渡りと鉛汚染がユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)の免疫機能及びA型インフルエンザの感染に及ぼす影響に関する研究

(Study on the effects of migration and lead pollution on host immunity, and infection of influenza A virus in Black-Headed Gull [*Chroicocephalus ridibundus*])

牛根奈々

渡りと鉛汚染がユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)の免疫機能及びA型インフルエンザの感染に及ぼす影響に関する研究

(Study on the effects of migration and lead pollution on host immunity, and infection of influenza A virus in Black-Headed Gull [*Chroicocephalus ridibundus*])

牛根奈々

日本獣医生命科学大学獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成30年入学

（指導教授：羽山 伸一）

令和4年3月

目次

緒言 1

本論文で使用される用語の説明 14

第1章 20

Body condition と鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響、および渡りの時期との関係を解明する 20

序論 20

本章に共通する材料と方法 26

第1節　ユリカモメの Body condition index を設定する 43

第2節 ユリカモメの鉛の地域的・時期的な汚染状況を把握する 48

第3節 ユリカモメの鉛汚染源を推定する 54

第4節　鉛汚染が免疫項目に及ぼす影響とその濃度を把握する 66

第4節-1. 鉛汚染が免疫項目に及ぼす影響を確認する 67

第4節-2. 免疫機能に影響を及ぼす血中鉛濃度を確認する 70

第5節　Body condition が免疫機能に及ぼす影響を把握する 76

第6節　Body condition と鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響と時期の関係を評価する 79

考察及び結論 85

考えられるバイアス 86

第2章 89

Body condition と鉛汚染は A 型インフルエンザの感染にどのような影響を与えているのか 89

序論 89

本章に共通する材料と方法.....91

第1節：ELISA キットを用いたユリカモメ血漿の抗体検査プロトコルの設定 93

第2節：ユリカモメはいつ A 型インフルエンザに感染するのか.....97

第3節：抗体量及び感染歴に、鉛汚染や Body condition が関係しているのか.....101

第4節：感染歴は Body condition と鉛汚染濃度の構成によって変化するのか.....105

第5節：春の渡り時期に Body condition と鉛汚染は A 型インフルエンザ感染にどのように影響しているのか.....110

考察及び結論.....115

考えられるバイアス.....119

総括及び結言.....124

謝辞.....133

緒言

1.　学部研究の概要と渡り鳥の渡りと体重、脂肪、筋肉の関係

鳥類は、適切な生息環境や餌資源を求めて長距離の移動を行う(Kirby *et al*., 2008)。この移動は渡りと呼ばれ、現在、地球上に生息する鳥類のおよそ20%が渡りの生態をもつ(Somveille, 2016)。渡りは莫大なエネルギーを消費する生態であるため、体内のエネルギー貯蔵を反映する体重、脂肪重量、筋肉重量を著しく変化させる(Gittleman and Thompson, 1988)。例として、カイツブリ目(Order, Podicipedidae)のハジロカイツブリ (*Podiceps nigricollis*)では、渡りを終えた時期は渡りを前の時期と比較して、体重がおよそ30%減少する(Jehl Jr, 1997)。ニワムシクイ(*Sylvia borin*)の渡り後の時期は渡り前の時期と比較して骨格筋重量が22%減少する(Bauchinger and Biebach, 2001)。

学部研究では、渡りと体重、脂肪重量、筋肉重量の関係性が未知であったチドリ目カモメ科のユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)を対象に、その関係性の解明を試みた。

冬季に日本に飛来するユリカモメの越冬期間を、渡りを考慮して、秋の渡り時期、越冬期、春の渡り時期に分類した。時期間で体重、スコア評価した筋肉(筋肉量)と脂肪(脂肪量)の差を分析した結果、体重と筋肉量は越冬期間中、春の渡り時期に有意に減少した(図1)。この結果から、国内で越冬するユリカモメは春の渡りにおいて、体内のエネルギー貯蔵が減少する渡りとエネルギー変化の関係が示唆された。

2.　渡り鳥の渡り戦略とユリカモメの渡り時期の意味合い

渡りで消費するエネルギーを最小限にするために、渡り鳥は渡りの飛翔距離、飛翔形態、時に飛翔方法を多様化させ、消費するエネルギーが最小限になるように渡りを行う(Zhao *et al*., 2017)。このエネルギーを最小限にする種ごとの渡り様式を、渡り戦略という(La Sorte *et al*., 2016)。渡り戦略は体サイズや移動距離に併せて、エネルギーの蓄積器官にも差異が生まれ、長距離を移動する種は、脂肪エネルギーを蓄積する傾向にある。たとえば、長距離を休みなく渡る小型鳥類のハゴロモムシクイ(*Setophaga ruticilla*)やコオバシギ(*Calidris*

canutus)は、渡りのエネルギーを皮下脂肪として蓄積する(Piersma *et al*., 1996; Smith and Moore, 2003)。オナガガモ(*Anas acuta*)やハシビロガモ(*Anas clypeata*)のような休みを取らない、あるいは1か所か2か所の中継地を経由して長距離を移動する中型鳥類(Gaidet *et al*., 2008)も、エネルギーの蓄積器官は脂肪に依存しており、渡り後は体重と脂肪が減少する(Fox and King, 2011; Guillemain *et al*., 2004)。一方で、短距離を渡る鳥種では、渡りに使用するエネルギーを脂肪ではなく筋肉や内部臓器に蓄積する(Lundgren and Kiessling, 1985)。これは、エネルギー蓄積に優れる脂肪よりも、運動機能として併用できる筋肉量を増大させることで、飛翔力向上とエネルギーの蓄積の両者をまかなう(Jehl Jr, 1997; Loria and Moore, 1990)。実際に Jehl Jr (1997)は、野外のハジロカイツブリの渡りに伴う体重変化には、栄養を蓄積することのできる肝臓などの臓器サイズと有意な関係があることを報告している。

ユリカモメの渡り戦略は、これまでの国内の標識調査によって他の渡り鳥よりも短い距離を、頻回の休息をはさみながら渡りを行うことが示唆されている(Ornithology, 2002)。この行動的特徴と、渡りを複数羽で渡りを行うために(Petersen and Exo, 1999)、秋の渡り時期は個体群としての越冬地が定まるまで、春の渡り時期は他個体と共に渡りを開始するまで、国内の越冬地とその周辺を頻繁に移動する行動が確認される(Ushine 未発表)。この特徴から、学部研究で定義した秋と春の渡り時期は繁殖地からの移動後、越冬地からの旅立ち前と背景は異なるが、共通して越冬地周囲を移動する行動がみられる。このため、国内に越冬するユリカモメの渡り戦略としては、短距離に分けて移動するために春の渡り時期に体重、筋肉、脂肪が著しく増加する必要はなく、反対に春の渡り時期に周辺地域への移動を行うことで、これらが減少すると考えられる。

3. 体重、脂肪、筋肉が免疫機能に及ぼす影響

渡り戦略により、鳥は種ごとに最小限のエネルギー消費で渡りを完了させるものの、渡りが生体にとって最大のエネルギー消費イベントの1つであることには変わりない(Pinowski and Kendeigh, 2012)。エネルギーの消費によって体重、脂肪重量、筋肉重量は減少し、その結果生体には様々な生理反応へ抑制の影響が表れる(Luna *et al*., 2020)。中でも、

免疫機能の抑制は鳥類や哺乳類で報告される典型的なエネルギー欠乏の結果である。例えば、ヒトでは幼児のたんぱく質の失調がリンパ球数に抑制の影響を及ぼす(Schaible and Kaufmann, 2007)。鳥類では、既存の公開データを用いてファブリキウス嚢の重量と体重を分析した Møller and Erritzøe (1998)が、体重の増加とファブリキウス嚢の重量の増加に有意な相関があることを報告した。ツバメ(*Hirundo rustica*)では、高体重の個体は低体重の個体に比較して細胞性免疫が高く、血液内原虫の出現率も有意に低くなる(Møller *et al*., 2004)。キタハタネズミ(*Microtus agrestis*)では栄養状態の指標に赤血球を、免疫機能の指標にリンパ球・好中球・単球の細胞数を用いて、その関係が調査され、赤血球数とリンパ球に正の相関を示すことが報告されている(Beldomenico *et al*., 2008)。ほ乳類では、骨格筋は自然免疫のサイトカインやケモカインの産生誘導や維持に機能する myokines を産生する(De Rossi *et al*., 2000; Kuchipudi and Chang, 2015; Tournadre and Miossec, 2007)。鳥類では骨格筋の myokine 産生の報告は未だないものの、同様の機序が存在する場合には、筋肉重量の減少によって特に自然免疫の抑制が引き起こされる可能性がある。

3. 渡りが免疫機能に及ぼす影響

鳥類では、渡りによって著しくエネルギーが消費されると、いくつかの生理機能は渡りとの間で、エネルギーのトレードオフが生じる(Schmidt-Wellenburg *et al*., 2008; Zera and Harshman, 2001)。その1つが免疫機能である。Van Dijk and Matson (2016)はいくつかの鳥種のエネルギー消費と免疫機能でモデル解析を行い、エネルギー消費が大きい身体的活動ほど、免疫機能とのトレードオフによって免疫機能に充てるエネルギーが不足し、病原体への感受性が亢進することを示した。スズメ目(Order, Passeriformes)の Swainson’s Thrush (*Catharus ustulatus*)では、春の渡り、秋の渡り、繁殖期の3時期に捕獲が行われ、白血球数とヘテロフィルとリンパ球の存在比(H/L 比)を計測した結果、春の渡りは免疫機能の抑制が起こることを示した(秋の渡り時期と異なる変化を示した理由については解明には至っていない)(Owen and Moore, 2006)。上述した知見は、それぞれ、トレードオフの報告と、渡り時期の免疫機能の抑制に関する報告であり、渡りによるエネルギーの減少によって免疫機能

が抑制されるという一連の仮説を研究した報告はみられない。

4.　渡り鳥と感染症の関係

既存研究から、・鳥類は渡りによって莫大なエネルギーを消費する、・エネルギーの不足は生理機能に抑制の影響を及ぼす、という2点が考察されている。これらの知見をあわせると、渡りと免疫機能の関係性は、以下のような仮説が立てられる。

渡りが Body condition を低下させる

→　免疫機能に抑制の影響が生じる

→　渡り鳥は渡りの時期に病原体の感染率が高まる

この仮説を全て網羅して研究した知見はこれまでに存在しない。そこで、この仮説に関連する知見がどこまで存在するのか、どの程度明らかになっているのかを明確にするため、現在鳥類で最も研究が行われている人獣共通感染症の A 型インフルエンザ(Naguib *et al*., 2019)を仮説の最下段に充て、A 型インフルエンザに関連する渡りと免疫機能の関係性について、レビューを行った。

レビューを通して、渡りと免疫機能の関係性を整理する上で、考慮すべき A 型インフルエンザの特徴が明らかになった。A 型インフルエンザは渡りを行う水鳥というグループを中心に感染・死亡事例が報告され(図2)、特に冬季に、野鳥や家禽の報告が増加する(Envirionment, 2015)。A 型インフルエンザの発生は、カモ目(Order, Anseriformes)とチドリ目カモメ科(Family, Laridae)で多く(Gambaryan *et al*., 2018)、オーストラリアでは感染のダイナミックを把握する目的で主要な A 型インフルエンザウイルスのベクターのカモ目とチドリ目カモメ科を対象にサーベイランスが実施されている状況であった(Curran *et al*., 2013)。

A 型インフルエンザウイルスの感染に関して、カモ目の中でも潜水して採餌するカモ類(潜水カモ類)が、水面で採餌するカモ類(水面採餌カモ類)に比較して感染率が高いという報告がある(Keawcharoen *et al*., 2008)。実際に、潜水カモ類のアメリカオシ(*Aix sponsa*)、アメ

リカホシハジロ(*Aythya americana*)、そして水面採餌カモ類のアメリカコガモ(*Anas crecca*)、オナガガモ、マガモ(*Anas platyrhynchos*)に同一亜型の A 型インフルエンザウイルスを感染させたところ、全種が感染したが、中でもアメリカオシは発症・死亡を呈した(Brown *et al*., 2006)。水面採餌カモ類のマガモは病原性が高い A 型インフルエンザウイルスに対しても不顕性感染を示すことが報告されており、この理由としてウイルスが感染した際には、速やかに自然免疫の抗ウイルス分子 RIG-1が誘導されることが調査されている(Evseev and Magor, 2019)。このように、カモ目については同じ分類群に属する中でも、A 型インフルエンザに対する感受性が異なり、その機序が免疫の観点から考察されている。

一方で、カモメ科はヨーロッパやオーストラリアで A 型インフルエンザサーベイランスのターゲット種として、調査対象に位置付けられている(Haynes *et al*., 2009; Hesterberg *et al*., 2009; Stallknecht, 2003)。2019年度に EU 諸国で行われたサーベイランス調査において、潜水カモ類のキンクロハジロ(*Aythya fuligula*)はカモ類の中で最大の陽性率22%を示したのに対し、カモメ科のオオカモメ(*Larus marinus*)は46%の陽性率を示し、カモ目と等しく A 型インフルエンザの感染が発生しやすいことが考察されている(Brouwer *et al*., 2019)。しかし、感染に関係する免疫機能の機序や、カモメ科の中での感受性の差といった知見は存在しなかった。

渡り戦略について、水面採餌及び潜水カモ類は、発信機や標識によって種ごとの渡り戦略も調査されており、渡りには休息をとらないか、1ないし2か所の中継地を経て長距離を移動すること(Warnock, 2010; Yamaguchi *et al*., 2008)、さらに渡りに関連した Body condition の変動の知見では、マガモは渡りを終えた後に体重と脂肪重量が低下して A 型インフルエンザの感染率が高まることも明らかになっている(Arsnoe *et al*., 2011; Kleijn *et al*., 2010)。一方、カモメ科の渡り戦略は、休息をとりながら短い距離を移動することが報告されているが(Baert *et al*., 2018; Shamoun‐Baranes *et al*., 2017)、この渡り戦略によるエネルギーの変化はユリカモメに関する2報に留まり(Cantos *et al*. 1994; Ushine *et al*. 2017)、それに伴う A 型インフルエンザの感染への影響に関する知見は存在しなかった。

渡りによるエネルギーの変化に関して、長距離をほぼ休みなく移動する潜水カモ類はカ

モメ科に比較してエネルギーのトレードオフが発生する可能性がある。一方で、渡り戦略として、カモ目は体重が増加した状態で渡り行動に入るに対し(Fox and King, 2011; Guillemain *et al.*, 2004)、カモメ科のユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)では、国内で越冬する個体群については渡り前の時期に体重と筋肉量が減少する(Ushine *et al.*, 2017)。これを考慮すると、カモメ科は潜水カモ類と比較して渡り開始時期の免疫機能とエネルギーのトレードオフが生じやすいと考えられる(図3)。カモメ科と潜水カモ類は同程度の A 型インフルエンザの感染率を有するものの(Brown *et al*., 2006)、両者の渡り戦略は異なっており、これらの差異が、免疫機能や A 型インフルエンザ感染にどのように影響しているのかは、解明されていない。また、これらのグループは A 型インフルエンザの拡散に重要な鳥類群であると評価されているにもかかわらず、カモメ科の A 型インフルエンザウイルス感染に関する知見はカモ類に比較して乏しいことがレビューから明らかになった(Envirionment, 2015; Olsen *et al*., 2006; Ramis *et al*., 2014; Tønnessen *et al*., 2013)(表1)。

5. 環境汚染物質の鉛が免疫機能に及ぼす影響

カモメ科と潜水カモ類の A 型インフルエンザ感染をレビューする上で、免疫に影響を及ぼす環境汚染物質の影響も考慮する必要がある。鳥類はこれまでに様々な環境汚染物質からの影響が報告されている(Burger and Gochfeld, 2004; Fisher *et al*., 2006; Fry, 1995; Getz *et al*., 1977; Scheuhammer, 1987, 1991; Wolfe *et al*., 1998)。中でも、重金属の鉛(Pb)は鳥類で最も一般的な環境汚染物質の1つで、多様な生物に様々な生体影響を及ぼしてきた(Cromie *et al*., 2014; Masindi and Muedi, 2018)。鉛は主に猟銃の弾、釣り錘、飛行機のガソリン、塗料に使用された後、環境中に残存することで環境汚染物質になる(Scheuhammer and Norris, 1996; Thomas, 1997, 2010)。

環境省が公表する化学物質に関するリスクコミュニケーションの中では、摂取量と生体影響の関係として、化学物質を取り込んだ時点から臨床症状を呈するまでの摂取量を影響量、臨床症状を呈してから致死の可能性がある摂取量を中毒量、これを上回る摂取量を死亡量と定義している(環境省. 環境リスクとその評価. URL:

http://www.env.go.jp/chemi/communication/taiwa/text/3s.pdf, 2021年9月8日閲覧)。死亡量の汚染では目立った症状を呈さず、速やかに死亡する場合が多い(Pain *et al*., 2019)。中毒量の汚染では神経症状、慢性中毒では免疫機能の抑制や繁殖成功率の低下をはじめとする非特異的な症状を引き起こす特徴がある(Kendall *et al*., 1996; Williams *et al*., 2017)。影響量の汚染では、行動異常(Pain *et al*., 2019)の他、見かけ上異常は呈さずとも液性免疫応答の減弱(Snoeijs *et al*., 2004)とアレルギーや炎症反応に関係するサイトカインの上昇と IgE の産生亢進(Heo *et al*., 1997; Miller *et al*., 1998; Tepper *et al*., 1990; Wood *et al*., 2004)が生ずる。そのため、野生動物で影響量の鉛汚染が発生している場合、積極的な調査手法を講じなければ、その影響を指摘することは困難であり(Johnson *et al*., 2007)、世代を超えた長期的な種の存続に致命的な影響をもたらす可能性がある。

渡り鳥の鉛汚染は種や渡り戦略によって、影響の受け方が異なる。1960年代に大規模な鉛と亜鉛の採掘場であったオクラホマ州の Tar Creek Superfund Site で留鳥と渡り鳥のスズメ目鳥類を対象に捕獲・鉛濃度の調査が行われ、渡り鳥の方が留鳥よりも有意に鉛濃度が低いことが示された(LePage, 2020)。この報告の中で、渡り鳥の渡り行動は、重金属汚染の曝露機会を減少させる効果を持ち、Migratory escape(Poulin *et al*., 2012)の役割を果たしていることが考察されている。一方でチドリ目(Order, Charadriiformes)は、渡りを行うものの、繁殖地や越冬地で摂食する餌動物の嗜好性によって、鉛汚染が発生しやすい(Pandiyan *et al*., 2020)。このため、渡りは環境汚染物質の曝露を回避する場合と積極的に汚染物質を取り込む場合のような、種によって環境汚染物質の曝露に対して反対の寄与が考えられる。そのため、渡りと免疫機能の関係を環境汚染物質を含めて検討する際には、調査対象種を異なる鳥類群から選定せず1種に限定するか、あるいは環境汚染物質に対する渡りの役割が明確な複数の鳥類群を対象にする必要がある。

国外では環境汚染や野生生物への影響を減少させる目的で、鉛製の銃弾の使用を規制する地域も存在する(Mateo and Kanstrup, 2019; Thomas and Guitart, 2010; Thomas and Guitart, 2013)。国内では1998年から1999年の間に死亡したオジロワシ属(Genus, Haliaeetus)の死因の79%が鉛中毒であったことを受け(Saito, 2009)、北海道では2000年から鉛製ライフル弾の使

用が規制されている(Ishii *et al*., 2017)。しかし、北海道以南では現在でも釣り錘を含めて鉛製品の使用が規制されていない。本州の野生ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)とクマネズミ(*Rattus rattus*)の体内鉛濃度を調査した報告では、愛知県や沖縄県をはじめとする西日本の地域で高いことが示されている(Nakata *et al*., 2017)。

6. 調査対象種のユリカモメについて

本研究では、以下の仮説を検証する。

渡りが Body condition を低下させる・鉛汚染は免疫機能に抑制の影響を及ぼす

→ 渡り鳥は渡りの時期に病原体の感染率が上がる

検証する上で、渡り生態と A 型インフルエンザ感染との関係が明らかでなく、知見に乏しいカモメ科鳥類として、本研究はユリカモメ1種を対象に調査を行う。

ユリカモメは、体長約38cm の小型カモメ類に属する渡り鳥である(Harrison, 1985)。ヨーロッパ北東部からロシア東部で繁殖し、冬期にはアフリカ北部やヨーロッパ南部、ロシア南部やアジア、アメリカ東海岸で越冬する(Baker, 1993)。渡りを行う地域は、近似する経度に位置する地域の中で(Del Hoyo and Elliott, 1996)、巣立った地域と第1回冬羽(以下、1w)に際に越冬した地域の間で行われる(Sugawa, 1984)。国内では北海道で旅鳥(Fujimaki, 2010)、本州以南では冬鳥で(Takano *et al*., 2007)、京都と東京湾地域では10月下旬から4月にかけて越冬個体が観察される(Sugawa, 2005; Ushine *et al*., 2017)。越冬期間には、市街地で行われる給餌に集まり(Hirata and Hasegawa, 2012)、夜間には市街地や内湾でねぐらを形成する(Hirata, 2007)。

鳥類の齢判定には、繁殖行動に基づく判定と羽衣に基づく判定があり、ユリカモメの繁殖行動に基づく成熟は繁殖行動の観察例から生後2年以降(Stefan *et al*., 2013)、羽衣に基づく成熟は孵化後約2年と言われている。羽衣による齢判定は、成鳥羽となる2歳まで用いることができる。具体的には、巣立ち雛は8-10月に幼羽への換羽、繁殖地から越冬地に移動する秋の渡り時期(以下、飛来期)に1w への換羽、越冬地から繁殖地に移動する春の渡り時期(以下、飛去期)に第1回夏羽への換羽、翌年の飛来期に第2回冬羽(以下、2w)への換羽、そ

して飛去期に第2回夏羽への換羽を行う。第2回夏羽は成鳥の羽衣(以下、成羽)とほぼ同様となるため、以後の年齢の判別は困難となる(Allaine and Lebreton, 1990; Baker, 1993; Coulson, 2016; Sellers, 2009)。ユリカモメの繁殖行動は基本的には一夫一妻で、多くは毎年つがい相手を変更する(Cramp and Brooks, 1992)。抱卵は主に雌が行い、育雛期の給餌は雌雄で行い、繁殖地では複数羽が近接して営巣するコロニーが形成される(Moynihan, 1955)。コロニーの位置は、農地、貯水池や市街地といったユリカモメに餌資源が豊富に存在する地域を選択する(Fouchier *et al.*, 2005)。雌雄は同色であり、外貌からの判別は困難であり、判別方法には外部計測値を用いた判別関数(Allaine and Lebreton, 1990)や、血液や糞を用いた DNA 解析(Fridolfsson and Ellegren, 1999)が行われている。

国内に飛来するユリカモメは、数十年に及ぶ標識調査データの集積によって、いくつかの渡りルートが明らかになっている。その中でも、主に東京湾で越冬する個体群はロシアのカムチャツカ地方から北海道に移動し、太平洋側地域を南下して飛来する。近畿地方で越冬する個体群はロシアの同地域から中国を経て、日本海側から国内に飛来すると報告されている(Ornithology, 2002)。

7. ユリカモメを調査する意義

ユリカモメは野鳥の中でも特に人間社会を生息環境に利用する傾向があるため、人間社会からの影響を被りやすい鳥種であると考えられる。ヨーロッパ地域では、人間の活動によって排出される環境汚染物質の鉛による生態影響が複数報告されている(Kitowski *et al.*, 2017b; Migula *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2003; ORŁOWSKI *et al.*, 2007)。これらの生態的特徴とそれによって被る生態影響により、ヨーロッパ地域では1989年と2014年を比較して、およそ45%の個体数減少が確認されている(Eising *et al.*, 2001)。International Union for Conservation of Nature(以下、IUCN)が公表するレッドリストでは、Least Concern(LC)に指定され(IUCN, 2012)、今後の A 型インフルエンザの流行(Melville and Shortridge, 2006)、油汚染(Gorski *et al.*, 1977)、化学物質汚染の影響や卵の乱獲(Fudge, 2000)による大量死が懸念されている。

チェコ共和国でも同様にユリカモメの急速な個体数減少が確認されている(Poprach *et al.*,

2016)。この原因には、家畜の放牧やレクリエーションによる生息環境の減少といった人間による直接的な影響だけではなく、重油(Tasker *et al*., 1986)、水銀(Pickard, 2010)、ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)やポリ塩化ビフェニル(PCB)による産卵数の減少(Kloubec and Švecová, 1990)、ブロマジオロン(Poprach *et al*., 2016)や有機リン系殺虫剤(Furness and Camphuysen, 1997)による大量死、温暖化で渡り時期の遅滞し、繁殖地の餌資源量が減少(Källender and Lebreton, 1997)、コロニー内個体数の減少により外敵からの攻撃が増加する等、人間による間接的な影響も報告されている(van Dijk *et al*., 2009)。

また、ユリカモメは人間社会の中で生じた病原体を保有し、運び屋を担う可能性が報告されている。チェコ共和国の繁殖コロニー内のユリカモメで検出された257亜型の大腸菌 *Escherichia coli* の内、抗生物質耐性大腸菌は75亜型に及ぶことが明らかになっている(Dolejska *et al*., 2007)。スウェーデンで繁殖する個体群からも extended-spectrum *β*-lactamase(基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ)を有する大腸菌が検出されている(Bonnedahl *et al*., 2010)。

ユリカモメはヨーロッパ地域、中国・モンゴルのアジア地域、ロシア地域といった世界各地で鳥インフルエンザの発生事例が報告される鳥種である。A 型インフルエンザは、国内外で家禽産業に甚大な影響を及ぼす他(Nicita, 2008)、濃厚接触した人間の死亡例(Dinh *et al*., 2006)や保全対象の希少鳥類への感染事例(Brooks-Moizer *et al*., 2009; Dinh *et al*., 2006)が報告される感染症であり、今後も国内外で流行が懸念されている(Poovorawan *et al*., 2013)。

ユリカモメは世界各地で高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)の感染が報告されている。以下にこれまで報告されている感染事例の有る亜型と報告された地域を記す：ロシア H5N1 (Sharshov *et al*., 2010)、日本　H5N6 (Environment., 2017)、香港　H5N1 (Ellis *et al*., 2004)、クロアチア　H5N1及び H5N2 (Jurinović *et al*., 2014)、オランダ　H5N1及び H13亜型 (Verhagen *et al*., 2014)、スウェーデン H5N1及び H13と H16亜型(Fouchier *et al*., 2005)。ユリカモメの低病原性鳥インフルエンザ(LPAI)感染事例は、ヨーロッパを中心に複数の亜型で報告されているが、中でも H16亜型は近年発見された亜型で、これまでにユリカモメのみで検出されている(Verhagen *et al*., 2014)。この事例から、ユリカモメは A 型インフルエンザウイルスの

運び屋の役割だけでなく、体内で A 型インフルエンザウイルスの変異が生じる野鳥として注目されている (Fouchier *et al.*, 2005)。ユリカモメは人間社会を生息域とするため、人間社会からの影響を被りやすく、同時に人間社会へ病原体の拡散といった影響を、他の鳥種よりも及ぼしやすい可能性が考えられる。

8. 目的と研究項目

本調査の目的は、以下の仮説を検証することである。

渡り時期に鉛汚染や Body condition によってユリカモメの免疫機能は影響をうける

→ ユリカモメの A 型インフルエンザ感染は渡り時期に増加し、それは鉛汚染と Body condition が関与する

本研究は、本州の東京湾と三河湾に越冬する2つのユリカモメ個体群を対象として、渡りによる Body condition の変動と鉛汚染が、免疫機能に及ぼす影響を把握し、その上で病原体の感染率がこれらの影響をうけるのか、調査した。

上記の仮説を検証する上で、本稿は2つの章に分類した(図4)。第1章では Body condition と鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響、および渡りの時期との関係を解明するというテーマで、6つの節で構成した。第1節はユリカモメの Body condition を定義するために体重と、筋肉量と脂肪量のスコアリングを使用して、Body condition index を作成した。第2節は、東京湾と三河湾で越冬するユリカモメ個体群の地域的・時期的な鉛汚染の傾向を把握することを目的として調査を行った。第3節ではユリカモメの鉛汚染源について、窒素と炭素の安定同位体比を使用して繁殖期の採餌内容から越冬期の採餌内容を推定した。第4節では、ユリカモメの生体影響として、鉛汚染による免疫影響と、その影響が起きる汚染濃度を評価した。第5節では第1節で設定した Body condition index を使用して、Body condition が免疫機能に及ぼす影響を把握した。そして第6節では Body condition や鉛汚染の免疫影響は、渡りと関係するのか、調査した。

第2章は A 型インフルエンザを対象にして、ユリカモメの A 型インフルエンザ感染が鉛汚染と Body condition index にどのような影響を受けるのか、明らかにするというテーマで、

5つの節で構成した。第1節は、市販のA型インフルエンザウイルス抗体のELISAキットでユリカモメのA型インフルエンザウイルス抗体を測定できるよう、プロトコルの改変を行った。第2節は、ユリカモメのA型インフルエンザウイルス抗体を計測し、ユリカモメがいつA型インフルエンザに感染しているのか、基礎知見を収集した。第3節ではELISAの判定結果を感染歴、ELISAの測定原理である吸光度を抗体量と定義して、感染歴のある群とない群の間で、Body conditionや血中鉛濃度に有意な差が生じるのか、そして感染歴のある個体を対象に、抗体量がBody conditionや血中鉛濃度と関係するのか、確認した。第4節はBody conditionと血中鉛濃度を高い群と低い群に分類し、これらを組み合わせた4つの群の間で感染歴がある個体の割合に差があるか確認した。最後に、第5節は時期ごとに、抗体量と感染歴にBody conditionや血中鉛濃度がどのように影響を及ぼすのか、解析を行った。本研究のような渡り鳥の生態から免疫機能や病原体の感染状況を追及した知見はこれまでにない。渡り鳥のユリカモメの鉛汚染や渡りとA型インフルエンザ感染の関係から得た知見は、One Healthの内、保全生物学の分野として社会へ貢献することが期待される。

本稿は以下の2章で構成される。

【第1章】Body conditionと鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響、および渡りの時期との関係を解明する

第1節：ユリカモメのBody condition indexを設定する

第2節：ユリカモメの鉛の地域的・時期的な汚染状況を把握する

第3章：ユリカモメの鉛汚染源を推定する

第4節：鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響を把握する

第5節：Body conditionが免疫機能に及ぼす影響を把握する

第6節：Body conditionや鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響と時期の関係を評価する

【第2章】Body conditionと鉛汚染はA型インフルエンザの感染にどのような影響を与えているのか

第1節：ELISA キットを用いたユリカモメ血漿の抗体検査プロトコルの設定

第2節：ユリカモメはいつ A 型インフルエンザに感染するのか

第3節：抗体の量及び感染歴に、鉛汚染や Body condition が関係しているのか

第4節：感染歴は Body condition と鉛汚染濃度の構成によって変化するのか

第5節：春の渡り時期に Body condition と鉛汚染は A 型インフルエンザ感染にどのように影響しているのか

本論文で使用される用語の説明

・**鉛曝露**：生体や細胞に意図的に鉛が取り込まれること

・**鉛汚染**：生体や細胞に非意図的に鉛が取り込まれること

・**Body condition**：体重、筋肉重量、脂肪重量を合わせた、体調の指標のこと

・**Body condition index**：第1章第1節で体重、筋肉及び脂肪のスコアリングを主成分分析して得た指標のこと

表1. カモ目とカモメ科の渡りと A 型インフルエンザのレビュー結果

分類	カモ目	カモメ科
渡り戦略	一度に長距離を移動(1)	頻繁に休んで移動(2,3)
渡りと Body condition の変化	渡り前に脂肪が増加、渡り後は体重や脂肪が減少(4,5)	渡り前に体重と脂肪が増加(スペインで越冬するユリカモメ)(6) 渡り前に体重と筋肉が減少(11)
渡りによる免疫影響	該当なし	該当なし
A 型インフルエンザとの関係	マガモやオナガガモ：不顕性感染で長距離ベクターとなり、潜水カモ類は水面採餌カモ類に比較して感染率が高い(7)	不明
A 型インフルエンザの発生状況	・2019年度の EU 諸国のアクティブサーベイランス及びパッシブサーベイランスではカモ目のキンクロハジロが22%の陽性率、カモメ科のオオカモメが46%だった(8) ・主要なレゼルボアはカモ目とチドリ目(9) ・感染のダイナミクスを把握する目的でカモ目、カモメ科、シギ科(Famili, Scolopacidae)がサーベイランス対象(10)	

1. (Warnock, 2010)、2,3. (Baert *et al*., 2018; Shamoun‐Baranes *et al*., 2017)、4,5. (Fox and King, 2011; Guillemain *et al*., 2004)、6. (Cantos *et al*., 1994)、7. (Keawcharoen *et al*., 2008)、8. (Brouwer *et al*., 2019)、9. (Höfle *et al*., 2012)、10. (Curran *et al*., 2013)、11. (Ushine *et al*. 2017)

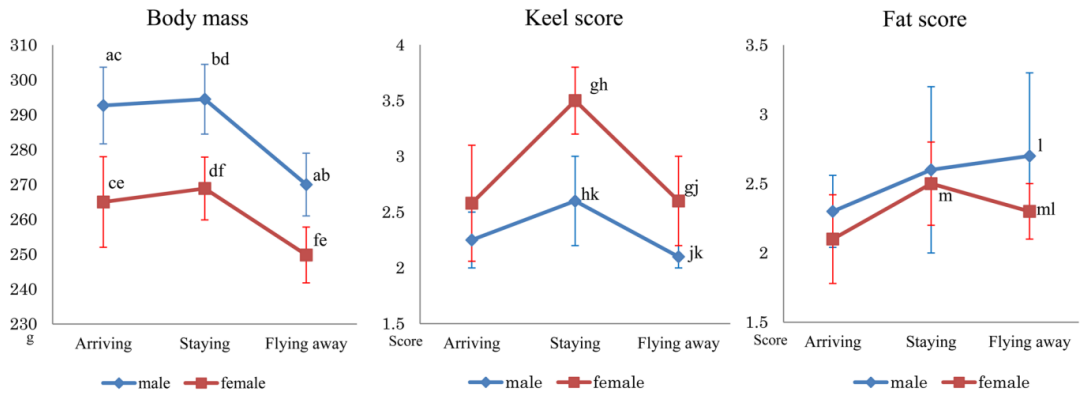


図1. 学部研究で得られた越冬期間中のユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)の体重、筋肉量、脂肪量の推移

秋の渡り時期を Arriving、越冬期を Staying、春の渡り時期を Flying away とし、Body mass を体重、Keel score を筋肉量、Fat score を脂肪量と示している。同一アルファベット間で有意差有を示す。(Ushine *et al*. 2017より引用)

