

多摩川の流域周辺に生息する
ワカケホンセイインコ (*Psittacula krameri manillensis*) など、
野生化した飼い鳥から人に感染する病原体の調査

2021年

佐々 悠木子

目次	
1. 背景と目的	----- 2
2. 材料と方法	
2-1. ねぐらの調査とサンプリング	----- 3
2-2. 核酸の抽出	
2-2-1. RNA の抽出	----- 4
2-2-2. DNA の抽出	----- 4
2-3. 逆転写反応	----- 4
2-4. リアルタイム PCR による病原体遺伝子の検出	----- 4
2-4-1. トリボルナウイルス	----- 5
2-4-2. クラミジア	----- 5
2-4-3. アストロウイルス	----- 5
2-5. サルモネラの培養による検出	----- 6
3. 結果	----- 6
4. 考察	----- 6
5. 計画していたが、実施・実現できなかったこと	----- 8
6. 結論	----- 8
7. 今後に向けての課題	----- 8
8. 参考文献	----- 9

1. 背景と目的

近年、緑色の大きな外来種の鳥であるワカケホンセイインコ (*Psittacula krameri manillensis*) が野生化し、関東圏で 1000 羽を超える大群をなして大学キャンパスや公園および住宅地などに群生し、糞害や鳴き声による騒音などの環境被害を引き起こしている。ワカケホンセイインコは、1960 年代後半に東京工業大学のキャンパスに群生したことから始まり、現在は東京都を中心として神奈川県、埼玉県に広く分布しており、群馬県、千葉県にも確認されている。ワカケホンセイインコは環境の変化に応じてねぐらを移しており、多摩川流域周辺の複数の場所で大群のねぐらを確認している。多摩川流域には、ワカケホンセイインコのねぐらとなる木や食性にあった生態系が存在するため、今後も多摩川流域において、ねぐらを拡大させていくと予想される。籠抜けや放鳥した飼い鳥が野生化する事例はワカケホンセイインコだけでなく、オオホンセイインコ、ダルマインコ、アオボウシインコ、ムジボウシインコ、セキセイインコなど多くの種が観察されている。

多摩川流域は市民の憩いの場であり、鳥類から人へと感染する感染症を予防し、市民の健康を守る必要性がある。野生化した飼い鳥は、海外原産であることから、どのような感染症を有しているか不明であり、住民への健康リスクが高い。また、野生化した飼い鳥はねぐら周辺に大量の糞便を撒き散らす。この糞便には鳥類から人へと感染する病原体が含まれる場合があり、特に、老人、子供、妊婦などの免疫力が低下した人間では大きな脅威となる。2017 年に本邦の妊婦での死亡例が報道されたオウム病クラミジアなど（日本産婦人科医会, 2017）、人で致死的な帰結となる病原体も鳥の糞便に排泄される。このため、多摩川およびその流域にねぐらを有している、あるいは今後ねぐらを作る可能性のある野生化した飼い鳥について、糞便に排泄される病原体の調査を行った。

本研究では、上述したオウム病クラミジアを含むクラミジア、トリボルナウイルス、アストロウイルス、サルモネラについて調査を行なった。

クラミジアは細菌の一種であり、上述したオウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*) など人にオウム病を惹き起こすものを含み、*C. psittaci* は 140 種を超える鳥類から検出されている。また、近年、*C. ibidis*、*C. gallinacea*、*C. avium* という 3 種の鳥クラミジアが新たに発見されている (Vorimore F, 2013; Sachse K, 2014)。ヒトへは乾燥した鳥類の糞・排泄物を吸引することにより感染するとされている。ねぐらは大量の糞便が堆積するため、人への感染源としての重要性から本研究の対象とした。

ボルナウイルスは 2008 年から相次いで新型が発見されており、2015 年には人に感染して致死的な脳炎を起こすリスボルナウイルスも報告された

(Hoffmann B, 2015)。ボルナウイルスは、19世紀末から最近までは乳動物に感染するボルナ病ウイルス(BoDV)-1 および-2 のみが知られていたが、2008年に前胃拡張症(PDD)を示すオウムでトリボルナウイルスが発見されたことを皮切りに、鳥類に感染するトリボルナウイルスが少なくとも15種類同定されている。研究代表者らも新しい遺伝子型のトリボルナウイルスを本邦にて発見しており、人へと感染するように変異する可能性も否定できないことから、感染状況を調査する必要性があった。

