

# ツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体検出系の確立と応用

小澤 真

鹿児島大学共同獣医学部

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

099-285-8685

## 要旨 (500 字以内)

鹿児島県出水野の水田地帯に毎冬渡来するツルは、その多くが国際希少野生動物種に指定されており、その希少価値は国際的にも広く認知されている。また、当地における観光資源としても重要な役割を担っている。そのため、ツルの保護は、国内外における重要な課題となっている。特に高病原性鳥インフルエンザは、これまでも野鳥の絶滅危惧種に大量死を引き起こしており、ツルへの影響も懸念されている。しかしこれまで、ツルの鳥インフルエンザウイルスに対する感受性を直接評価する手段がなかった。本研究では、既存の ELISA 法を改良して、ツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体を検出する競合 ELISA 法を確立した。また確立した競合 ELISA 法を、2001 年から 2004 年、ならびに 2012 年から 2013 年に採取された血清・全 28 検体の試験に応用した結果、8 検体から抗インフルエンザウイルス抗体を検出された。本研究で見られたツルの抗体陽性率 (25%) は、他の野生水禽類と比較して明らかに低く、その生息環境中には鳥インフルエンザウイルスが確認されていることも併せると、ツルの鳥インフルエンザウイルスに対する感受性は低く、爆発的な感染流行が引き起こされるリスクもほとんどないと考えられる。

## 1. 緒言

鹿児島県出水野の水田地帯には、毎冬 1 万羽を超えるツルが渡来する。中でも、世界の生息数の約 9 割が渡来するナベヅル (*Grus monacha*)、5 割が渡来するマナヅル (*Grus vipio*) は、いずれも絶滅の恐れがあることから国際希少野生動物種に指定されており、その希少価値は国際的にも広く認知されている。またこれらのツルは、当地における観光資源としても重要な役割を担っている。そのため、ツルの保護は、国内外における重要な課題となっている。

感染症の蔓延は、これら希少動物種の存続を脅かす可能性が最も高い要因のひとつと考えられる。特に高病原性鳥インフルエンザは、これまでも野鳥の絶滅危惧種に大量死を引き起こしていることから<sup>1)</sup>、ツルへの影響も懸念されている。実際、2010-11 年シーズンに出水野へ渡来した 7 羽のナベヅルの死亡個体において、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染が確認された<sup>2)</sup>。さらに 2014-15 年シーズンにも、1 羽のマ

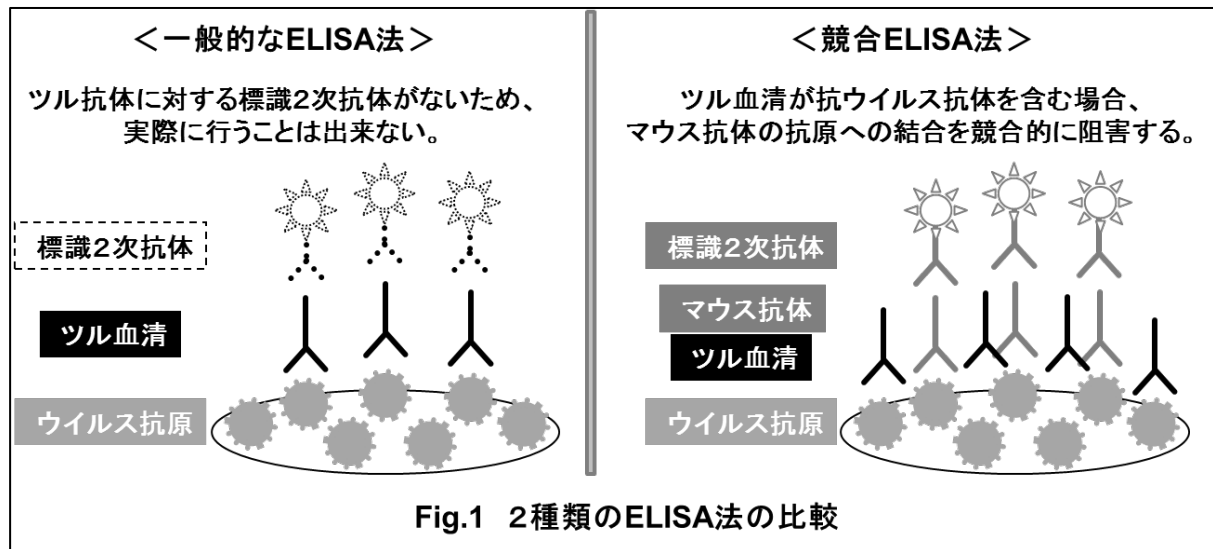
ナヅルと4羽のナベヅルから H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された<sup>3)</sup>。また、一部の水田地帯に水を張ることで整備される「ツルのねぐら」の水からは、東アジア地域でカモから分離されたウイルス株と遺伝的に高い相同性を示す低病原性鳥インフルエンザウイルス（2012-13年ならびに2014-15年シーズン）や H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス（2014-15年シーズン）が分離されており、2013-14年シーズンには同地で越冬するカモの糞便からも低病原性鳥インフルエンザウイルスが分離されている。これらの結果は、ツルの生息域に鳥インフルエンザウイルスが存在すること、ならびに、ツルが、少なくとも高病原性ウイルス株に対して感受性を示すことを示唆している。しかしその一方で、これまで10年以上に渡って続けられてきたツルの糞便調査において、2015年の1例を除き、鳥インフルエンザウイルスが分離されたことはない。また、夜間のツルはねぐら内で密集して過ごすにもかかわらず、高病原性鳥インフルエンザが発生したシーズンにおいても大量死は見られなかった。これらの結果は、ツルの鳥インフルエンザウイルスに対する感受性が限定的なことを示唆している。