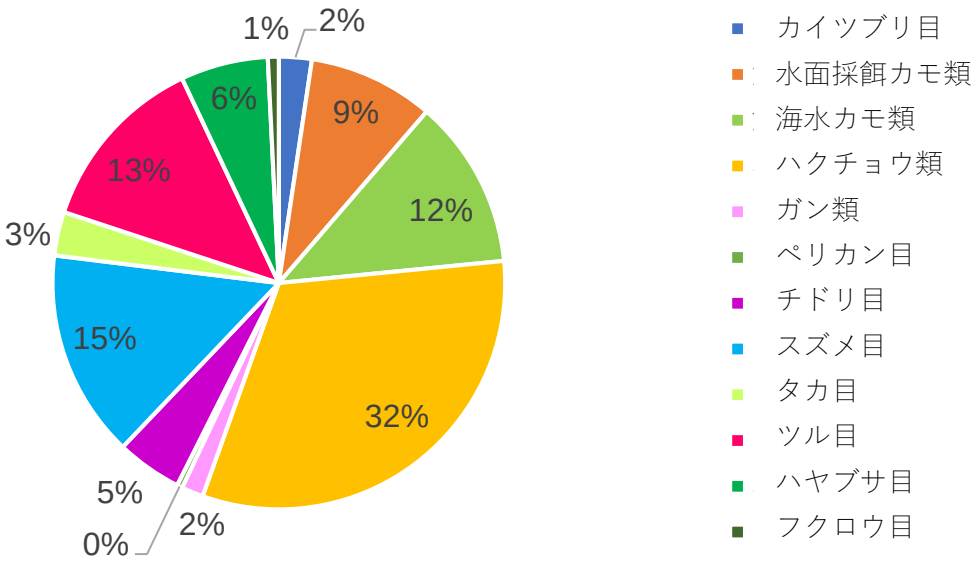


図2. 2007年から2018年における国内の野鳥のA型インフルエンザ発生事例257件における分類群の割合

環境省 Web サイトから改変(URL: http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/bird_flu/, 2021年9月20日閲覧)。 カモ目は水面採餌カモ類、潜水カモ類、ハクチョウ類、ガン類に細分している

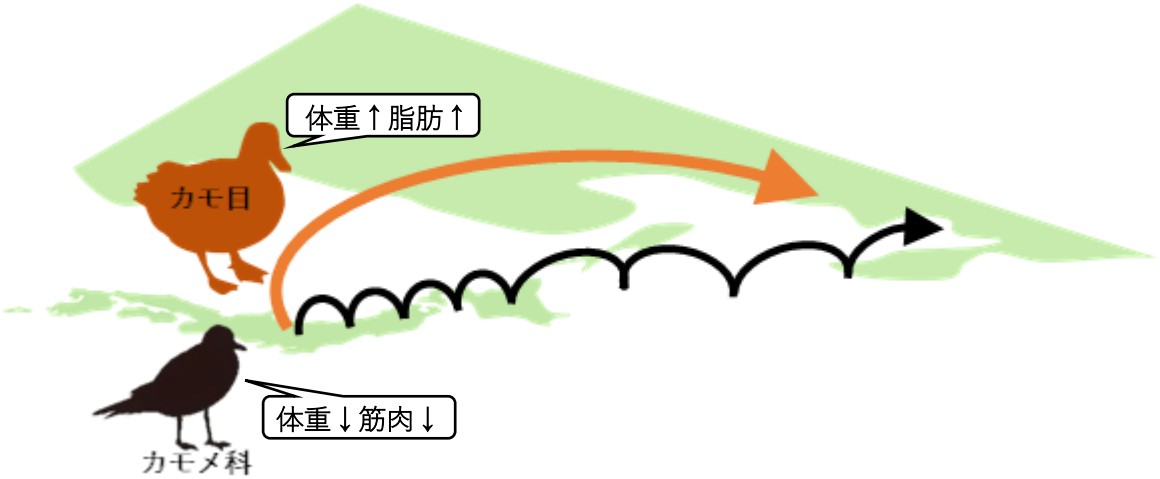


図3. カモ目とカモメ科鳥類の渡り戦略

カモ目は休息をとらない又は1、2か所の中継地をとって渡りを行うが、カモメ科は頻繁に休息をとりながら渡りを行うと考えられている。渡り前にカモ目は体重や脂肪が増加するが、国内に越冬するカモメ科(ユリカモメ)は減少が見られる。このような違いが病原体の感染率にどのように関係しているのかは明らかになっていない。

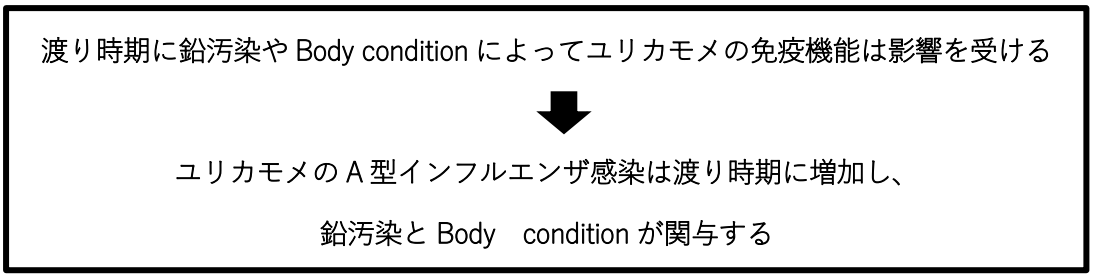


図4. 本研究で検証する仮説

第1章

Body condition と鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響、および渡りの時期との関係を解明する

序論

1. Body condition と免疫機能に係る既存報告

体重、筋肉重量、脂肪重量をはじめとする体調の指標(Body condition)は免疫機能に密接に関係すると考えられる。例えば、カモ目のホンケワタガモ(*Somateria mollissima*)は末梢血中のリンパ球数、ジフテリア菌及びボツリヌス菌に対する抗体価が体重の減少によって有意に減少する(Hanssen *et al*., 2005)。マガモに A 型インフルエンザウイルスを感染させると、低体重の個体では正常体重の個体に比較して A 型インフルエンザウイルスの感染率が有意に高くなる(Arsnoe, 2010)。いくつかの既存報告から、Flint and Franson (2009)は、カモ目の鳥類は Body condition が負に偏ると病原体の感染率が高まるという condition-dependent hypothesis を提唱している。

免疫機能は病原体の感染に関係する。シジュウカラ(*Parus major*)は鳥類の免疫機能の簡易的な指標として用いられるヘテロフィルとリンパ球の比(H/L 比)と *Brucella abortus* 感染率との間に正の相関がみられる(Krams *et al*., 2012)。キアオジ(*Emberiza citrinella*)の血液内原虫(*Haemoproteus* spp.)感染の調査からは、末梢血中のリンパ球の割合と感染率の間で有意な負の相関が確認されている(Dunn *et al*., 2013)。

2. Body condition を変化させる渡り

一般的に、Body condition は渡りに伴って変化し、渡り前の時期に増加、渡りを終えた時期は減少する傾向にある(Brown, 1996; Clark, 1979; Newton, 2006)。渡りによる筋肉重量の変動の事例として、チドリ目のオオソリハシシギ(*Limosa lapponica*)は渡り前の時期に筋肉量が増加し、その増加の15～40%は胸筋で生じる(Piersma, 1990)。チドリ目のミユビシギ(*Calidris alba*)は、渡り前の時期は渡り後の時期に比較して有意に筋肉重量が増加する(Scott *et al*., 1994)。脂肪重量が変動する事例として、Total Body Electrical conductivity 法を用いてスズメ目のキヅタアメリカムシクイ(*Setophaga coronata*)、アカメモズモドキ(*Vireo olivaceus*)、

ノドジロシトド(*Zonotrichia albicollis*)を調査した報告では、長距離を渡る種ほど、渡り前の時期に脂肪重量が増加することが示されている(McWilliams and Whitman, 2013)。カモ目のマガモやオナガガモでは、越冬地において、春の渡り前に体重と脂肪量が増加する(Dufour and Ankney, 1995; Moon and Haukos, 2009)。カオジロガン(*Branta leucopsis*)では、秋の渡り後と春の渡り後の時期は越冬期間中よりも脂肪重量に起因した体重の減少が生じ、特にその増減は雄で大きくなる(Portugal *et al*., 2007)。

いくつかの鳥種で渡りと Body condition の関係が調査される中、その関係が未だ明らかにされていない鳥種も存在する。国内に生息する鳥類は迷鳥を除くと60科存在し、渡りを行う科はおよそ半数の27科に及ぶ(Takano *et al*., 2007)。そのうち22科は少なくとも1報以上の Body condition と渡りの関係が報告されている(Blanco and Frías, 2001; Brown, 1996; Campos *et al*., 2008; Choi *et al*., 2009; Clark, 1979; Colabuono *et al*., 2012; Crossin *et al*., 2013; Gibson *et al*., 2018; Grond *et al*., 2014; Hood *et al*., 1998; Jehl Jr, 1997; Lamb *et al*., 2017; Maggini and Bairlein, 2011; Parrish, 1997; Paruk *et al*., 2016; Smith and McWilliams, 2014; Sockman and Schwabl, 2001; Vernasco *et al*., 2018; Yong and Finch, 1997)。この内、カモメ科は、国内に生息する45種の内44種が渡りの生態を有するにもかかわらず、渡りと Body condition の関係は未解明の部分が散見される(Japan, 2012)。カモメ科のユリカモメの渡りと Body condition の関係を調査した Cantos *et al*. (1994)は、越冬地において渡りを行わない時期から、春の渡り前の時期に体重が増加すること、血中総脂質量は秋の渡りの後から春の渡り前の時期にかけて上昇することを報告した。しかし、ユリカモメは雌雄で体長や体重に有意な差が見られること(Arima *et al*., 2004)、血中総脂質量を構成するトリグリセリドやリン脂質は食後の経過時間や採餌内容によって変動すること(Sakate *et al*., 2003) を鑑みると、この知見は慎重に参考する必要がある。

3. 鳥類の免疫機能

鳥類の免疫を担う細胞と分子は、ほ乳類と同様の細胞と分子で構成され、類似する機能を持つ(Nochi *et al*., 2018; Sharma, 1991)。免疫機能は自然免疫と獲得免疫に分けられ、自然免疫は非自己分子に対する初動反応、獲得免疫は特定の非自己分子に対する特異的な排除

反応を担う(Sharma, 1997)。血液中の免疫細胞のうち、自然免疫には主に樹状細胞、単球や哺乳類の好中球に該当するヘテロフィルが寄与し、獲得免疫はリンパ球が機能する(Maxwell and Robertson, 1995, 1998)。ヘテロフィルの機能には異物を貪食する Phagocytosis、異物反応や炎症反応に係る Degranulation がある(Harmon, 1998; Maxwell and Robertson, 1998)。鳥類のヘテロフィルとリンパ球は白血球全体の95%を占める(Davis *et al*., 2008)。リンパ球は機能等によって T リンパ球と B リンパ球に分類され(Reese *et al*., 2006)、T リンパ球は表面に発現するタンパク分子によって非自己に対する免疫機能の補助や維持に係る CD4陽性 T リンパ球と、ウイルスなど特定の病原体の排除に働く CD8陽性 T リンパ球に分けられる(Huang *et al*., 2012)。

免疫機能の簡易的な評価方法には、これらの白血球数を評価する方法に加えて、白血球分画のヘテロフィルとリンパ球の割合の比(H/L 比)を算出する方法がある(Gross and Siegel, 1983; Hegemann *et al*., 2012)。H/L 比は鳥類で使用される簡易的な免疫機能のパラメーターであるが、鳥種によってヘテロフィルをリンパ球の割合が異なること、ヘテロフィルとリンパ球が同時に減少している場合は H/L 比に反映されないという特徴もある(Krams *et al*., 2012; Pap *et al*., 2010)。

4. CD4と CD8の役割

CD4は T 細胞の他に、単球、マクロファージ、樹状細胞の表面に発現する(押味和夫, 1989)。CD8は、ウイルスに感染した細胞など内在性抗原が樹状細胞に貪食され、MHC クラスI分子で提示されることで、T リンパ球の細胞膜表面に発現する。CD8が発現したリンパ球はCD8陽性Tリンパ球(キラーT細胞)と称され、非自己の排除を積極的に行う、獲得免疫に寄与する(Kwon *et al*., 2008)。CD4はリンパ球などの免疫細胞の細胞膜表面に発現する。細胞外の非自己の抗原を貪食した単球や樹状細胞が細胞膜の MCH クラスII分子にその抗原を結合させ、ナイーブ T 細胞に提示すると CD4が産生される。CD4が T リンパ球内で産生・発現すると、ヘルパーT 細胞と呼ばれる細胞となり、他の免疫細胞の活性化といった免疫機能の亢進に寄与する(Adams *et al*., 2009)。

CD4と CD8の測定方法には、抗原抗体反応を用いる手法と分子生物学を用いる手法があ

る。前者は flow cytometry を用いる方法で、一般的にニワトリ(*Gulls gulls*)の CD4と CD8のモノクローナル抗体(mAb)が使用されている。しかし、鳥種によるタンパク分子の表面構造の違いから、ニワトリ以外の鳥種での測定精度が疑問視されている(Fair *et al*., 2008)。2012年以降にアヒル(*Anas platyrhynchos domesticus*)の CD4と CD8の mAb が合成された後、アヒルとニワトリを中心にCD4とCD8の flow cytometry解析が行われている(Florijančić *et al*., 2009)。

後者は CD4や CD8の塩基配列を標的とした PCR を行う方法で、これまでにアヒルやニワトリを対象に塩基配列の特定と研究が行われている(Adams *et al*., 2009; Kothlow *et al*., 2005; Qin *et al*., 2017)。しかし、抗原抗体反応を用いる手法と同様に、CD4と CD8のいずれの塩基配列も鳥種による塩基配列の差異が問題となる。例えば、CD4の mRNA はカモ目の北京ダック(*Anas platyrhynchos domesticus*)とノバリケン(*Cairina moschata*)の間で91.3%の相同性、北京ダックとキジ目(Order, Galliformes)のニワトリの間で60.2%の相同性であり、CD8でもそれぞれで86.5%と59.6%の相同性である(Schultz and Magor, 2014)。そのため、PCR 反応に使用する primer が各鳥種の塩基配列で設計されていない限り、分子生物学的手法の検査を行うことができない。CD4や CD8を対象とした既存研究では、種ごとに CD4と CD8の primer が作成されている(Adams *et al*., 2009; Kothlow *et al*., 2005; Qin *et al*., 2017)。

5. 渡りによる Body condition の変動による免疫機能の影響

Body condition を関連付けた、渡りと免疫機能の関係に関する知見は乏しい。渡り行動が免疫機能に及ぼす影響を調査して限定的な知見として、同地域に生息するクロウタドリ(*Turdus merula*)の内、渡りを行う個体群と行わない個体群を対象に捕獲調査を行った Eikenaar and Hegemann (2016)は、抗体検査から獲得免疫の機能は渡りの有無による差はないが、大腸菌への攻撃性(Bacterial killing ability: BKA)を指標に測定した自然免疫の評価では、渡りを行う個体群は行わない個体群に比較して BKA が低値で、ブースター効果も低いことを示した(French and Neuman-Lee, 2012)。ガンカモ類 Anseriformes の既存報告を使用して渡りと血液内原虫の末梢血中の存在率を研究した報告では、渡りの長距離を移動する鳥種ほど、末梢血中の血液内原虫の存在率が高いことを示し、渡りによる免疫機能の抑制を示唆

した(Figuerola and Green, 2000; Weber and Stilianakis, 2007)。

渡りが Body condition に及ぼす影響とそれによる免疫影響を報告した知見は、モデル解析として一報が報告されている。コオバシギ(*Calidris canutus*)をモデルとして渡りと免疫機能の関係を分析した報告では、免疫機能は個体間の遺伝子の多様性による病原体への耐性で示される遺伝的作用と Body condition の変動といった環境的作用によって抑制や亢進を呈する。そして、免疫機能が渡りとの間でトレードオフを生じた場合にも、十分なエネルギーが供給される場合には生存、供給されない場合は感染・発症、そして死亡するというトレードオフモデルを提唱した(Buehler *et al*., 2010)。渡りと免疫機能の関係に関する知見は乏しいものの、渡り鳥は渡り行動に伴う Body condition の低下によって免疫機能の抑制が生じ、病原体の感染率があがる可能性が示唆される。

6. 鉛汚染による免疫機能の影響

環境汚染物質として最も一般的なものは重金属といわれ(Mañosa *et al*., 2001; Rhind *et al*., 2010)、その中でも鉛は、多様な生物で汚染影響が報告されている(Berglund *et al*., 2015; Mateo, 2009b; Oleksyn and Reich, 1994; Pain *et al*., 2019; Rahman *et al*., 2017)。

鳥類は、鉛による汚染が報告され(Furness, 1993; Leighton, 1995; Pérez-López *et al*., 2006)、中毒量の汚染が生じた場合、その影響は嗜眠や死亡から、異常行動、再生不良性貧血、免疫機能の低下といった非特異的症状を呈するまで、多様である(Fallon *et al*., 2017; Krone, 2018; Reid *et al*., 2012; Vallverdú-Coll, 2016)。スズメ目のチャカタルリツグミ(*Sialia mexicana*)の飼育下の雛に中毒量の鉛を投与し、細胞性免疫の評価としてリンパ球刺激(PHA)試験を行ったところ、細胞性免疫は鉛の汚染濃度と有意な負の相関を示した(Fair and Myers, 2002)。猛禽類の海ワシ亜科(Haliaeetinae)では、中毒量の鉛曝露によって鉛がカルシウムに置換して血中のカルシウム濃度が減少し、卵殻の菲薄化が生じる(Lucia *et al*., 2010)。中毒量の汚染で見られる非特異的症状の中でも、振戦や斜頸のような神経症状を発症することによって、生命活動に支障をきたす例も報告されている(Kendall *et al*., 1996; Scheuhammer, 1987; Williams *et al*., 2017)。

一方で、影響量の汚染濃度による生体影響の知見は中毒量に比較して乏しい。この原因

には、野生下の個体群を調査することが困難であること、鳥種によって鉛汚染の発症に閾値の差異が存在することが挙げられる(Pain *et al*., 2019)。この例として、カモ目やハヤブサ目(Order, Falconiformes)で定義されている影響量の鉛を曝露されたチドリ目のセグロカモメ(*Larus argentatus*)とアジサシ(*Sterna hirundo*)では、中毒量の鉛曝露で見られるような行動異常、採餌能力の低下、バランス能力の低下、認知能の低下が報告されている(Gochfeld, 2000)。

鉛は現在でも広く使用されており、環境中の汚染レベルはその地域における鉛製品の消費量によって明確に地域差が生じる(Cai and Calisi, 2016)。Cai and Calisi (2016)は、ニューヨーク州の都心部から半径10km の地域に生息するカワラバト(*Columba livia*)の血中鉛濃度を計測した。カワラバトは餌資源や個体間の闘争がない限り、孵化した地域から移動せずに生息する生態の特徴がある。この調査では3km 程度離れた地域間で、カワラバト体内の鉛濃度が有意に異なる結果が示された。体内の鉛濃度の地域差は、カモメ科でも報告される。イタリアのアルノ川流域の2地域(上流域と下流域、2地域間は約20km 離れている)で捕獲されたセグロカモメとユリカモメは、上流域で捕獲した2種は下流域で捕獲した2種と比較して腎組織及び肝組織中の鉛濃度が高かった。上流域の捕獲地域は家庭ごみの集積所と皮革製品とガラス製品の工場があり、いずれも工程で鉛を使用した工業機器を使用していることから、ごみの採餌や工場からの排気を吸入したことで、当該地域の捕獲群では鉛濃度が増加したと考察している(Leonzio *et al*., 1986)。

7. 目的

本章では、東京湾群と三河湾群のユリカモメを対象に、「渡り時期に鉛汚染や Body condition によってユリカモメの免疫機能は影響を受ける」という仮説について、検証する。

この検証を試みるにあたり、ユリカモメの免疫機能として、正常な機能をもたらす免疫の検査値が解明されていない。そのため、本研究では計測された免疫検査値の変動として、評価を行った。

まず、調査対象のユリカモメの Body condition として、ユリカモメの体重、筋肉量と脂肪量のスコアリングから Body condition index を作成した。調査対象の個体群の鉛汚染の状況

を把握し、鉛汚染と Body condition がユリカモメの免疫機能にどのような影響を及ぼすのか、そして、その影響は渡り時期によって差異があるのか、評価を行った。

本章に共通する材料と方法

1. 供試動物

ユリカモメは千葉県市川市と愛知県蒲郡市で捕獲した個体群を対象とした。各々の地点で観察される個体群を以下、東京湾群、三河湾群とした。捕獲期間は2018年11月から2021年3月(但し、愛知県蒲郡市は2019年1月から)に実施した。捕獲は、手、くくり罠(noose trap、図1-1)(Wegner, 1981)、又は whoosh net(図1-2)(Colles, 2006; Sutherland *et al.*,.,.,., 2004)のいずれかの方法で実施した。Gaunt *et al*. (1997)は、鳥類の倫理で安全に採取できる血液量を、体重の1%未満と示した。そこで本研究では捕獲個体の体重を速やかに計測し、右正中中足静脈または右翼下静脈から、体重の0.5%未満の血液量を、ヘパリン処理した26G の注射針 (Terumo、 Tokyo、Japan) を付した1ml シリンジ (Nipro、Osaka、Japan) で採取した。採血後は止血を確認し、自然翼長と全頭長を計測した。その後、東京湾群の捕獲個体は左跗蹠にプラスチック製の標識調査専用のカラーリングを付し、東京湾群及び三河湾群の捕獲個体では、右跗蹠に環境省鳥類標識用足環を付し、放鳥した。

本研究の採血調査については、本学の実験動物倫理委員会の承認を得ると共に(承認番号：30s-47、2020K-78)、捕獲調査では環境省及び千葉県(千葉県自指令第1568号、1667号、900号)、愛知県(31東環第588-5号、2東環第1013-3号)に承認を得て実施した。捕獲した羽数を表1-1に示した。

2. Body condition と齢及び性の評価

Body condition の評価するために、体重(BW)、スコアリングとして筋肉量スコア(筋肉量)、脂肪量スコア(脂肪量)を評価した。体重は個体を専用の布袋に入れてデジタル体重計(HL-3000WP、A&D、Tokyo、Japan)で測定した。筋肉量と脂肪量はスコアリングで評価を行った。すなわち、筋肉量(Gaunt *et al*., 1997)と脂肪量(Redfern *et al*., 2000)は1から5及びその間の

計9段階で評価した(筋肉量：図1-3、脂肪量：図1-4)。対象種の齢は羽衣で判定した。すなわちその年生まれの1歳未満(Yearling)と、1歳以上(Adult)の2つに分類した。性の判定では、polymerase chain reaction (PCR)による分子生物学的検査を実施した。雌雄判定の標的は性染色体上の Chromodomain helicase DNA binding protein (CHD)遺伝子(Çakmak *et al*., 2017)とし、カモメ類が属するチドリ目やカモ目で使用される primer 2550F/2718R(表1-2)を使用した(Ushine *et al*., 2016)。採取した血液は DNeasy blood and tissue kit (Qiagen、Venlo、Netherland)を使用して DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、PCR 反応を行った。PCR 組成は、50ng> DNA 産物、5pM forward primer (2550F)、5pM reverse primer (2718R)、0.02U/μL KOD Fx Neo DNA polymerase、そして0.4mM dNTPs を加えて、DNA free water で20μL に調整した。PCR 設定は、pre-denaturation 94℃/2min の後、denaturation 98℃/10sec、annealing 56℃/30sec、extension 68℃/5sec を35サイクル実施した後に、final extension 72℃/5min 行った。得られた PCR 産物は2%アガロースゲルで20min/100V で電気泳動を行い、標的領域の増幅を確認した(図1-5)。

3. 免疫機能の評価

採取した血液2μL を Natto and Herrick 液で染色し、血球計算盤上で白血球数(WBC)をカウントした。塗抹標本は白血球分画を評価するためにライトギムザ染色を行い、染色した標本は風乾後に封入した。光学顕微鏡400～1000倍で白血球中のリンパ球の割合(リンパ球：Lym)、ヘテロフィルの割合(ヘテロフィル：Het)、そしてヘテロフィルとリンパ球の比(H/L 比)をカウントした。

4. CD4・CD8α の評価：primer 設計

遠心分離した血球成分100μL で、Trizol reagent(Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA)で RNA を抽出した。抽出した RNA は Recombinant DNase I(Takara Bio、Shiga、Japan)と ReverTra Ace qPCR RT kit(TOYOBO、Osaka、Japan)の2つの試薬、または cDNA Synthesis kit(TOYOBO、Osaka、Japan)を使用して gDNA 除去と cDNA への逆転写を行った。

CD4と CD8の検査を行う前段階として、ユリカモメの標的遺伝子の塩基配列を特定する必要がある。そこで、生物の遺伝子情報が一括して登録されている国立生物工学情報センター(NCBI)のデータベースから、鳥類の CD4と CD8の mRNA の塩基配列データを抽出した。CD4は NCBI のデータベース上の鳥類33種(表1-3)、CD8は最も登録データ数の多い CD8α を対象に、38種(表1-4)の塩基配列データを用いて、CD4と CD8α primer (degenerate primer)を作成した(表1-5)。血球成分から精製した cDNA は、作製した CD4及び CD8α の degenerate primer で PCR を行った。PCR 組成は、1 U/μL KOD FX Neo(TOYOBO、Osaka、Japan) 0.2μL、2x PCR Buffer 8.0μL、2mM dNTP mixture 2.0μL、5pM forward primer と reverse primer を各0.8μL、100ng/μL 未満の cDNA を混合し、滅菌水で合計量が20μL になるように調整した。PCR 設定を表1-6に示した。PCR 産物は2%アガロースゲルで100 V/25分間の電気泳動を行った後、紫外線下で増幅領域を確認した。増幅された複数の領域毎にアガロースゲルを切り出し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up(Takara Bio、Shiga、Japan)で精製した。精製した PCR 産物をシーケンス解析した後、領域ごとに NCBI の Basic local alignment search tool (NCBI/Blast)で検索し、CD4及び CD8α として登録された塩基配列との相同性を確認した。

Degenerate primer を使用して増幅された複数の領域の中で、共通領域に被らないような領域から、鳥類に汎用性のある CD4及び CD8α primer として作成した(avian-common CD4 or CD8α primer：表1-7)。avian-common CD4 or CD8α primer を用いて、cDNA を PCR し(表1-8)、増幅産物をシーケンス解析した。解析した塩基配列の中から、NCBI/Blast データベース上で他の鳥種の発現タンパクや mRNA と被らない独自の領域を特定し、種特異の CD4及び CD8α primer(species-specific CD4/CD8α primer)を作成した(表1-9)。作製した species-specific CD4/CD8α primer を用いて PCR(表1-8)及びシーケンスを実施し、標的領域が増幅されていることを確認した。最後に、標的領域を増幅することが確認された specific primer、cDNA、そして KOD SYBR qPCR Mix(TOYOBO、Osaka、Japan)を使用して real-time PCR を実施し、末梢血1μL 中の CD4と CD8α mRNA の発現量(コピー数：copy)を定量した。real-time PCR は、TA クローニングで作成した遺伝子断片を用いる検量線法で測定した。評価では、得られた

CD4及び CD8α mRNA コピー数を対数変換して使用した。

5. CD4・CD8α の評価：TA クローニング

CD4及び CD8α の定量検査には real-time PCR を用いた。Real-time PCR を検量線法で評価する場合、コピー数が判明している標的断片が必要となる。本調査では、TA クローニングを用いて、設計した species-specific CD4/CD8α primer で cDNA 中の標的領域を増幅させた PCR 産物から作成した。

標的配列の増幅に KOD FX Neo を PCR polymerase に使用したため、はじめに dATP を付す作業を行った。組成は500ng/μL 以下の DNA に対して、10x Ex Taq buffer 0.25μL、dATP 0.5μL(Nippon Gene、Japan)を加え、DNA-free water で25μL に調整し、68℃ 3分でインキュベートした。インキュベートした産物25μL と TE 65μL (pH8.0)、3M の Sodium Acetate 10μL を混合後、フェノール100μL を混合し、14000 G/25℃/3分間遠心分離した。分離された上清にクロロホルム100μL を混合し、12000 G/25℃/3分間遠心分離した。上清にエタチンメイト(Nippon Gene、Toyama、Japan)1μL と100%エタノール200μL を加えて、14000 G/25℃/10分間遠心分離した。得られたペレットを70%エタノール 500μL で洗浄し、14000 G/25℃/2分間で遠心分離する操作を2回行った。2回目の操作後にエタノールを取り除き、Tris-EDTA Buffer (TE) 40μL を加えて混合した。

標的断片とプラスミドベクターのライゲーションは、精製した DNA 産物1μL、TE 1μL、50ng/μL pTAC-vector 0.5μL、Mighty mix (Takara、Shiga、Japan) 2.5μL を混合し、16℃/ 20分間インキュベートした。

プラスミドベクターを組み込んだ大腸菌のトランスフォーメーションでは、カルベニシリン耐性大腸菌を competent cells として使用した。ligated DNA 2μL を30分間氷上で静置し、42℃のウォーターバスで40秒間インキュベート後、再び氷上で2分間静置した。この ligated DNA に SOC 培地(Funakoshi、Tokyo、Japan)300μL を混合して、37℃/30分間インキュベートした。この混合液を3000rpm/2分間遠心分離した後に上清を捨て、さらに SOC 培地100μL を混合し、寒天培地にまき、37℃/24時間培養した。

コロニーPCRでは、培養したコロニーを少量取りTE 50μLと混合した。100℃/10分間インキュベートした後に、目的の領域が得られているかを PCR して確認した。PCR 組成は、DNA 液2μL、Go Taq polymerase(Promega、Madison、USA)5μL、5pM specific forward primer 0.4μL、5pM specific forward primer 0.4 μL、DNA free waterで10μLに調整した。PCR設定は、denaturation：98℃ 10sec、annealing：57℃ 15sec、extension：72℃ 1min、この3stepを35cycle行い final-extension：72℃ 5minで実施した。得られたPCR産物は1.5%のアガロースゲルで電気泳動を行った。標的の遺伝子断片のサイズにバンドが得られたコロニーを Tris-borate (TB)液2mlとカルベニシリン2μLに混合し、振盪しながら37℃で培養した。大腸菌からのプラスミド回収では、培養液1ml に Wizard plus miniprep DNA purification system(Promega、Madison、USA)を使用して、プラスミドを回収した。回収したプラスミドは0.8%アガロースゲルで電気泳動して、約1600bp に増幅されるバンドを確認した。回収したプラスミドはnanodrop(Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA)で濃度を確認した。

プラスミドは、Big Dye (v3.1) 0.5μL、5xSequence buffer 1.75μL、1.0pmol/L T7 primer 2.5μL、100ngプラスミドDNA及びDNA free waterを加えて計10μLに調整し、PCRした。PCR設定は pre-denaturation: 96℃ 45sec の後、denaturation：96℃ 10sec、annealing：50℃ 5sec、extension：60℃ 2minを28cycle行った。得られたPCR産物はSephadex G50 (GEヘルスケアライフサイエンス、Tokyo、Japan)で精製した。精製プロトコルは、PCR 産物に2.2% SDS 1μL 混合し voltex した。空のカラムに sephadex G50を入れ遠心し固定したものにPCR産物を触れるように加えて、1000G/4分間遠心分離し、得られた産物を風乾した。乾燥させたPCR産物にHiDi formamide (Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA) 15μL加えて混合した。この産物を96wellプレートに入れ、95℃/2分間インキュベートしたあと、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA)にセットして塩基配列を解析した。

トランスフォーメーションした大腸菌の増菌培養は、シーケンスで標的領域が取り込まれ、増幅されているコロニーを対象に、TB液2mlとカルベニシリン50μLを合し、37℃で一晩振盪させた。増菌培養した大腸菌はNucleabond xtra midi kit (Takara Bio、Shiga、Japan)を使用してプラスミド DNA を回収した。この方法で回収したプラスミド DNA を real-time

PCR の検量線法に使用した。

これらの検査によって得られた免疫項目の検査値を表1-10に示した。この値を母集団として、本研究内で各種の解析を実施した。

6. 鉛濃度の測定

血中鉛濃度の測定は、血球成分を使用した。血球成分は高圧滅菌した後、北海道大学毒性学研究室で測定した。測定機器は誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて、血球成分1dL 当たりの鉛量(μg/dL) を算出した。鉛の測定は、北海道大学大学院獣医学研究院毒性学教室の石塚真由美教授、中山翔太准教授のご厚意で計測いただいた。

表1-1. 2018年11月から2021年4月に東京湾群、2019年1月から2021年4月に三河湾群で捕獲したユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)326羽の内訳

Yearling は Adult に比較して羽数が少ないため、小計は記していない。

地域	性	調査期間	秋の渡り時期			越冬期			春の渡り時期		
		(年)	Adult	計	Yearling	Adult	計	Yearling	Adult	計	Yearling
東京湾群	雄	2018-2019	16		0	35		3	1		0
		2019-2020	1	17	0	20	55	0	6	16	0
		2020-2021	0		0	0		0	10		0
	雌	2018-2019	13		1	22		0	10		0
		2019-2020	0	13	0	2	44	0	11	21	0
		2020-2021	0		0	20		0	0		0
三河湾群	雄	2018-2019	2		0	3		1	2		2
		2019-2020	10	13	0	15	21	1	3	9	0
		2020-2021	1		0	3		3	2		0
	雌	2018-2019	1		1	1		0	1		0
		2019-2020	20	22	2	20	30	3	20	23	4
		2020-2021	1		0	9		0	2		0

表1-2. 雌雄判別に使用した primer

Primer 名称	F/R	塩基配列(5' → 3')	Tm 値 (℃)
2550F	F	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	56.0
2718R	R	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	61.5

F: Forward primer、R: Reverse primer

表1-3. CD4の degenerate primer 作製のために参考とした鳥種と国立生物工学情報センター(NCBI)の Accession number

CD4は既に登録されている33種の鳥種の塩基配列データを参考に、degenerate primer を作成した。

Accession number	学名	Accession number	学名
MG214789.1	*Columba livia*	XM_009639189.1	*Egretta garzetta*
XM_008935179.1	*Merops nubicus*	XM_009700431.1	*Cariama cristata*
XM_009287122.1	*Aptenodytes forsteri*	XM_009811354.1	*Gavia stellata*
XM_009330028.1	*Pygoscelis adeliae*	XM_009892936.1	*Charadrius vociferus*
XM_009476223.1	*Nipponia nippon*	XM_009925149.1	*Haliaeetus albicilla*
XM_009492644.1	*Pelecanus crispus*	XM_009932044.1	*Opisthocomus hoazin*
XM_009566700.1	*Cuculus canorus*	XM_009950995.1	*Leptosomus discolor*
XM_009575970.1	*Fulmarus glacialis*	XM_009966772.1	*Tyto alba*
XM_009983489.1	*Tauraco erythrolophus*	XM_010075480.1	*Pterocles gutturalis*
XM_010128348.1	*Chlamydotis macqueenii*	XM_010167611.1	*Caprimulgus carolinensis*
XM_010284516.1	*Phaethon lepturus*	XM_010304952.1	*Balearica regulorum gibbericeps*
XM_010567572.1	*Haliaeetus leucocephalus*	XM_011587498.1	*Aquila chrysaetos canadensis*
XM_014253336.1	*Pseudopodoces humilis*	XM_023939944.1	*Cyanistes caeruleus*
NW_011950871.1	*Aquila chrysaetos canadensis*	NC_029516.1	*Coturnix japonica*
NC_029516.1	*Calidris pugnax*	NW_013185931.1	*Anser cygnoides domesticus*
NW_009246109.1	*Cuculus canorus*	NW_009126467.1	*Phalacrocorax carbo*
KX588247.1	*Anas platyrhynchos*		