また、ボルナウイルス以外にも、遺伝子のデータベース解析にて様々なウイルス科にて新型のウイルスが見つかり、アストロウイルスも鳥で新型が発見されているウイルスの一つである。これまで、アストロウイルスによる鳥の感染症は、鶏や七面鳥などの家禽で白雛などの被害が報告されてきた。近年、本邦にて鶏雛が緑色化して死亡した症例を研究代表者らが解析した結果、アストロウイルス感染によるものであったため、アストロウイルスの強毒化を懸念し本研究において対象とした。

サルモネラは、人に胃腸炎を主徴とするサルモネラ症を起こす細菌であり、鳥を含む動物が保有している。動物は無症状でサルモネラを保有している場合も多く、糞便にはサルモネラが排泄されている。日本で飼育される愛玩鳥でもサルモネラ感染症の発症はみられ、日本の愛玩鳥の保護施設において集団発生が認められた例もある。鳥の糞便が人への直接的な感染源となるため、本研究の調査対象とした。

1. 材料と方法

2-1.ねぐらの調査とサンプリング

2019年度および2020年度に寄せられたワカケホンセイインコを目撃情報を元に現地調査を行い、80検体の糞便を採取した。ねぐらの木の下に使い捨ての大型プラスチックシートを敷き、落下した糞便を1.5mlチューブに個別に回収し、氷上に保持して持ち帰り使用まで-80℃にて保管した。

調査した場所は、目黒区、世田谷区、杉並区、北区、豊島区、府中市、調布市、小金井市、立川市、東村山市、川崎市、横浜市であり、多くは多摩川流域であったが一部は荒川流域であった(図1)。ねぐらの詳細な位置については保護のために非公表とする。

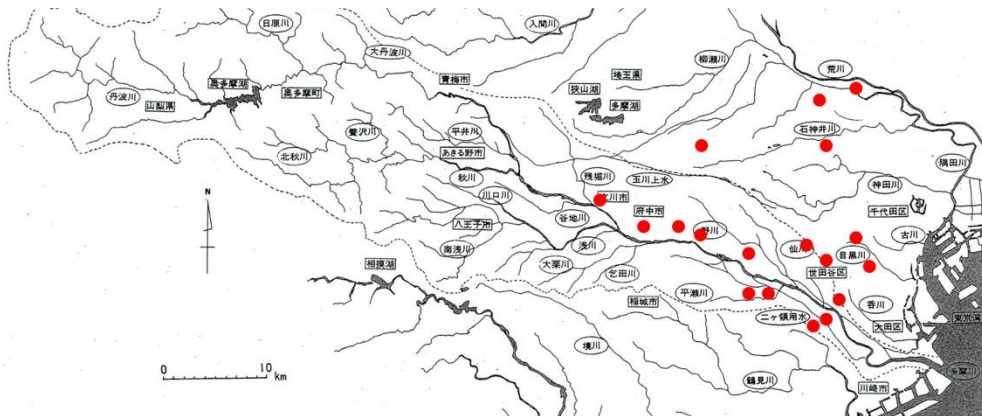


図1: 調査を行なった場所 (地図は東急財団提供の図を使用)

2-2. 核酸の抽出

2-2-1. RNA の抽出

糞便に 500ul の PBS を加えよく懸濁した後に 10000g、10 分遠心し、200ul の上清を RNA 抽出の材料とした。High pure viral nucleic acid kit (Roche) を用い、製造社の説明に従い RNA を抽出した。

2-2-2. DNA の抽出

上述した糞便 PBS 懸濁液約 100ul を DNA 抽出の材料とした。Sepa Gene(積水メディカル)を用い、製造社の説明に従い DNA を抽出した。55°C 30 分にて 100ul の DNase free water (Ambion) に DNA を溶解した。

2-3. 逆転写反応

Prime Script RT-PCR kit を用いて、2-2 にて抽出した RNA を鋳型とし random hexamer をプライマーとして、30°C、10 分、42°C、30 分、95°C、5 分にて逆転写反応を行ない、cDNA を作製した。

2-4. リアルタイム PCR による病原体遺伝子の検出

Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara) を使用し、リアルタイム PCR にて核酸の検出を試みた。プライマーおよびプローブの配列は表 1 に示す通りである。また、検出に用いた試薬、サイクルなどを以下に示す。