このように、ツルの鳥インフルエンザウイルスに対する感受性に関する従来の評価は、間接的な知見に基づく推察に限定されてきた。ツル血清中における抗インフルエンザウイルス抗体の有無を調べ、各ツル個体のウイルス感染歴を明らかにすることができれば、ツルの鳥インフルエンザウイルスに対する感受性、さらには鳥インフルエンザに対する感染リスクを、より直接的に評価することができる。

動物血清中の抗ウイルス抗体を検出して各個体のインフルエンザウイルス感染歴を調べる方法は、大きく分けて4種類ある。このうち、赤血球凝集阻止試験とウイルス中和試験は、ウイルス表面の糖タンパク質に対する抗体のみを特異的に検出する方法で、特定のウイルス株に対する感染歴を調べる上で効果的な検査法と考えられる。しかし本研究のように、幅広いウイルス株に対する感染歴の解明が求められる場合は適応できない。寒天ゲル内沈降法と ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法は、いずれもウイルス粒子を構成する様々なウイルスタンパク質に対する抗体の存在を検証できる。標的となるウイルスタンパク質の中には、その構造がウイルス株間で高度に保存されている M1 タンパク質や NP タンパク質が含まれることから、試験に用いるウイルス株に左右されることなく、幅広いウイルス株に対する感染歴を調べることができる。しかし寒天ゲル内沈降法は、試験に必要な血清の容量が大きく、死亡個体などから採取した少量の血清の試験では十分な検出感度が得られない。そのため、ツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体の検出には、ELISA 法が最も適していると考えられる。

しかしこの ELISA 法にも、ツル血清を試験する上で克服すべき大きな課題がある。一般的な ELISA 法では、ウイルスタンパク質を抗原として、検体血清中の抗原特異的な抗体を反応させ、酵素などで標識した2次抗体を用いて抗ウイルス抗体を検出する (Fig.1・左側)。この標識2次抗体は、検体血清の動物種ごとに調製する必要があるが、ツルに対する標識2次抗体は市販されておらず、またその作出も難しい。そのため、一般的な ELISA 法を用いてツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体を検出することはできない。そこ

で、一般的な ELISA 法を改良して、ツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体を検出するための競合 ELISA 法を確立し (Fig.1・右側)、これを死亡個体などから採取した少量のツル血清の試験に応用することを目的として本研究を行った。



## 2. 材料と方法

### 2.1. ウイルス抗原

2012 年に出水平野のツルのねぐらから分離した鳥インフルエンザウイルス株 A/environment/Kagoshima/KU-ngr-D/2012(H4N6)を 10 日齢の発育鶏卵に接種して増やし、超遠心機を用いて濃縮・精製した。精製ウイルスを Disruption buffer (0.5 M Tris-HCl [pH 8.0]、0.6 M KCl、0.5% Triton X-100) で溶解し、ウイルス抗原として競合 ELISA 法に用いた。