表1-4. CD8の degenerate primer 作製のために参考とした鳥種と国立生物工学情報センター(NCBI)の Accession number

CD8では、既に登録されている38種の鳥種の CD8α の塩基配列データを参考に、degenerate primer を作成した。

Accession number	学名	Accession number	学名
XM_008930984.2	*Manacus vitellinus*	XM_009648885.1	*Egretta garzetta*
XM_009289393.2	*Aptenodytes forsteri*	XM_009710272.1	*Cariama cristata*
XM_009471689.1	*Nipponia nippon*	XM_009817459.1	*Gavia stellata*
XM_009492630.1	*Pelecanus crispus*	XM_009882514.1	*Charadrius vociferus*
XM_009476223.1	*Phalacrocorax carbo*	XM_009913001.1	*Haliaeetus albicilla*
XM_010184038.1	*Mesitornis unicolor*	XM_009934747.1	*Opisthocomus hoazin*
XM_009556019.1	*Cuculus canorus*	XM_009946784.1	*Leptosomus discolor*
XM_009580142.1	*Fulmarus glacialis*	XM_009976783.1	*Tyto alba*
XM_009991395.1	*Tauraco erythrolophus*	XM_010079535.1	*Pterocles gutturalis*
XM_010120813.1	*Chlamydotis macqueenii*	XM_010165795.1	*Caprimulgus carolinensis*
XM_010293492.1	*Phaethon lepturus*	XM_010312781.1	*Balearica regulorum gibbericeps*
XM_010577855.1	*Haliaeetus leucocephalus*	XM_030026337.1	*Aquila chrysaetos canadensis*
XM_014260931.1	*Pseudopodoces humilis*	XM_023948504.1	*Cyanistes caeruleus*
XM_011593105.1	*Aquila chrysaetos canadensis*	XM_015862933.1	*Coturnix japonica*
XM_014966763.1	*Calidris pugnax*	XM_013177815.1	*Anser cygnoides domesticus*
XM_009556019.1	*Cuculus canorus*	XM_009503311.1	*Phalacrocorax carbo*
AF378373.1	*Anas platyrhynchos*	XM_017835210.1	*Lepidothrix coronata*
XM_025896518.1	*Manacus vitellinus*	XM_019006458.1	*Parus major*
JQ272859.1	*Anser anser*	XM_005229872.3	*Falco peregrinus*

表1-5. CD4と CD8α の degenerate primer

標的	primer	F/R	塩基配列(5' → 3')	Tm 値(℃)
CD4	CD4F0518	F	GTTTCTTGTCTYGTSCAT	48.8
	CD4R0518	R	TTCTGCASCTGGGTCTGA	44.0
CD8α	CD8F0518	F	GTSTCCTGCACTGCTCCT	52.0
	CD8R0518	R	CTGCATCKTCGTCTTCTGGT	49.0

F: Forward primer、R: Reverse primer

表1-6. Degenerate primer の PCR 設定

3-step cycle	Cycle condition	Number of cycles
Pre-denaturation	94℃, 2min	1
Denaturation	98℃, 10sec	30
Annealing	Tm-5℃, 30sec	
Extension	68℃, 10sec	
Final-extension	72℃, 5min	1

表1-7. Avian-common CD4 or CD8α primer

標的	primer	F/R	塩基配列(5' → 3')	Tm 値(℃)
CD4	CD4F0803	F	AGTCAGTATCTCACTGCATGTC	58.4
	CD4R0803	R	CTTTGATGTGAAGGTATTAGGTTTTCAG	64.7
CD8α	CD8F0803	F	TGGAACCCTTCATTTCATCGTCTTCAT	71.5
	CD8R0803	R	GAAGGCAGGCTGGCTGGGGCTGAAGTACAG	80.8

F: Forward primer、R: Reverse primer

表1-8.　PCR 設定

3-step cycle	Cycle condition	Number of cycles
Pre-denaturation	94℃, 2min	1
Denaturation	98℃, 10sec	
Annealing	Tm -5℃, 30sec	35
Extension	68℃, 10sec	
Final-extension	72℃, 5min	1

表1-9. Species-specific CD4/CD8α primer

target / primer	F/R	塩基配列(5' → 3')	Tm 値(℃)
CD4			
L.ridibundusCD4F	F	TTGAATGTGAGTGATTAGAGGGCTTTTAT	52.1
L.ridibundusCD4R	R	GATTAATCAATGGAGAATCTGCATGGACAT	53.7
CD8α			
Specific0924CD8F	F	TTTTGGAACCCTTCATTTCATCGTCTTC	53.2
Specific0924CD8R	R	AAGGCAGGCTGGCTGGGGCTGAAGTAG	62.0

F: Forward primer、R: Reverse primer

表1-10. 免役機能の評価を行った2018年11月から2021年4月に東京湾群、2019年1月から2021年4月に三河湾群で捕獲したユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)170羽の検査項目の測定結果

上段は中央値、下段は最大値と最小値を示す。

個体群 (サンプルサイズ)	検査項目()	秋の渡り時期	越冬期	春の渡り時期
東京湾群 (118)	WBC (cell/μL)	4000 8000 – 2000	9800 13000 – 1400	2600 9000 – 1200
	Het (%)	42.4 56.4 – 22.7	37.5 56.0 – 20.0	41.8 55.5 – 27.3
	Lym(%)	54.5 76.0 – 40.9	58.0 77.0 – 37.0	57.0 65.8 – 43.6
	H/L 比	0.76 1.35 – 0.30	0.66 1.44 – 0.26	0.73 1.27 – 0.47
	CD4 (log (copy/μl))	4.09 6.24 – 2.18	5.11 5.77 – 3.14	4.40 6.38 – 2.05
	CD8α (log (copy/μl))	1.73 7.00 – 1.17	2.50 13.94 – 1.60	2.31 8.39 – 1.34
三河湾群 (52)	WBC (cell/μL)	5600 8800 – 4000	7000 11800 – 2000	4400 9600 – 2400
	Het (%)	47.1 53.8 – 28.6	36.6 51.0 – 22.5	44.5 59.0 – 21.7
	Lym(%)	52.4 68.0 – 46.0	62.2 74.0 – 44.0	52.5 77.0 – 38.0
	H/L 比	0.90 1.17 – 0.42	0.59 1.16 – 0.30	0.85 1.55 – 0.28
	CD4 (log (copy/μl))	4.09 5.12 – 3.33	4.09 5.27 – 2.59	4.10 7.31 – 2.59
	CD8α (log (copy/μl))	1.90 5.00 – 0.84	2.07 11.20 – 0.31	2.22 11.60 – 1.28

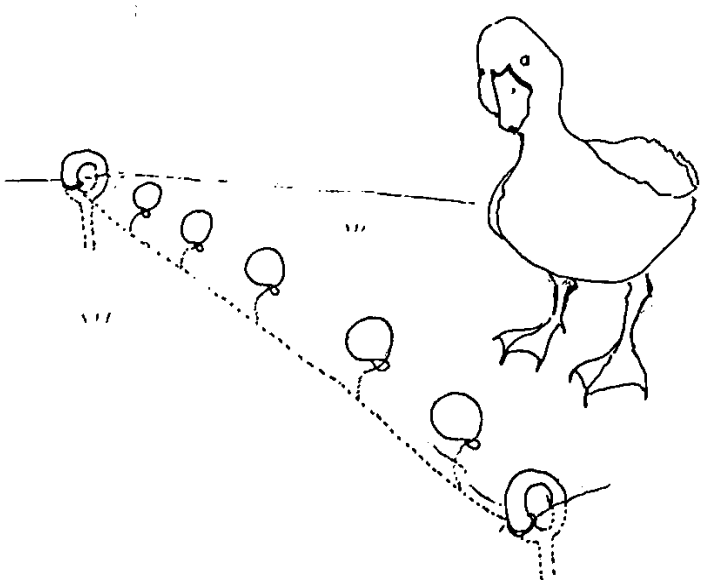
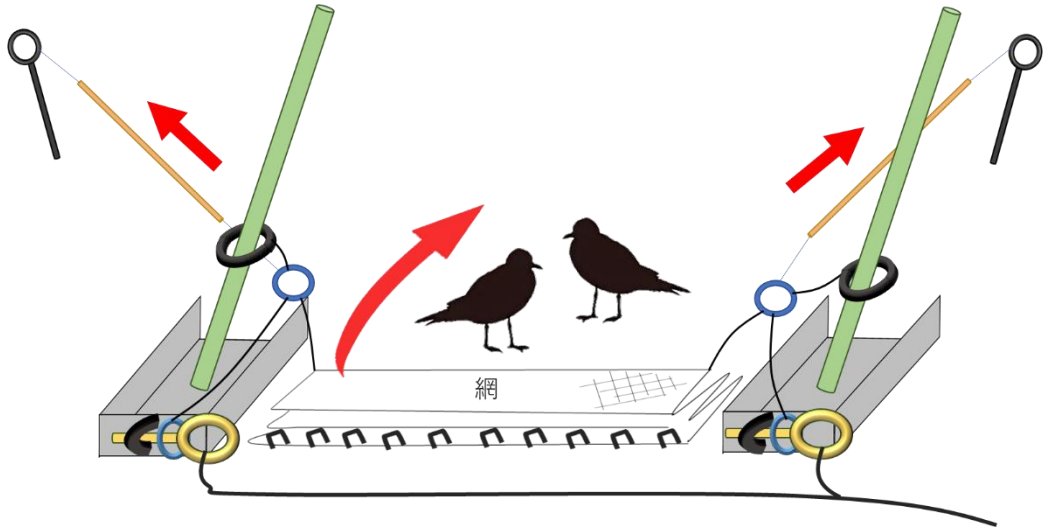


図1-1. くくり罠の模式図

図中の点線部は地中に設置しているため、輪の部分のみが地表に露出する。鳥の足が輪に入ることで捕獲できる。

a. 展開前



b. 展開後

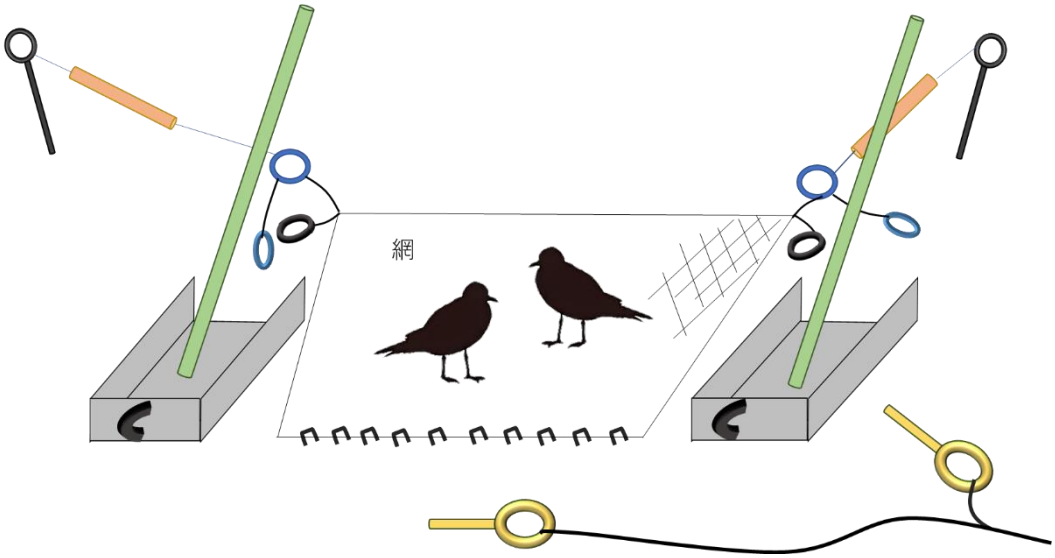


図1-2. Whoosh net の模式図

図 a は展開前、図 b は展開後の模式図を示す。左右の竹竿(緑棒)は金属の設置装置によって地面に対して斜めに設置されている。図中の鳥シルエットはユリカモメを示す。トリガーである黄色の掛け金を付けた紐を引くと、網の両側に取り付けられた黒輪がゴムの伸縮力(直矢印)によって竹竿から引き抜かれ、網が展開される(曲矢印)。

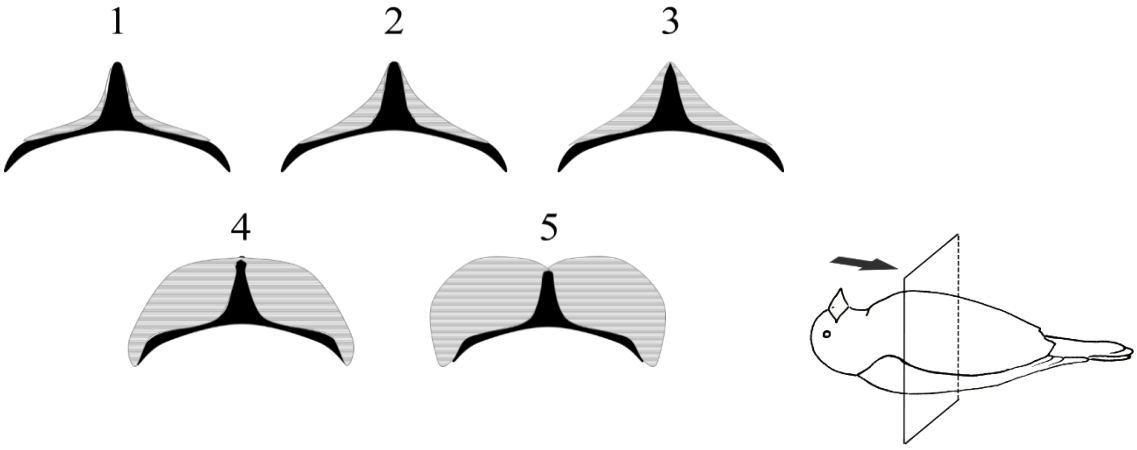


図1-3. 筋肉量のスコア評価

左の1~5の図は鳥の胸部の頭側横断面(右図の矢印向きからみた図)を示す。黒色は骨、灰色は胸筋を示す。図の上部が腹側、下部が背側を示す。筋肉量のスコア評価は、胸筋の量によって1から5に分類した。つまり、筋肉量1：竜骨突起を指でつかむことができる、筋肉量2：竜骨突起はつかめないが、側面を指で触ることができる、筋肉量3：胸筋が竜骨突起から傾斜を成し、三角形様を呈する、筋肉量4：胸筋に富み竜骨突起と水平になる、筋肉量5：筋肉に富み、竜骨突起を超えて盛り上がる(Gaunt *et al*., 1997)。

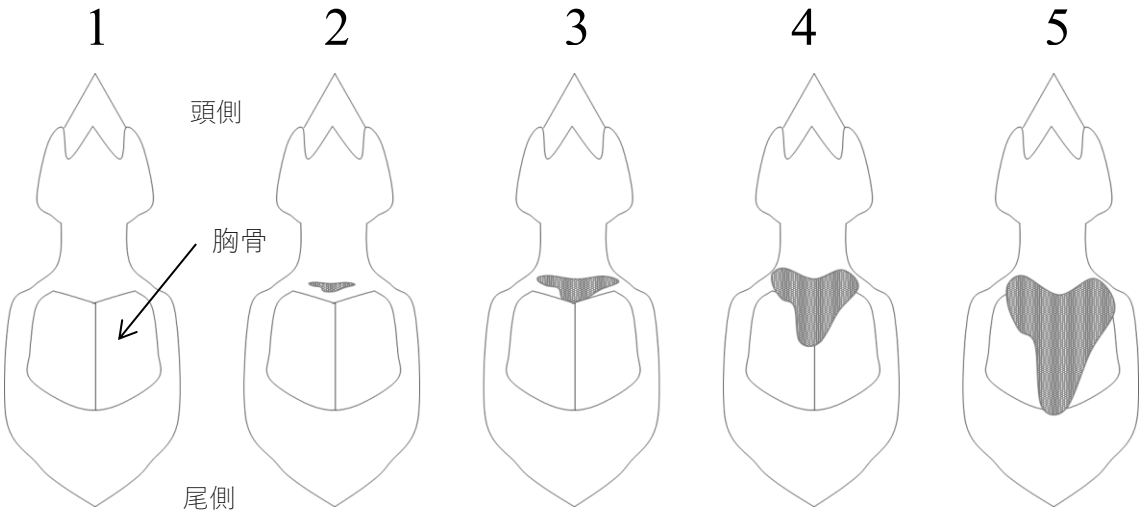


図1-4. 脂肪量のスコア評価

図は Redfern *et al*. (2000)を改変したもので、鳥の腹側面を示している。灰色部分を脂肪として示した。脂肪量の評価は鎖骨—胸骨縁とし、触手によって以下のように判断した。脂肪量1：脂肪が認められない、脂肪量2：鎖骨と気管で囲まれる部分の半分以下の範囲に脂肪が確認される、脂肪量3：胸部の半分以上が脂肪で覆われる、脂肪量4：胸部全てが脂肪で覆われており竜骨突起まで覆われる、脂肪量5：胸部と竜骨突起が全て脂肪で覆われ、胸骨縁まで脂肪が及ぶ。

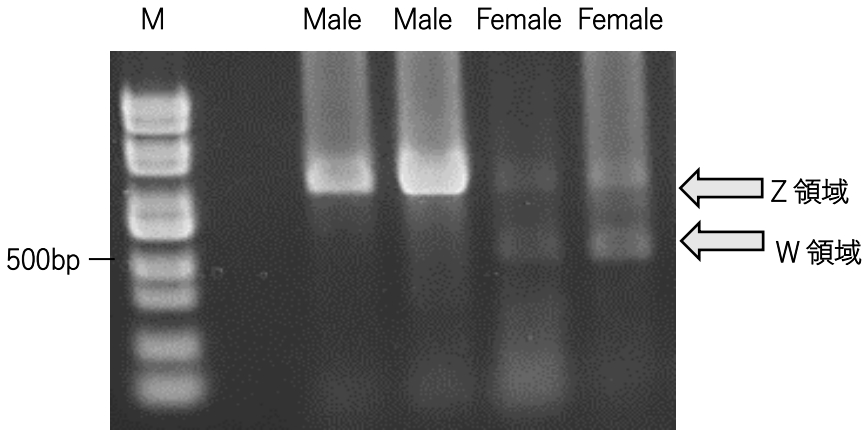


図1-5. CHD 遺伝子を対象とした雌雄判定

図は CHD 遺伝子を標的とした PCR の電気泳動像であり、右から死体の筋肉から抽出し、雌雄が判別できている雌2検体、雄2検体の結果を示している。図左はサイズマーカーで下から100bp 毎にバンドが表れている。鳥類は雌ヘテロ型のため、雌 ZW と雄 ZZ を呈する。本プロトコルで PCR を実施すると、Z 遺伝子は600bp、W 遺伝子は450bp に標的領域の増幅が確認される。

第1節　ユリカモメの Body condition index を設定する

序論

鳥の臨床では胸筋の充実度と竜骨突起の見え方で評価する筋肉量が Body condition を評価する方法として一般的であり、筋肉量に併せて、皮下脂肪の割合(脂肪量)の評価が行われている(Doneley *et al*., 2006)。この2つのスコアリングによる Body condition の評価方法は、採卵鶏を殺処分し、全ての内部臓器及び部位の重量を、筋肉重量や脂肪重量と共に測定した結果、胸筋と皮下脂肪のスコアリングは、臓器の重量と正の関係を有するという知見に基づいている(Gregory and Robins, 1998)。

体重は Body condition の評価の際に最も簡易な項目である(Schamber *et al*., 2009)。しかし、体重は体サイズに関係するとされ、スズメ目やカモ目鳥類を中心として、体重を Body condition として使用する際には翼長や全頭長といった体サイズで補正され、使用されている(Ankney and Afton, 1988; Moser and Rusch, 1988; Piersma and Davidson, 1991; Rising and Somers, 1989)。補正に使用される計測部位には、翼の長さを示す自然翼長、嘴の先端から後頭部までを示す全頭長、踵から膝関節の脛骨の部分(跗蹠)の長さがある。これらの項目は種によってさまざまな組み合わせで使用されており、体重を自然翼長、尾長、全頭長で除したもの(ROLOFF, 2003)、全頭長で体重を区分したもの(Dinsmore and Collazo, 2003)、体重、自然翼長、全頭長で主成分分析したもの(Lanctot *et al*., 1998; Phillips and Furness, 1998; Tveraa *et al*., 1998)がある。ワキジロアリサザイ(*Formicivora grisea*)、ムナフイカル(*Saltator striatipectus*)、ハイイロヒメウソ(*Sporophila schistacea*)、アカボウシアメリカムシクイ(*Basileuterus rufifrons*)で天候の変化による Body condition の変動を調査した報告では、体重に跗蹠長と自然翼長を加えたモデル Scaled mass index が作成されている(Sánchez-Guzmán and Losada-Prado, 2019)。

本調査の対象種ユリカモメは、体サイズを考慮した Body condition の調査は行われていない。同じカモメ科のオオカモメ(*Larus marinus*)で自然翼長と全頭長から主成分分析が行われ、体サイズを考慮した Body condition index が作成されている(Mawhinney *et al*., 1999)。そこで、本節ではユリカモメの体重、筋肉量、脂肪量が体サイズに関係があるかを確認したうえで、

ユリカモメの Body condition index (BCI)を作成した。

解析方法

初めに、ユリカモメの Body condition のおける体サイズの関係性を確認した。2018年11月から2021年4月(但し、愛知県蒲郡市は2019年1月から)に、東京湾で捕獲した個体群(東京湾群)および三河湾で捕獲した個体群(三河湾群)を解析対象とした。体重、筋肉量、脂肪量の体サイズの関係性は Moriguchi *et al*. (2006)の検証手順に倣い、実施した。すなわち、オオカモメで使用された自然翼長と全頭長を用いて主成分分析を行い、2つの項目と合わせて、体サイズの主成分(体サイズ PC1)を算出した。体サイズ PC1と体重(BW)、筋肉量(KS)、脂肪量(Fat)との間でそれぞれ Spearman の順位相関係数を求めた。体サイズ PC1と BW、KS、Fat との間で回帰分析を行い、得られた回帰式に BW、KS、Fat の計測値を代入し、個体ごとの残差を求めた。そして残差と計測値との間で Spearman の順位相関係数を求めた。

次に、ユリカモメの Body condition index を設定した。まず、BW、KS、Fat の3つを主成分分析し、Body condition の主成分(Body condition PC1)を算出した。BW、KS、Fat の全ての項目が体サイズ PC1と有意な関係が見られた場合は、Body condition PC1と体サイズ PC1と合わせた成分を算出、有意な関係が見られなかった場合は Body condition PC1を対象にして、BW、KS、Fatとの間でSpearmanの順位相関係数を算出し、相関を越冬期間と各時期で各々確認した。全ての検定の有意水準は0.05とした。統計分析はフリーソフトの Stata (ver. 14.0)を使用した。

結果

調査期間中に326羽のユリカモメを捕獲した(表1-1)。Yearling は捕獲個体数が少なかったため、齢は混合して解析に用いた。BW、KS、Fat と体サイズ PC1の間には有意な相関がなかった(BW 相関係数 ρ= 0.17、P= 0.15：KS ρ= -0.11、P= 0.32：Fat ρ= -0.18、P= 0.41)。残差と体サイズ PC1について、BW と Fat は残差との間に正の相関があったが、KS には相関はみられなかった(BW ρ= 0.99、P< 0.001：Fat ρ= 0.97、P< 0.01：KS ρ は算出なし、P= 1.00)。

体サイズとの関係が全ての項目で見られなかったため、体サイズ PC1を使用してユリカモメの Body condition index の設定を行った。算出された Body condition PC1を表1-11に示し

た。主成分分析の結果、Body condition PC1は BW、KS、Fat の3項目の分散の52%を説明しており、BW、KS、Fat の全てで有意な相関を示した(Body condition PC1と BW ρ= 0.48、P< 0.0001、図1-6：Body condition PC1と Fat ρ= 0.82、P< 0.0001、図1-7：Body condition PC1と KS ρ= 0.82、P< 0.0001、図1-8)。時期ごとの相関結果を表1-12に示した。

考察

ユリカモメでは、BW、KS、Fat は、体サイズと有意な相関は見られなかった。そのため、ユリカモメではBW、KS、Fatが大きい個体は体サイズに関係せず栄養状態のみに関係していることが考えられる。長距離を休みなく移動するシギ類では、渡りに伴ってBWやFatが著しく増減するが、その項目は体サイズに関係する(Alfaro *et al*., 2018)。この知見を鑑みると、ユリカモメの場合は、短距離を少しずつ移動する渡り戦略を有することから、BW、KS、Fat は渡りによる変動の影響が少なく、個体ごとの採餌状況によってばらつきが生じる可能性が考えられる。

この解析結果から、ユリカモメでは体サイズを考慮せず、BW、KS、Fat を使用して、BCIを設定することとした。主成分分析の結果、BW、KS、Fat全ての項目とBody condition PC1は有意な相関を有していたため、本研究はこの Body condition PC1を BCI として使用した。

表1-11. 2018年11月から2021年4月に東京湾群、2019年1月から2021年4月に三河湾群で捕獲したユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)から算出された Body condition PC1

地域		秋の渡り時期	越冬期	春の渡り時期
東京湾群	平均値	-0.27	0.31	-0.72
	標準偏差(1SD)	0.62	0.99	1.08
三河湾群	平均値	0.94	1.12	-0.94
	標準偏差(1SD)	0.84	1.13	0.68

表1-12. 2018年11月から2021年4月に東京湾群、2019年1月から2021年4月に三河湾群で捕獲したユリカモメ(*Chroicocephalus ridibundus*)から算出された Body condition PC1の時期ごとの体重 BW、筋肉量 KS、及び脂肪量 Fat との相関解析結果

地域	時期(サンプルサイズ)		BW	KS	Fat
東京湾群	秋の渡り時期(30)	相関係数 ρ	0.39	0.48	0.61
		P 値	0.02	0.007	0.0003
	越冬期(99)	相関係数 ρ	0.37	0.80	0.64
		P 値	0.005	0.001>	0.001>
	春の渡り時期(37)	相関係数 ρ	0.76	0.61	0.50
		P 値	0.001>	0.0003	0.004
三河湾群	秋の渡り時期(35)	相関係数 ρ	0.43	0.47	0.76
		P 値	0.02	0.04	0.01
	越冬期(51)	相関係数 ρ	0.65	0.71	0.59
		P 値	0.002	0.001>	0.007
	春の渡り時期(32)	相関係数 ρ	0.69	0.31	0.64
		P 値	0.001	0.01	0.002

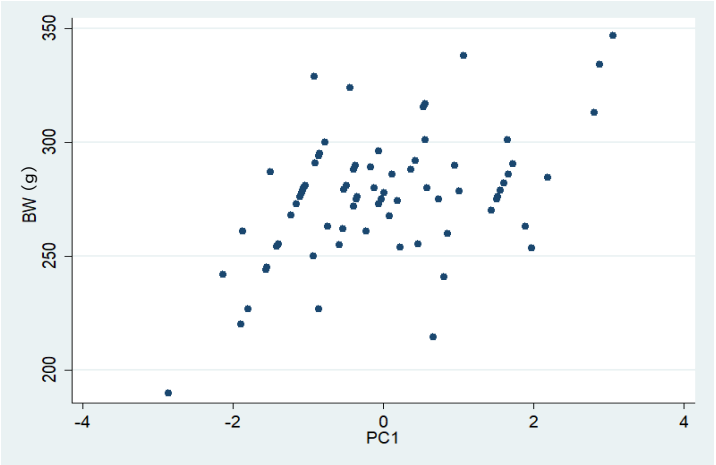


図1-6. 体重(BW, g)と Body condition PC1の関係(ρ= 0.48、P< 0.0001)

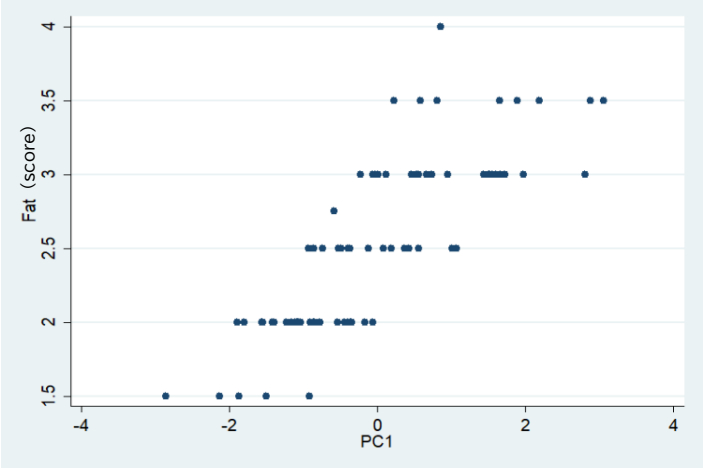


図1-7. 脂肪量(Fat)と Body condition PC1の関係(ρ= 0.82、P< 0.0001)

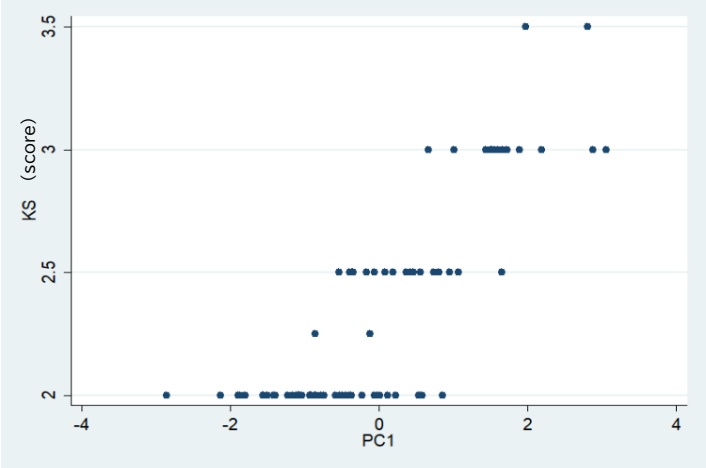


図1-8. 筋肉量(KS)と Body condition PC1の関係(ρ= 0.82、P< 0.0001)

第2節 ユリカモメの鉛の地域的・時期的な汚染状況を把握する

序論

鉛は多様な生物種に様々な影響を及ぼす重金属である(Cromie *et al*., 2014; Masindi and Muedi, 2018)。デンマーク、オランダ、カナダ、アメリカ等、諸外国では渡り鳥の重要な飛来地や湿地で環境中の鉛濃度とその地域に生息する動物の汚染濃度が調査され、鉛弾の使用規制が施行されている(Mateo and Kanstrup, 2019; Thomas and Guitart, 2010; Thomas and Guitart, 2013)。鉛汚染の特徴の1つは、地域における人間社会の鉛消費量がその地域の鉛濃度に繋がるということである(Cai and Calisi, 2016)。鉛汚染のもう1つ特徴は体内動態にあり、鉛は経口又は経気道により体内に取り込まれると、血中に含まれて速やかに全身を移動するが、排出も速やかに行われる(Beyer and Meador, 2011; De Voogt, 2015; Gangoso *et al*., 2009)。アカアシイワシャコ(*Alectoris rufa*)で行われた高濃度の鉛曝露実験では、曝露後7日目には血中鉛濃度が232.2± 32.4 µg/dL を示したのに対し、曝露後14日目には58.7± 13.1µg/dL に低下した(Vallverdú-Coll, 2016)。飼育下のトビ(*Milvus migrans*)に鉛弾を投与した実験では、投与後10時間で血中鉛濃度がピークとなり、投与後14日目で半減したものの、14日目以降も血中鉛濃度は摂取前の0.0µg/dL の濃度に戻ることはなかった(Torimoto *et al*., 2021)。これらの知見から、血中の鉛濃度を鉛汚染として評価する際には、リアルタイム汚染を反映すると考えられる。

本節では、鉛汚染による生体影響が報告されるユリカモメを対象に(Kitowski *et al*., 2017a; Migula *et al*., 2000; Muller *et al*., 2003)、国内で越冬する調査対象のユリカモメが鉛に汚染されているのか、また、汚染が発生している場合には、その汚染濃度に時期や地域の特徴がみられるか確認する目的で、調査を実施した。

解析方法

調査対象群は2018年11月から2021年4月(但し、愛知県蒲郡市は2019年1月から)に捕獲した東京湾群と三河湾群170羽を対象とした。Yearling は捕獲個体数が少なかったため、齢は混合して解析に用いた。血中鉛濃度に正規性をもたせるため、対数変換を行った。時期と地域の条件が互いに影響し合う可能性があるため、秋の渡り時期、越冬期、春の渡り時期と

いう時期の要素と、東京湾、三河湾という地域の要素を併せて、鉛濃度を目的変数にとり、重回帰分析を実施した。全ての検定の有意水準は0.05とした。統計分析はフリーソフトのStata(ver. 14.0)を使用した。

結果

測定した血中鉛濃度の結果を表1-13に示した。重回帰分析の結果、地域による濃度差は見られなかったが(P> 0.05)、時期では全ての時期間で有意な差がみられた(表1-14：図1-9)。各時期の血中鉛濃度の中央値は、秋の渡り時期が1.00μg/dL、越冬期が2.00μg/dL、春の渡り時期が1.97μg/dL となった(図1-9)。

考察

ユリカモメの血中鉛濃度は秋の渡り時期から越冬期にかけて有意に増加し、越冬期から春の渡り時期には減少したものの、春の渡り時期の血中鉛濃度は秋の渡り時期に比較して高値となった。鉛の体内動態の知見によれば、経口で曝露した鉛は速やかに血中に移行して全身を循環し、また速やかに、そのほとんどは腎臓から排出される(Ishizuka 未発表)。調査対象のユリカモメは日本に飛来する秋の渡り時期から、その後の越冬期にかけて有意に血中の鉛濃度は増加した。同一個体を複数買い採血できていないものの、個体群として鉛汚染の傾向を考慮すると、調査対象のユリカモメは国内で汚染が生じていることが考えられる。また、この汚染に地域差がみられなかったことから、東京湾及び三河湾では同程度の鉛汚染が発生している可能性がある。

本調査対象の個体群の越冬期間の行動域は明らかになっていないが、これまでに行われた鳥類標識調査による足環番号の回収記録(牛根 未発表)と環境省が実施する発信機による行動追跡調査の結果(環境省 未発表)から両個体群の行動域が推定される。この行動域をすべて含むように円を描き、産業技術総合研究所地質調査総合センターが1999年から2006年にかけて調査された海洋の鉛濃度の底質調査結果を合わせると、東京湾群と三河湾群の行動域には、同程度の鉛濃度が分布していることが示唆される (図1-10)。この底質調査結果は、2つの個体群間に鉛濃度の有意差がみられなかったという本調査結果と符合し、本調査結果はこれらの地域に通年生息していていない、冬季のみ生息するユリカモメにおいて

も、地域的な鉛汚染が反映されることが示唆された。

表1-13. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年に捕獲した三河湾群、計170羽の性、齢、血中鉛濃度の内訳

n はサンプルサイズ、ハイフンは該当なしを示す

群	性	齢	n	血中鉛濃度 (μg/dL)		
				中央値	最大値	最小値
東京湾群	雄	Adult	59	2.75	21.23	0.18
		Yearling	3	1.00	3.00	1.00
	雌	Adult	55	4.00	26.05	0.23
		Yearling	1	0.48	-	-
三河湾群	雄	Adult	11	4.29	28.90	0.91
		Yearling	3	1.00	3.00	1.00
	雌	Adult	34	3.25	31.60	1.30
		Yearling	4	1.18	3.50	0.80

表1-14. 血中鉛濃度を目的変数としたときの地域と時期の重回帰分析の結果

説明変数 (サンプルサイズ)	Coef.	P 値	95% CI
地域 (170)	0.16	0.06	-0.00 – 0.32
越冬期 (77)	Reference		
秋の渡り時期 (41)	-0.59	0.0001>	-0.76 − -0.42
春の渡り時期 (52)	-0.26	0.001	-0.42 − -0.10
秋の渡り時期 (41)	Reference		
越冬期 (77)	2.12	0.03	0.19 – 4.05
春の渡り時期 (52)	2.00	0.04	0.08 – 4.34