表1: 検出に用いたプライマー

	名称	プライマー配列	Ref
トリボルナウイルス N	MH175	AARGARTAYYTIAAYGARTGYATGGAYGC	Horie M, 2012
	MH170	GGRTTYTCYTTYTTICTCCARTAAAANGC	
トリボルナウイルス M	MH180	GGCAAGGTAATYGTCCCTGGATGGC	Horie M, 2012
	MH181	CCAACACCAATGTTCCGAAGCCGAT	
クラミジア	panCh16F2	CCGCCAACACTGGGACT	Lienard J, 2011
	panCh16R2	GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTTAC	
	probe panCh16S	FAM-CTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATC-BHQ1	
アストロウイルス	Astrovirus ANV-1	GAYTGGACIMGITAYGAYGGIACIATICC	Todd D, 2009
	Astrovirus ANV-1	YTTIACCCACATICCRAA	

2-4-1. トリボルナウイルス

2-3 で作製した cDNA を鋳型として用いた。変異種を検出しやすいよう 3'exonuclease 活性をもつ酵素(Ex Taq HS, Takara)を使用し、SYBR green (Ronza) を添加することでインターカレーター法の試薬を自作して使用した。Nucleoprotein (N)および Matrix (M)を標的とする 2 種類のプライマーセットを用い、さらに縮重プライマーを用いることで変異種の検出の可能性を高めた。94°C, 2 分の後、94°C, 30 秒、55°C, 30 秒、72°C, 30 秒の 3 ステップを 40 サイクル行い、Amplification curve および Dissociation curve にて遺伝子の検出を判断した。(Horie M, 2012; Sassa Y, 2013 および 2015)。

2-4-2. クラミジア

2-2 で抽出した DNA を鋳型として用いた。Premix Ex Taq, Probe qPCR(Takara)を用い、プローブ法にて検出を行なった。検出感度が高いことが特徴であり、人の肺液サンプルを用いた場合に 5 コピーまでの検出が可能である。また、*C.psittaci* 及び新種を含めた幅広いクラミジアの 16S rRNA を検出することが可能である。95°C, 30 秒の後、95°C, 5 秒、60°C, 34 秒の 2 ステップを 50 サイクル行ない、Amplification curve にて遺伝子の検出を判断した。(Lienard J, 2011)。

2-4-3. アストロウイルス

2-3 で作製した cDNA を鋳型として用いた。変異種を検出しやすいよう 3'exonuclease 活性をもつ酵素(Ex Taq HS, Takara)を使用し、SYBR green (Ronza) を添加することでインターカレーター法の試薬を自作して使用した。縮重プライマーを用い、変異種の検出の可

能性を高めた。94°C, 2 分の後、94°C, 30 秒、45°C, 30 秒、72°C, 30 秒の 3 ステップを 40 サイクル行い、Amplification curve および Dissociation curve にて遺伝子の検出を判断した。(Todd D, 2009)。

2-5. サルモネラの培養による検査

糞便を材料としてペプトン水にて 37°C にて 22±2 時間、その後ラバポート培地にて 42°C にて 22±2 時間前培養したのちに、H₂S 産生により判定する培地(DHL, MLCB)と、H₂S 産生によらず判定する培地(ブリリアントグリーン寒天; BRS)の両方を用い 37°C で一晩培養した。サルモネラが疑われたものについては、TSI 培地および LIM 培地にて性状を確認した。

2. 結果

調査した 80 検体のうち、PCR による遺伝子断片の検出では、トリボルナウイルスについては全ての検体で陰性であり、クラミジアは 13 検体(16.2%)、アストロウイルスは 1 検体 (1.2%) で陽性であった。アストロウイルスが陽性であった 1 検体については、Dissociation curve にて明瞭な結論が得られず、アストロウイルスであるかどうか疑問が残る。また、サルモネラ の培養では、1 検体が H₂S 産生能によらない鑑別培地である BRS 培地の赤色変化を示しサルモネラを疑う所見となったが、LIM 培地にてリジン脱炭酸反応陰性であるなどサルモネラではないことを強く示唆する結果を得た。