### 2.2. ツル血清

出水平野へ飛来し保護された個体または回収された死亡個体から、2001 年から 2004 年、ならびに 2012 年から 2013 年に採取された血清で、-20℃で凍結保存されていた 28 検体 (Table1) を、レセプター破壊酵素 (Receptor destroying enzyme、RDE II : デンカ生研社) で使用書に従って処理し、競合 ELISA 法に用いた。

**Table1 本研究に用いたツル血清の概要**

血清番号	採取日	鳥種	備考
1	2001 年 1 月	ナベヅル	
2	2002 年 1 月	マナヅル	
3	2003 年 11 月 19 日	ナベヅル	
4	2003 年 11 月 21 日	ナベヅル	
5	2003 年 11 月 26 日	ナベヅル	
6	2003 年 11 月 26 日	ナベヅル	

7	2003年11月26日	ツル (詳細不明)	
8	2003年11月26日	ツル (詳細不明)	
9	2003年11月26日	ツル (詳細不明)	
10	2003年11月26日	ツル (詳細不明)	
11	2003年12月10日	ツル (詳細不明)	
12	2003年11月26日 2004年1月8日～14日	ナベヅル マナヅル	2 個体分のプール血清
13	2004年1月6日	マナヅル	
14	2004年1月16日	ナベヅル	
15	2004年1月27日	ツル (詳細不明)	
16	2004年1月23日～2月10日	ツル (詳細不明)	4 個体分のプール血清
17	2004年2月17日	ナベヅル	
18	2012年3月21日	ナベヅル	
19	2012年3月21日	ナベヅル	
20	2012年4月9日	マナヅル	
21	2012年12月28日	ナベヅル	
22	2013年1月28日	マナヅル	
23	2013年2月22日	ナベヅル	陽性対照検体
24	2013年2月22日	ナベヅル	陰性対照検体
25	2013年2月22日	ナベヅル	
26	2013年2月22日	ナベヅル	
27	2013年2月22日	ナベヅル	
28	2013年3月14日	ナベヅル	

### 2.3. 競合 ELISA 法

競合 ELISA 法は、以下の手順で実施した。

- ① ウイルス抗原を PBS で 100 倍に希釈して、高結合型 ELISA プレート (MaxiSorp : Nunc 社) の各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ加え、4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。統計学的な評価のため、各ツル血清の希釈条件ごとに 3 ウェルずつ用意した。
- ② ELISA プレートの各ウェルを、150  $\mu$ l ずつの 0.1% Tween/PBS で 3 回洗浄した。
- ③ ELISA プレートの各ウェルに 20% Blocking One (ナカライ社) を 150  $\mu$ l ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。
- ④ ELISA プレートの各ウェルを、150  $\mu$ l ずつの 0.1% Tween/PBS で 3 回洗浄した。
- ⑤ ELISA プレートの各ウェルに、2% Blocking One で 20 倍、200 倍、2000 倍にそれぞれ希釈したツル血清を 50  $\mu$ l ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。ツル血清の入っていない対照ウェルも用意した。
- ⑥ ELISA プレートの各ウェルを、150  $\mu$ l ずつの 0.1% Tween/PBS で 3 回洗浄した。
- ⑦ ELISA プレートの各ウェルに、2% Blocking One で 1000 倍に希釈した抗インフルエンザウイルス M1 タンパク質・マウスモノクローナル抗体 (クローン WS 27-52 : 東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与) を 50  $\mu$ l ずつ加え、37  $^{\circ}$ C