Coef. は決定係数、95% CI は95%信頼区間を示す。Reference は有意性を検証する際の基準とした項目を示す。

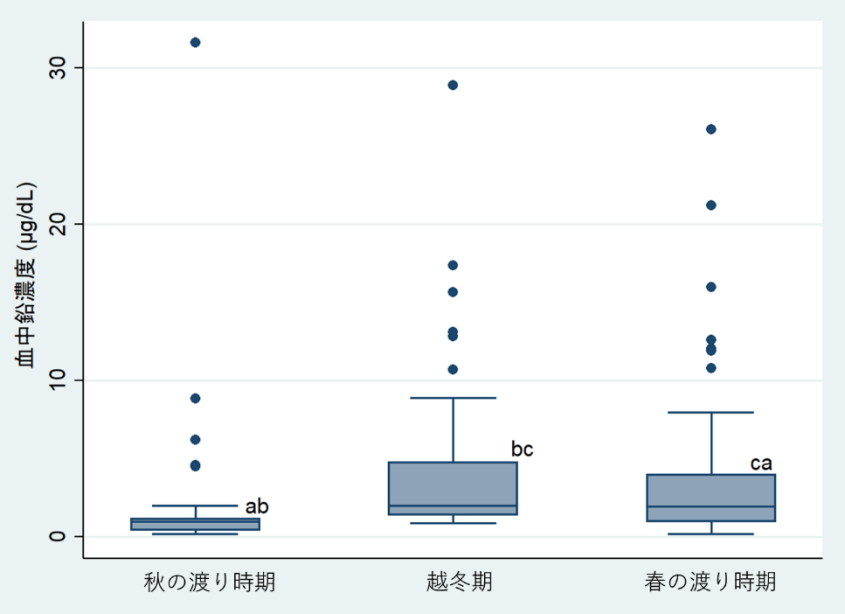


図1-9. 血中鉛濃度(µg/dL)の時期の推移

同一アルファベット間で有意差がみられたことを示す。ドットは外れ値を、上下のバーは箱ひげ図の上限と下限を示す。

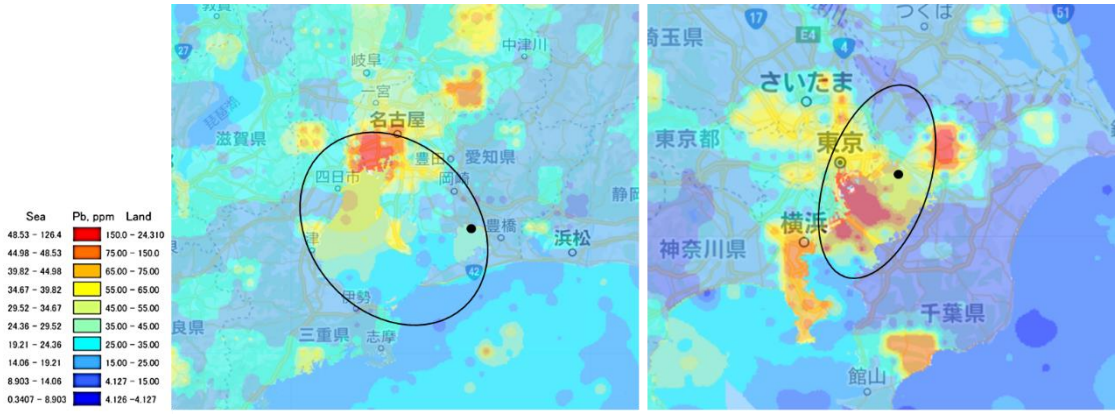


図1-10. 海洋の底質調査における鉛濃度(産総研地質調査総合センターウェブサイト(閲覧日 2021年9月6日 URL: https://gbank.gsj.jp/geochemmap/gmaps/map.htm)とユリカモメの標識調査記録

右地図は東京湾、左地図は三河湾を示し、共に黒点は捕獲地点を示す。これまでの標識調査から得られた推定される行動域を黒枠で囲っている。両行動域について、東京湾と三河湾の海洋の底質中の鉛濃度は共に薄緑色の中程度の鉛濃度を呈しており、なおかつ近隣に高濃度の地域が存在するという共通の特徴がみられる。

第3節 ユリカモメの鉛汚染源を推定する

序論

前節から、調査対象のユリカモメが国内で鉛汚染をうけていることが明らかになった。鉛の生体影響は、濃度によって多様な影響を及ぼすという特徴がある(De Francisco *et al*., 2003)。鳥類は死亡量の汚染を受けると、臨床症状を呈さずに速やかに死亡すると報告される(Pain *et al*., 2009)。中毒量の汚染では、様々な非特異的症状を呈するが、卵殻の形成不全や行動異常といった症状を呈した場合、種の存続への影響が懸念される(Pain *et al*., 2019)。実際に、スズメ目のシジュウカラでは卵の卵膜上に存在する精子数に鉛汚染濃度と有意な負の相関が報告され、繁殖成功率に影響が生じると指摘されている(Dauwe *et al*., 2004)。種によっては、既に鉛汚染の影響によって種の存続が危惧されている(Hernández and Margalida, 2009; Kendall *et al*., 1996; Pain *et al*., 2019)。カリフォルニアコンドル(*Gymnogyps californianus*) では鉛散弾に汚染された獣肉の摂食により、1982年から1986年に急激に個体数を減少させ、現在では1000羽程度が生息するのみとなっている (Wiemeyer *et al*., 1988)。カオジロオタテガモ(*Oxyura leucocephala*)では鉛汚染が原因で10年以内の短期間で急激に個体数を減らし、現在では絶滅の危機に瀕している(Mateo, 2009a; Wiemeyer *et al*., 1988)。

鉛の汚染は急死という形以外にも、緩やかな影響の結果として種の存続を脅かす恐れがあることから、国内において生物への鉛汚染は根絶しなければならない。そこで、本節では国内での鉛汚染の実態把握に繋げるために、調査対象のユリカモメの汚染源を推定することを目的として調査を実施した。

解析方法

1. 調査地域における環境中の鉛に関する知見

ユリカモメの鉛汚染源として、ユリカモメが接する、水(海・湖沼)、土壌、大気、そして餌が挙げられる。水の内、下水は水質汚濁防止法に基づき鉛の排水基準濃度は0.1mg/L と定められている(環境省. 2021年9月6日 閲覧. URL: https://www.env.go.jp/water/impure/haisui.html)。上水道は水道法によって水道水質基準が定められ、鉛は0.01mg/L とされている(厚生労働省. 2021年9月6日 閲覧. URL:

https://www.mhlw.go.jp/shingi/2002/12/s1209-5c.html)。

本調査地が接する自治体はいずれも数か月に1回の頻度で上下水道の水質検査を実施しているものの、鉛の検査結果は基準値以下と記されている(東京都水道局. URL: https://www.waterworks.metro.tokyo.lg.jp/suigen/kekka/r02.html, 千葉県環境生活部水質保全課. URL: https://www.pref.chiba.lg.jp/suiho/press/2021documents/20210811_sokuteikekka.pdf, 愛知県. URL: https://www.pref.aichi.jp/soshiki/suishitsushiken/0000083587.html, 2021年9月6日閲覧)。

上下水道に含まれない水域の底質調査には、鉛の基準値が設けられていない。そのため、測定されている場合、具体的な数値が公開されている。東京湾(35° 34'N, 139° 55'E)では2016年の調査において水深10m程度の地点で約20mg/kg (環境省. URL: https://www.env.go.jp/press/files/jp/105660pdf, 2021年9月26日閲覧)、三河湾では2019年度で底質に37 mg/kgと、両地域共に上下水道の基準値以上の鉛濃度が含まれている (愛知県水大気環境課. URL: https://www.pref.aichi.jp/soshiki/mizutaiki/koukyou2019data.html, 2021年9月6日閲覧)。東京湾に繋がる河川の底質調査結果を参照すると、江東区は2020年度で64.6～208 mg/L(江東区. URL: https://www.city.koto.lg.jp/380303/machizukuri/sekatsu/suishitsuosen/7308.html, 2021年9月6日閲覧)、江戸川区は2020年度に乾燥重量で13～89 mg/kg(江戸川区. URL: https://www.city.edogawa.tokyo.jp/documents/1221/r2_teisitu.pdf, 2021年9月6日閲覧)と報告されている。千葉県は海域と河川の底質検査の詳細は公開されていない(千葉県. URL: https://www.pref.chiba.lg.jp/suiho/kasentou/koukyouyousui/index.html, 2021年9月6日閲覧)。これらの公開情報を踏まえると、水環境は上下水道では極めて低濃度であるが、底質では上下水に比較して数倍以上の鉛が存在していることが示唆される。

土壌については、土壌汚染対策法に基づいて塗装を扱う工場を対象に、土壌検査が求められている。この検査で鉛は土壌含有量基準が150mg/kg 以下と定められている(環境省. URL: https://www.env.go.jp/kijun/dt1.html, 2021年9月6日閲覧)。一部の事業者が検査対象となるため、具体的な検査結果は公表されていない。2000年に全国の自治体を対象に土壌中の鉛濃度が調査され(中西 準子 *et al.*, 2006)、その報告によると、東京都が最も高く、ついで大

阪、愛知の順に高い汚染濃度として示されている(図1-11)。

大気は、2002年に改正された大気汚染防止法の検査項目に鉛に関する基準値は設けられておらず(環境省. URL: https://www.env.go.jp/air/osen/law/, 2021年9月7日閲覧)、近年の自治体による検査報告は存在しない。中西 準子 *et al.* (2006)は国設大気測定局の1974～1997年のモニタリングデータと各地方自治体のモニタリングデータを解析し、1970年代から2003年にかけて大気中の鉛濃度が減少傾向にあることを報告した(図1-12)。この減少には1970年代から有鉛ガソリンの規制が強化された背景がある(立木清廣, 1990)。2021年8月30日にアルジェリアで、地球上で唯一の有鉛ガソリンの販売が終了したことを鑑みると(CNN. URL: https://www.cnn.co.jp/business/35175956.html, 2021年9月7日閲覧)、大気中の鉛濃度は現在も減少傾向にあると考えられる。

餌について、鉛の最大の汚染経路は経口とされていることから(Badry *et al.*, 2020)、ユリカモメの採餌内容を確認することは重要である。ユリカモメは雑食性とされ(Kubetzki and Garthe, 2003)、人間社会で発生するゴミ(Vernon, 1972)や積極的な餌付けによる菓子(Feng and Liang, 2020)に依存することがある。越冬期間のユリカモメの採餌内容を解析する最も簡潔な方法は、越冬期間中の食性解析である。鳥類の食性を解析する方法は、胃洗浄によって胃内容物を採取する方法(Barrett *et al.*, 2007; Provencher *et al.*, 2019)、あるいは、把握した時期に形成された羽を採取し、羽に含まれる安定同位体から安定同位体比を算出して、その羽の形成に使用された餌生物を推定する方法(Stearns, 2010; Thompson and Furness, 1995)が挙げられる。安定同位体比の解析手法について、次に説明を行う。

2. 安定同位体比について

食餌からに含まれる安定同位体の内、炭素は14C、13C、12C、窒素は15N と14N が存在する。環境中の割合は炭素では12C が98.9 %、窒素では14N が99.63%を占める(Coplen *et al.*, 2002)。炭素と窒素の安定同位体比は、炭素が13C/12C の比(δC)、窒素が15N/14N の比(δN)として測定される (総称を δCN とする)。δN は食物連鎖を介するほど増加するという特徴がある(Cabana and Rasmussen, 1994)。そのため、生態ピラミッドの高次捕食者ほど、体内のδN が増す(Inger and Bearhop, 2008)。一方、δC は動物の食物連鎖の影響ではなく、その個体

が捕食した生物の有する δC を反映するという特徴がある(DeNiro and Epstein, 1978)。δC のもう1つの特徴は、餌資源に利用した植物の光合成機序によって変化する点である。C3植物を餌資源として利用した場合、C3植物は大気中の12C を使用する化学反応が素早く進むので、採餌した動物は12C の含有割合が高まる。C4植物は化学反応に使用する炭素は同位体間で差が少ないため、C3植物よりも相対的に12C 含有割合が少ない。海洋中の藻類では、海水中の限られた炭素原子を利用しているため、陸上の C3植物よりも相対的に13C の含有量が高くなる(Kelly, 2000)。

安定同位体比を用いた食性解析は、ヒト(Kusaka *et al*., 2010)をはじめ、魚類(Tulli *et al*., 2020)や鯨類(Smith *et al*., 2021)をはじめ、様々な生物群で用いられている。鳥類は、安定同位体比が食性解析に用いられ始めた1970年代当時から使用されている(Matsubara and Minami, 1998; 杉崎宏哉, 2017)。鳥類の安定同位体比の解析には、主に羽が使用される(Meier *et al*., 2017)。これは、δCN が羽の形成時期に羽内に取り込まれることに基づいている(Mazerolle *et al*., 2005)。

3. ユリカモメの食性の解析方法の検討

ユリカモメの食性解析をする上で、胃洗浄は捕獲個体1羽ごとにある程度の作業時間が必要となるため、限られた調査時間の中で実施する本調査にとっては現実的な手法ではない。残された手法として、越冬期間中に生えた羽を採取し、安定同位体比を測定する方法であるが、この手法はユリカモメの換羽様式の点から、実施は非常に困難である。この理由はユリカモメの換羽様式にある。ユリカモメは繁殖を終えた時期の晩夏に、全身の羽を換羽する。越冬期間中は翼と尾羽を除く体部の羽が次第に生え代わり、繁殖期間の前までに体部の羽の換羽は完了する(Walters, 1982)。体部の羽は頭部を除いて通年白色であるため、越冬期間中に生え変わったか否か判別できない。頭部の羽は越冬期間中に次第に黒色になるものの、頭部が黒色の個体を選択的に捕獲することは容易ではない。以上の点から、越冬期間に生えた羽を採取して安定同位体比を解析する方法は選択せず、本節では、ユリカモメの食性解析に、繁殖期間の食性から越冬期間の餌の嗜好性を推定するというアプローチで調査を実施した。解析に使用する羽は、確実に繁殖期間に生えた羽を対象とするため、

翼を構成する風切羽と同じ換羽様式の初列大雨覆羽(大雨覆羽)を使用した。

4. 試料の採取と解析方法

解析対象は、東京湾群は2016年12月から2017年2月に捕獲した成鳥雄10羽と雌11羽、三河湾は2020年12月から2021年3月に捕獲した成鳥雄7羽と雌8羽の大雨覆羽を使用した。上述の個体から、大雨覆羽を2枚採取した。成鳥を対象とした理由は、ユリカモメの生態として、若齢のユリカモメは queing と称され、より確実な繁殖機会を得るために出自コロニー以外のコロニーに容易に移動する可能性があることに加え(Coulson *et al*., 1984)、ユリカモメは幼鳥と成鳥で必要な栄養素が異なることが示唆されている(Cantos *et al*., 1994)ためである。

採取した大雨覆羽は、既存研究に倣い、以下の手順で測定前準備を行った(Bearhop *et al*., 2002; Cherel *et al*., 2000)。最初に、クロロホルム2：メタノール1の割合で調整した混合溶液で洗浄した後、1~2日間、風乾した。乾燥させた大雨覆羽を、純粋30: 中性洗剤1の割合で混合した洗浄液で30秒間洗浄し、その後、純粋で洗浄液をすすいだ。すすぎ終えた大雨覆羽は1~2日風乾させた後、1mm程度にカットし、電子天秤ですべてのサンプルの重量が1mg ±0.1mg になるように揃えた。

安定同位体比の測定は、北海道大学オープンファシリティの安定同位体比質量分析システム(Iso Prime 100、Elementar、UK)を使用した。標準試料として L-Alanine (δ15N：8.70‰、δ13C：−19.6 ‰、Shoko science、Tokyo)を用い、10 試料ごとに測定した。標準試 料の繰り返し分析に基づき算出した安定炭素同位体比の誤差は±0.03 ‰であった。

5. 統計解析

得られた同位体比は、個体群ごとに δ15N 及び δ13C それぞれで Shapiro-Wilk test を行い、正規性を確認した。個体群間の δ15N 及び δ13C の差の検定を実施する前に、性差を検定した。正規性が認められた場合には、性差は Student の t 検定を、認められなかった場合には Mann–Whitney の U 検定を用いた。性差が認められた場合には性を分け、認められなかった場合には性を混合して δ15N 及び δ13C の個体群間の差を検定した。個体群間の差の検定には、正規性が認められる場合には多変量分散分析を、認められない場合には Steel-Dwass

testを用いた。ユリカモメは、これまでの国内のユリカモメの標識調査により、毎年特定の地域に飛来する習性がある(Ornithology, 2002; Sugawa, 1984)。そのため、本調査では、調査年度を問わず、東京湾及び三河湾の調査地域で捕獲された個体をそれぞれの個体群として定義した。全ての分析の有意水準は0.05とし、統計分析はフリーソフト R (ver. 3.5.0) 及び Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

δ15N 及び δ13C の分析結果を表1-15に記す。δ15N は10.00～20.00‰で推移し、δ13C は-25.00～-15.00‰で推移した。δ15N と δ13C は共に正規性を示したため、Student の t 検定を実施した結果、性差は認められなかった(δ15N P= 0.09、δ13C P= 0.60)。雌雄を混合して、多変量分散分析を実施した結果、2個体群のδ15N及びδ13Cには有意な差は見られなかった(P= 0.176、図1-13)。

考察

個体群間に差がみられなかったことから、東京湾群と三河湾群は、繁殖期には類似する餌資源を摂食していると考えられる。δ13C は食物連鎖の起点となる生産者を反映する(Jabot *et al*., 2017)。植物の δ13C は、C3植物でおよそ-25 ‰以下となり、C4植物で-15 ‰以上となる(Berto *et al*., 2019)。海洋の海藻や植物プランクトンでは C4と C3植物の間の-27～-15‰に位置する(Chisholm and Koike, 1999; Gladyshev, 2009)。生産者はこれらの範囲を保ちながら、人間社会から放出される二酸化炭素量といった大気と土壌中の炭素量によって多少変動し、消費者はこの生産者の δ13C に由来する(Saugier *et al*., 2012)。δ15N は食物連鎖の上昇に伴って増大する(Minagawa and Wada, 1984)。生産者である植物の δ15N は大気、土壌中の窒素に依存する(Saugier *et al*., 2012)。植物を採餌する一次消費者は、生物としての寿命や窒素代謝の速さから、人間社会からの下水などの窒素含有量の高い水環境に影響を受けない限り、顕著な地域差は生じないことが考察されている(Cabana and Rasmussen, 1996)。ユリカモメは、繁殖期及び越冬期を問わず、人間によって整備された土地やその環境から発生する餌資源のような、生活環境を利用する生態をもつことから(Maciusik *et al*., 2010; 平田和彦, 2007)、通年で窒素、炭素の影響を受けている可能性がある。これらの知見に基づいて、

本結果(δ15N: 10.00～20.00‰、δ13C: -25.00～-15.00‰)を考察すると、δ13C は海洋で窒素固定をする植物に由来していると推定される。δ15N は海洋生物で推定された数値(Chikaraishi *et al*., 2009; Popp *et al*., 2007)を参考にすると、一次消費者の貝や甲殻類(力石嘉人 *et al*., 2010)が該当した(図1-14)。

この結果から、調査対象のユリカモメは繁殖期には海洋の底質に生息するような貝や甲殻類を嗜好し、採餌していることが推定される。そのため、越冬期においても、この嗜好性によって類似する生物を採餌している可能性がある。ユリカモメが留鳥として生息するポルトガルのテージョ川河口自然保護区の潮間帯地域の調査では、ユリカモメは繁殖期にゴカイ(*Hediste spp.*)、越冬期に二枚貝の *Scrobicularia plana* を主の餌資源とする(Moreira, 1995)。この知見は、本調査結果である繁殖期の採餌内容の推定と越冬期における採餌内容の可能性を支持する。

本調査では汚染源と推定された餌生物の鉛含有量の測定を実施しておらず、実際に調査地に生息する海洋生物がどの程度鉛に汚染されているのかは明らかではない。そのため、本調査結果は以下の既存知見を使用して考察を行う。国内の海洋生物の知見として、貝類は底質に存在する重金属を容易に取り込みやすい生物である(Mohanraj *et al*., 2021)。貝類は鉛を食物と共に摂食することで、筋肉中に蓄積させるが(Benaltabet *et al*., 2021)、一部の貝の種類では貝殻が鉛の吸着材として着目されるように、海水と接触する貝殻で鉛の親和性が高い種類もいる(Issabayeva *et al*., 2006; 道川慧太 *et al*., 2014)。鉛はカルシウムを標的として置換し、カルシウムが吸着すべき部位に優先して吸着する性質を持つ(Bushnell and Jaeger, 1986)。このため、鳥類や哺乳動物では鉛汚染による骨の脆弱化がみられる(Pain *et al*., 2019)。貝類では、海洋という外界に貝殻という炭酸カルシウムが露出することで、他の海洋生物よりも鉛を含有しやすい生物であると考えられる。これらの知見を合わせると、国内に越冬するユリカモメが繁殖期と同様の嗜好性を有している場合には、調査地域の海洋の底質中に存在する鉛に汚染された一次消費者を採餌することによって鉛汚染を受けている可能性がある。

表1-15. 2016年12月から2017年2月に捕獲した東京湾群、2020年12月から2021年3月に捕獲した三河湾群の窒素の安定同位体比(δ15N)及び炭素の安定同位体比(δ13C)の測定結果

個体群	性 (n)	δ15N (‰)	δ13C (‰)
東京湾群	雄 (11)	13.73 ±2.60	-19.05 ±2.62
	雌 (10)	12.29 ±2.02	-19.55 ±3.63
三河湾群	雄 (7)	14.46 ±2.27	-19.96 ±3.66
	雌 (8)	13.78 ±2.22	-19.90 ±4.39

n: サンプルサイズ、数値は平均値±標準偏差 (1SD)を示す。

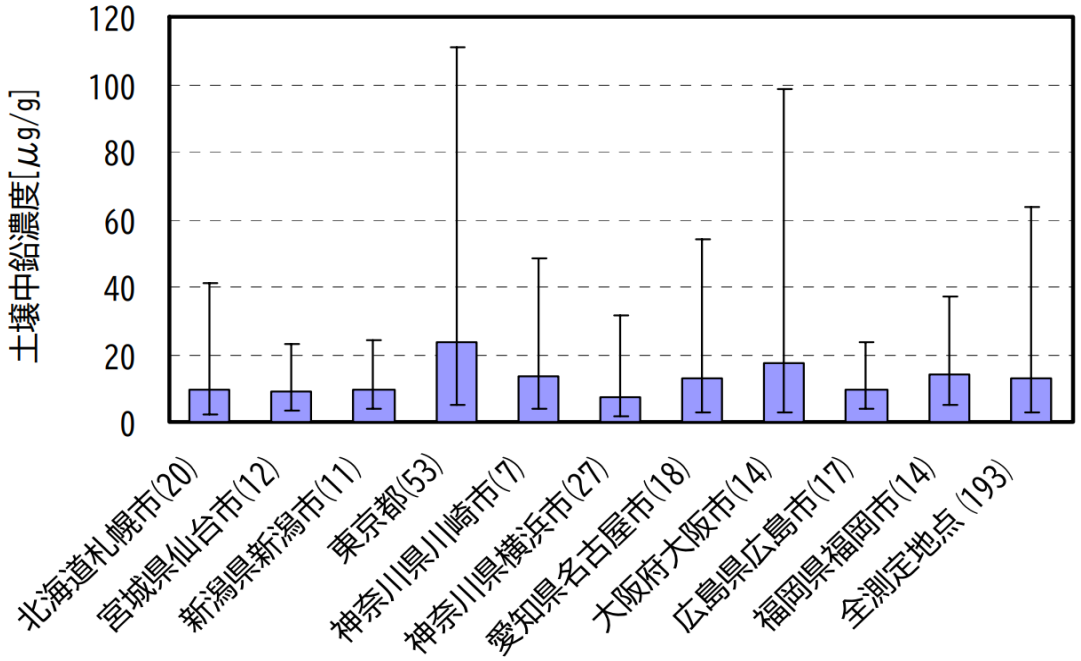


図1-11. 土壌中鉛濃度の調査結果。中西ほか(2006) より抜粋

2000年に全国の自治体を対象に行われた調査結果に基づいている。箱ひげは5%値－幾何平均値－95%値を示す。括弧内は計測地点を示す。

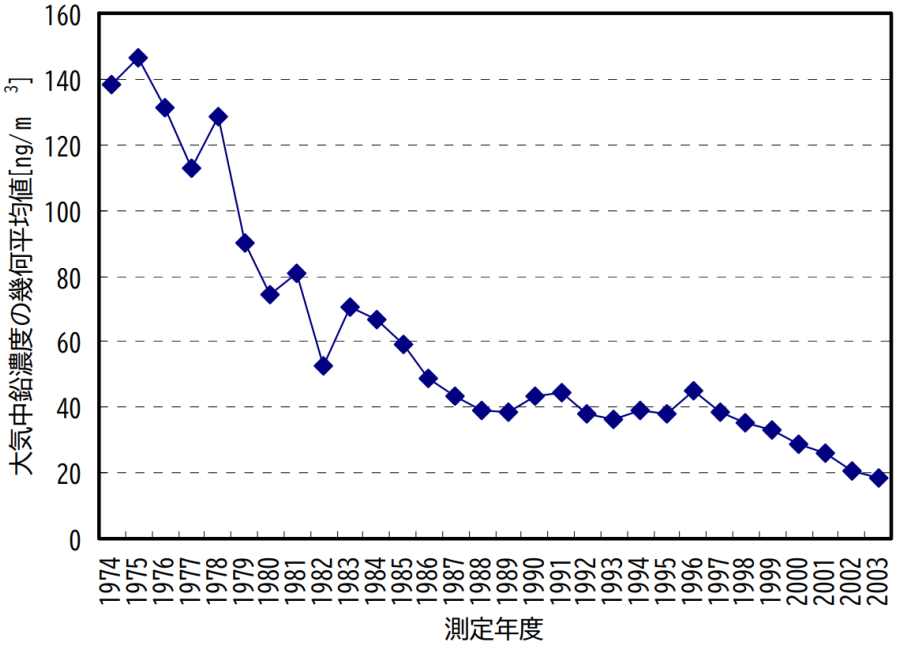


図1-12. 大気中の鉛濃度の推移。中西ほか(2006) より抜粋

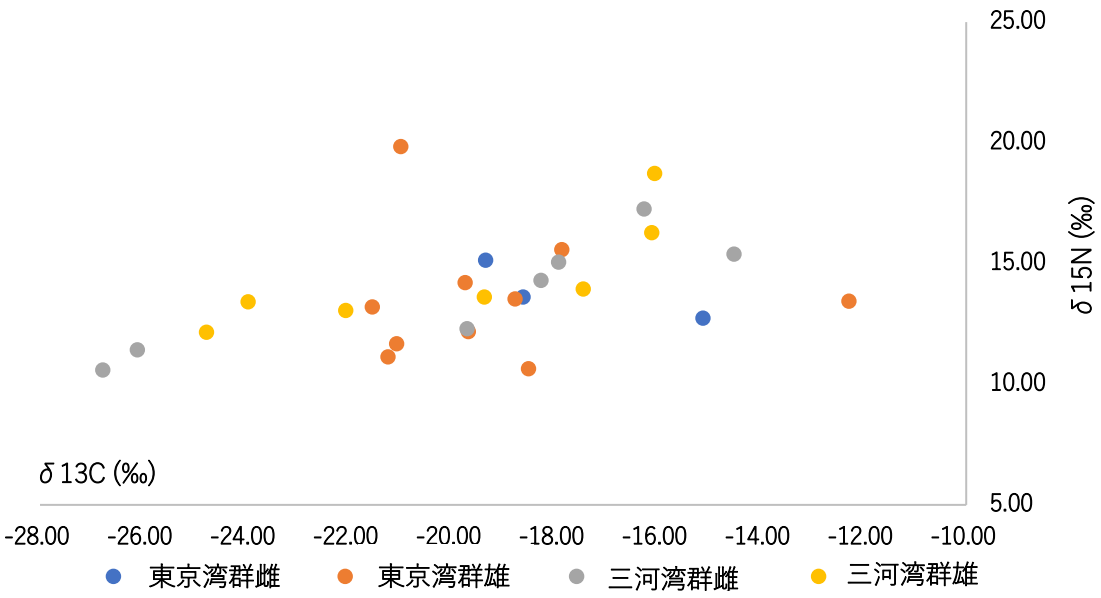


図1-13. 2016年12月から2017年2月に捕獲した成鳥雄10羽と雌11羽(東京湾群)、2020年12月から2021年3月に捕獲した成鳥雄7羽と雌8羽(三河湾群)から得られた窒素原子の安定同位体比(δ15N)及び炭素原子の安定同位体比(δ13C)の雌雄ごとの散布図

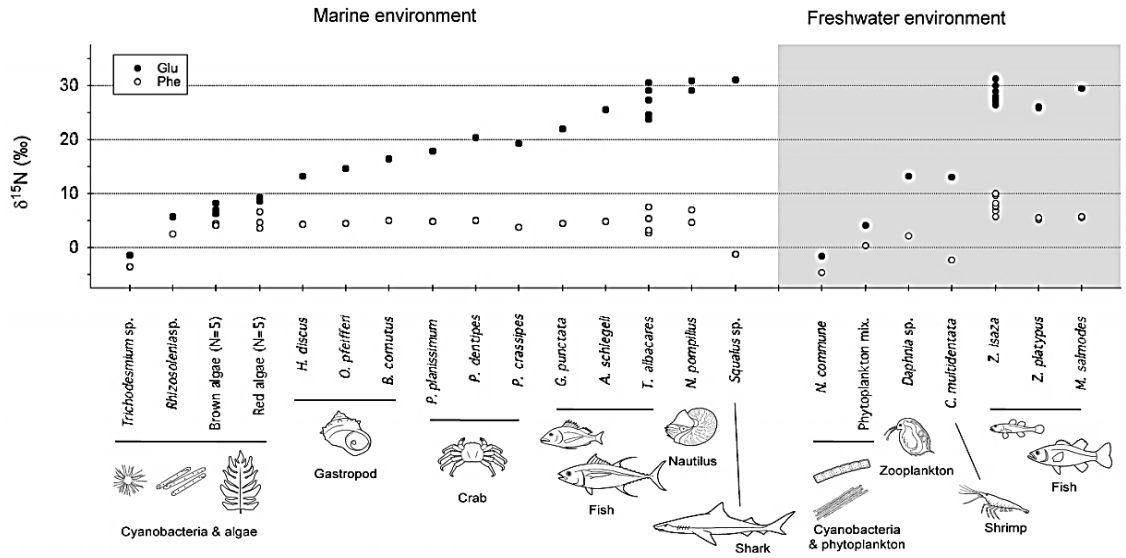


図1-14. 海洋の δ15N の推移。力石ほか(2010)より一部抜粋.

第4節　鉛汚染が免疫項目に及ぼす影響とその濃度を把握する

序論

鉛汚染はヒトを含めた多くの動物種で報告されており、その生体影響の特徴は汚染濃度によって、様々な影響を引き起こす点にある(Levin *et al*., 2020)。鉛の生体影響は影響量で様々な影響が報告されている。イヌワシ(*Aquila chrysaetos*)では2.5µg/dL の血中鉛濃度で飛行高度が10%低下する(Ecke *et al*., 2017)。オオハクチョウ(*Cygnus cygnus*)では血中鉛濃度44 µg/dL 以上で越冬期間中の体重が有意に減少する(Newth *et al*., 2016)。マガモでは孵化した雛と卵殻の鉛濃度は相関し、雛の血中鉛濃度18µg/dL 以上の時に成長遅滞が有意に生じる(Vallverdú‐Coll *et al*., 2016)。シジュウカラでは羽に含まれる鉛が乾燥重量150ppm 以上の雄は50ppm 以下の雄に比較して、有意に縄張りを主張する地域面積が小さくなる(Gorissen *et al*., 2005)。生体影響の内、免疫機能への影響は見かけ上健康な影響量の汚染で報告される(Vallverdú-Coll *et al*., 2019)。鳥類の免疫機能に対する鉛の作用機序は解明されていないが(Rocke and Samuel, 1991; Snoeijs *et al*., 2005)、マガモでは幼鳥は血中鉛濃度10µg/dL 以上でヘルパーT 細胞の活性を有意に抑制する(Vallverdú-Coll *et al*., 2019)。野外のカナダガン(*Branta canadensis*)では鉛汚染とコクシジウム症による死亡が関連付けられ(Locke and Bagley, 1967)、鉛曝露実験では二ホンウズラ(*Coturnix japonica*)の大腸菌感染率は、鉛の高汚染群が低汚染群に比較して低かったのに対し、抗ウイルス作用を持つ Toll-like receptor-3の発現量は高濃度群で有意に減少することが報告されている(Nain and Smits, 2011)。

鉛は種差や病態が多様なことから、汎用的な閾値が設けられていないが、鉛汚染が種の存続に影響する鳥種では、中毒レベルを示す血中鉛濃度の基準が示されている。すなわち、カモ目(Martinez-Haro *et al*., 2011)とタカ目(Order, Accipitriformes)(Walters *et al*., 2010)では20µg/dL、タカ目のうち、魚食性のタカ科オジロワシ属(BEDROSIAN and CRAIGHEAD, 2009)では40µg/dL とされる。

本調査対象のユリカモメは汚染の基準値は提唱されていないものの、これまでに生体影響として繁殖への影響が報告されている(Kitowski *et al*., 2017a; Migula *et al*., 2000; ORŁOWSKI *et al*., 2007)。基準値が定められていないことから、本調査では免疫機能への影

響ではなく、免疫項目の検査値の変動を鉛汚染が及ぼすのか、調査を試みた。

第4節-1. 鉛汚染が免疫項目に及ぼす影響を確認する

解析方法

前節で地域的な鉛汚染に差がないことを確認した個体群を対象に、免疫機能の検査項目(WBC、Het、Lym、H/L 比、CD4、CD8α)と血中鉛濃度との間で Speaman の順位相関係数を用いて、関係を解析した。年齢は Yearling のサンプルサイズが小さかったことから、前節と同様に年齢は混合して調査に用いた。全ての分析の有意水準は0.05とし、統計分析はフリーソフト R (ver. 3.5.0) 及び Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

Het(ρ= 0.22, P= 0.004)、Lym(ρ= -0.22, P= 0.003)、H/L 比(ρ= 0.22, P= 0.003)が血中鉛濃度と有意な関係があった(図1-15)。すなわち、Het と H/L 比は血中鉛濃度と正の相関があり、Lym は負の相関がみられた。WBC、CD4、CD8α は有意な関係性はみられなかった。

考察

リンパ球は、獲得免疫に寄与する他、病原体の防御や免疫系の維持に機能するため、割合の減少は病原体への易感染状態を引き起こすと考えられている(Sharma, 1997)。ヘテロフィルは自身が自然免疫に機能するが、ヘテロフィルの過度な増加を引き起こす炎症反応は、慢性化すると骨髄由来抑制細胞の産生亢進を引き起こす(Maxwell and Robertson, 1998)。骨髄由来抑制細胞は、炎症メディエーターのサイトカインのプロスタグランジン(PG)E2、インターロイキン(IL)-6、IL-1β を産生し、これらのサイトカインは免疫機能の抑制や炎症組織のがん化を引き起こす(Wang and DuBois, 2015)。そのため、本調査結果で得られた血中鉛濃度の増加によるヘテロフィルの増加とリンパ球の減少は、免疫機能に抑制の影響を引き起こした可能性が考えられる。

リンパ球とヘテロフィルの比 H/L 比は、鳥種ごとにその比が維持されている(Minias, 2019)。この H/L 比の逸脱は、慢性のストレスの曝露や飢餓といった、体調にとって正常ではない状態を意味する(Totzke *et al*., 1999)。ユリカモメは通常、リンパ球がヘテロフィルよりも多

いので、H/L 比は1より小さくなる(Ushine *et al*., 2020)。本調査では H/L 比は血中鉛濃度と正の相関が認められたことから、血中鉛濃度の増加は H/L 比の増加を引き起こすことが示され、免疫機能が平常時から逸脱した状態に寄与していることが示唆された。

