21細胞に接種し、上記フォーカスアッセイを行った。被検血清の代わりに血清希釈液とウイルス希釈液の混合液から得られたフォーカス数（コントロール）と被検血清とウイルス液の混合液から得られるフォーカス数を比較し、フォーカス減少率を計算した。上記中和試験にて被検血清におけるフォーカス減少率が90%以上ある場合を中和抗体陽性とした。10倍希釈した被検血清でもフォーカス減少率が90%に達しない場合は中和抗体陰性(<10)と判定した。10倍希釈で中和抗体陽性の被検血清については、さらに階段希釈して上記中和試験を行い、フォーカスが90%減少する血清の希釈倍数を中和抗体価として求める。

(6) 鳥類由来初代培養細胞のWNV感受性試験

サブテーマ2から提供されたニワトリ、ハト、カラスおよびヤンバルクイナ由来細胞を25cm²細胞培養用フラスコでおよそ50~80%位の密度になるように培養し、WNVを接種・吸着させ、経時的に培養上清を採取して培養液中に放出される子孫ウイルスの感染価を上記測定した。

(7) 鳥類由来細胞のWNV遺伝子導入に関する試験

WNV遺伝子RNAの調整：225cm²の培養フラスコに増殖したヒトスジシマカ由来C6/36細胞株にWNV(NY株)を接種し、28℃にて一週間培養後、細胞を剥離させ、低速遠心にて感染細胞と感染培養上清に分離した。感染細胞はリン酸緩衝生理的食塩水(PBS)で洗浄後、蒸留水で浮遊させた後に凍結保存した。感染培養上清は70%(v/v)になるようにエタノールを加え-20℃に冷却後、低速遠心し、沈澱をRNA精製に供した。DNase-I 含細胞溶解緩衝液を細胞成分もしくは感染培養上清のエタノール沈澱物に加え、固形成分を溶解、RNA吸着用カラムに通導して試料中のRNAを吸着せしめ、カラムに洗浄用緩衝液を通導して夾雑物を除去した後にRNA溶出用緩衝液を通導し、吸着したRNAを溶出した。溶出したRNA画分は使用に供するまで-80℃に保存した。精製したWNV-RNA画分は階段希釈し、リポフェクトアミンと混合してマイクロプレートに培養した哺乳ハムスター腎由来BHK-21細胞、もしくはアフリカミドリザル腎由来Vero細胞の培養液に加え、24時間37℃で培養後に細胞をアルコール固定してWNV抗原の発現を確認し、ウイルスRNA画分の細胞導入に最適な希釈倍数を求めた。

トリ由来細胞へのWNV-RNA導入：超低温で保存してあるニワトリ、カラス、ハト、およびヤンバルクイナ細胞を解凍し、3日間培養して増殖させた。コラーゲン処理マイクロプレート(24well)に上記細胞を一晩培養し、ウイルス遺伝子導入実験に供した。BHK-21およびVero細胞への遺伝子導入で求めた最適希釈倍数でウイルス遺伝子画分を遺伝子導入用無血清培養液で希釈し、同無血清培養液で希釈したりポフェクトアミンを加えてRNA-リポフェクトアミン複合体を形成させ、各トリ由来細胞の培養液に加えた。2から6時間静置した後に増殖用培養液と置換し培養を続けた。各トリ由来細胞を培養したプレートは各々2枚準備し、一枚は遺伝子導入後24時間でアルコール固定して免疫染色法にてウイルス抗原の発現を確認した。残りの一枚は遺伝子導入後も継続して培養を継続し、培養上清中へのウイルス産生を確認した。

4. 結果及び考察

(1) ニワトリ標準抗血清の評価

サブテーマ2（近畿大学）から提供されたWNVとJEVに対するニワトリ抗血清の抗体価を中和試験で評価した(表(4)-1)。免疫に供されたニワトリは4個体とも免疫前の血清がWNVおよびJEV対

する抗体価が陰性で、両ウイルス抗原に対しては未感作であったことが確認された。可溶化精製 WNV で免疫されたニワトリの中和抗体価は90%フォーカス減少法では全て陰性で、50%フォーカス減少法(FRNT)でのみ中和抗体が検出された。このことから、免疫に用いた可溶化WNV抗原の抗原量が少な過ぎたか、抗原が可溶化によって変性していた可能性が考えられた。一方、JEV抗原免疫された2個体のニワトリの免疫後血清は何れも高い中和抗体価を示した。JEV免疫ニワトリ抗血清は50% FRNTでWNVに対する弱い交叉中和も検出されが、90%FRNTで判定すると交叉中和は認められなかった。