で1時間インキュベートした。

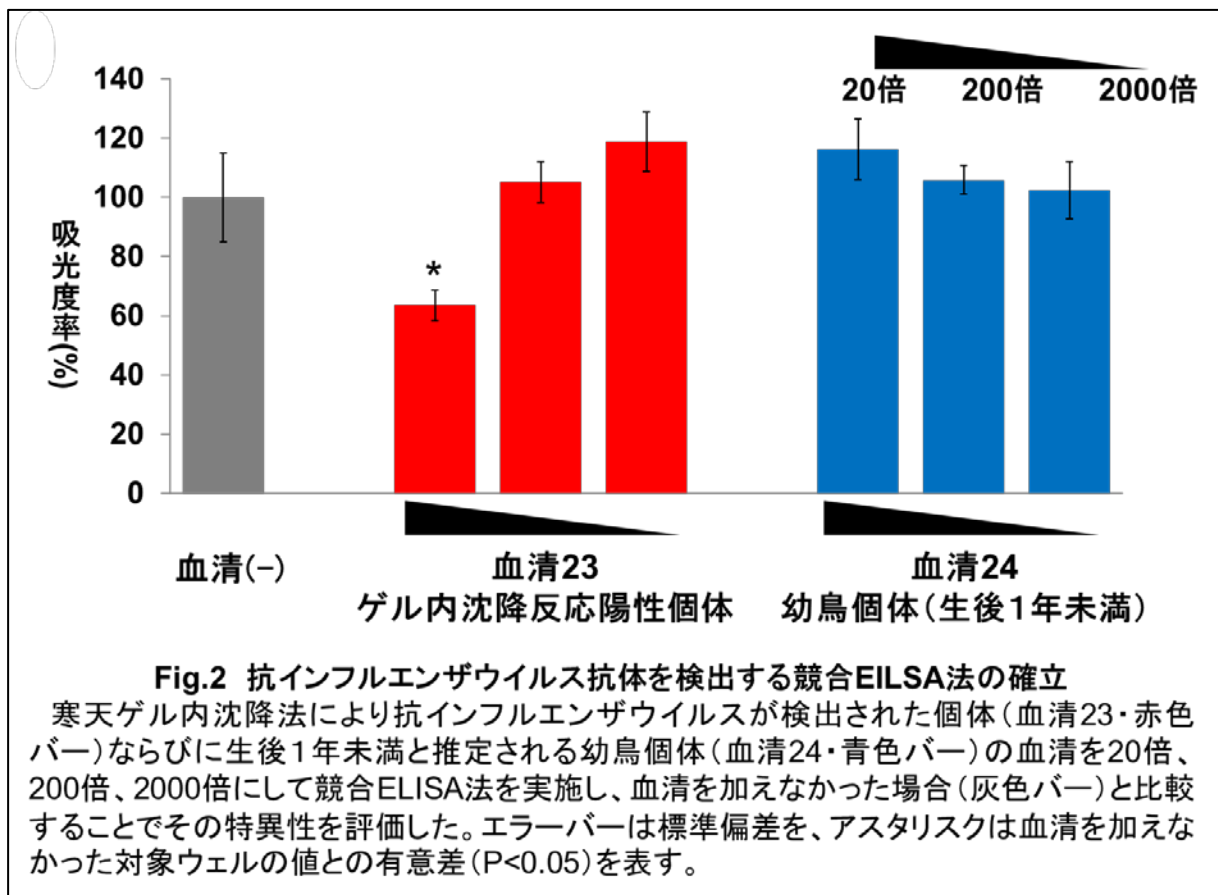
- ⑧ ELISA プレートの各ウェルを、150  $\mu$ l ずつの 0.1% Tween/PBS で3回洗浄した。
- ⑨ ELISA プレートの各ウェルに、2% Blocking One で1000倍に希釈した二次抗体 (Goat anti-mouse IgG-HRP conjugate : Sigma 社) を50  $\mu$ l ずつ加え、37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。
- ⑩ ELISA プレートの各ウェルを、150  $\mu$ l ずつの 0.1% Tween/PBS 3回洗浄した。
- ⑪ ELISA プレートの各ウェルに、使用直前に調製した HRP 基質 (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit : Bio-Rad 社) を100  $\mu$ l ずつ加えて37  $^{\circ}$ Cで15~20分間インキュベートし、青色の発色が十分認められた段階で1 M 硫酸を100  $\mu$ l ずつ加え、反応を停止させた。
- ⑫ 吸光度計 (GloMax-Multi+ Microplate Multimode Reader : Promega 社) を用い、ELISA プレートの各ウェルにおける450 nm 波長の吸光度を測定した。
- ⑬ 各ツル血清の希釈条件ごとの測定値を、ツル血清の入っていない対照ウェルの測定値と比較することで、各ツル血清中における抗インフルエンザウイルス抗体の有無を評価した。

### 3. 結果

#### 3.1. 競合 EILSA 法の確立と陽性ならびに陰性対照検体の決定

新たな抗体検出系を確立する上で、その結果の正しさを担保するために、陰性ならびに陽性対照となる検体は欠かせない。出水市内のツル保護センター施設内には、数年前に保護され、家畜保健衛生所で実施された寒天ゲル内沈降法によりその血清中から抗インフルエンザウイルスが検出されたことのあるツル個体が飼育されていた。同個体の血清 (血清23) は、本研究で確立する競合 EILSA 法においても陽性を示す可能性が高いと考えられたため、陽性対照検体としての有用性を検証した。一方、生まれてからの歳月が浅い幼鳥個体は、成鳥個体と比べて病原体と接触する期間が短いことから、鳥インフルエンザウイルスにも未感染で、競合 EILSA 法においても陰性を示す可能性が高いと考えられた。そこで、2014年に保護された生後1年未満と推定される幼鳥個体の血清 (血清24) の、陰性対照検体としての有用性を検証した。