本結果より、CD4と CD8α には、血中鉛濃度は有意な影響を及ぼさなかったことが示唆された。CD4と CD8α と同じ免疫分子に関する鉛曝露の影響として、マウスの曝露実験では、0.8μg/dL の血中鉛濃度の時、免疫機能の調節を担う IL-2の有意な増加と、二次リンパ組織で産生され獲得免疫に寄与する IL-4の有意な減少が引き起こされる(Iavicoli *et al*., 2006)。一方で、ヒトでは3歳未満の幼児は血中鉛濃度15μg/dL 以上で IgG、IgM、IgA が有意に高くなる(Sarasua *et al*., 2000)。これらの免疫分子は、B 細胞によって産生・分泌される。一方で、本調査で検査した免疫分子 CD4、CD8α は主に T 細胞で発現する。これらの知見を踏まえると、本調査で血中鉛濃度と有意な関係性がみられなかった CD4及び CD8α は、両分子の発現に影響が生じる汚染濃度に達していなかったいう汚染濃度の可能性や、検査した免疫細胞による影響量の濃度の差異といった可能性、そして種による感受性の可能性が影響を及ぼしたと考えられる。

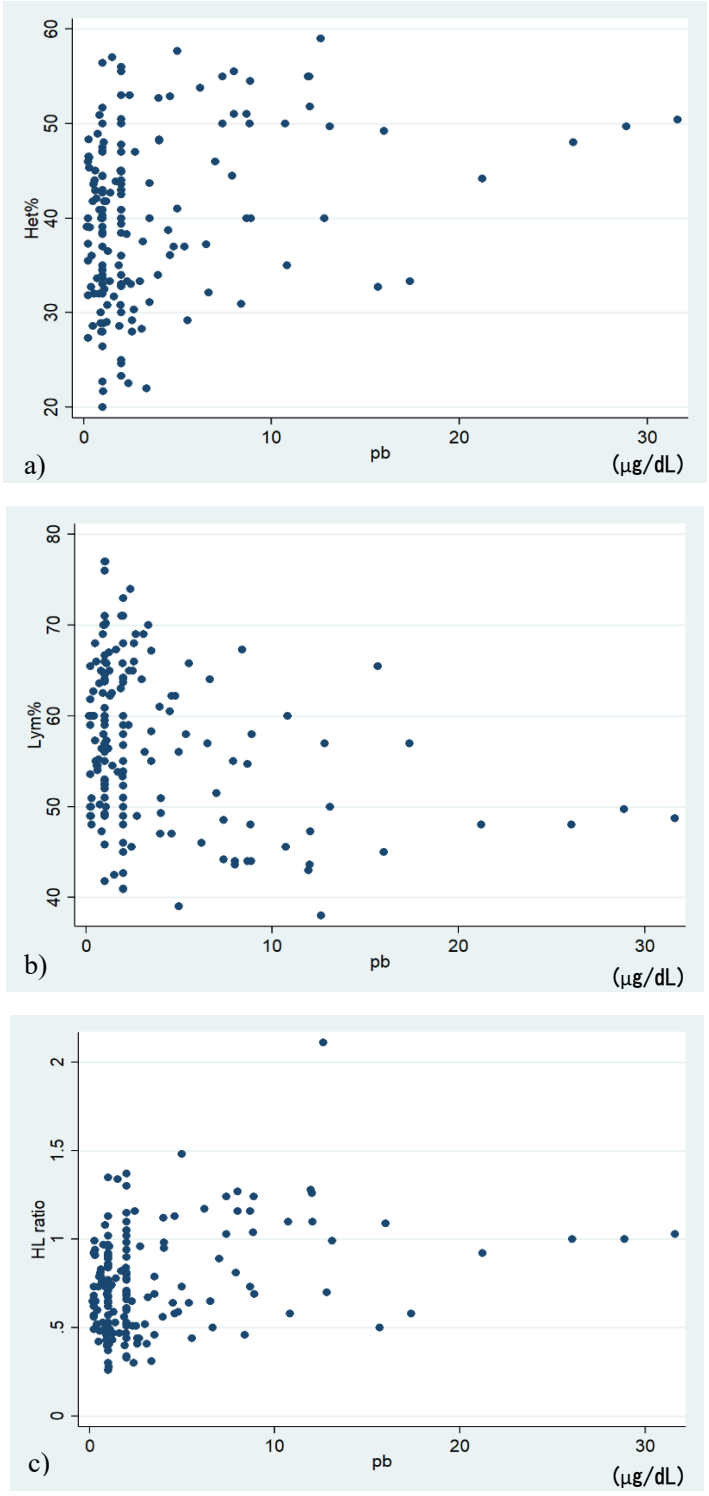


図1-15. 血中鉛濃度と有意な関係が認められた免疫機能項目

a) Het(ρ= 0.22、P= 0.004)、b) Lym(ρ= -0.22、P= 0.003)、c) H/L 比(ρ= 0.22、P= 0.003)が血中鉛濃度と有意な関係があった。なお、Het はヘテロフィルの割合(%)、Lym はリンパ球の割合(%)、H/L ratio は H/L 比を示す。

第4節-2. 免疫機能に影響を及ぼす血中鉛濃度を確認する

背景

前小節より、ユリカモメでは鉛汚染は免疫機能の指標となる血液検査項目の内、ヘテロフィルとリンパ球の割合に有意な影響を及ぼすことが明らかになった。ユリカモメは鉛汚染の繁殖影響の報告は存在するものの、免疫影響の既存知見はなく、汚染の状態を示す基準濃度は報告されていない。近年、鉛汚染はヒトを中心に低濃度の影響が次々と報告され、妊婦や子供への影響評価には ALARA：As low as reasonable achievable(合理的に達成可能な限り低く)の概念に基づいて、可能な限り鉛汚染を減らす対策が検討されている(内山巌雄 and 東賢一, 2009)。毒性学的アプローチとして、有害物質に対する閾値を設定する際には、動物実験から用量－反応曲線(図1-16)の作成が求められる(経済産業省製造産業局科学物質管理課, 2007)。現在、汚染濃度の基準値が提唱されているカモ目及びタカ目は、これまでの野生下個体の致死事例を含めた生体影響とその際の濃度、そして飼育下の中毒量以上の鉛曝露実験のデータに基づいている(Pain *et al*., 2009; Pain *et al*., 2019)。

ユリカモメでは飼育下の曝露実験が実施されていないことから、閾値を設定することが困難である。そのため、本節では、前節で血中鉛濃度と有意な関係が認められた3つの免疫項目の内、H/L 比は同様に有意な影響がみられたヘテロフィルとリンパ球の比であることから、本調査ではヘテロフィルとリンパ球の割合の2つの免疫細胞の割合を対象として、それぞれを目的変数とした時、その割合に有意な変化がみられるときの血中鉛濃度を調査した。

解析方法

前小節で対象としたユリカモメ個体群を対象として解析を実施した。測定した血中鉛濃度は、サンプル数が等しく分類されるよう、4.0μg/dL ごとに分類した。16.0μg/dL 以上はサンプルサイズの点から1つの群とした。ヘテロフィルとリンパ球の割合(Het、Lym)を目的変数として、4.0μg/dL 未満の最も低い血中鉛濃度群を Reference として、他の濃度群との間で、重回帰分析を実施し、それぞれの細胞の割合に差がみられるときの濃度を算出した。全ての分析の有意水準は0.05とし、統計分析はフリーソフト R (ver. 3.5.0) 及び Stata (ver. 14.0) を

使用した。

結果

ヘテロフィル、リンパ球共に最も低い血中鉛濃度群(4.0µg/dL未満)が、それ以上の濃度群との間で、それぞれ有意に低い、高い割合を示した(表1-16：図1-17)。

考察

本調査結果より、ユリカモメは血中鉛濃度が4.0µg/dLの濃度を境として、血液中の免疫細胞ヘテロフィルとリンパ球の割合が有意に変化することが明らかになった。すなわちヘテロフィルの割合は4.0µg/dL 未満の群で少なく、リンパ球の割合は4.0µg/dL 未満で多くなった。ヘテロフィルの割合は増加によって炎症反応に起因した免疫機能の抑制に働き(Harmon, 1998)、リンパ球の割合の減少は免疫機能の調節に抑制の影響を及ぼす(Sharma, 1991)。また、H/L 比は種ごとに一定の割合が維持されており(Minias, 2019)、H/L 比の逸脱は、慢性ストレスや飢餓といった体調にとって正常ではない状態を意味する(Totzke *et al.*, 1999)。そのため、血中鉛濃度が4.0µg/dL 以上の場合、H/L 比の増加によって種としてのH/L 比の逸脱が生じ、免疫機能に抑制影響が生じる可能性がある。

現在、鳥類で汚染の基準と提唱されている濃度はカモ目で20µg/dL、魚食性のタカ目で40µg/dL である。本節で得られたユリカモメの免疫影響はこれらの濃度に比較して低い4.0µg/dL で有意にヘテロフィルとリンパ球の割合は変化した。ヒトでは健康影響を及ぼす血中鉛濃度は10µg/dL と定められている(Registry, 2020)。一方で、児童を対象に実施されたIQ の報告では、10µg/dL 以上の群に比較して、5µg/dL 未満の児童で IQ レベルが優に低下したことが報告されたことで(Bellinger *et al.*, 1992; Canfield *et al.*, 2003; Lanphear *et al.*, 2000)、2020年に米国疾病予防管理センター(CDC)は5µg/dL をアクションレベルと設定している(CDC. URL: https://www.cdc.gov/nceh/lead/resources/scientific-publications.html, 2021年9月8日閲覧)。

鳥類の鉛汚染の免疫影響の中で、低濃度の汚染に直目した知見は見られない。しかし、ヒトの IQ の知見のように、特定の生体影響は個体単位の汚染基準とは一致しない可能性が考えられる。そのため、本調査を踏まえて、これまでに報告・提唱されている鳥類の鉛汚

染の基準値の再考や、種ごとの汚染基準の設定として、カモメ科鳥類の鉛汚染の基準を設定することが求められる。

表1-16. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽のヘテロフィル(Het)とリンパ球(Lym)における4.0μg/dL ごとの群間の重回帰分析の結果

最小濃度である Reference の群と各群との間で、Het と Lym の割合に差があるか、検定を行った。

Het (サンプルサイズ)	Coef.	P 値	95% CI
< 4.0μg/dL (129)	Reference		
< 8.0μg/dL (17)	5.80	0.01	1.71 – 9.89
< 12.0μg/dL (9)	8.13	0.002	3.02 – 13.24
< 16.0μg/dL (6)	9.70	0.003	3.39 – 16.01
16.0 ≤ μg/dL (5)	10.62	0.005	3.21 – 18.04
Lym (サンプルサイズ)	Coef.	P 値	95% CI
< 4.0μg/dL (129)	Reference		
< 8.0μg/dL (17)	-4.86	0.02	-8.94 – -0.77
< 12.0μg/dL (9)	-8.21	0.002	-13.31 – -3.12
< 16.0μg/dL (6)	-8.93	0.006	-15.23 – -2.63
16.0 ≤ μg/dL (5)	-12.14	0.001	-19.53 – -4.74

Coef. は決定係数、95% CI は95%信頼区間を示す。

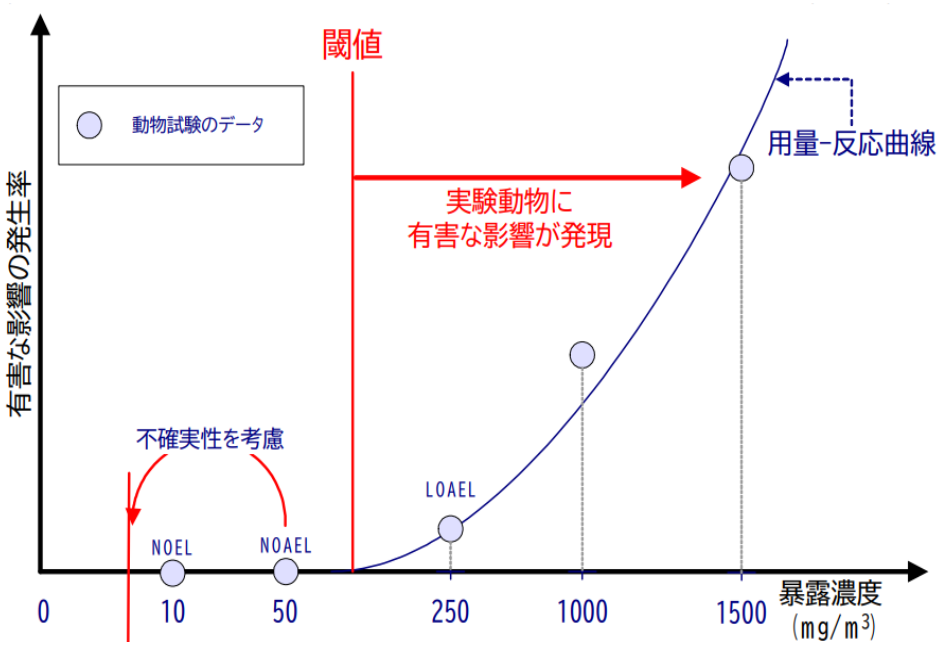


図1-16. 動物試験から得られる用量ー反応曲線とこれによって得られる閾値。経済産業省製造産業局科学物質管理課 (2007)より抜粋

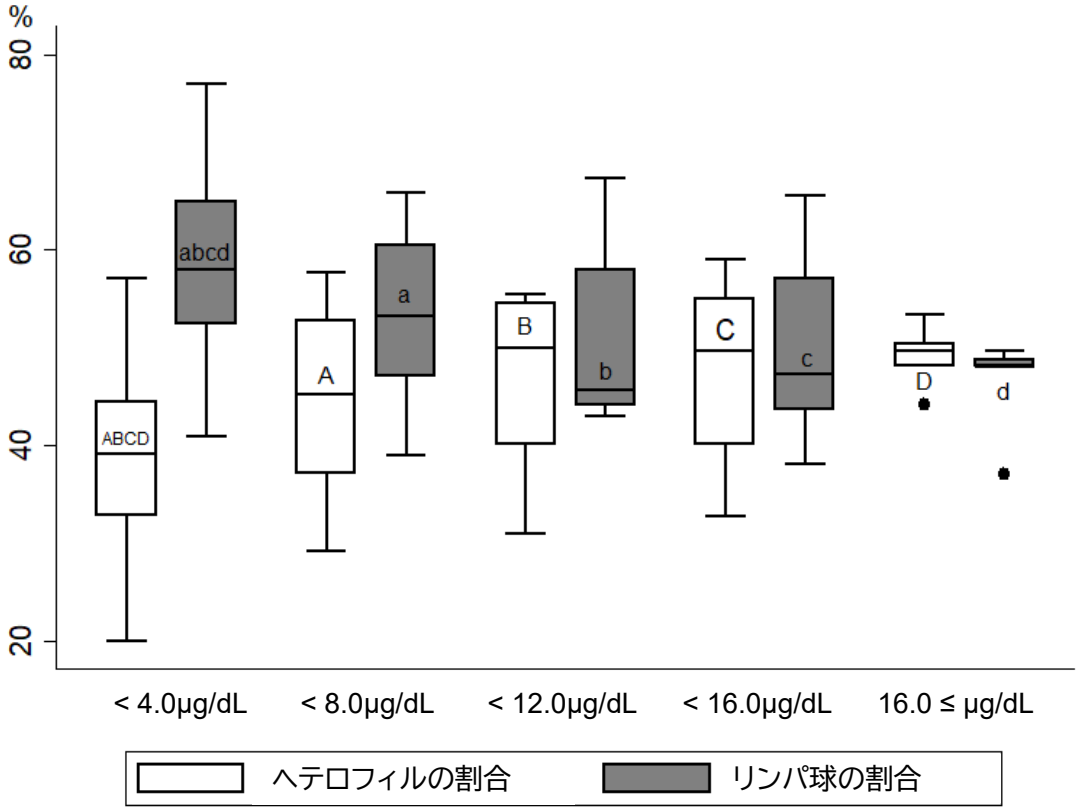


図1-17. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽における、4.0μg/dL ごとに血中鉛濃度を区分した時のヘテロフィルの割合とリンパ球の割合の結果

縦軸はヘテロフィルとリンパ球の割合(%)を、横軸は血中鉛濃度の群を示す。中央のバーは中央値(%)、上下のバーはそれぞれ箱ひげ図の最大域と最小域を示す。ドットは外れ値を示す。同一アルファベット間は重回帰分析で有意差がみられたことを示す。

第5節　Body condition が免疫機能に及ぼす影響を把握する

序論

Body condition は種の生態に密接に関与し、正常な渡り行動、繁殖行動を可能とする(Møller *et al*., 1998)。鳥類では、これらの行動と生存率とのトレードオフの存在が提唱されている(Linden and Møller, 1989)。Body condition の維持は、生体内の生理機能の維持、恒常性の維持に重要である(Bernabucci *et al*., 2005; Elmquist *et al*., 2005)。生理機能の中でも免疫機能の維持は多大なエネルギーを要するため、エネルギーを消費する行動が生じた際には、病原体の感染率を増加させる恐れがある(Bobby Fokidis *et al*., 2008)。緒言で述べた鳥類の Body condition と免疫機能の調査事例の他にも、カモメ科のキアシセグロカモメ(*Larus cachinnans*)では、PHA 試験によって T リンパ球の発現量が体重と有意な正の相関を有することが報告されている(Alonso-Alvarez and Tella, 2001)。そこで本調査では、ユリカモメにおいて、Body condition が免疫機能に及ぼす影響について評価を実施した。

解析方法

本章第1節で設定した Body condition index と免疫機能の指標となる血液検査項目を対象に、Spearman の順位相関係数を算出した。全ての分析の有意水準は0.05とし、統計分析はフリーソフト R (ver. 3.5.0) 及び Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

白血球数、ヘテロフィルの割合、リンパ球の割合、H/L 比で、Body condition index との有意な関係が示された(図1-18)。この内、白血球数とリンパ球の割合は正の相関(白血球数 ρ= 0.33, P< 0.001, リンパ球の割合 ρ= 0.22, P= 0.004)、ヘテロフィルの割合と H/L 比は負の相関(ヘテロフィルの割合 ρ= -0.21, P= 0.004, H/L 比 ρ= -0.22, P= 0.004)がみられた。CD4(ρ= 0.04, P= 0.58)と CD8α(ρ= -0.06, P= 0.40)は、Body condition index との有意な相関はみられなかった。

考察

ユリカモメの Body condition index の増加は、リンパ球の割合や白血球数と正の相関が示され、ヘテロフィルの割合と負の相関が示された。免疫検査項目の意味合いを考慮すれば、

野生下の渡り鳥にとって Body condition index の増加は免疫機能の維持に寄与することが示唆される。このため、緒言で示した既存知見で示されるような体重、筋肉量、脂肪量と免疫機能の検査項目の関係性は、ユリカモメにも適応され、Body condition index の低下は、免疫検査項目の内、免疫細胞に関係する検査項目と有意な関係性を持ち、それらの細胞の機能や量の意味合いを考慮すると、Body condition index の減少による免疫細胞の増減は、免疫機能に抑制を及ぼす可能性が示唆される。

一方で、CD4と CD8α の発現量は Body condition index に依存しないことが示された。CD4 はヘルパーT 細胞の他、樹状細胞、マクロファージに発現する分子で、これらの免疫細胞は抗原提示細胞から T 細胞へのシグナル伝達、サイトカイン産生の調節に寄与する(Yoon *et al*., 2015)。CD8α はキラーT 細胞に発現する分子で異物への攻撃に係る細胞性免疫に寄与する(Kreijtz *et al*., 2008; Okino *et al*., 2013)。CD4と CD8α の機能は抗原を検出し、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)に結合することで非自己に特異的な免疫機能を確立することであるためことから、発現には異物への曝露量が関わっている(Matson *et al*., 2020; Swain *et al*., 2012)。そのため Body condition index よりも、異物の曝露量あるいは曝露量に関連する加齢といった要素によって CD4と CD8α の発現量は影響を受ける可能性があるため、本調査で使用した、体重、筋肉量、脂肪量から設定した Body condition index という単一条件との関係性の解析では、有意な関係性が示されなかった可能性がある。

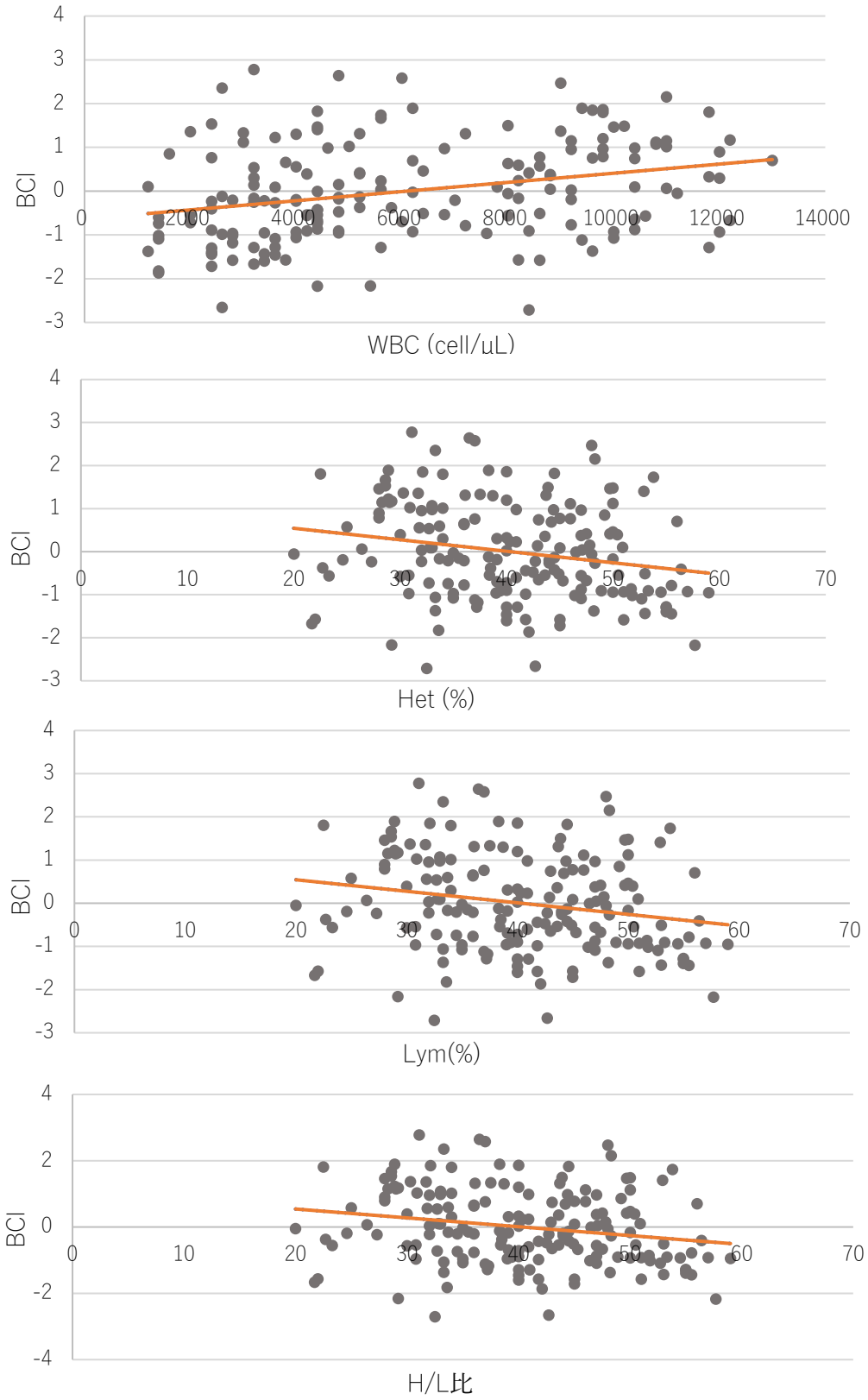


図1-18. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽における、Body condition index(BCI)と有意な関係性が示された免疫検査項目の結果

第6節　Body condition と鉛汚染が免疫機能に及ぼす影響と時期の関係を評価する

序論

これまでの調査結果から、鉛汚染濃度の増加と Body condition の低下は、免疫機能に抑制の影響を及ぼすことが示された。血中鉛濃度は時期によって有意な変動が生じ、Body condition を構成する体重や筋肉量も同様に各時期で有意に変動する(Ushine *et al*. 2017)。すなわち、免疫機能に変動を及ぼす2つの要素が時期によって有意に変動するため、免疫機能の評価に使用される血液検査項目(免疫項目)も、時期によって変動する可能性や、血液検査項目に及ぼす影響の程度に、時期による差が現れる可能性がある。

そこで本節では、これまでに確認した Body condition と鉛汚染が免疫機能に与える影響が、時期によって変動するのか、解明を試みた。

解析方法

血液から得た免疫機能項目(WBC、Lym、Het、H/L 比、CD4、CD8α)を対象に Shapiro-wilk 検定で正規性を確認した。WBC、CD4、CD8α は正規性が認められなかったため、WBC は 200cell/μL ごと(0~2000、2001~4000、4001~6000、6001~8000、8001~)、CD4は1.00 copy/μL ごと(2.00~3.00、3.01~4.00、4.01~5.00、5.01~)、CD8α は2.00 copy/μL ごと(0.00~2.00、2.01~4.00、4.01~6.00、6.01~)に分類した。次に、各免疫項目に年度差や地域差があるか、t 検定を実施し、全ての項目間で差がないことを確認した。そして、目的変数、BCI と Pb を説明変数として、Lym、Het、H/L 比は重回帰分析、WBC、CD4、CD8α は順序ロジスティック回帰分析を実施した。全ての分析の有意水準は0.05とし、統計分析はフリーソフト R (ver. 3.5.0) 及び Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

解析結果を表1-17に示した。秋の渡り時期と越冬期では同一の免疫項目が Body condition と血中鉛濃度によって有意に影響を受けることが示された。すなわち、秋の渡り時期は Het(P= 0.001、95% CI 3.50 –11.49)と H/L 比(P< 0.001、95% CI 0.14 – 0.38)の増加は Pb の増加と有意に関係しており、Lym(P= 0.001、95% CI -11.43 – -3.21)の減少は Pb の増加にのみ有意な影響をうけていた。CD4は BCI のみによって、3.00 copy/μL 未満の群と以上の群、5.00

copy/μL 未満の群と以上の群を有意に区分していた。CD8α は Pb と BCI 両要素によって2.00copy/μL 未満の群と以上の群を有意に区分していた。

越冬期についても、Het (P< 0.0001、95% CI 8.92 – 20.05)、H/L 比(P< 0.0001、95% CI 0.26 – 0.59)は Pb の増加によって有意に増加する関係がみられたのに対し、Lym(P< 0.0001、95% CI -19.93 – -8.59)は Pb の増加によって有意に減少する関係がみられた。CD4は BCI のみによって、3.00 copy/μL 未満の群と以上の群、4.00 copy/μL 未満の群と以上の群を有意に区分していた。CD8α は Pb と BCI 両要素によって2.00copy/μL 未満の群と以上の群を有意に区分していた。

春の渡り時期は、Het、H/L 比の増加は Pb の増加と BCI の減少と有意に関係しており、Lym の減少は BCI の減少と Pb の増加と有意に関係していた。WBC は BCI のみによって、WBC の2000 cell/μL 以上と未満を有意に区分し、4000及び6000 cell/μL 以上と未満を有意に区分した。CD4と CD8α は BCI と Pb によって有意に数値を区分しなかった。

考察

解析の結果から、ヘテロフィルとリンパ球の割合は越冬期間の3時期全てで、血中鉛濃度から有意な影響を受けることが確認された。これは本章第4節の、鉛汚染が免疫細胞に及ぼす影響と合致するとともに、渡りの要素が存在する場合にも鉛汚染による免疫影響は生じることが示唆された。秋の渡り時期と越冬期で、白血球数に Body condition や血中鉛濃度との有意な関係が示されなかった原因として、末梢の白血球の大半を占めるヘテロフィルとリンパ球の割合(Davis *et al.*, 2008)がこの鉛汚染によって正反対の影響を受けることによって、見かけ上有意な影響が表れない可能性が考えられた。

秋の渡り時期と越冬期に、CD4は Body condition の増加で有意に増加し、CD8α は Body condition の低下と血中鉛濃度の増加で有意に増加した。CD8α は、キラーT 細胞に発現し、ヘテロフィルと同様に、血中を循環して異物の監視と免疫機能の亢進を惹起させる(Herndler-Brandstetter *et al*., 2018)。本調査結果では、CD8α は2.00 copy/μL を境に血中鉛濃度の増加によって有意に増加した。ラットの鉛曝露実験では、濃度に依存せずに CD8α の有意な増加が報告される(Yathapu *et al*., 2020)。本調査結果である低濃度の鉛汚染影響は、ラ

ットの知見に符合し、CD8α の発現量は血中鉛濃度の増加によって有意に増加することが示唆された。CD4は鉛汚染と CD4発現量の亢進に関する知見は見られないが、ハシグロヒタキでは CD4が寄与する獲得免疫と Body condition の間には有意な正の相関が確認されている(Eikenaar *et al*., 2020)。本調査項目の CD4と CD8α は獲得免疫に寄与する(Eikenaar *et al*., 2020)。獲得免疫の中には、鉛の影響を受けないリンパ球系細胞も存在することから(Vallverdú-Coll *et al*., 2019)、CD8α は上述の通り、血中鉛濃度の影響も受ける一方で、CD4は Body condition の影響をうけることで、秋の渡り時期と越冬期に CD4の増加と Body condition の増加の関係が示されたと考えられる。

春の渡り時期は秋の渡り時期や越冬期と異なり、ヘテロフィルとリンパ球の割合は Body condition と血中鉛濃度の両者に影響し、なおかつ CD4と CD8α は Body condition と血中鉛濃度の影響を受けなかった。春の渡り時期は個体群の中で繁殖地に向かう渡りが始まる時期にあたり、この時期に捕獲される個体は越冬期間の中で最も体重が低下する(Ushine *et al*., 2017)。この渡り前の体重低下は、越冬地を中心とした徘徊行動の発生や、Zugunruhe と呼ばれる渡り前の生体内の渡りに備えたエネルギーの代謝機構の変化(Helm, 2006)が考えられる。そのため本調査結果は、春の渡り時期に体重が低下した状態で、渡りと免疫機能のエネルギーのトレードオフを維持している時、鉛汚染が加わった結果として、Body condition と血中鉛濃度の両者による免疫細胞の変動が生じた可能性が示唆される。CD4と CD8α の発現量は、春の渡り時期は他の時期と異なり血中鉛濃度や Body condition 以外の要素に影響を受けていることが考えられた。CD4と CD8α は獲得免疫に機能し、病原体の侵入シグナルによって細胞表面に発現する(Makaroff *et al*., 2009)。この知見を考慮すると、春の渡り時期は他の時期とは異なる病原体の曝露量や、生体側の防御機能に関する変化が生じている可能性が考えられる。

表1-17. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽を対象とした時期ごとの重回帰分析と順序ロジスティック回帰分析の結果

秋の渡り時期	Coef.	P 値	95% CI
Het　BCI	-2.19	0.09	-4.69 – 0.31
Pb	7.49	0.001	3.50 – 11.49
Lym　BCI	2.68	0.05	0.10 – 5.25
Pb	-7.32	0.001	-11.43 – -3.21
H/L 比　BCI	-0.08	0.06	-0.15 – 0.00
Pb	0.26	0.0001>	0.14 – 0.38
WBC　BCI	0.14	0.30	3.39 – 6.01
Pb	0.75	0.16	-0.29 – 1.80
Cut1 (2000 cell 区切)	-3.72	-	-5.71 – -1.74
Cut2 (4000 cell 区切)	-0.22	-	-0.85 – 0.41
Cut3 (6000 cell 区切)	1.52	-	0.72 – 2.32
Cut4 (8000 cell 区切)	2.35	-	1.29 – 3.41
CD4　BCI	2.92	0.001>	1.37 – 4.46
Pb	-0.65	0.35	-2.00 – 0.71
Cut1 (3.00 copy/μL 区切)	-5.55	-	-8.27 – -2.83
Cut2 (4.00 copy/μL 区切)	-0.18	-	-0.98 – 0.62
Cut3 (5.00 copy/μL 区切)	5.66	-	2.75 – 8.57
CD8α　BCI	-1.31	0.03	-2.51 – -0.10
Pb	2.06	0.02	0.34 – 3.77
Cut1 (2.00 copy/μL 区切)	1.47	-	0.51 – 2.42

次頁に続く

越冬期	Coef.	P 値	95% CI
Het　BCI	0.27	0.75	-1.38 – 1.91
Pb	14.49	0.0001>	8.92 – 20.05
Lym　BCI	0.44	0.61	-1.24 – 2.11
Pb	-14.26	0.0001>	-19.93 – -8.59
H/L 比　BCI	-0.08	0.76	-0.06 – 0.04
Pb	0.43	0.0001>	0.26 – 0.59
WBC　BCI	-0.26	0.19	-0.66 – 0.13
Pb	-1.31	0.05	-2.65 – 0.02
Cut1 (2000 cell 区切)	-4.71	-	-6.49 – -2.93
Cut2 (4000 cell 区切)	-3.76	-	-5.18 – -2.33
Cut3 (6000 cell 区切)	-2.56	-	-3.76 – -1.36
Cut4 (8000 cell 区切)	-1.67	-	-2.76 – -0.58
CD4　BCI	-0.59	0.01	-1.04 – -0.15
Pb	-0.32	0.65	-1.74 – 1.08
Cut1 (3.00 copy/μL 区切)	-3.88	-	-5.46 – -2.29
Cut2 (4.00 copy/μL 区切)	-2.33	-	-3.57 – -1.09
Cut3 (5.00 copy/μL 区切)	-0.56	-	-1.69 – 0.56
CD8α　BCI	-0.52	0.01	-0.93 – -0.11
Pb	-0.24	0.0001>	-0.37 – -0.10
Cut1 (2.00 copy/μL 区切)	-2.64	-	-3.60 – -1.69
Cut2 (4.00 copy/μL 区切)	-0.17	-	-0.86 – 0.53
Cut3 (6.00 copy/μL 区切)	0.88	-	0.10 – 1.65

次頁に続く

春の渡り時期	Coef.	P 値	95% CI
Het　BCI	-4.17	0.0001>	-5.61 – -2.72
Pb	0.71	0.0001>	0.38 – 1.05
Lym　BCI	3.89	0.0001>	2.54 – 5.23
Pb	-0.77	0.001>	-1.09 – -0.46
H/L 比　BCI	-0.13	0.0001>	-0.18 – -0.09
Pb	0.03	0.0001>	0.02 – 0.04
WBC　BCI	0.72	0.002	0.27 – 1.17
Pb	0.08	0.11	-0.02 – 0.17
Cut1 (2000 cell 区切)	-1.72	-	-2.59 – -0.84
Cut2 (4000 cell 区切)	0.48	-	-0.22 – -1.18
Cut3 (6000 cell 区切)	2.10	-	1.15 – 3.04
Cut4 (8000 cell 区切)	3.48	-	2.01 – 4.95
CD4　BCI	0.41	0.07	-0.03 – 0.84
Pb	-0.01	0.79	-0.11 – 0.08
Cut1 (3.00 copy/μL 区切)	-2.69	-	-3.82 – -1.57
Cut2 (4.00 copy/μL 区切)	-1.19	-	-1.95 – -0.44
Cut3 (5.00 copy/μL 区切)	1.50	-	0.69 – 2.23
CD8α　BCI	-1.29	0.73	-0.49 – 0.35
Pb	-0.09	0.09	-0.20 – 0.01
Cut1 (2.00 copy/μL 区切)	-1.29	-	-2.08 – -0.51
Cut2 (4.00 copy/μL 区切)	1.60	-	0.74 – 2.46
Cut3 (6.00 copy/μL 区切)	2.54	-	1.33 – 3.74

略語(単位)は次の通り: Coef. は決定係数、95% CI は95%信頼区間、BCI, Body condition index; WBC, 白血球数(cell/μl); Het, ヘテロフィルの割合(%)：Lym、リンパ球の割合(%)：H/L 比、ヘテロフィルのとリンパ球割合の比：CD4、末梢血中の CD4の mRNA のコピー数(copy/μl)：末梢血中の CD8α の mRNA のコピー数(copy/μl)：Pb、血中鉛濃度(μg/dL)。Cut は各群間の閾値を示し、示した数値を境にした時に、その検査項目を有意に分けることを意味する。