表(4)-1. WNVもしくはJEVで免疫されたニワトリ抗血清の中和抗体価

| 免疫抗原 | 個体コード | 採血時期 | 中和抗体価 | | | |
|------|-------|------|----------|---------|---------|---------|
| | | | 抗WNV | | 抗JEV | |
| | | | 90%FRNT* | 50%FRNT | 90%FRNT | 50%FRNT |
| WNV | A1 | 免疫前 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | | 免疫後 | <10 | 26 | <10 | <10 |
| | A2 | 免疫前 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | | 免疫後 | <10 | 17 | <10 | <10 |
| JEV | C1 | 免疫前 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | | 免疫後 | <10 | 13 | 48 | 2,700 |
| | C2 | 免疫前 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | | 免疫後 | <10 | 25 | 720 | 8000 |

FRNT：フォーカス減少中和試験

(2) 中和試験における判定基準の決定

2009年に北海道東部で捕獲されたシギ・チドリ類の血液材料152検体について実施された中和試験では二つの基準で判定した。検体に加えたウイルスの感染価を50%以上減少した場合を陽性とする基準で判定すると、152検体中10検体(6.6%)が陽性となった(表(4)-2)。これらの陽性と判定された10検体を中和試験とは測定原理の異なるELISA法で測定すると、10検体すべてが陰性となり、両測定法の結果の間に矛盾が生じた。米国CDCではブラック法で90%以上減少した場合を陽性としていることから、本研究でも加えたウイルスの感染価を90%以上減少した場合を陽性とする基準を採用して再検討した。その結果、全ての検体でWNV中和抗体が陰性となり、ELISA法の結果と一致した。また、JEVに対する中和試験ではいずれの基準でも陰性と判定された。以上の結果と抗JEVニワトリ標準抗血清が90%FRNTでWNVに対する中和抗体価が検出されなかったことから、以降の中和試験では加えたウイルスの感染価が90%以上減少した場合を中和抗体陽性と判定することにした。

表(4)-2. 異なった判定基準によるシギ・チドリ類血清152検体の中和試験

| 用いたウイルス | 陽性率(%) | |
|--------------|----------|---------|
| | 90%FRNT* | 50%FRNT |
| ウエストナイル熱ウイルス | 0 | 6.6 |
| 日本脳炎ウイルス | 0 | 0 |

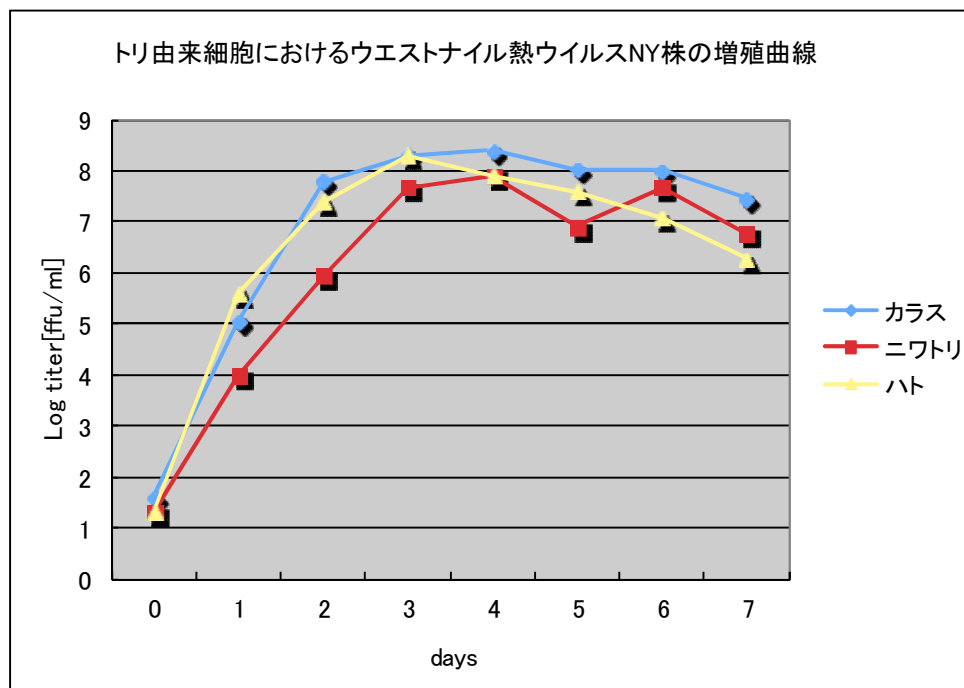
*FRNT：フォーカス減少中和試験

(3) 渡り鳥およびアイガモ血清の中和試験(2009, 2010, 2011年度実施)