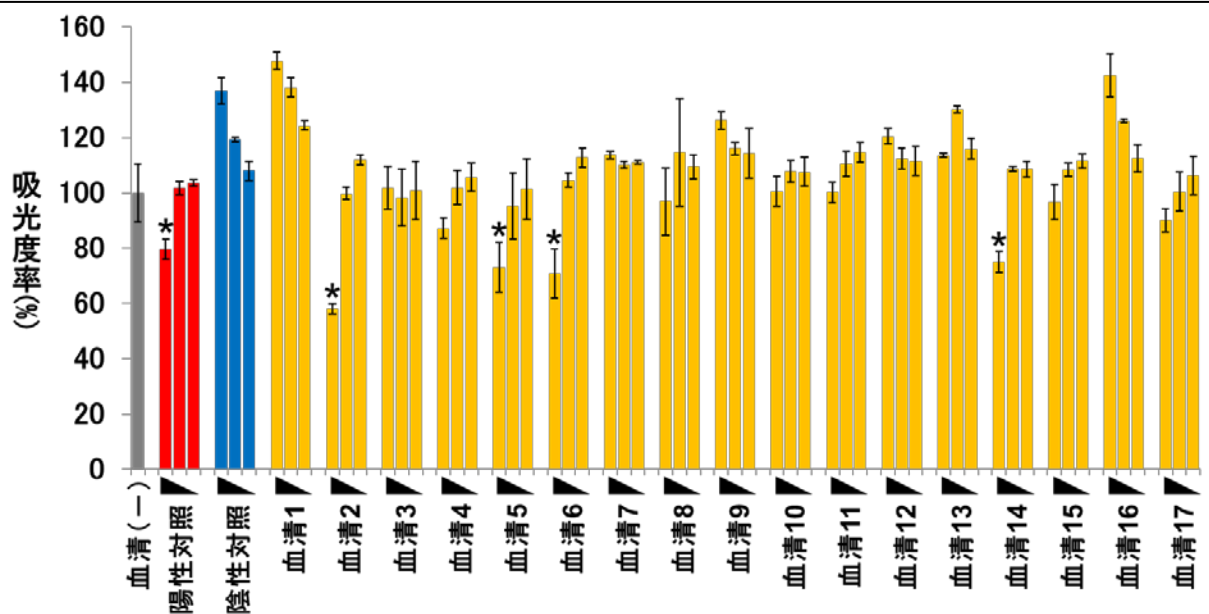
競合 EILSA 法において、ツル血清の入っていない対照ウェルの測定値 (Fig.2・灰色バー) を100%に換算した時、寒天ゲル内沈降法陽性個体の血清 (Fig.2・赤色バー) を20倍に希釈して添加したウェルの測定値は約60%で、両群の値には有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。一方、幼鳥個体の血清 (Fig.2・青色バー) を添加したウェルの測定値はいずれの希釈倍率においても100~110%で、対照ウェルの測定値との間に有意差は認められなかった。以上の結果より、本競合 EILSA 法により、ツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体を特異的に検出できることが示された。また以後の試験では、寒天ゲル内沈降法陽性個体の血清を陽性対照、幼鳥個体の血清を陰性対照として用いた。