考察及び結論

本調査によって、東京湾と三河湾で越冬するユリカモメは鉛汚染を生じ、汚染は国内で、海洋の底生生物を捕食することで生じることが示唆された。鉛汚染によって、ユリカモメの免疫細胞の内、ヘテロフィルとリンパ球の割合が有意な影響を受ける可能性が示唆された。そして、Body condition は白血球数、リンパ球やヘテロフィルの割合と有意な関係を持ち、免疫機能の維持に寄与することが考えられた。Body condition と鉛汚染が免疫に及ぼす影響について、ユリカモメの越冬期間を3つの時期に分類すると、春の渡り時期のみに Body condition と鉛汚染の両者が、ヘテロフィルとリンパ球の割合に影響を及ぼすことが示された。また、獲得免疫に係る CD4、CD8α の発現量は Body condition や鉛汚染からの単一の影響は受けないが、時期を考慮すると、秋の渡り時期から越冬期には、CD4は Body condition、CD8α は Body condition と鉛汚染に影響をうけることが明らかになった。

CD4と CD8α への Body condition と鉛汚染の影響は、環境中の病原体の存在量の時期的な変動も関与している可能性がある。2008年から2015年に環境中から採取された鳥類の糞便中の A 型インフルエンザウイルス量を計測した Onuma *et al*. (2017)は、12月から2月と、3月から5月の2群間で、糞便中の A 型インフルエンザウイルス量が調査年によらず減少傾向にあることを示した。野鳥の糞便中の A 型インフルエンザウイルス量が時期によって異なる場合、野外で越冬するユリカモメの A 型インフルエンザウイルスの曝露機会に時期的な差異を生む可能性がある。この点については、野外の病原体の量を含めて、CD4や CD8α に及ぼす鉛汚染や Body condition の変動との関係を調査する必要がある。

ユリカモメで報告される鉛汚染は、筋肉中の鉛濃度が10～12μg/g の時、産卵数減少といった影響があるものの(Migula *et al*., 2000)、他の影響はこれまでに報告されていない。第4節からユリカモメは鉛汚染によって末梢血中のヘテロフィルとリンパ球の割合が影響をうけ、その影響は血中鉛濃度4.0μg/dL と、提唱される野鳥の鉛汚染の基準濃度(BEDROSIAN and CRAIGHEAD, 2009; Martinez-Haro *et al*., 2011; Walters *et al*., 2010)を下回る濃度で生じることが示された。この汚染が、海洋の底生生物の採餌に由来している場合、底生生物を介した生物濃縮により、ユリカモメが効率的に鉛汚染を受けている可能性を示唆し、ユリカ

モメ個体群と同一地域に生息して、海洋の底生生物を採餌している他種の野鳥も同様の鉛汚染が生じていることが懸念される。韓国でダイサギ(*Ardea alba*)の重金属汚染を年齢ごとに調査した Honda *et al*. (1986)は、銅やマンガンの体内濃度は加齢と共に増加するのに対して、鉛は加齢とともに増加しない傾向がみられた。この報告の中で、鉛は換羽等によって速やかな排泄が生じることが考察されている。体内に取り込まれた鉛はほとんどが腎臓で排出されるが、排出されない場合には肝臓、腎臓、骨に蓄積する(Pain *et al*., 2019)。体内の器官に蓄積した場合にも、繁殖や渡りといった身体的負担が大きいイベントによって再び循環血中に放出、排泄される(Vallverdú-Coll, 2016)。このため、本調査で計測された血中鉛濃度の全てが国内の鉛汚染に起因するとは限らないが、秋の渡り時期から越冬期にかけて血中鉛濃度は有意に増大することを踏まえると、ユリカモメは少なくとも国内で鉛汚染を受けていると考えられる。そして、この知見は本調査対象のユリカモメが、越冬期間という数か月間で鉛汚染をうけ、その影響が免疫細胞に生じていることを意味する。野生下の鳥類では中毒量の鉛汚染で、貧血や神経症状といった臨床症状が報告されている(Holladay *et al*., 2012; Witeska *et al*., 2010)。本調査対象のユリカモメの2つの個体群は国内で鉛汚染を受け、その濃度は非特異的症状を呈さない、影響量の汚染であることが示唆された。

本章から、調査対象のユリカモメ個体群は、越冬期間中の全ての時期で免疫細胞は鉛の汚染影響を受けているが、中でも春の渡り時期には Body condition の変動による免疫細胞の影響も加わり、これらに加えて、春の渡り時期には免疫分子の発現が強く影響を受けるような非自己の存在が示唆される(図1-19)。

考えられるバイアス

本研究デザインは、野外個体群を対象としているため、個体群間のサンプルサイズが均一ではない。特に Yearling の捕獲数が少ないため、Yearling について解析できなかった。Yearling はいくつかの環境汚染物質の蓄積の研究で、Adult と異なる特徴を有する可能性がある(Berglund *et al*., 2011; Monteiro and Furness, 1995)。コアホウドリ(*Phoebastria immutabilis)* では、繁殖地域の鉛に汚染された土壌で雛が過ごすことによって、末梢血中の鉛濃度が巣

内雛の方が親鳥よりも高くなる(Finkelstein *et al*., 2003)。また、Yearling は免疫機能の点で、Adult と異なる特徴を持つ可能性がある。例えば、ニワトリは加齢によって CD8の発現量が増加する(Nikolich-Žugich *et al*., 2012)。野鳥では、白血球と加齢との直接的な関係は明らかにされていないため、今後はサンプルサイズを大きくし、年齢に関して解析する必要がある(Aina and Ajibade, 2014; Hawkey *et al*., 1984; Howlett *et al*., 1998)。

また、本研究デザインは、時期ごとの Body condition の変動を明らかにするため本来であれば同一個体を対象に Body condition を繰り返し評価する必要がある。しかし、野外個体群を対象としているため、越冬期間中の複数回の再捕獲は繰り返しの捕獲は困難であった。

雌雄について、環境汚染物質や体重といった項目に差が生じる。鉛に関連する知見として、鳥類は、卵殻に鉛を含ませることで排泄するので、繁殖終了後の時期には雌は雄よりも体内の鉛汚染量が低い(Burger, 1994)。本調査では2地域共に血中鉛濃度に雌雄差は見られなかった。本調査はサンプルサイズが小さく、時期の分類を実施していることから、個体群が真に汚染濃度において雌雄差がない可能性と、サンプルサイズによって見えにくくなっている可能性が考えられる。安定同位体比についても雌雄差がみられる可能性がある。Jakubas *et al*. (2020)は GPS ロガーを用いて、ポーランドで繁殖するユリカモメが餌を探すために費やす移動距離と範囲を、性や個体群ごとに調査した。その結果、雌は雄よりも長距離を移動し、雄は雌に比較して特定の採餌場を利用せず様々な採餌場を利用することを示した。本章の安定同位体比の解析では、雌雄の羽数が均等になるようにサンプルをランダムに選抜し、結果として雌雄差は見られなかった。安定同位体比における雌雄差の検証についても、サンプルサイズを増やすとともに繁殖地域の餌資源の安定同位体比の基礎データを集積し、照合を行うことが求められる。

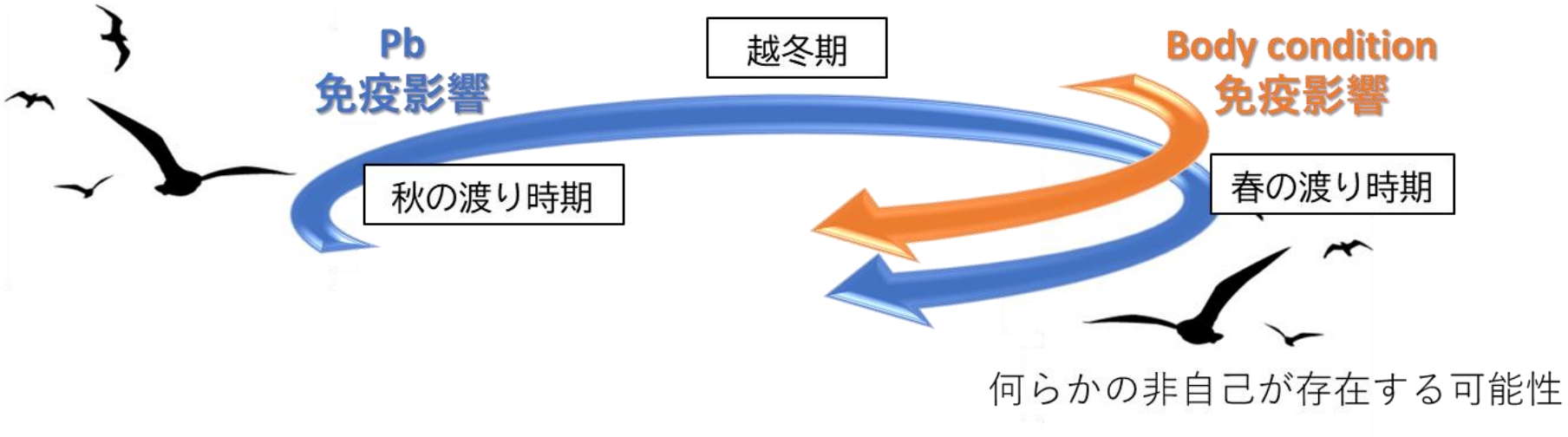


図1-19. 第1章の調査結果から考えられる国内で越冬するユリカモメ個体群の免疫機能が受ける影響の模式図

越冬期間を通して(曲矢印)、鉛汚染の影響が免疫細胞に生じることが考えられた。さらに、春の渡り時期には Body condition の変動による免疫細胞への影響も存在する可能性がある。このように、同じ渡り時期であっても、春の渡り時期は特に免疫機能に影響を及ぼす要素が多いと考えられるために、ユリカモメは春の渡り時期に、特に病原体に感染しやすい状態にある可能性が考えられる。

第2章

Body condition と鉛汚染は A 型インフルエンザの感染にどのような影響を与えているのか

序論

1. A 型インフルエンザとは

A 型インフルエンザは、鳥由来の人獣共通感染症で、家禽に甚大な被害を及ぼしている(Elenwo and Okafor-Elenwo, 2014; Kim *et al*., 2021)。近年では世界各地でヒトへの感染が報告されている(Bird and Mazet, 2018; Cui *et al*., 2019)。A 型インフルエンザは表面の16種類の赤血球凝集素(ヘマグルチニン: HA)と9種類のノイラミニダーゼ(NA)の種類よって亜型が決定する(独立行政法人科学技術振興機構, 2004)。この内、HA が5または7を持つウイルスの一部で病原性が高いものを高病原性鳥インフルエンザ、それ以外の H5、H7亜型を低病原性鳥インフルエンザと定義されている(Iwamoto, 2016)。

国内の A 型インフルエンザは、2004年以降継続して冬季に発生している(Okamatsu *et al*., 2017; Sawabe *et al*., 2006; Sawabe *et al*., 2011; Tanimura *et al*., 2006)。A 型インフルエンザを引き起こす A 型インフルエンザウイルスは、人間の経済活動によるヒトやモノの移動と、渡り鳥の飛来によって国内に持ち込まれると考えられている(Benkaroun *et al*., 2016)。日本のように、冬季に A 型インフルエンザが発生する地域では、秋季に飛来する渡り鳥が主のウイルスの運び屋と考えられている(Fouchier *et al*., 2003; Koch and Elbers, 2006)。

2. A 型インフルエンザ早期発見を目的とした調査手法

A型インフルエンザ感染の検査法には、病原体を検出する方法と宿主免疫を検査する方法がある。前者は、生体から気管スワブやクロアカスワブを採取し、Reverse transcription PCR (RT-PCR)などの方法を用いてウイルスを検出・同定する(Lewis *et al*., 2013)。この方法の特徴は、検査対象の生体に感染したウイルスの亜型を直接的に調査できる長所を有する一方で、検出・同定に A 型インフルエンザウイルスが必要であるため、バイオセーフティレベルが2以上の設備が必要という制限や、検出確率が検体の鮮度に左右されるといった

短所をもつ(Ameji *et al*., 2017; Grillo, 2011)。

後者は、生体内の A 型インフルエンザ抗体を標的として感染歴を評価する方法である(Brown *et al*., 2009b)。感染歴の調査は、血漿中の抗体を対象に検査する中和試験や酵素結合免疫機能吸着測定法(ELISA)が用いられている。中和試験は抗体検出のために抗原にウイルスを使用するため、上述した設備の制限を伴うが、使用する A 型インフルエンザウイルス亜型を選択することによって、特定のウイルス抗原に対する抗体保有状況と抗体価を測定することができる(Swayne *et al*., 2015)。ELISA は、特定の A 型インフルエンザウイルス亜型抗体を検査することはできないが、多量の検体を迅速にスクリーニングですることができるため、集団を対象とした検査や早期診断に必須の方法として用いられている(Okamatsu *et al*., 2016)。ELISA は抗体の保有状況という定性分析の手法であるため、検査結果は検査対象種や対象とする疾病ごとに血中の抗体持続期間を考慮する必要がある。

ELISA の原理は、タンパク質(抗原)と野鳥の血中に含まれる抗体(1次抗体)の結合と、標識された2次抗体が1次抗体に結合し、発光することに基づいている(Aydin, 2015)。A 型インフルエンザウイルス抗体の ELISA は、一般的なウイルスに比較して変異速度が速い A 型インフルエンザウイルスの中で、変異の少ない M1タンパク質や NP タンパク質を標的とすることで、亜型を問わず A 型インフルエンザウイルスの感染歴を調べることができる (Ozawa, 2015)。しかし、野鳥の生体でつくられる1次抗体と市販される標識2次抗体の結合性は種差がある可能性が否定できないため、未知の鳥種に適応する前には、予備実験を行い予め ELISA の適用可否を確認することが求められる。

3. A 型インフルエンザ抗体の検査意義

A型インフルエンザの抗体検査は、高病原性鳥インフルエンザの早期発見を目的としたサーベイランスにおいて、オーストラリア、アジアやヨーロッパ諸国で取り入れられている(Ameji *et al*., 2017; Brown *et al*., 2009a; Grillo, 2011)。

一般的に、免疫機能として血中に維持される抗体は寿命が長い生物ほど各々の病原体に特異的でかつ長期間維持される(Lee, 2006)。A 型インフルエンザウイルスのような組織に侵入し変異頻度の高い病原体に対する抗体は、短期間産生されるか(Fereidouni *et al*., 2010;

Hoye *et al*., 2011)、あるいは季節的に血中へ再分布することが考えられている(Buehler *et al*., 2009; Martin II *et al*., 2008)。マガモに低病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた実験では、感染後7日目は抗体陽性率が100%であったのに対し、感染後42日目には抗体陽性率は63%に減少した(Muth, 2012)。これらの結果から、A 型インフルエンザウイルス感染に対する免疫機能は、持続能が1年に満たないことが示唆される。

4. 目的

本章では、ユリカモメの A 型インフルエンザ感染は渡り時期に増加し、それは鉛汚染と Body condition が関与する、という仮説を検証する。この仮説の検証のために、最も適切な調査は A 型インフルエンザウイルスの検査(病原体検査)である。しかし、本調査を遂行するにあたり、捕獲許可申請の理由から、病原体検査が実施できなかった。そこで、本調査は宿主側の感染を表す抗体検査を実施することで、仮説の検証を試みた。

抗体検査を使用したため、緒言で提示していた仮説の「感染率」という用語は使用せず、「感染歴」という用語を使用して、調査を遂行した。この用語は、ELISA によって得られる A 型インフルエンザウイルス抗体の定性結果を感染歴、ELISA で測定する吸光度を抗体量と定義した。

本章の調査を遂行するにあたり、本章で使用する ELISA キットはニワトリ用の検査キットであり、これまでユリカモメで使用されたことがない。そこで、初めに予備実験としてユリカモメ血漿に含まれる A 型インフルエンザウイルス抗体を計測するためのプロトコルを設定した(第1節)。その上で、ELISA の結果を用いて、A 型インフルエンザ感染に影響を及ぼす要素について、解析を試みた(第2～5節)。

本章に共通する材料と方法

1. 供試動物

ユリカモメは千葉県市川市と愛知県蒲郡市で捕獲した個体群を対象とした。各々の地点で観察される個体群を以下、東京湾群、三河湾群とする。捕獲期間は東京湾群が2018年11月から2021年3月、三河湾群が2019年1月から2021年4月の期間で実施した。捕獲は、手、くくり罠(noose trap; 図1-1)(Wegner, 1981)、又は whoosh net(図1-2)(Colles, 2006; Sutherland *et*

al.,,,,,, 2004)のいずれかの方法で実施した。Gaunt *et al*. (1997)は、鳥類の倫理で安全に採取できる血液量を、体重の1%未満と示した。そこで本研究では捕獲個体を速やかに体重計測し、右正中中足静脈または右翼下静脈から、体重の0.5%未満の血液量をヘパリン処理した26 G の注射針 (Terumo、Tokyo、Japan) を付した1ml シリンジ (Nipro、Osaka、Japan) で採取した。採血後は止血を確認し、東京湾群の捕獲個体は左跗蹠にプラスチック製の標識調査専用のカラーリングを付し、東京湾群及び三河湾群の捕獲個体では、右跗蹠に環境省鳥類標識用足環を付し、放鳥した。

本研究の採血調査については、本学の実験動物倫理委員会の承認を得ると共に(承認番号：30s-47、2020K-78)、捕獲調査では環境省及び千葉県(千葉県自指令第1568号、1667号、900号)、愛知県(31東環第588-5号、2東環第1013-3号)に承認を得て実施した。

2. Body condition と齢及び性の評価

Body condition として、第1章第1節より3項目から Body condition index (BCI)を設定した。齢は羽衣で、その年生まれの1歳未満(Yearling)と、1歳以上(Adult)の2つに分類した。性の判定は、第1章と同様に PCR 法で判定した。

3. 免疫機能の評価

第1章と同様の方法で、白血球数(WBC)、リンパ球の割合(リンパ球：Lym)、ヘテロフィルの割合(ヘテロフィル：Het)、そしてヘテロフィルとリンパ球の割合の比(H/L 比)、CD4及び CD8α mRNA コピー数(CD4、CD8α)を算出した。

4. 鉛濃度の測定

血中鉛濃度の測定は、血球成分を使用した。血球成分は高圧滅菌した後、北海道大学毒性学研究室で測定した。測定機器は誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて、血球成分1dL 当たりの鉛量(μg/dL) を算出した。鉛の測定は、北海道大学大学院獣医学研究院毒性学教室の石塚真由美教授、中山翔太助教授のご厚意で計測いただいた。

第1節：ELISA キットを用いたユリカモメ血漿の抗体検査プロトコルの設定

緒言

ELISA を使用したユリカモメの A 型インフルエンザウイルス抗体の検査には、ELISA の原理の中でも1次抗体と2次抗体の結合の検証が必要であり、これらの抗体の結合性の検証を行うためには、抗体を保有する血漿(抗体陽性血漿)と保有しない血漿(抗体陰性血漿)を使用することが前提として必要である。また、本調査で使用する市販の ELISA キットは家禽用として販売されている商品で、ハヤブサ類(*Falco spp.*)、フラミンゴ(*Phoenicopterus spp.*)、ヨーロッパウズラ(*Coturnix coturnix*)、二ホンウズラ、メキシコマシコ(*Carpodacus mexicanus*)、ワライカモメ(*Larus atricilla*)、ムクドリ(*Sturnus spp.*)、セグロカモメ(*Larus argentatus*)で感受性試験が検討されているものの、ELISA キットで使用される2次抗体は、マウスで生成された西洋ワサビ由来ペルオキシターゼ標識 A 型インフルエンザウイルスマウスモノクローナル抗体で、本製品で抗体検査を実施するには、このマウス由来の2次抗体とユリカモメの1次抗体が結合することが必須であるが、この結合性は明らかではない。

そこで本節では、捕獲したユリカモメ個体の中から、抗体陽性血漿と抗体陰性血漿を確保することを目的として、中和試験を実施した。中和試験で抗体陽性血漿と抗体陰性血漿を得たうえで、市販される ELISA キット (IDEXX インフルエンザ A エリーザキット；IDEXX、Westbrook、USA) の有用性を検証した。

材料と方法

抗体陽性血漿と抗体陰性血漿を得る目的で、2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群のうち、過去に A 型インフルエンザウイルスに感染した可能性の低い幼鳥7羽と、感染した可能性の高い成鳥9 羽の計16 羽の血漿を使用した。この理由は、水禽類の A 型インフルエンザ感染の条件として、種や生息環境といった要素の他に、感染機会や免疫機能の発達に係る年齢の要素が推定されている知見に基づいている(Koch and Elbers, 2006)。第1章で対象としたユリカモメ個体群を対象とし、調査にあたっては本学の実験動物倫理委員会の承認を得ると共に(承認番号：30s-47、2020K-78)、環境省及び千葉県(千葉県自指令第1568号、1667号、900号)、愛知県(31東環第588-5号、

2東環第1013-3号)に承認を得て実施した。

ELISA キットの使用可否を確認するため、まず、捕獲したユリカモメ血漿を対象に中和試験を行った。中和試験には A 型インフルエンザウイルスを使用すること、専門的な設備と技術を必要とするため、本学での実施は困難である。そのため、本試験は鹿児島大学農水産獣医学域獣医学系共同獣医学部獣医学科動物衛生学分野の小澤真准教授にご協力いただき、実験を遂行いただいた。血漿を50倍に希釈した時の中和活性について、表2-1のウイルス株を用いて判定した。

次に、捕獲個体の血漿を過度に消費することを防ぐために、陰性・陽性と判定された検体から各3つを用いて、ELISA キットのプロトコル (Appendix 2-1)の改変を実施した。キット内の2次抗体はマウスに由来するのであるため、ユリカモメの血漿内の1次抗体との結合性をより高めるために、市販される鳥由来の2次抗体 Goat anti-bird IgY H&L (HRP) (Abcam plc、Cambridge、UK)を使用する方法 (改変プロトコル：Appendix 2-2)を試行した。陰性/陽性の評価は、キットの判定方法の検体の吸光度と陰性コントロールの吸光度の比が0.5以上で陰性、0.5未満で陽性と判定するがこの判定方法は2次抗体と1次抗体の結合性が確認できていない種で、適切に結合が生じていないとき、陰性に偏りやすくなる(偽陰性となる)恐れがある。そこで本調査では、ELISA の汎用的な評価方法である、陰性コントロールの分散値を3倍したものに陰性コントロールの平均値を加算した値を用いた(Ministry of Agriculture, 2019)。この値以上のとき陽性、未満のとき陰性と判断される。

ELISA キットの有用性の解析方法には、サンプル数が少ない場合に使用でき、P 値の精確性が高い点から、Fisher’s 正確確率検定を用いた(α =0.05)。統計解析にはソフトウェア Stata (14.0.0) を使用した。本予備実験は(株)IDEXX ラボラトリーズとの共同研究により実施した。

結果

検査した16羽のうち、中和試験では成鳥2羽で H10に対する中和活性を示した。幼鳥では中和試験は陰性となった。改変プロトコルを使用した際、陰性コントロールの吸光度から、カットオフ値は1.30であった。Fisher’s 正確確率検定から、改変プロトコルで得られる陰性/陽性判定は、中和試験の結果と差が認められなかった(P =0.47)。

考察

改変プロトコルを使用した定性検査結果が中和試験結果と有意な結果の差異が見られなかったことから、改変プロトコルはユリカモメ血漿中の A 型インフルエンザ抗体を十分に測定することが示され、陰性/陽性の判定を有意に判別しうることが判断された。今回対象とした16羽は野生個体のため、背景情報が不明であり、偽陰性の可能性が否定できない。偽陰性の理由としては、使用したウイルス株が各個体の血漿に含まれる抗体と結合しなかったことと、中和反応が小さい (中和抗体価が50以下) ことが考えられる。本研究では、この可能性に関する検証が実施できない。

本実験で使用した ELISA キットをニワトリの H11N6亜型の感染実験で使用した報告では、50羽の内、半数以上の個体が陽性判定を示す日数は感染後およそ21日目であった(Zera and Harshman, 2001)。デンマークでは、本キットを使用して秋季と春季の渡り時期に約300羽ずつ捕獲したコザクラバシガン(*Anser brachyrhynchus*)の同一個体群を対象に、A型インフルエンザウイルス抗体検査が実施された(Hoye *et al*., 2011)。その結果、コザクラバシガンではA型インフルエンザウイルス抗体は約340日間維持されることが明らかになった。そのため、ELISAキットはおよそ感染後21日目から1年未満の期間で陽性判定が得られることが推定される。この知見をふまえると、本節で陽性と判定された成鳥2羽は昨年の越冬期から当年の繁殖期、そして今冬季の国内で、A 型インフルエンザウイルスに感染した可能性があり、幼鳥は繁殖地で孵化した後、越冬地に飛来するまでの期間に A 型インフルエンザウイルスの感染機会が得られず、全ての個体で陰性判定となった可能性がある。

表2-1. 中和試験で使用したウイルス株

HA タンパク	ウイルス株
H1	A/swine/Iowa/15/1930 (H1N1)
H2	A/Singapore/1/1957 (H2N2)
H3	A/duck/Ukraine/1/1963 (H3N8)
H4	A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6)
H5	A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1)
H6	A/duck/Hong Kong/960/1980 (H6N2)
H7	A/seal/Massachusetts/1/1980 (H7N7)
H8	A/turkey/Ontario/6118/1968 (H8N4)
H9	A/duck/Hokkaido/49/1998 (H9N2)
H10	A/chicken/Germany/N/1949 (H10n7)
H11	A/duck/England/1/1956 (H11N6)
H12	A/duck/Alberta/60/1976 (H12N5)
H13	A/gull/Maryland/704/1977 (H13N6)
H14	A/mallard/Astrakhan/263/1982 (H14N5)
H15	A/duck/Australia/341/1983 (H15N8)
H16	A/duck/Hokkaido/WZ82/2013 (H16N3)

第2節：ユリカモメはいつ A 型インフルエンザに感染するのか

緒言

A 型インフルエンザが世界的に流行した2017～2018年冬季における、アジア地域の発生事例によれば、国内外共に同一の亜型による感染事例が報告されている。この年に国内で死亡したユリカモメは国内外に共通する亜型に感染していた(Adlhoch *et al.*,,,,,, 2018)。今回の調査対象のユリカモメは病原体の検査が実施できず、国内の死亡事例を参考とした場合にも、国内で感染が起きているか、明らかにすることは困難である。

感染歴を評価する上で、ユリカモメがいつ A 型インフルエンザに感染しているのか、感染の時期的な消長を把握する必要がある。ユリカモメは A 型インフルエンザの感染率が高い種であるため(Ramis *et al.*,,,,,, 2014)、生息環境中に A 型インフルエンザウイルスが存在する場合には発症しないまでも感染は生じる可能性がある。国内で越冬するユリカモメは越冬期間中にマガモ、オナガガモ、ハクチョウ類のような A 型インフルエンザウイルス感染事例や死亡事例のある種と生息環境を共有するため(高畑 and 宮脇, 2010)、国内に飛来した後、A 型インフルエンザ感染が生じる可能性がある。本節では、国内に越冬するユリカモメが、いつ A 型インフルエンザに感染しているのか、把握する目的で、ELISA で測定される抗体陽性率と抗体量を時期ごとに確認した。

材料と方法

2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽のユリカモメの血漿と前節で設定した改変プロトコルを使用して、A 型インフルエンザウイルス抗体を検出した。各プレート間の誤差を考慮するために、陽性コントロールを対象に計測誤差を算出した。プレート間の誤差は6.4%(誤差範囲：1.7~7.9%)であった。算出した誤差を使用して、各血漿サンプルの吸光度を補正した。得られた抗体陽性個体は、捕獲数における抗体陽性個体の割合を百分率で算出し、抗体陽性率として用いた。陽性/陰性判定に用いるカットオフ値は、ELISA 法の判定として汎用的に使用される、陰性コントロールの分散値を3倍した値と陰性コントロールの平均値の和を算出し、使用した。

時期の定義は第1章と同様に、調査地でカウントされるユリカモメの羽数に基づいて、秋

の渡り時期、越冬期、春の渡り時期の3時期に分類した。各時期の抗体量の中央値と最大値、最小値を求めた後、時期間の抗体量の差の検定に Wilcoxon の順位相関係数を使用した。時期間の抗体陽性個体の割合を比較する検定には、カイ二乗検定を使用した。有意水準は0.05とした。統計分析はフリーソフトの R(ver. 3.5.0) と Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

測定した陰性コントロールの吸光度からカットオフ値は0.43であった。各時期の抗体量の中央値、最大値及び最小値、そして陽性率を表2-2に示した。抗体量の時期ごとの推移を図2-1に示した。解析の結果、抗体量と抗体陽性率共に、越冬期から春の渡り時期にかけて有意に増大した。すなわち、抗体陽性率は秋の渡り時期41.6%と越冬期44.2%の間で有意な差はなく、春の渡り時期59.6%との間で有意な差がみられた($P< 0.05$)。抗体量は中央値を比較した結果、秋の渡り時期0.41と越冬期0.66との間に有意な差はみられなかったが、春の渡り時期0.88との間には有意な差がみられた($P< 0.05$)。

考察

検定結果から、日本に飛来する時期に既に4割が抗体を有していることが示された。さらに抗体陽性率が春の渡り時期に有意に増加したことから、調査対象のユリカモメ個体群は、国内で A 型インフルエンザ感染が生じている可能性がある。既存知見より、抗体陽性の判定は、感染から21日目以降で現れ、1年に等しい期間持続すると考えられる。記憶免疫に由来する抗体産生の機序は未解明であるため、初感染としてこの知見を考慮すると、秋の渡り時期は、春の渡り時期に比較して、繁殖期で A 型インフルエンザに感染し、抗体を産生したものや昨冬季に越冬地で感染し、産生された抗体が反映される可能性が高いと考えられる。そのような可能性があるにも関わらず、本調査結果は春の渡り時期にのみ、抗体量や感染歴は有意に増加した。この結果から、調査対象のユリカモメ個体群については、春の渡り時期に A 型インフルエンザウイルス抗体の産生を増加に導くような特異な要素が存在すると可能性が考えられる。

表2-2. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽の抗体陽性率と抗体量(波長560nmの時の吸光度)の時期ごとの結果

	秋の渡り時期	越冬期	春の渡り時期
サンプルサイズ (羽)	41	75	51
抗体陽性率 (%)	41.6a	44.2b	59.6ab
抗体量 (nm)			
中央値	0.41c	0.66d	0.88cd
最大値	2.67	2.05	3.41
最小値	0.10	0.12	0.09

同一アルファベット間で有意差がみられたことを示す($P < 0.05$)

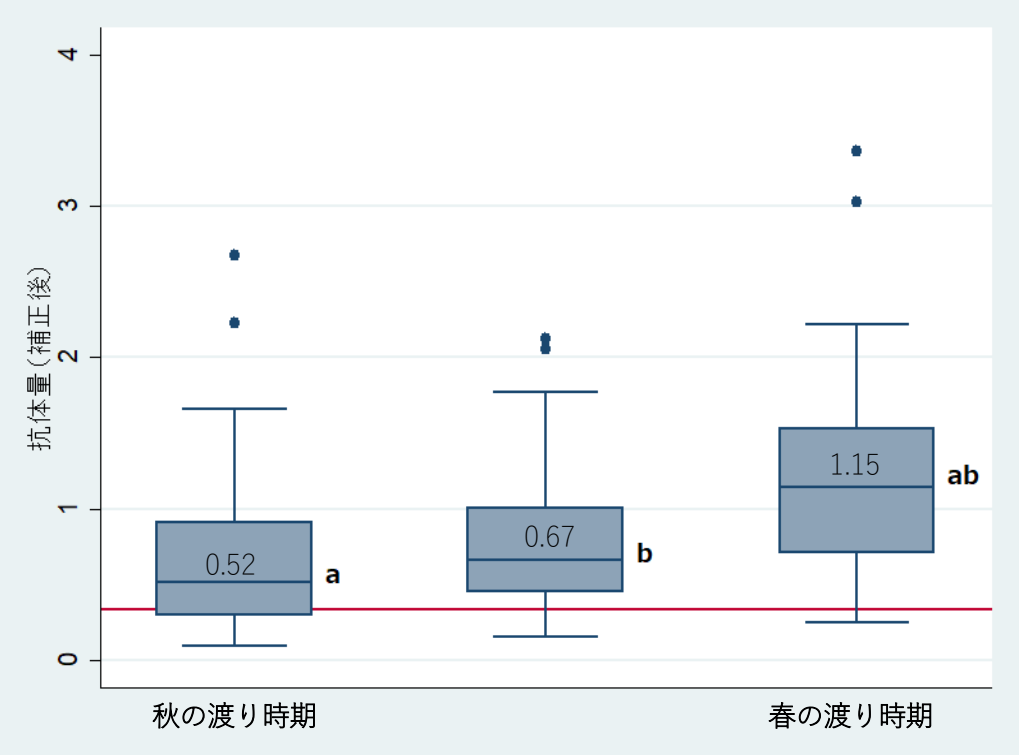


図2-1. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽のユリカモメにおける越冬期間の各時期の抗体量の推移

同一アルファベット間で有意差有。ボックス内の数値は補正した抗体量を示す。本調査対象のユリカモメは春の渡り時期に有意な抗体量の増加が示された。

第3節：抗体量及び感染歴に、鉛汚染や Body condition が関係しているのか

緒言

調査対象のユリカモメ個体群で示された春の渡り時期の有意な抗体量と感染歴の増加について、第1章で免疫に影響を及ぼすことが示唆された Body condition や血中鉛濃度がこれらの要素に関係するか、確認された既存知見は存在しない。そこで、本節では Body condition index と血中鉛濃度を使用して、これらが A 型インフルエンザの感染歴や抗体量に影響を及ぼすのか、影響を及ぼす場合には、それらがどのように影響するのかについて、各要素を単一で解析する方法を用いて、確認を行った(図2-2)。

材料と解析方法

解析した個体群は前節と同様に. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群と東京湾群、計170羽を対象とした。個体群に地域差と年度差がないことを確認したうえで、感染歴と抗体量への Body condition index と血中鉛濃度の影響について、解析を行った。解析の前に抗体量は対数変換を行い、Shapilo-wilk 検定で正規性を有することを確認した。

初めに、感染歴のある群とない群の間に Body condition や血中鉛濃度の差があるか、確認した。感染歴ありを1、感染歴なしを0の目的変数と定義し、BCI と Pb を説明変数として、ロジステッィク回帰分析を行った。次に、感染歴のある91羽を対象として、抗体量が Body condition と血中鉛濃度に説明されるか確認した。この時、抗体量(連続変数)を目的変数、Body condition と血中鉛濃度を説明変数として重回帰分析を用いて解析した。有意水準は0.05とした。統計分析はフリーソフトの R(ver. 3.5.0) と Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

解析の結果を表2-3に示した。感染歴によって Pb (P= 0.02、95% CI 0.15 – 1.81)は差がみられ、感染歴のある群は、ない群よりも有意に血中鉛濃度が高いことが示された。また、BCI (P= 0.04、95% CI -0.60 – -0.02)も差がみられ、感染歴のある群はない群よりも Body condition が有意に低いことが示された。

感染歴の有る個体群を対象とした解析では、抗体量は血中鉛濃度の増加によって、有意

に減少する関係が示された(P= 0.03、95% CI -0.16 – -0.01)。

考察

感染歴について、感染歴がある群は感染歴がない群に比較して Body condition が低くなり、血中鉛濃度が高くなることが示された。抗体量は Body condition には関係はみられなかったが、血中鉛濃度では負の関係、つまり血中鉛濃度が高くなると抗体量は減少するような関係がみられた。