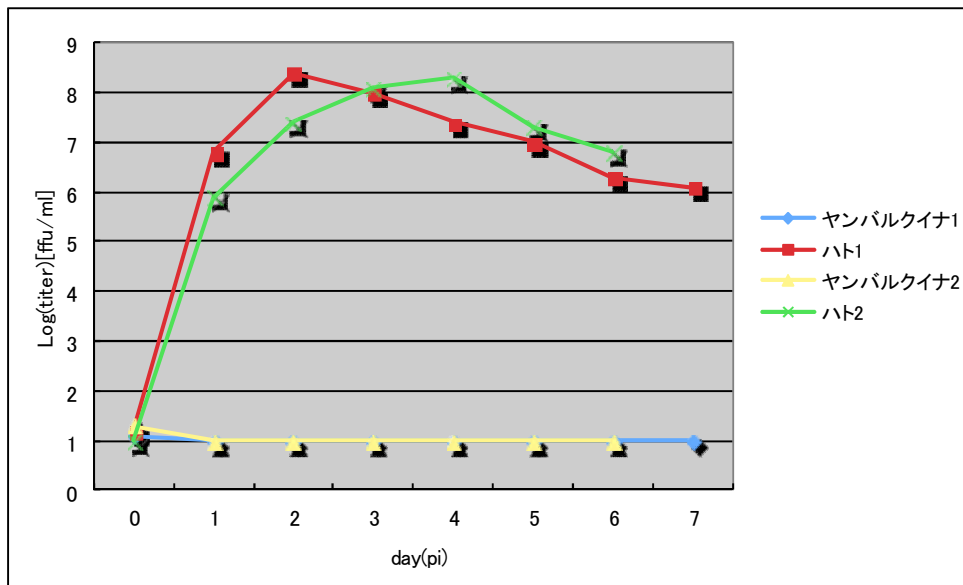
3年間の調査を通して北海道東部で捕獲されたシギ・チドリ類407個体、および2010年に沖縄で捕獲されたシギ・チドリ類77個体の血液材料は、いずれもWNV(NYおよびEg101株)とJEVを中和しなかった。また、2010年と2011年に宮城県で捕獲されたオナガガモ12個体と、2010年に北海道で飼育されたアイガモ36個体の血液材料もいずれのウイルスも中和しなかった。これらの結果から、媒介昆虫が吸血行動を行う季節に渡ってくるシギ・チドリ類はWNVに感染している可能性が低いと考えられた。また、北海道で飼育されたアイガモが抗体を保有していなかったことも日本へのWNV侵入および循環の否定を支持する結果だと考えられる。

(4) 鳥類由来初代培養細胞のWNV感受性試験(2010年度実施)