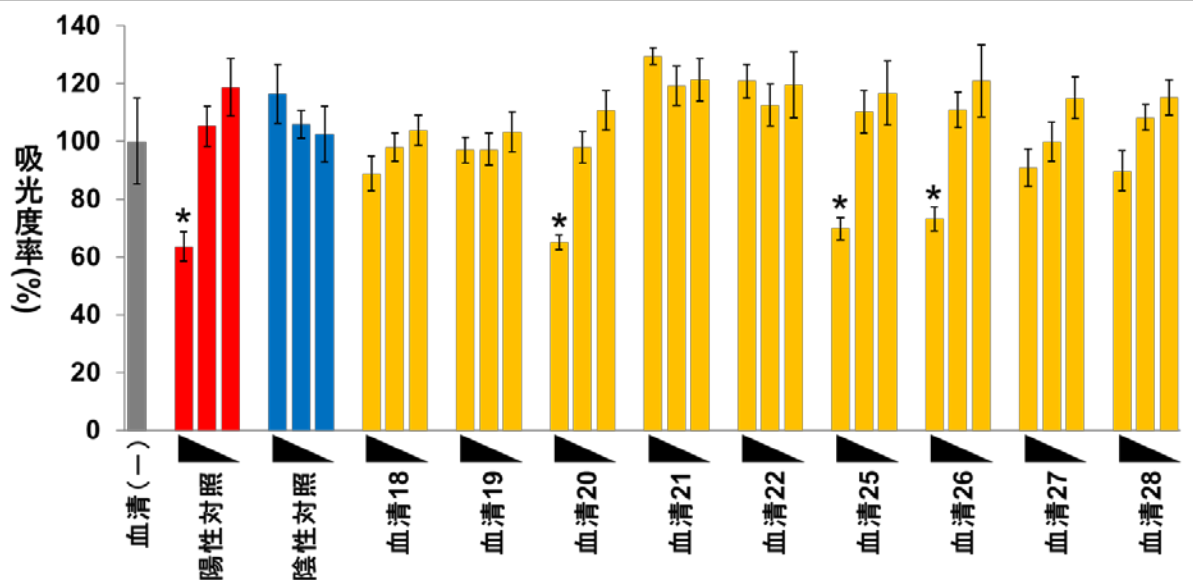
### 3.2. 競合 EILSA 法を用いたツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体の検出

上記の実験で選定した陽性ならびに陰性対照検体を除く 26 血清を、その採取年を基準にして 2 グループに分け、確立した競合 EILSA 法による抗インフルエンザウイルス抗体の検出を試みた。各グループ検体の試験において、それぞれ陽性ならびに陰性対照検体を用意し、試験結果の妥当性を評価した。

グループ検体ごとに実施したいずれの競合 EILSA 法においても、陽性対照検体では測定値の有意な減少が見られ、陰性対照検体では顕著な増減は見られなかった (Fig.3 および Fig.4・赤色バーならびに青色バー) ことから、その試験結果より、各血清中の抗インフルエンザウイルス抗体の有無を判定できることが推定された。このような条件下において、2001 年から 2004 年に採取された血清・17 検体のうち、血清 2、血清 5、血清 6 および血清 14 の 4 検体 (いずれも 20 倍希釈液を添加した場合) の測定値で、ツル血清の入っていない対照ウェルの測定値と比べて有意な減少が認められた (Fig.3)。また、2012 年から 2013 年に採取された 9 血清のうち、血清 20、血清 25 および血清 26 の 3 血清 (いずれも 20 倍希釈液を添加した場合) の測定値は、対照ウェルの測定値よりも有意に低かった (Fig.4)。以上の結果から、本研究で確立した競合 ELISA 法を用いて試験した全 28 検体 (対照検体に選定したものも含む) のうち、8 検体 (28.6%) のツル血清で、抗インフルエンザウイルス抗体が検出された。



**Fig.3 2001年～2004年に採取されたツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体の検出**  
 2001年～2004年に採取された17検体の各ツル血清(血清1～17・黄色バー)を、陽性対照(赤色バー)ならびに陰性対照(青色バー)と共に20倍、200倍、2000倍に希釈して競合ELISA法を実施し、血清を加えなかった場合(灰色バー)と比較することで、抗インフルエンザウイルス抗体の有無を評価した。エラーバーは標準偏差を、アスタリスクは血清を加えなかった対象ウェルの値との有意差(P<0.05)を表す。



**Fig.4 2012年～2013年に採取されたツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体の検出**  
 2012年～2013年に採取された9検体の各ツル血清(血清18～22ならびに25～28・黄色バー)を、陽性対照(赤色バー)ならびに陰性対照(青色バー)と共に20倍、200倍、2000倍に希釈して競合ELISA法を実施し、血清を加えなかった場合(灰色バー)と比較することで、抗インフルエンザウイルス抗体の有無を評価した。エラーバーは標準偏差を、アスタリスクは血清を加えなかった対象ウェルの値との有意差(P<0.05)を表す。