病原体に対する免疫機能と Body condition に関する知見として、ヒトのインフルエンザ不活化ワクチン接種に関する報告では、健康的な BMI を持つヒトはそうでないヒトに比較して、初回接種時に防除反応として IgG の増加が有意に生じる(Sheridan *et al.,.,.,.,* 2012)。病原体に対する重金属汚染の事例では、影響量の汚染濃度域の中で、血中鉛濃度が高い被験者で構成される群は、低い濃度の被験者で構成される対象群に比較して *Toxoplasma gondii* の感染率が有意に高くなる(Krueger and Wade, 2016)。鉛は Th2細胞の亢進と Th1細胞の抑制を起こし、IgE 亢進に起因するアレルギーを誘発するため(Hsiao *et al.,.,.,.,* 2011; Wang *et al.,.,.,.,* 2017)、炎症反応を誘発し、免疫機能の抑制に働く(Metryka *et al.,.,.,.,* 2018)。

鳥類の A 型インフルエンザウイルス感染に対する Body condition と鉛汚染の両者の影響に関する知見はみられないが、上記の既存知見から、Body condition の低下や鉛汚染は、ユリカモメの A 型インフルエンザウイルス抗体の産生に影響を及ぼす可能性がある。そして、Body condition と鉛汚染が A 型インフルエンザ感染に及ぼす影響には差異があり、Body condition の影響は、抗体産生の時点では明瞭には現れないが、鉛汚染は、抗体産生の時点から有意な影響を及ぼすことが示唆された。

表2-3. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽の感染歴と感染歴のある91羽の抗体量について、Body condition (BCI)と血中鉛濃度(Pb、μg/dL)が及ぼす影響を、感染歴はロジステッィク回帰分析、抗体量は重回帰分析した結果

目的変数	説明変数	Coef.	P 値	95% CI
感染歴	BCI	-0.31	0.04	-0.60 – -0.02
	Pb	0.98	0.02	0.15 – 1.81
抗体量	BCI	0.03	0.21	-0.01 – 0.06
	Pb	-0.08	0.03	-0.16 – -0.01

BCI：主成分分析から推定される値よりも実測値が少ない群をマイナス、大きい群をプラスとした時の分類であり、それぞれBCI-とBCI+で分類している。 Pb：血中鉛濃度4.0μg/dL未満の群をPb low、4.0μg/dL以上の群をPb highで分類している。Coef.は決定係数、95% CIは95%信頼区間を示す。

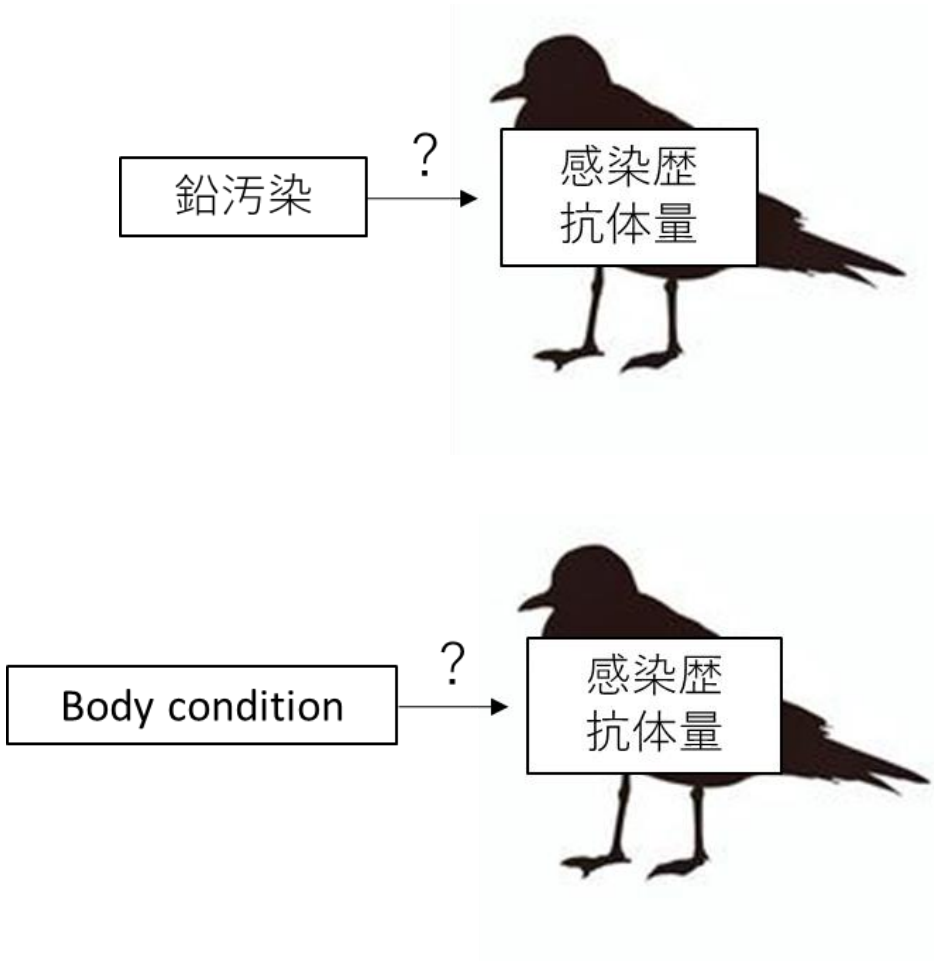


図2-2. 第2章第3節で検証したテーマの概要図

本節では、ユリカモメの A 型インフルエンザ感染に関して、Body condition index と血中鉛濃度がそれぞれどのような影響を及ぼすのか、調査を試みた。

第4節：感染歴は Body condition と鉛汚染濃度の構成によって変化するのか

緒言

前節で、A 型インフルエンザの感染歴は Body condition index の減少や、血中鉛濃度の増加で高まることが示された。抗体量は血中鉛濃度の増加によって減少する関係が示された(図2-3)。これらの結果を考慮すると、Body condition index が低く、かつ血中鉛濃度が高いという状態をもつユリカモメの集団は、それ以外の状態のユリカモメの集団に比較して、有意に感染歴あり (ELISA 検査陽性)の割合が高くなると考えられる。

そこで本節では、Body condition index と血中鉛濃度の両要素の高低によって、感染歴に差がみられるのか、確認した(図2-4)。

材料と解析方法

本節で解析対象とした個体群は前節と同様の個体群である。すなわち、2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽を対象に、Body condition と鉛汚染について、以下の分類を行った。Body condition は、Body condition index を設定する際に使用した主成分分析で、実測値が予測値よりも小さい個体は第1主成分の Body condition index がマイナスに、実測値が予測値よりも大きい個体は Body condition index がプラスの値となる。そこで、本節では BCI がプラスの値を持つ個体(BCI+)とマイナスの値を持つ個体(BCI-)で、2群に分類した。

血中鉛濃度は第1章第4節から、末梢血中のリンパ球とヘテロフィルの割合に有意な影響を与える濃度は4.0μg/dL であると示された。そこで、本節では血中鉛濃度4.0μg/dL 未満の値を持つ個体(Pb low)と、4.0μg/dL 以上の値を持つ個体(Pb high)の2群に分類した。そして、BCI と血中鉛濃度の+/-、high/low を組み合わせることで、検査対象のユリカモメを BCI-かつ Pb low、BCI-かつ Pb high、BCI+かつ Pb low、BCI+かつ Pb high の4群に分類した。

解析手法は、A 型インフルエンザ抗体陰性を0、陽性を1として、上記の4群間で Kruskal-wallis 検定を実施した。また、血中鉛濃度による抗体量の差を確認するために、感染ありの群の中で、各時期の Pb high と low の間で Wilcoxon の順位和検定を実施した。全ての解析の有意水準は0.05とした。統計分析はフリーソフトの R(ver. 3.5.0) と Stata (ver. 14.0) を使用

した。

結果

解析の結果、BCI-かつ Pb high 群は、BCI+かつ Pb high 群、BCI-かつ Pb low 群との間には感染歴に有意な差はみられなかったが、BCI+かつ Pb low 群との間には感染歴に有意な差がみられた(表2-4)。すなわち、BCI-かつ Pb high 群は BCI+かつ Pb low 群よりも有意に感染歴のある個体の割合が多くなった。他の群の間には感染歴の有無の個体の割合に、有意な差はみられなかった(表2-4)。抗体量に影響を及ぼす血中鉛濃度は、秋の渡り時期(P= 0.08)と越冬期(P= 0.06)では、血中鉛濃度の高低によって有意に2分されなかったが、春の渡り時期には、血中鉛濃度が高い群が低い群よりも、陽性と判定される際の抗体量が有意に低くなった(P= 0.04)。

考察

本調査は Body condition index と血中鉛濃度が、感染歴に及ぼす影響として調査を実施した。この調査結果から、Body condition index が低く血中鉛濃度が高い群は、これらと反対の条件を共に持つ Body condition index が高く血中鉛濃度が低い群に比較して、感染有の個体の割合が有意に高いことから、Body condition index の低下と血中鉛濃度の増加が共に現れるとき、感染歴のある個体の割合が増加することが示唆された。

第1章の結果から、春の渡り時期のヘテロフィルとリンパ球の割合は Body condition index と血中鉛濃度の両者が有意に影響を及ぼすことが示されている。本調査結果を合わせると、春の渡り時期には Body condition index の低下と、血中鉛濃度が増加した状態の個体が、個体群の中で増加するため、A 型インフルエンザ抗体を持つ個体の割合が春の渡り時期に増加している可能性が考えられる。感染歴の増加という点では、免疫機能は機能していると考えられるものの、Body condition index や血中鉛濃度の高低の条件によって、感染歴に有意な差異が見られることは、感染後の獲得免疫等の機能とは別に、感染に係る免疫機能にこれらの要素が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

表2-4. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽の感染歴について Body condition と鉛汚染の構成による差を Kruskal-wallis 検定で解析した結果

P 値	BCI-・Pb low (70)	BCI-・Pb high (21)	BCI+・Pb low (58)	BCI+・Pb high (21)
BCI-・Pb low (70)	-	0.37	0.09	0.68
BCI-・Pb high (21)	-	-	**0.01**	0.22
BCI+・Pb low (58)	-	-	-	0.44
BCI+・Pb high (21)	-	-	-	-

BCI：主成分分析から推定値よりも実測値が小さい群をマイナス、大きい群をプラスとした時の分類で、それぞれ BCI-と BCI+で分類している。Pb：血中鉛濃度4.0μg/dL 未満の群を Pb low、4.0μg/dL 以上の群を Pb high で分類している。括弧内はサンプルサイズを示す。

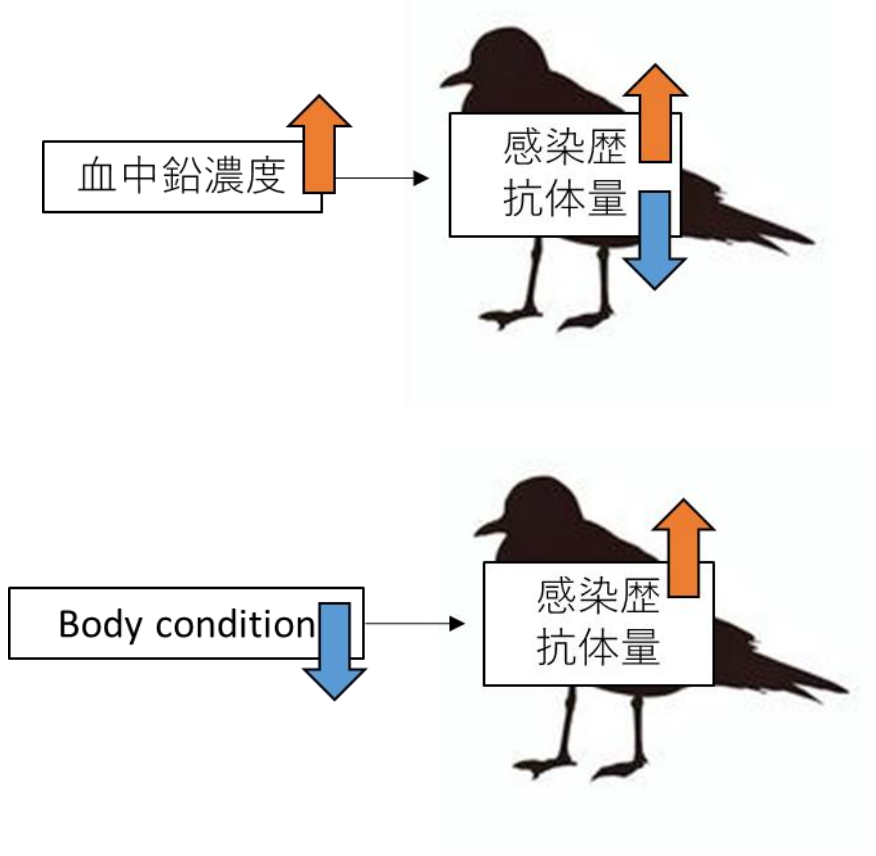


図2-3. 前節の結果から導かれた、Body condition index と血中鉛濃度の変化によって生じるA型インフルエンザの感染歴と抗体量の推移の模式図

橙色の矢印は増加、青色の矢印は減少を示す。第2章第3節ではこのような関係性が示唆される結果が得られた。

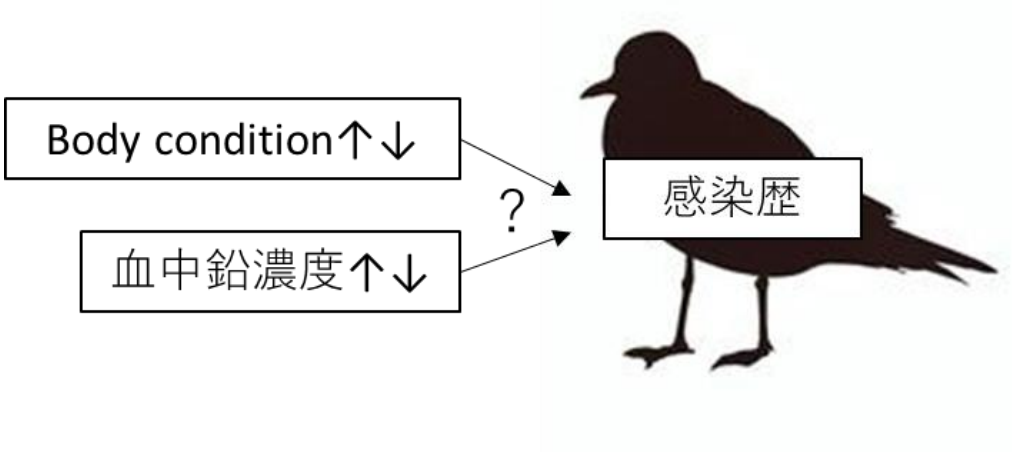


図2-4. 本節で検証する関係性の模式図

本節では、A 型インフルエンザの感染歴と抗体量に影響を及ぼすことが示唆された Body condition index と血中鉛濃度を対象にして、これらの程度(高低)によって感染歴に有意な差異がみられるか、確認を行った。

第5節：春の渡り時期に Body condition と鉛汚染は A 型インフルエンザ感染にどのように影響しているのか

緒言

これまでの調査によって、Body condition の減少と血中鉛濃度の増加は、血中の免疫機能細胞や分子に抑制の影響を及ぼすことが明らかになった。さらに、その影響は A 型インフルエンザの感染に対して、Body condition 減少と血中鉛濃度増加が共に存在することで、感染歴のある個体の割合が有意に増加することが示唆された。一方、調査地域で越冬するユリカモメの Body condition は、越冬期間中有意に変動することが示されている(Ushine *et al*., 2017)。すなわち、体重と筋肉量は秋の渡り時期から越冬期は有意に増加、越冬期から春の渡り時期に有意に減少し、越冬期間中を通して春の渡り時期に最も低値となる(Ushine *et al*., 2017)。また、第1章から、血中鉛濃度も越冬期間中に有意に変動することが示されている。

ユリカモメの A 型インフルエンザウイルスの感染歴や抗体量は春の渡り時期に有意に増加することから、感染歴に影響を及ぼす Body condition と血中鉛濃度の2つの要素が、共に越冬期間中に変動する時に、春の渡り時期に Body condition が低下し、かつ血中鉛濃度が高い個体の割合が増加する結果、A 型インフルエンザの抗体陽性率や抗体量が有意に増加する可能性がある。

本節では、渡りを考慮して分類した越冬期間の3つの時期における、Body condition と血中鉛濃度に対する A 型インフルエンザウイルスの感染歴と抗体量の関係性について、検証を行った。

材料と方法

2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽を対象とした。時期の定義は第1章に倣い、ユリカモメの越冬期間を、秋の渡り時期、越冬期、春の渡り時期に分類した。

解析手法は、ELISA で測定された抗体量に正規性があることを Shapiro-wilk 検定で確認した。はじめに感染歴を目的変数として、調査年や地域の要素で関係性がないことを確認し、BCI と血中鉛濃度を説明変数として、多項ロジステッィク回帰分析を実施した。次に抗体

量を目的変数、Body condition と血中鉛濃度を説明変数として、重回帰分析を実施した。抗体量については全ての分析の有意水準は0.05とし、統計分析はフリーソフト Stata (ver. 14.0) を使用した。

結果

各時期の解析結果を表2-5に示した。秋の渡り時期の感染歴 (BCI：P= 0.23、95% CI -0.17 – 0.71、血中鉛濃度：P= 0.34、95% CI -1.24 – 0.43)と抗体量 (BCI：P＝0.52、95% CI -0.09 – -0.19、血中鉛濃度：P= 0.23、95% CI -0.00 – 0.04)は、Body condition と血中鉛濃度によって有意に説明されなかった。越冬期は、感染歴が血中鉛濃度によって、有意に説明されたが(血中鉛濃度 P= 0.02、95% CI 0.03 – 0.33)、Body condition には有意に説明されず、抗体量は Body condition と血中鉛濃度共に有意に説明されなかった。一方で、春の渡り時期では、感染歴は Body condition (P= 0.03、95% CI -7.99 – -0.43)と血中鉛濃度(P= 0.047、95% CI 0.03 – 4.28)の両要素によって有意に説明されたことに加えて、抗体量は Body condition (P= 0.047、95% CI -0.34 – -0.00)によって有意に説明された。

考察

本解析結果のうち、秋の渡り時期の A 型インフルエンザ感染は、Body condition や鉛汚染の影響は有意に関係していないことが示唆された。越冬期では、感染歴について血中鉛濃度が増加すると感染歴のある個体が有意に増加することが示された。これは本章第3節の考察から、鉛汚染の影響は抗体産生の時点で明瞭に現れるような明敏な影響であるという考察に符合する。そして春の渡り時期には、感染歴に Body condition が有意な抑制の影響を及ぼすと共に、抗体産生に血中鉛濃度が有意な抑制の影響を及ぼすことが示唆された。

A型インフルエンザウイルスに対して、生体は自然免疫と獲得免疫が共役して防除に働く(Koutsakos *et al.,* 2019)。100種以上の鳥類の体重とヘテロフィル、リンパ球の血中細胞数の関係を解析した Ruhs *et al.* (2020)は、ヘテロフィルの数は鳥自身の生活環境よりも体重に依存することを示し、免疫細胞に及ぼす Body condition の影響の重要性を示唆した。ユリカモメの体重と筋肉量は越冬期間のうち、春の渡り時期に最低となる(Ushine *et al.,* 2017)。春の渡り時期にユリカモメの免疫機能は、第1章の結果から Body condition と鉛汚染の両者に有

意な影響をうける。血中鉛濃度についても、越冬期間を通して有意に変動し、春の渡り時期は秋の渡り時期よりも汚染濃度が高くなる。前節で、この2つの要素が共に免疫機能の抑制を引き起こす条件を満たすとき、A 型インフルエンザウイルス感染の陽性個体は有意に増加することが示されている。これらの結果をふまえると、春の渡り時期は血中鉛濃度が個体群の中でより高い状態、そして、Body condition index が個体群の中でより低い状態を満たした個体が存在した場合には、感染歴の亢進が有意に生じる可能性が示唆された(図2-5)。

A 型インフルエンザが発症した際の症状の1つに、体重の減少がある(Van Gils *et al*., 2007)。渡り時期は Zugunruhe という生態によって体重の減少が、実際の渡り行動が開始される前に、既にみられると考えられている(Bauchinger and Biebach, 2001)。この知見を踏まえると、春の渡り時期に A 型インフルエンザに感染したユリカモメは症状として、さらに Body condition index を構成する、体重の減少が引き起こされる可能性も懸念される。

環境汚染物質・病原体の感染・Body condition の3つの要素を対象に調査を試みた知見は、渡りを行わず通年同一地域に生息する生態を有する鳥類(留鳥)で、わずかに報告されている。留鳥のシジュウカラを対象に10月から7月の9ヵ月間の住血胞子虫の寄生率、体重、そして空気中の重金属濃度の関係を調査した報告では、Body condition と重金属濃度はいずれも住血胞子虫の寄生率に影響を及ぼさなかった(DUTRA *et al.,* 2017)。一方で、フランスで16個体群のスズメ(*Passer montanus*)を対象に、餌から取り込まれるカドミウムと鉛の汚染濃度、血液原虫 *Plasmodium relictum* の感染率、そして体重の関係を調査した知見では、鉛の汚染濃度は *P. relicum* の感染率及び体重と負の関係を有することが示された(Bichet *et al*., 2013)。これらの知見から、病原体の感染率に及ぼす Body condition や鉛汚染の影響は、宿主となる鳥種、調査対象の病原体の病原性、鉛の汚染経路といった要素によって関係の有無やその程度に差異が生じると考えられる。本調査の場合、ユリカモメの持つ渡り生態が加わることによって、経口的な汚染経路が考えられる鉛汚染と Body condition は変動を生じており、これらの要素が春の渡り時期に、A 型インフルエンザウイルスの感染率を有意に高めるような消長が生じていると示唆された。

表2-5. 2018年11月から2021年4月に捕獲した東京湾群と2019年1月から2021年4月に捕獲した三河湾群、計170羽における、各時期の感染歴と感染歴のある91羽の抗体量に及ぼす Body condition(BCI)と血中鉛濃度の影響を、各々ロジスティック回帰分析と重回帰分析した結果 Coef. は決定係数、95% CI は95%信頼区間を示す。括弧内はサンプルサイズを示す。

秋の渡り時期 (41)				
目的変数	説明変数	Coef.	P 値	95% CI
感染歴	BCI	0.27	0.23	-0.17 – 0.71
	血中鉛濃度	-0.41	0.34	-1.24 – 0.43
抗体量	BCI	0.13	0.23	-0.09 – 0.35
	血中鉛濃度	-0.09	0.56	-0.43 – 0.24
越冬期 (77)				
目的変数	説明変数	Coef.	P 値	95% CI
感染歴	BCI	-0.25	0.28	-0.70 – 0.20
	血中鉛濃度	0.18	0.02	0.03 – 0.33
抗体量	BCI	0.05	0.24	0.00 – 0.09
	血中鉛濃度	-0.06	0.52	-0.25 – 0.13
春の渡り時期 (52)				
目的変数	説明変数	Coef.	P 値	95% CI
感染歴	BCI	-4.21	0.03	-7.99 – -0.43
	血中鉛濃度	2.16	0.047	0.03 – 4.28
抗体量	BCI	-0.01	0.24	-0.04 – 0.01
	血中鉛濃度	-0.20	0.0001	-0.25 – -0.16

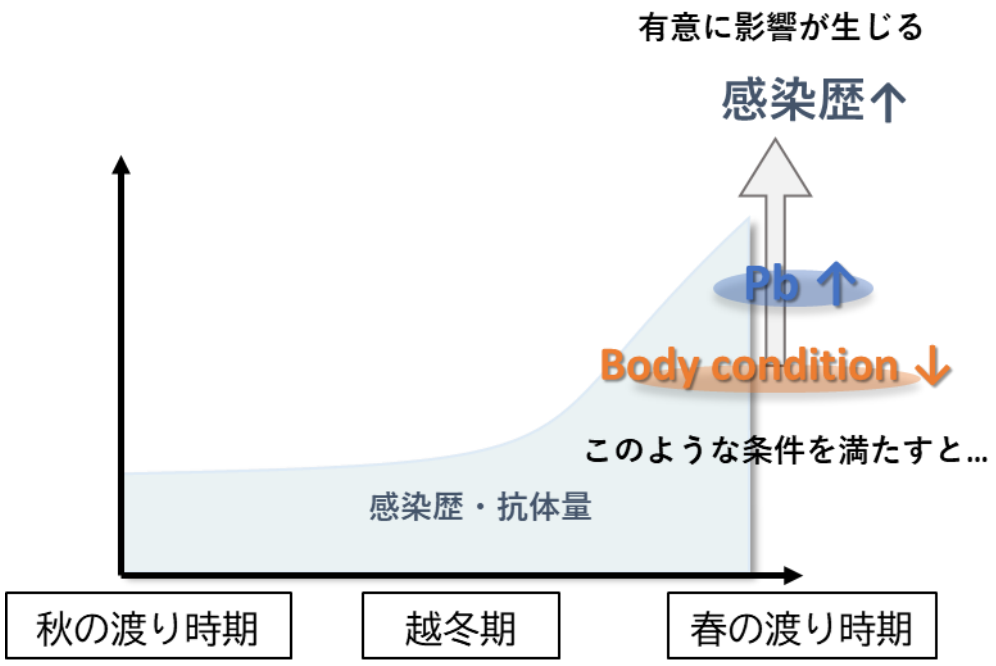


図2-5. 本節の結果から考えられる、春の渡り時期の A 型インフルエンザの感染歴の増加の機序の模式図

本節の解析結果から、春の渡り時期は、・血中鉛濃度が他個体より高い、・Body condition index が他個体より低い、という状態を共に有する個体がいる時には、有意に感染歴が増加に傾くことが示唆された。

考察及び結論

ELISA の陽性判定の持続期間を考慮すると、本章第2節から調査対象のユリカモメ個体群は国内で A 型インフルエンザの感染が起きていると考えられる。しかし、抗体量や抗体陽性率は秋の渡り時期から春の渡り時期にかけて直線的な増加は示されなかった。この理由として、はじめに、秋の渡り時期から越冬期の期間に、抗体量と抗体陽性率に有意な変化がみられなかった点を考察する。第1章の結果から、秋の渡り時期から越冬期は、血中鉛濃度が有意に増加する。この変化に加えて、Body condition として用いた体重、脂肪量、筋肉量も有意に増加する(Ushine *et al*., 2017)。この2つの要素の増加は、免疫機能に対して相反する事象が増加することを意味するため、これらの事象が共に A 型インフルエンザの感染に対して作用したことによって、秋の渡り時期から越冬期の期間には、抗体量と抗体陽性率に有意な差が表れなかったと考えられる。

次に、越冬期から春の渡り時期の期間に、抗体量と抗体陽性率が有意に増加した点を考察する。本章第3節の解析結果から、春の渡り時期は他の時期と異なり、血中鉛濃度は Body condition と共に免疫機能に有意な影響を及ぼすだけではなく、血中鉛濃度単一でも、抗体量に有意な影響を及ぼすという、明敏な鉛汚染の免疫影響が示唆された。第1章より血中鉛濃度は越冬期から春の渡り時期は有意に減少するが、この減少傾向にもかかわらず、抗体量や抗体陽性率は春の渡り時期に有意に増加する。この理由の1つには、血中鉛濃度の持続的な汚染影響が考えられる。鉛をはじめとする重金属は、それ自体が生体に影響を及ぼすため、体外に排泄されると影響はなくなるが(Afsar *et al*., 2019)、持続的な汚染を受けている場合には鉛の持続汚染として、生体影響が表れる。国内の製鋼作業従事者712名を対象に行われた鉛汚染の影響調査では、従事者の就業年数によって汚染期間に幅があるものの、1年未満から10年以上の汚染期間を持つ従事者において、平均汚染量が14.2±7.6μg/100g/日と低濃度の汚染であったにも関わらず、過酸化脂質合成に係る Superoxide dismutase(SOD)活性の亢進と過酸化脂質代謝に係る Glutathione peroxidase(GPx)活性の減弱が報告されている(伊藤 *et al*., 1984)。活性酸素はそれ自体の作用によって異物を排除するが、同時に炎症反応の誘発に寄与するので、過剰な産生は免疫機能の抑制や免疫機能を担う細

胞の死に機能する(Torres *et al*., 2005; Yang *et al*., 2013)。前章の調査結果から本調査対象のユリカモメは、国内で越冬している間、量に変動はあるものの、絶えず鉛に汚染を受けていることが明らかになった。鳥類の鉛の影響量の持続汚染による免疫機能への影響は、これまでに報告されていないが、上述のヒトの知見を考慮すると、低濃度の鉛汚染を絶えず受けることによって、ユリカモメの免疫機能の抑制が生じている可能性がある。この持続的な汚染影響による免疫機能の抑制と、Body condition の減少による免疫機能評価のための検査項目への影響が加わることで、春の渡り時期は A 型インフルエンザウイルスの感染歴と抗体量が増加した可能性がある(図2-6)。

本調査では、春の渡り時期の感染歴の増加の原因として、ユリカモメ体内の要因として、Body condition index の変動や汚染を受ける血中鉛濃度の量に注目して、感染の受けやすさを検証した。しかし、感染歴を増加する要因として、感染に実際に係る病原体の存在、つまり、春の時期に新たな感染の発生(感染機会の増加)という要素も考えられる。この要素に関連するものに、ユリカモメの生態的特徴が挙げられる。ヨーロッパで実施された渡り鳥の A 型インフルエンザサーベイランス調査を使用して、渡り鳥の A 型インフルエンザ感染に係るダイナミクスをモデル解析したがある(Alba *et al*., 2012)。この解析の中で、ユリカモメは春の渡りの時期(3月以降)に、マガモなど A 型インフルエンザウイルスに不顕性感染するカモ類を初発種とした二次感染のリスク種として示されている(Alba *et al*., 2012)。本調査地域においても、春の渡り時期になると、ユリカモメ個体群は A 型インフルエンザに不顕性感染する水面採餌カモ類やオオバン (*Fulica atra*) と共に採餌や休息している姿が観察される (牛根 未発表) 。これらの知見に基づくと、本章の調査結果の春の渡り時期の有意な抗体量と抗体陽性率の増加には、春の渡り時期にユリカモメがカモ類といった他種の渡り鳥と生息環境を共有することによって、A 型インフルエンザウイルスの感染機会が増加し、その結果、抗体量や抗体陽性率の増加が引き起こされた可能性も考えられる。

本章第3節より、感染歴と抗体量に及ぼす鉛汚染の影響について、血中鉛濃度の増加は抗体量の減少に寄与するのに対し、個体群内の感染歴のある個体の割合は、血中鉛濃度の増加によって有意に増加した。ここで矛盾する事象は、血中鉛濃度は抗体量に対して抑制の

影響を示すにもかかわらず、血中鉛濃度が高くなると抗体陽性率が増加することである。この事象を説明する知見は、以下に述べるヒトの免疫細胞やマウス及びラットの鉛曝露実験から、知見を収集することで考察される。

鉛は免疫系の分子や細胞に異なる作用を及ぼす。例えばウイルス感染の防御に寄与するIgM 型の B 細胞やヘルパーT 細胞、あるいは TNFα、IFN-γ、IL-2に対しては抑制作用を示すが(Boskabady *et al*., 2012; Han *et al*., 2021; Skalny *et al*., 2020; USEPA, 2011)、炎症反応を惹起する IL-1、4、8、10の産生を亢進する作用を有する(Xing *et al*., 2018)。IgM 型の B 細胞やヘルパーT 細胞の抑制によって、鉛汚染は抗体産生抑制作用と持つ一方で、TNFα、IFN-γ、IL-2への抑制作用や炎症反応の惹起によって易感染性を導いた結果、感染が起きると、鉛が影響を及ぼさない獲得免疫や鉛によって亢進を生じる IgG、A、E によって、抗体が多量に産生される(Bernier *et al*., 1995; Cao *et al*., 2018; USEPA, 2011)。すなわち、感染が発生していない場合、鉛による直接的な免疫細胞の機能抑制による抗体産生の抑制が、免疫機能の抑制による易感染性の作用と共に生じているが、一度感染が成立すると、鉛自身の免疫細胞の抑制と同時に、鉛による抑制を受けない獲得免疫の亢進によって抗体産生が増大するため、見かけ上、血中鉛濃度の増加によって、抗体産生の増加が示されると考えられる(図2-7)。

本章の結果から、渡りによる感染率の上昇には、生態的な影響と共に Body condition や鉛汚染が影響しており、これらはそれぞれが時期ごとに有意に変動しながら、寄与していることが考えられる。渡り時期の A 型インフルエンザウイルスの感染率の増加には、鉛や Body condition、そして調査対象以外の要素が同時に寄与すると考えられる。

本章は A 型インフルエンザウイルスを対象に解析を実施した。感染はウイルスの病原性や環境中の A 型インフルエンザウイルスの存在量や分布に影響する可能性がある。このうち、国内の A 型インフルエンザの分布は、渡り鳥が飛来する秋の時点で速やかに全国に拡大する(Moriguchi *et al*., 2021)。そのため、本調査地域である東京湾と三河湾の間には、A 型インフルエンザウイルスの分布に著しい偏りはないと考えられる。A 型インフルエンザウ

イルスの特徴は変異速度の速さである(Kim *et al*., 2018)。A 型インフルエンザウイルスの宿主を担う鳥類は、感染によって獲得した抗体がおよそ1年しか持続しない(Hoye *et al*., 2010)。そのため鳥類は毎年、感染する A 型インフルエンザウイルスを学習し、抗体を産生する必要がある。渡り鳥の A 型インフルエンザウイルス拡散と A 型インフルエンザウイルスの変異速度を同時に示唆した知見を以下に示す。2018年度に香川県の養鶏場で発生した高病原性鳥インフルエンザ H5N6亜型(香川株)は、NA 遺伝子以外は2016-2017年度にヨーロッパ・韓国の野鳥から分離された H5N8亜型(各々、ヨーロッパ株、韓国株)と近縁で、国内の死亡野鳥サーベイランスで島根県のコブハクチョウ、東京都のオオタカ、兵庫県のハシブトガラス及びハシボソガラスから分離された H5N6亜型(国内野鳥株)とは分子系統樹で異なる分枝に位置していた。また、NA 遺伝子は香川株と国内野鳥株で共に、ヨーロッパで分離された H3N6亜型・H4N6亜型に由来していた。このことから、香川株はヨーロッパを中心に流行した H5N8亜型とユーラシア大陸で循環している低病原性の N6亜型の NA 遺伝子を持つ遺伝子再集合ウイルスであり、夏季の野鳥の繁殖地域で遺伝子再集合が起こった可能性が推察されている(高病原性鳥インフルエンザ疫学調査チーム, 2018)。A 型インフルエンザウイルスが遺伝子再集合を行うほど、家禽やヒトに病原性が強い変異株が発生する確率が高くなる。そのため、A型インフルエンザウイルスの遺伝子再集合の機会は、One Health の上で重要な防疫ポイントとなると考えられる。水鳥では複数の個体群が合わさり、コロニーを形成して繁殖する、コロニー繁殖の生態を持つ(Buckley, 1979; Burger, 1979)。コロニーでは、繁殖期間中の A 型インフルエンザウイルスの感染拡大の場を担うだけでなく、異なる越冬地で感染し、コロニーに持ち込まれたウイルスが1羽の生体内で出会うことで、遺伝子再集合が発生しやすい場でもある(Postnikova *et al*., 2021)。ユリカモメは繁殖地で数百羽程度のコロニーを形成し、繁殖する(Gribble, 1976)。2008年から2009年にオランダのユリカモメの大型コロニーで行われた低病原性 H16亜型ウイルス検査では、生後1週の巣内びなで H16亜型ウイルスが検出され、その検出率は繁殖日数を経るごとにコロニー内で増加傾向にあった(Verhagen *et al*., 2014)。ユリカモメは休息をとりながら、短距離を移動する渡り戦略であることを踏まえると(Ornithology, 2002)、ユリカモメは越冬地で A 型インフルエン