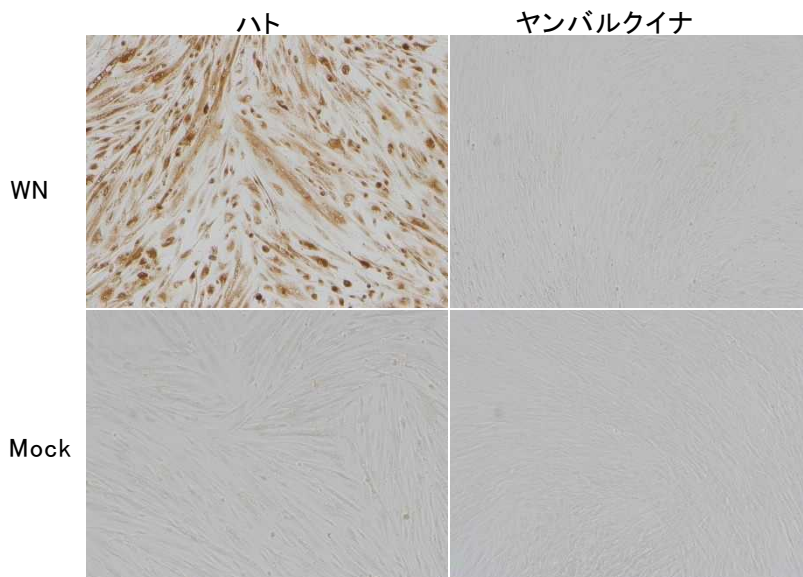
ニワトリ、カラス、ハトおよびヤンバルクイナのそれぞれ1個体から調整された初代培養細胞でWNVの増殖を検討したところ、ニワトリ、カラス、およびハトに由来する各々の細胞ではWNVが効率的に増殖した(図(4)-1)。北米における流行で、カラスはニワトリに比べるとWNVに致死感染しやすいといわれているが、図(4)-1の結果に見られるように、感染後4日目までのカラス由来細胞の培養液のウイルス感染価はニワトリ由来細胞に比べて高い傾向があった。この差は感染後2日目には約100倍近くあり、最も大きかった。一方、ヤンバルクイナ由来細胞ではウイルス抗原と子孫ウイルス両方が全く産生されなかった。ヤンバルクイナ細胞で得られた結果はヤンバルクイナの個体におけるウイルス感受性を反映しているのか否かについては多くの個体から得られた細胞を用いた詳細な解析が必要である。



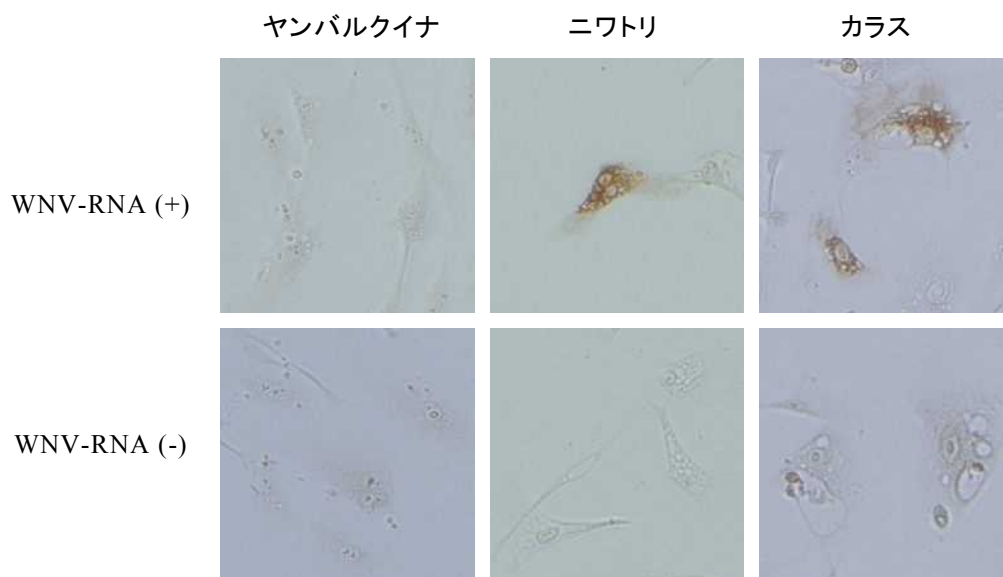
図(4)-1.トリ由来細胞におけるウエストナイル熱ウイルスの増殖



図(4)-2.ヤンバルクイナ由来細胞とハト由来細胞におけるWNV増殖の比較



図(4)-3.WNV接種したハトおよびヤンバルクイナ由来細胞の免疫染色



図(4)-4. 鳥類由来細胞へのWNV-RNA導入実験

(5) トリ由来培養細胞へのWNV遺伝子RNAの導入試験(2011年度実施)

WNV-RNAを導入したニワトリ、カラス、ハト由来の細胞は遺伝子導入から約24時間後には細胞内にウイルス特異抗原が蓄積し、子孫ウイルスが培養細胞に放出されることが確認された。一方、ヤンバルクイナ由来細胞ではウイルス特異抗原と子孫ウイルスの両方の産生が認められなかった。遺伝子導入から一週間の継続した培養でも前者の3種類の細胞は僅かにしか生残していないにもかかわらず、培養液中に感染価が認められた。ところが、ヤンバルクイナ細胞はほとんどが生残しており、培養液の感染性ウイルス、ウイルス特異抗原を蓄積する細胞ともに全く認められなかった(図(4)-4)。これらの結果は図(4)-2および図(4)-3で得られた実験結果と矛盾しなかった。ヤンバルクイナ由来細胞ではWNV遺伝子が細胞内に導入されてもウイルス蛋白質の翻訳あるいはウイルス遺伝子の複製に何らかの制限がかかっていると思われる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