#### 4. 考察

本研究では、既存の ELISA 法を改良して、ツル血清中の抗インフルエンザウイルス抗体を検出する競合 ELISA 法を確立した (Fig.2)。また確立した競合 ELISA 法を応用し、2001 年から 2004 年、ならびに 2012 年から 2013 年に採取された血清・全 28 検体のうち、8 検体から抗インフルエンザウイルス抗体を検出した (Fig.3 および Fig.4)。

今回試験したツル血清検体の一部 (血清 12 および血清 16) は、複数個体の血清を混ぜたプール血清であったが、いずれの検体からも抗インフルエンザウイルス抗体は検出されなかった。そのため、試験した血清の個体数に対する陽性率は 25% (=陽性検体数 8 ÷ 全試験個体数 32) と算出される。今回確立した抗体検出法と同様の手順で、アラスカで営巣する様々な野生水禽類の抗インフルエンザウイルス抗体保有状況を調査した先行研究<sup>4)</sup>において、鳥インフルエンザウイルスの自然宿主とされるカモ類の抗体陽性率は平均 86%と高く、ハクチョウやガンなど他の野生水禽類においても、その平均抗体陽性率は 43%だった。これらの結果と比べると、本研究で示されたツルの抗体保有陽性率は明らかに低い。出水平野において、ツルとカモ類は、ねぐらをはじめとする様々な場所で生息域を共有しており、またその環境水などからも鳥インフルエンザウイルスが分離されていることから、ツルが鳥インフルエンザウイルスに接触する機会は頻繁に訪れるものと考えられる。このような知見も勘案すると、ツルの鳥インフルエンザウイルスに対する感受性は低く、爆発的な感染流行が引き起こされるリスクもほとんどないと考えられる。

#### 5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただいた公益社団法人サンケイ科学振興財団、ならびにツル血清の採取、保管にご尽力いただいた鹿児島県ツル保護会のみなさま、および鹿児島大学共同獣医学部高瀬公三教授に深く御礼申し上げます。

#### 6. 引用文献

- 1) M. Asakawa, S. Nakamura and M. A. Brazil. An Overview of Infectious and Parasitic Diseases in Relation to the Conservation Biology of the Japanese Avifauna. *J. Yamashina Inst. Ornithol.*, 2012;34: 200-221.
- 2) World Organisation for Animal Health. OIE 10746, June 29, 2011, Country: Japan.  
[http://web.oie.int/wahis/reports/en\\_fup\\_0000010746\\_20110629\\_171928.pdf](http://web.oie.int/wahis/reports/en_fup_0000010746_20110629_171928.pdf)
- 3) World Organisation for Animal Health. OIE 17219, February 20, 2015, Country: Japan.  
[http://www.oie.int/wahis\\_2/public%5C.%5Ctemp%5Creports/en\\_fup\\_0000017219\\_2015022](http://www.oie.int/wahis_2/public%5C.%5Ctemp%5Creports/en_fup_0000017219_2015022)



[0\\_144318.pdf](#)

- 4) H. M. Wilson, J. S. Hall, P. L. Flint, J. C. Franson, C. R. Ely, J. A. Schmutz and M. D. Samuel. High Seroprevalence of Antibodies to Avian Influenza Viruses among Wild Waterfowl in Alaska: Implications for Surveillance. *PLoS ONE*, 2013;8(3):e58308.

# Establishment and application of a detection system of anti-influenza virus antibodies in crane sera

Makoto Ozawa

Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University  
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan  
+81-99-285-8685

Most cranes overwintering at the Izumi plain, which is located in Kagoshima prefecture, Japan, are known as endangered avian species. In addition, these cranes serve as the tourism resources. Their conservation, therefore, is one of the most important domestic and international issues. Although highly pathogenic avian influenza have been posing serious threats to wild bird populations, including the cranes, the evaluation system of cranes' sensitivity against the responsible viruses have not been available. Here, we established a competitive ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) system for detection of anti-influenza virus antibodies in crane sera by modifying the standard ELISA procedure. We further applied the established assay system to crane serum specimens collected in 2001-2004 and 2012-2013 and found that eight out of 28 specimens were positive for anti-influenza virus antibodies. The seroprevalence (25%) is considerably lower than those in other waterfowls (approximately 43%) in a previous report. Avian influenza viruses have been often detected in the cranes' habitat environment. These results suggest that the cranes' sensitivity against avian influenza viruses is relatively low, and thus the risk of explosive outbreak in cranes is limited.