3. 考察

日本の愛玩鳥および野鳥においてトリボルナウイルス感染症を調査した報告では、飼い主のいるペットの愛玩鳥でおよそ 5%、野鳥で 0.9%の感染率であった。また、15 ある遺伝子型のうち、日本で認められる主要な遺伝子型は PaBV-2 と-4 であった (Sassa Y, 2013 および 2015)。今回の結果は、80 検体全てが陰性であり、ペットの愛玩鳥と比較して感染率は低い結果となった一方で、野鳥と比較した場合には結論を得るには不十分な検体数であった。また今回使用したトリボルナウイルス検出型は主として PaBV-1 から-5 を検出するものであり、さらに縮重プライマーや PCR 酵素に工夫を凝らし検出感度の改善を試みた。それでも尚、ペットの愛玩鳥で流行している主要な遺伝子型や多少の変異体は検出できるものの、新種や遺伝的相同性の低い遺伝子型は検出が難しかった可能性がある。

クラミジアについては、13 検体が PCR にて陽性であった。今回調査の対象となったワカケホンセイインコは健康な個体群であり、明瞭な臨床症状を

示す個体は存在しなかったが、臨床症状を示さない鳥が糞便に排泄するクラミジアの量は従来の PCR 検査では検出限界ギリギリであると言われてきた。*C.psittaci* は少量であっても人への感染源となり、高齢者など免疫力の不十分な人が過ごす場所では集団感染を惹きおこす可能性があるため感度の高い検出系が必要である。今回採用した検出系は、5 コピーから検出が可能であり、*C.psittaci* ばかりでなく、鳥に見つかった新種のクラミジアである *C. ibidis*、*C.gallinacea*、*C. avium* (Vorimore F, 2013; Sachse K, 2014) の検出も可能である。しかしながら、この系はこれまでに行なったペットの愛玩鳥を対象とする研究において、水から得られる *Uncultured Chlamydiales bacterim* や *Parachlamydia acanthimoebae* などの環境に存在するクラミジアをも検出していることが明らかとなった。このため、今回陽性であった 13 検体はクラミジアであるものの、動物や人に対して病原性をもつクラミジアであるのか否かを、塩基配列決定などの遺伝子解析や病原体の分離で今後確認していく必要がある。また、オーストラリアにおける調査で、飼い鳥で 8%、野鳥で 0.7% からクラミジアの遺伝子が検出されたとする報告がある (Amery-Gale J, 2020)。使用した検出系が異なるため一概に比較はできないが、今回の結果はオーストラリアと比較して非常に高い保有率であり、詳細な解析を行う必要がある。

アストロウイルスは 1 検体が PCR 陽性であった。今回使用した系は既存の系の中では検出感度の高いものであるが、データベース検索で見られている新種のアストロウイルスを検出可能かどうかについては疑問が残る。陽性であった 1 検体については、*Dissociation curve* にて明瞭な結論が得られなかった。縮重プライマーや PCR 酵素といった工夫により検出感度を上げているゆえに、非特異反応も起こりやすくなってしまいう側面があるため、今回陽性であった検体について、塩基配列の決定などの遺伝学的解析によってアストロウイルスであるか否かを確認する必要がある。

サルモネラは全て陰性であったが、これは研究代表者がこれまでに明らかにしたペット、展示施設、保護施設の愛玩鳥でのサルモネラの低い保有率と一致する。これまでの調査では 973 検体を調査し、2 検体 (0.2%) にてサルモネラが疑われたが、最終的には PCR にて否定され、全て陰性という結果になっている。鶏ではサルモネラはコントロールすべき重要な課題となっているが、ペットの愛玩鳥や野生化した愛玩鳥の間での感染の伝搬は簡単ではないことが示唆され、愛玩鳥はサルモネラの感染源として重要性がほぼないと考えられる。

4. 計画していたが、実施・実現できなかったこと

本研究での検体数は当初 400 検体を目標としていたが、ねぐら調査の難しさと新型コロナウイルス感染症の影響で結果として 80 検体となってしまった。ねぐら調査の難しさとしては、①ワカケホンセイインコは 20km 以上と飛翔距離が長いと、目撃された場所付近にねぐらが見つけれないことが多々あった、②ねぐらを確認できても私有地であるなどの理由で糞便の採取ができなかった、③ねぐらが不規則に遷移するため常に調査をし続ける必要性があった、という点が挙げられる。早朝および日暮の目撃情報はねぐらの近辺であることや、ワカケホンセイインコは日暮れ時にねぐらへと帰り着いた後に 1-2 時間程度で糞便をすることが分かるようになり、サンプリングが効率的に行えるようになった。また、枇杷の実のなる時期には枇杷の木にワカケホンセイインコが集まり、食餌しつつ糞便を落とすことも分かった。しかしながら、新型コロナウイルス蔓延による緊急事態宣言やその後の出張禁止や外出自粛要請のために十分なねぐら調査を行うことができなかった。