研究推進期間中に北海道と沖縄の両地域で捕獲されたシギ・チドリ類はWNVとJEVに対する中和抗体を保有しておらず、何れのウイルスにも感染していないことが確認された。また、鳥類由来細胞のWNVに対する感受性を検討したところ、ヤンバルクイナ由来細胞以外の用いた細胞では予測通りWNVが増殖した。ところが、ヤンバルクイナ由来細胞では感染培養上清に感染性ウイルスが全く検出されず、ウイルス接種細胞内にもウイルス特異抗原が検出されなかった。このことは、ヤンバルクイナがWNVに感受性がないことを示唆する。今後、複数のヤンバルクイナの複数個体から採取された細胞について検討する必要があるが、この細胞がWNVの細胞内増殖における宿主側の増殖因子を明らかにするのに役立つツールとなる可能性があり、学術的に極めて重要な

知見である。

(2) 環境政策への貢献

調査研究結果だけでWNVがシギ・チドリ類の渡りに伴って我国に侵入することを強く否定するには例数が少なく、今後データを重ねることによって我国の環境保全対策に貢献することが可能となる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない。

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

なし

Risk Analysis Study on Infectious Disease Transmission from Migratory Birds to Endangered Japanese Birds.

Principal Investigator: Takashi KUWANA

Institution: Institute of Advanced Technology, Kindai University
14-1 Minami-Akasaka, Kainan, Wakayama, 642-0017 Japan
Tel: 073-483-7887, Fax: 073-483-7717
E-mail: kuwanat@gmail.com

Cooperated by: Ryukyu University, Tokyo University, Core Corporation Kansai
Company

[Abstract]

Key Words: West Nile virus, Migratory bird, Endangered bird, Migratory route, GPS transmitter

The West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne disease that was found in all over the world including Far East Russia. This region is used by several migratory bird species, including some that spend in Japan during their migration. Our objectives in this project were to: 1) evaluate the likely routes by which WNV may enter Japan, and 2) evaluate the risk of widespread mortalities in wild Japanese bird populations.

We conducted telemetry research on migratory birds, developing an ultra-light GPS transmitter to document the migratory behavior of small migratory birds and collecting blood and oral swab samples from migratory birds to test for the presence of WNV and anti WNV antibody.

To elucidate the migration routes of potential carrier birds of WNV, we caught whimbrels and a bar-tailed godwit at Komuke Lake, Hokkaido, Japan. We used the solar-powered transmitters with GPS that were newly developed in the present project.

And, we captured migratory birds at several wetlands in Japan. We also sampled the northern pintails and examined for WNV antigens and WNV gene. In addition, WNV susceptibility was evaluated using cultured cells obtained from Jungle crow, pigeon, chicken and Okinawa rail. Furthermore, relation between mortality rate and Amino acid sequence of OAS gene which regulated WNV resistance was evaluated.

From the viewpoint of conserving Japan's biodiversity, predicting and avoiding the extinction risks that emerging infectious diseases pose to Japan's ecosystems and in particular to endangered bird species are important tasks. There are fears that WNV will in time invade Japan, so predicting infection routes for WNV and assessing risks to endangered bird species are important. This research is aimed at developing an

ultra-compact GPS-based tracking device to enable elucidation of the flight routes of WNV-resistant shorebirds. Striving to reduce the overall size, weight, power consumption of the GPS device by reviewing all of its components including the GPS receiver module, antenna, timer, battery, and casing, we have succeeded to develop a whole new GPS-based tracking device of 11.3 g in weight.

To confirm sensitivity of an endangered Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*) to WNV, cells isolated from Okinawa rail were inoculated with WNV. No virus production and no viral antigen were detected in the cell culture, indicating that Okinawa rail have no sensitivity to WNV.

D-0907

渡り鳥による希少鳥類に対する新興感染症リスク評価に関する研究