また PCR 陽性の検体について、遺伝子解析や分離培養などさらに進んだ解析を研究期間内に行う予定であったが、新型コロナウイルス蔓延防止対策として大学施設への立ち入りの自粛要請や、附属実験施設の利用制限、実験室内での人員数の制限やさらには解析を行う予定であった留学生の渡航禁止などが影響して当初の予定どおりに実験を進めることができなかった。

その代わりに研究代表者のラボ内で完結できる実験として、当初予定していなかったアストロウイルスの検出を加えた。

5. 結論

鳥類に時に致死的な感染症となるトリボルナウイルスとアストロウイルス、および人へと感染するサルモネラについては、存在しないか存在しても非常に低い保有率であることが示された。クラミジアについては、80 検体中 13 検体 (16.2%) が保有していることが分かったが、非病原性のクラミジアを含めて検出している可能性があるため、人への危険性を明らかにするために塩基配列決定などのさらなる解析が必要である。

6. 今後に向けての課題

- ① 検体数を増やす。当初予定していた 400 検体を目指し糞便を収集する。
- ② PCR で陽性であった検体の遺伝学的解析および病原体の分離を進める。
- ③ ねぐらの遷移の様子を解明する。複数のねぐらに分かれる時期もあれば、全てのワカケホンセイインコが一箇所に集合しているように見受け

る時期もある。集団の形成と保有する微生物の関連が解明できれば、病原体のコントロールに役立てることができる。

7. 参考文献

日本産婦人科医会（柳原格）, 2017, <http://www.jaog.or.jp/news/oumu0428/>, 「オウム病について」

Amery-Gale J, Legione AR, Marends MS, Owens J, Eden PA, Konsak-Ilievski BM, Whiteley PL, Dobson EC, Browne EA, Slocombe RF, Devlin JM. (2020) Surveillance for *Chlamydia* spp. With multilocus sequence typing analysis in wild and captive birds in Victoria, Australia. *J Wildl Dis.* 56: 16-26.

Horie M, Ueda K, Ueda A, Honda T, Tomonaga K. (2012) Detection of Avian bornavirus 5 RNA in *Eclectus roratus* with feather picking disorder. *Microbiol Immunol* 56 (5): 346-349.

Hoffmann B, Tappe D, Hoper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, Niederstaber O, Müller T, Jenckel M, van der Grinten E, Lutter C, Abendroth B, Teifke JP, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Ulrich RG, Beer M. (2015) A Variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med.* 373: 154-162.

Lienard J, Croxatto A, Aeby S, Jatou K, Posfay-Barbe K, Gervaix A, Greub G. (2011) Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 2637-2642.

Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy HH, Weidmann M, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruetzger A, Bavoil PM, Hufert FT, Rosselló-Móra R, Marz M. (2014) Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 37(2): 79-88.

Sassa Y, Bui VN, Saitoh K, Watanabe Y, Koyama S, Endoh D, Horie M, Tomonaga K, Furuya T, Nagai M, Omatsu T, Imai K, Ogawa H, Mizutani T. (2015) Parrot bornavirus-2 and -4 RNA detected in wild bird samples in Japan are phylogenetically adjacent to those found in pet birds in Japan. *Virus Genes*, 51: 234-243.

Sassa Y, Horie M, Fujino K, Nishiura N, Okazaki S, Furuya T, Nagai M, Omatsu T, Kojima A, Mizugami M, Ueda K, Iki H, Ebisawa K, Tomonaga K, Mizutani T. (2013) Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan. *Virus Genes*, 47: 173-177.

Todd D, Wilkinson DS, Jewhurst HL, Wylie M, Gordon AW, Adair BM. (2009) A seroprevalence investigation of chicken astrovirus infections. *Avian Pathology* 38: 21-29.

Vorimore F, Hsia RC, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A, Sachse K, Bavoil P, Myers G, Laroucau K. (2013) Isolation of a New Chlamydia species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): Chlamydia ibidis. *PLoS One*. 8(9): e74823.

多摩川の流域周辺に生息するワカケホンセイインコ (*Psittacula krameri manillensis*) など、野生化した飼い鳥から人に感染する病原体の調査

(研究助成・学術研究 VOL. 50—NO. 356)

著 者 佐々 悠木子

東京農工大学農学研究院 講師 (採択当時)

発行日 2021年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>