ザウイルスに感染した場合にも、短距離を少しずつ移動して、繁殖地までたどり着ける可能性がある。つまり、本章の調査が示した結果と考察は、春の渡り時期にユリカモメの A 型インフルエンザの感染率が有意に増大することが、その個体の死亡しやすさを示しているのではなく、繁殖地へより高率に A 型インフルエンザウイルスを運び、新たな変化株の発生に貢献している可能性を示唆している。これまでにも、カモメ類はヨーロッパ大陸と北アメリカ東部の A 型インフルエンザウイルスの多様化や分布拡大を担っていることが報告され(Benkaroun *et al*., 2016)、ユリカモメのみで発見される A 型インフルエンザウイルス亜型 H16亜型も報告されている(Munster *et al*., 2005)。これらの知見から、渡り鳥の中でもユリカモメは A 型インフルエンザウイルスの変異に貢献している可能性が高く、本調査は、宿主の免疫機能と、免疫機能に影響を及ぼす要素の検証によって、ユリカモメにおける A 型インフルエンザウイルス変異への関与を考察した知見の意味合いも有する。

考えられるバイアス

第1章でもバイアスとして述べたが、齢についてはサンプルサイズの点から解析を実施しなかった。A型インフルエンザウイルス抗体は感染機会と関係するとともに、加齢による免疫機能の構築とも関係するため、成鳥は幼鳥に比較して抗体産生能が高いと言われている(Hill *et al*., 2016; Van Ginkel *et al*., 2015)。そのため、今後は齢の解析を実施するために十分なサンプルサイズを整える必要がある。

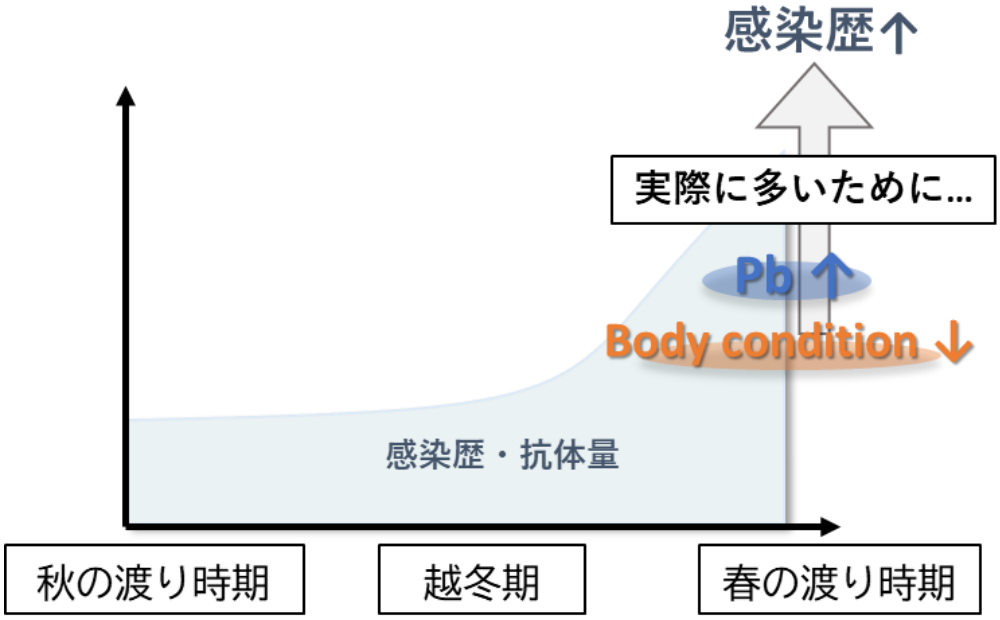


図2-6. 第2章の調査結果から考察される春の渡り時期における感染歴増加に繋がる模式図

本調査結果によって、A 型インフルエンザの感染歴は春の渡り時期に有意に増加した。感染歴の増加を引き起こす要素として、Body condition index の減少と血中鉛濃度の増加の両要素が存在すると、有意に感染歴が増加することが示唆された。時期を考慮して解析した結果、他の時期と異なり、春の渡り時期は Body condition index の減少と血中鉛濃度の増加の状態を共に満たす個体が表れた時、有意に感染歴の増加が引き起こされることが考察された。この考察にこれまでに調査されたユリカモメの Body condition index と血中鉛濃度の推移を合わせると、春の渡り時期は Body condition index が他個体に比較して低い、血中鉛濃度が高い(時期で分類した時、越冬期から有意に減少するものの、秋の渡り時期と比較すると有意に高いことから)という、感染歴の増加に寄与する状態を満たした個体が春の渡り時期は増加する可能性があることから、実際に春の渡り時期に感染歴が増加した可能性が考えられる。

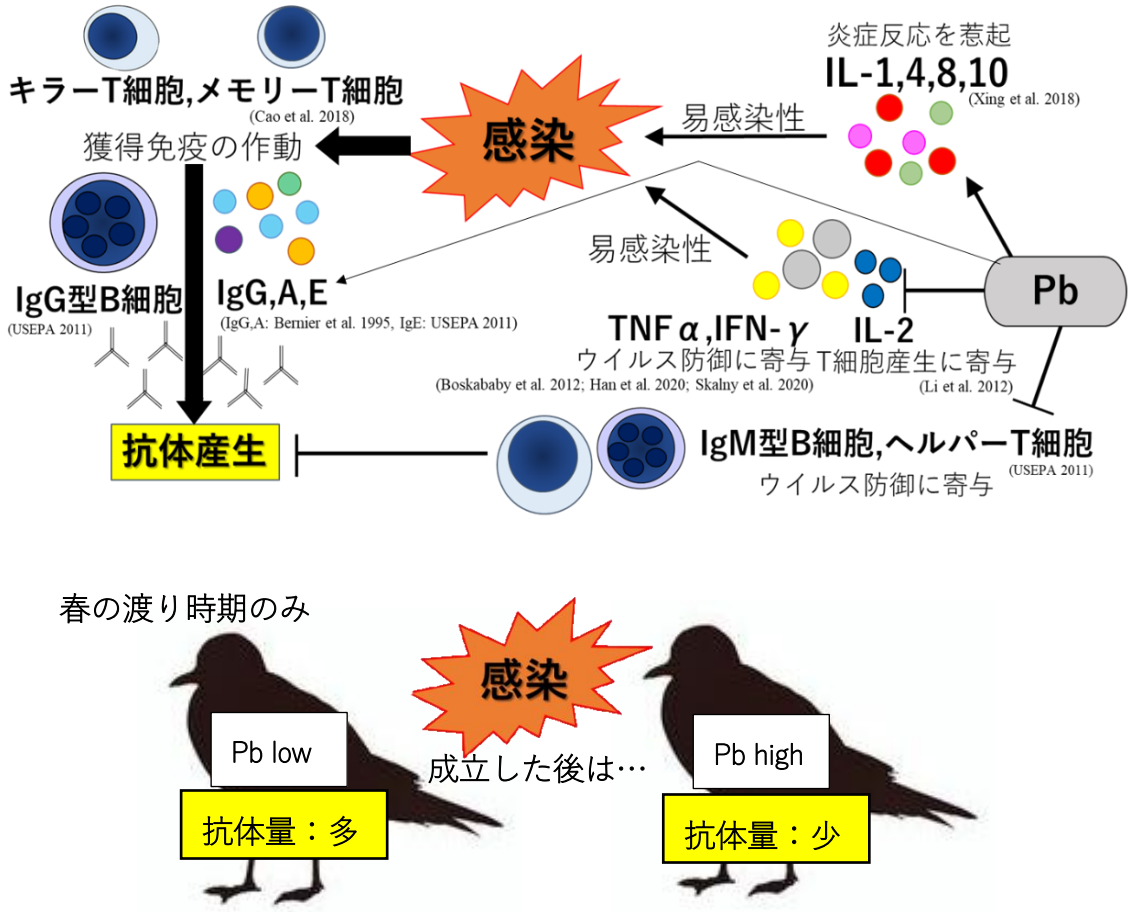


図2-7. 既存の知見から考えられる抗体陽性個体における鉛濃度と抗体量の関係性の模式図

抗体産生について、血中鉛濃度の増加は有意に減少の影響を及ぼすことが示唆された。一方で、感染歴に対して血中鉛濃度の増加は有意な増加の影響を及ぼすことが示された。この結果が導かれた原因の1つとして、鉛が影響を及ぼす免疫細胞の種類が考えられる。つまり、鉛汚染は感染に関する免疫細胞や分子の機能の妨げることで感染しやすい状態を作る。そして、感染が成立した後、春の渡り時期においては抗体産生に係る免疫細胞に対して、血中鉛濃度が高い個体の免疫細胞にはより大きい抗体産生機能の抑制を引き起こすことによって、感染歴としては増加するものの、産生される抗体量は、血中鉛濃度が高い個体ほど、その抑制の影響を受けやすいという機序が考えられる。

Appendix 2-1. キットのプロトコルに従う方法のプロトコル

1. キットのインフルエンザ A エリーザプレート(不活性化 A 型インフルエンザウイルス抗原を吸着したストリップ式 96 穴マイクロプレート)を開封し、室温にする
2. 指示陰性血清(抗 A 型インフルエンザウイルス抗体陰性鶏血清)100μL を 2well に入れる
3. 指示陽性血清(抗 A 型インフルエンザウイルス抗体陽性鶏血清)100μL を 2well に入れる
4. 検体希釈液(界面活性剤・アジ化ナトリウム含有緩衝食塩液)で 10 倍に希釈した検体の血漿 100μL を well に入れる
5. 室温で 60 分インキュベート
6. 界面活性剤含有リン酸緩衝液 200μL で 4 回洗浄する
7. コンジュゲート(西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識抗 A 型インフルエンザウイルスマウスモノクローナル抗体)100μL を各 well に入れ、室温で 30 分間インキュベート
8. 界面活性剤含有リン酸緩衝液 200μL で 4 回洗浄する
9. 過酸化水素含有テトラメチルベンジジン(TMB)溶液 100μL を入れ、室温で 10 分間インキュベート
10. 反応停止液(ドデシル硫酸ナトリウム水溶液)100μL を入れる
11. 波長 650nm で吸光度を測定する
12. 検体の吸光度 S、陰性血清の吸光度 N の比 S/N が 0.5 以上のとき陰性、0.5 未満のとき陽性と判定した。

Appendix 2-2. キット内の2次抗体のみを、市販される2次抗体で代替する方法のプロトコル

1. キットのインフルエンザ A エリーザプレート(不活性化 A 型インフルエンザウイルス抗原を吸着したストリップ式 96 穴マイクロプレート)を開封し、室温にする
2. 指示陰性血清(抗 A 型インフルエンザウイルス抗体陰性鶏血清)100μL を 2well に入れる
3. 指示陽性血清(抗 A 型インフルエンザウイルス抗体陽性鶏血清)100μL を 2well に入れる
4. 検体希釈液(界面活性剤・アジ化ナトリウム含有緩衝食塩液)で 10 倍に希釈した検体の血漿 100μL を well に入れる
5. 室温で 60 分インキュベート
6. 界面活性剤含有リン酸緩衝液 200μL で 4 回洗浄する
7. 検体希釈液で 2000 倍に希釈した Goat anti-bird IgY H&L (HRP)100μL を各 well に入れ、室温で 30 分間インキュベート
8. 界面活性剤含有リン酸緩衝液 200μL で 4 回洗浄する
9. 過酸化水素含有テトラメチルベンジジン(TMB)溶液 100μL を入れ、室温で 10 分間インキュベート
10. 反応停止液(ドデシル硫酸ナトリウム水溶液)100μL を入れる
11. 波長 650nm で吸光度を測定する
12. 陰性/陽性の判定の判定は、ELISA で一般的に用いられる算出方法である、陰性検体の分散値を不確かさとして算出し、分散値を 3 倍した値に陰性検体の吸光度の平均値を加算した値を基準として、この値以上の吸光度を持つ検体を抗体陽性、未満の検体を抗体陰性と判定した。

総括及び結言

渡り生態とエネルギー代謝に関する既存知見を考慮すると、生体のエネルギーは渡りと免疫機能の間でトレードオフが生じるため、渡りの際には免疫機能に十分なエネルギーが充てられず、その結果渡り時期には病原体の感染率が増加するという一連の仮説が立てられる。しかし、この仮説を検証した報告はこれまでに存在しない。

現在渡り鳥が病原体の運び屋と考えられ、人獣共通感染症の A 型インフルエンザで、上述の仮説に関連する知見がどこまで明らかにされているのか、レビューを行った。A 型インフルエンザの感染事例はカモ目とチドリ目カモメ科の鳥類が多く、カモ目の潜水カモ類とカモメ科で死亡率が高いことが示された。さらに、カモ目とカモメ科では渡り戦略や渡りに伴う体重、筋肉量、脂肪量といった項目(Body condition)の変動に差が認められ、潜水カモ類とカモメ科は共に A 型インフルエンザウイルスの感染率が高いとされるが、この渡り生態が感染にどのように影響するのかは、解明されていなかった。この他、A 型インフルエンザの感染実験による感染機序の知見や A 型インフルエンザと Body condition の関係に関する知見はカモ目に比較してカモメ科で乏しいことが明らかとなった。

病原体の感染に係る免疫機能は、Body condition の減少による影響だけでなく、環境汚染物質の曝露によっても影響を受ける。環境汚染物質の中でも重金属の鉛は、多くの野鳥種で汚染による生体影響が報告され、一部の鳥種では鉛汚染によって種の存続にまで影響が及んでいる。

本研究では、カモメ科の内、本州で越冬するユリカモメを対象に、渡りによる Body condition の変動と環境汚染物質の鉛の汚染が及ぼす免疫機能への影響を把握し、Body condition と鉛汚染が実際に病原体の感染に影響を及ぼすのか、「渡り時期に鉛汚染や Body condition によってユリカモメの免疫機能は影響を受け、この影響によって、ユリカモメの A 型インフルエンザ感染は渡り時期に増加し、それは鉛汚染と Body condition が関与する」という仮説の検証を試みた。

第1章では、仮説の内「渡り時期に鉛汚染や Body condition によってユリカモメの免疫機能は影響を受ける」という部分の検証を本章で実施した。2018年から2021年に、東京湾で越冬する個体群と三河湾で越冬する個体群計326羽のユリカモメを捕獲した。これらのユリカモメは秋の渡り時期、春の渡り時期、その間の越冬期の全ての時期の間で有意な鉛汚染濃度の差異がみられ、越冬期、春の渡り時期、秋の渡り時期の順に高濃度となった。鉛の汚染源はユリカモメの初列大雨覆羽に含まれる窒素と炭素の安定同位体比の分析によって、海洋性の甲殻類や貝類と推定された。鉛はユリカモメの調査対象の免疫機能の指標となる血液検査項目の内、ヘテロフィルとリンパ球の割合に有意な影響を及ぼし、これらの免疫細胞の割合との関係から、免疫機能に抑制の影響を及ぼすことが明らかになった。また、血中鉛濃度は4.0μg/dL を境として、ヘテロフィルの増加とリンパ球の減少に働くことが示され、既存報告で提唱されている鳥類の鉛汚染の基準と位置付けられる濃度20μg/dL よりも低い濃度で免疫機能に影響を及ぼす可能性考えられた。Body condition は主成分分析を用いて Body condition index と免疫機能を評価する血液検査項目との関係を解析した結果、Body condition は免疫機能の維持に寄与することが示された。

以上の鉛汚染と Body condition が免疫機能に及ぼす影響を踏まえて、時期を考慮して重回帰分析や順序ロジスティック回帰分析を実施した。その結果、秋の渡り時期から春の渡り時期を通してヘテロフィルとリンパ球の割合は血中鉛濃度にそれぞれ亢進と抑制の関係を示したが、特に春の渡り時期ではヘテロフィルとリンパ球の割合は Body condition にもそれぞれ有意な亢進と抑制の関係を有していた。実際に春の渡り時期は秋の渡り時期よりも血中鉛濃度が高く、Body condition の体重と筋肉量は越冬期間中で最低となるため、春の渡り時期は、渡りと免疫機能の間でエネルギーのトレードオフが生じ、Body condition が鉛汚染と共に免疫機能に有意な影響を及ぼす可能性があると考えられた。CD4と CD8α はヘテロフィルとリンパ球の割合と反対の挙動を示し、秋の渡り時期と越冬期には CD4は Body condition の増加によって有意に増加し、CD8α は Body condition の低下と血中鉛濃度の増加によって有意に増加したが、春の渡り時期にはこのような関係は得られなかった。

以上の結果から、仮説「渡り時期に鉛汚染や Body condition によってユリカモメの免疫機

能は影響を受ける」は当てはまらず、免疫機能は時期によってBody conditionや鉛汚染から受ける影響に差異があり、春の渡り時期では、ヘテロフィルとリンパ球の割合は Body condition と鉛汚染によって有意な影響を受け、春の渡り時期はこれら免疫細胞の割合へ抑制が生じやすいことが示唆された。

第2章では、仮説の内「ユリカモメの A 型インフルエンザ感染は渡り時期に増加し、それは鉛汚染と Body condition が関与する」という部分の検証を実施した。第1章と同一の個体群を対象に、市販 A 型インフルエンザウイルス抗体の ELISA キットのプロトコルを改変して、ユリカモメ血漿中の A 型インフルエンザウイルス抗体を測定した。ELISA で得られる定性結果を感染歴、ELISA で測定する吸光度を抗体量と定義した。第1章で定義した秋の渡り時期、越冬期、春の渡り時期の間の抗体量と抗体陽性率の差を Wilcoxon の順位相関係数とカイ二乗検定を使用して評価した結果、春の渡り時期にのみ、抗体量と抗体陽性率は有意に増加することが示された。A 型インフルエンザ感染に Body condition や鉛汚染が影響しているのか、第1章で定義した BCI と血中鉛濃度の測定結果を使用して解析を行った。A 型インフルエンザウイルス抗体陰性を0、陽性を1として解析したところ、Body condition(決定係数 [以下、Coef.] -0.31、P= 0.04、95%信頼区間 [以下、 95% CI] -0.60 – -0.02)と血中鉛濃度(Coef. 0.98、P= 0.02、95% CI 0.15 – 1.81)は共に感染歴によって有意な差異がみられ、Body condition が高いと抗体陽性個体は減少し、反対に血中鉛濃度が高いと抗体陽性個体は増加する傾向が確認された。抗体陽性と判定された91羽を対象に、抗体量と Body condition、血中鉛濃度の関係を重回帰分析した結果、Body condition は有意な関係は有さなかった(Coef. 0.03、P= 0.21、95% CI -0.01 – 0.06)が、血中鉛濃度は増加によって抗体量を有意に減少させる関係がみられた(Coef. -0.08、P= 0.03、95% CI -0.16 – -0.01)。

血中鉛濃度と Body condition は A 型インフルエンザの感染歴と有意に関係するため、Body condition と血中鉛濃度を高低に分類し、それぞれの条件を満たす4つの群について、感染歴に差がみられるか確認した。Body condition の高低の基準は、第1章で BCI

設定の際に算出した第1主成分の実測値と推定値の差の正負を、血中鉛濃度の高低の基準は、第1章で免疫細胞の割合に影響を及ぼした4.0μg/dL 以上/未満を使用した。解析の結果、Body condition が低く血中鉛濃度が高い群は、Body condition が高く血中鉛濃度が低い群よりも感染歴のある個体の割合が有意に高くなった。

最後に、A 型インフルエンザの感染歴と抗体量に対する Body condition と血中鉛濃度の影響は、渡り時期によって差異がみられるのか、確認した。秋の渡り時期、越冬期、春の渡り時期ごとに、抗体量と感染歴をそれぞれ目的変数として、BCI と血中鉛濃度を説明変数として重回帰分析と多項ロジスティック解析を実施した。その結果、秋の渡り時期は全ての変数間に有意な関係がみられなかったが、越冬期は感染歴に対して血中鉛濃度が有意な影響を与え(Coef. 0.18、P= 0.02、95% CI 0.03 – 0.33)、春の渡り時期には感染歴に Body condition(Coef. -0.42、P= 0.03、95% CI -7.99 – -0.43)と血中鉛濃度(Coef. 2.16、P= 0.047、95% CI 0.03 – 4.28)、抗体量に Body condition(Coef. 0.20p= 0.047、95% CI -0.34 – -0.00)が有意な影響を及ぼした。これらの調査結果から、ユリカモメの A 型インフルエンザ感染は、渡り時期であっても秋の渡り時期と春の渡り時期で鉛汚染や Body condition から受ける影響の程度に差異があり、春の渡り時期にのみ鉛汚染と Body condition 両者の影響を受けやすいことが示唆された。既存知見や第1章で示された春の渡り時期は越冬期に比較して血中鉛濃度と Body condition は有意に減少する点を鑑みると、これらの要素だけでは春の渡り時期の有意な抗体量や感染歴の増加は説明できず、ユリカモメがカモ目などの他種の鳥類と生息地を共有するという生態的要素も原因となると示唆された(図5)。

本研究によって、渡り鳥のユリカモメの生存戦略に人為的な要素が介入することで、種の存続に潜在的な影響が引き起こされる可能性が示唆された。すなわち、ユリカモメは渡り戦略として、短距離に分けて渡りを行う。この生態的特徴に合致するように渡り前はエネルギーの過度な貯蔵が確認されない。この渡り戦略をとるため、渡り時期の中でも特にこれから移動を行う(体内のエネルギーが減少に傾く)時期は、免疫機

能が抑制を受けやすいと考えられる。この生態と生理のバランスに、環境汚染物質の曝露等が加わることによって、春の渡り時期に、病原体の感染が有意に生じやすい状態が導かれると考えられた(図6)。

本研究を通して、ユリカモメの渡りによる Body condition の変動と環境からの鉛汚染による免疫機能への影響や、A 型インフルエンザウイルスの感染との関係が、基礎的な知見と共に明らかになった。今回解明あるいは示唆された知見の中でも、1. 免疫機能は Body condition の増加によって維持、鉛汚染によって抑制される、2.ユリカモメは 4.0μg/dL 以上という低濃度で免疫機能の抑制を生じる可能性がある、3. A 型インフルエンザの感染は渡り時期、Body condition、そして鉛汚染が複合的に影響する、という3点は野生動物感染症の管理へ重要な示唆を与えるものである。これらは現行の野生動物感染症の管理体制への提言として、次のように表せる(図7)。

1. 野鳥の保全において、季節的な免疫機能等の基礎データを把握する必要がある。

本研究結果では、これまでに渡り生態の基礎が明らかでなかったユリカモメについて、渡りに伴う免疫項目の関係性を Body condition や血中鉛濃度の要素から検証した。国内に生息する野鳥の約半数は渡りを行い、その中には未だ渡り生態の基礎的な知見が明らかになっていない種も存在する。普通種/希少種の定義は容易に変わりうるため、今後の種の保全やそれらの種を含めた多様性の意味でも、種の存続に係るような健康状態に関する基礎的なデータを調査し、把握することが必要である。

2. 鉛汚染の実態調査、鉛汚染の把握が必要である。

第1章第3節のレビューから、国内の環境中の鉛濃度は大気中では減少傾向にあると考えられるが、土壌中には一定の濃度で存在していることが推定される。本調査によって、国内を冬季のみ利用するユリカモメにおいて、鉛汚染と汚染による免疫機能の抑制の影響が確認された。そのため、国内に年間を通して生息するような野生動物種についても、鉛汚染を受け、何らかの生体影響を起こしている可能性がある。このような潜在的な汚染が存

在する場合、A 型インフルエンザのような、野生動物に致死的症状を及ぼす病原体が国内で拡大した際には、在来種でのアウトブレイクが生じる恐れがある。野生動物の保全や多様性の維持に繋げるためにも、国内の固有種を含めた在来種について、鉛の汚染状況を把握することは重要である。

3. サーベイランスの際には、動物側の情報(Body condition や鉛汚染)を把握する必要がある。

近年、野生動物由来感染症の早期発見を目的とした調査(サーベイランス)の体制が整備されている。サーベイランスに取り組む際、現在は病原体側の情報が病原性や機序が調査され、その情報を共有するネットワークも構成されている(Kuiken *et al*., 2005)。一方で、宿主側の知見は病原体側の知見に比較すると乏しい。感染の3大要素を鑑みても、病原体側の情報と同じくらい、宿主側の情報も重要であると考えられる。そのため、今後野生動物由来感染症のサーベイランスや感染ダイナミクスに関係する調査に取り組む際には、事前に宿主側の情報を調査し、知見を把握することが重要である。

渡り鳥において、渡りの時期に病原体の感染率が高まるという知見がいくつかの捕獲調査から報告されているが、具体的な免疫機能を評価する血液検査項目との関係や渡り時期との関係について詳細な解明には至っていない。本研究のように、渡り生態と免疫機能の関係を明らかにして、その影響を実際の感染症を取り上げて実証した知見は、初めての知見となる。

近年、野生動物に関連する感染症は様々な社会的影響を及ぼしている。野鳥が関係する人獣共通感染症は、野鳥の生態と感染機会の観点において未解明な部分が多く存在する。日本は渡り鳥が国内で観察される野鳥の半数以上を占める。このため、渡り鳥によってもたらされる病原体による在来種の影響だけでなく、感染症の中の野鳥の役割や、渡り鳥を通して国内の環境把握を行うことによって、種の多様性に係る保全生物学へ貢献することが期待される。

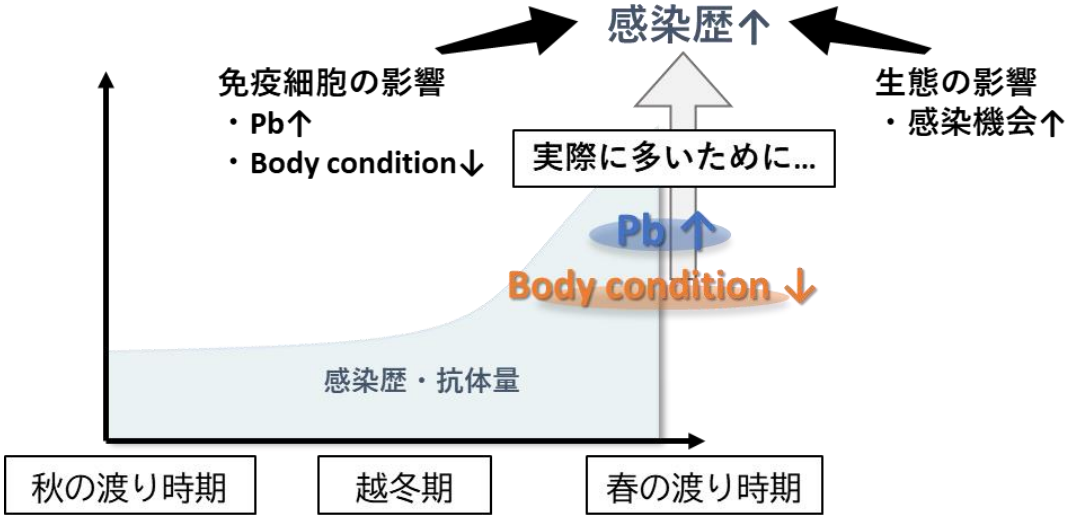


図5. 本研究から考察されるユリカモメの A 型インフルエンザ感染歴増加に影響を及ぼす要因の模式図

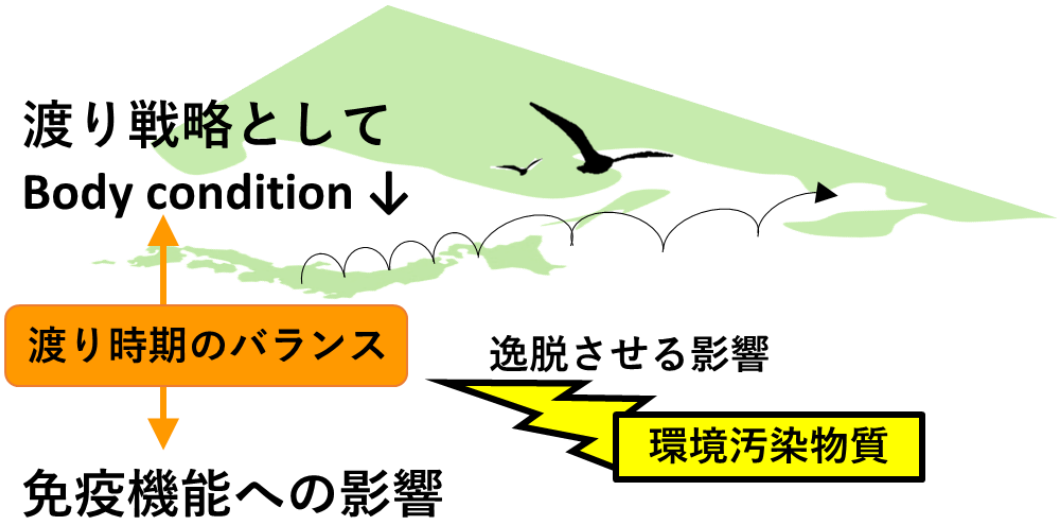


図6. 本研究から考察される、ユリカモメの生態に影響を及ぼす環境汚染物質の意味合いの模式図

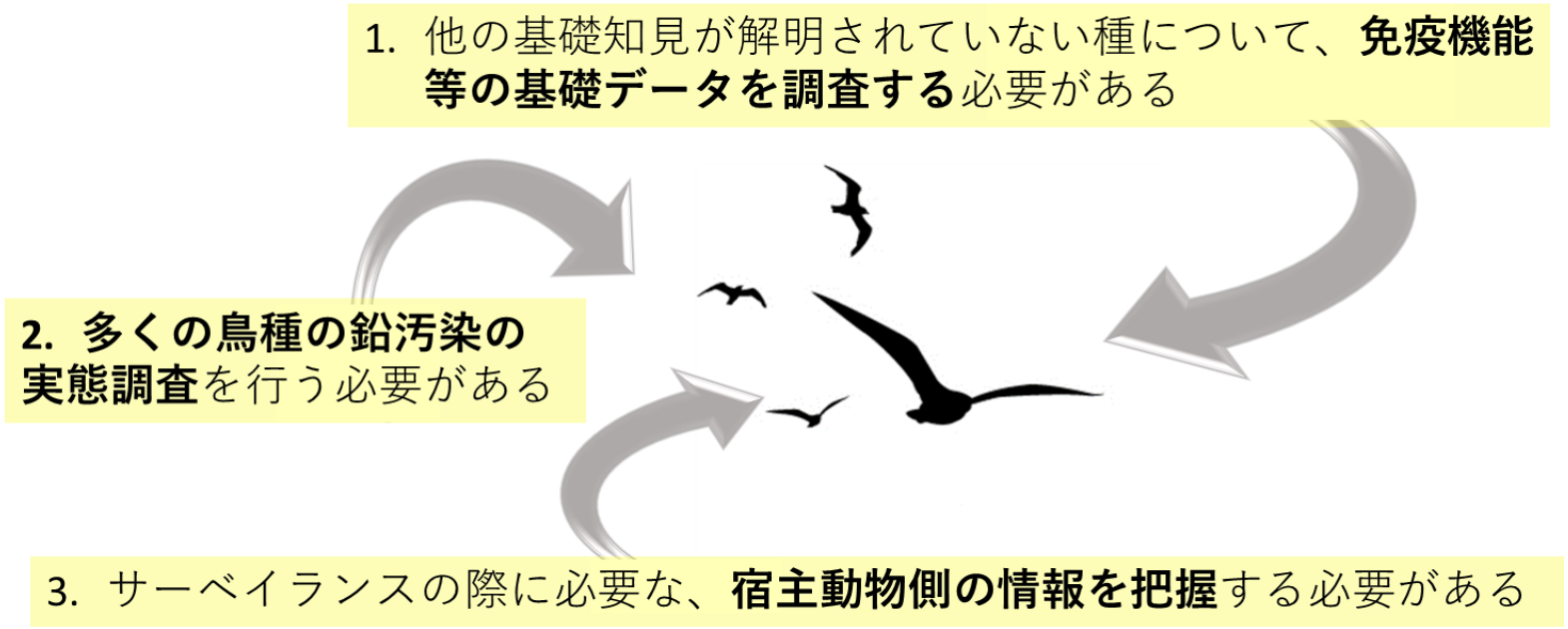


図7. 本研究から導かれる提言の模式図

本研究は渡り鳥のユリカモメの生態的な基礎知見の解明から、A 型インフルエンザを対象とした感染症の発生に係る要素に検証を試みた。本研究結果から導かれるこれらの提言を通して、社会に貢献すると期待される。

謝辞

本研究を行うに当たり、懇篤なご指導とご高配を賜りました日本獣医生命科学大獣医学部応用獣医学部門羽山伸一教授に厚く御礼申し上げます。また、ユリカモメの捕獲、外部計測に当たり、ご指導・ご助言を賜りました NPO 法人行徳野鳥観察舎佐藤達夫様に深甚なる感謝の意を示します。並びに、現地調査を支えていただきました NPO 行徳野鳥観察舎のスタッフの皆様、日本鳥類標識協会倉橋義弘様、時田賢一様、内田聖様に心から感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、研究・論文執筆へのご理解と貴重なご助言を賜りました日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科水族医学研究室倉田修教授、動物衛生学研究室田中良和教授、獣医寄生虫学研究室常盤俊大講師、日本獣医生命科学大学動物医療センター早川典之先生、国立環境研究所生物・生態系環境研究センター大沼学主任研究員、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室岡松正敏准教授に深甚なる感謝の意を示します。そして、本研究に不可欠な専門的な実験を実施いただきました、北海道大学大学院獣医学研究院毒性学教室石塚真由美教授、中山翔太助教授、鹿児島大学農水産獣医学域獣医学系共同獣医学部獣医学科動物衛生学分野小澤真准教授に心から感謝申し上げます。そして、決して順調ではなかった野外調査に同行し、安全にユリカモメを扱っていただいた、日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科野生動物学研究室大坪寛子様、若山絵夢様、廣田祥子様に深く感謝いたします。執筆のあらゆる段階において有益なご示唆をいただきました日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科野生動物学研究室加藤卓也講師に御礼申し上げます。結びに、抗体検査の共同研究にご理解をいただき、試薬をご提供いただきました(株)IDEXX ラボラトリーズ産業動物診断薬事業部石亀貴士様、江口幸子様、波多野れん様に厚く御礼申し上げます。本研究は平成30年度公益財団法人日本科学協会笹川科学研究助成、平成29年度環境省総合環境研究推進費(SII-1)、JST/JICA, SATREPS (JPMJSA1501) 及び Program for supporting introduction of the new sharing system (JPMXS0420100619)からの助成を受けて遂行することができました。

最後に、本研究にご協力を賜りました日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科野生動

物学研究室員の皆様、並びにポストドクター、研究員、大学院生、大学院研究生、教室員の皆様、並びに公益財団法人山階鳥類研究所の皆様に心よりお礼申し上げます。

引用文献

Adams, S.C., Xing, Z., Li, J., Cardona, C.J., 2009. Immune-related gene expression in response to H11N9 low pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells. Molecular immunology 46, 1744-1749.

Afsar, B., Elsurer Afsar, R., Kanbay, A., Covic, A., Ortiz, A., Kanbay, M., 2019. Air pollution and kidney disease: review of current evidence. Clinical Kidney Journal 12, 19-32.

Aina, O.O., Ajibade, T., 2014. Age-related changes in haematologic parameters of cage-raised Japanese quails (Cortunix japonica). Journal of Veterinary Medicine and Animal Health 6, 104-108.

Alba, A., Bicout, D.J., Vidal, F., Curcó, A., Allepuz, A., Napp, S., García-Bocanegra, I., Costa, T., Casal, J., 2012. Model to Track Wild Birds for Avian Influenza by Means of Population Dynamics and Surveillance Information. PLoS ONE 7, e44354.

Alfaro, M., Sandercock, B.K., Liguori, L., Arim, M., 2018. Body condition and feather molt of a migratory shorebird during the non‐breeding season. Journal of Avian Biology 49, jav-01480.

Allaine, D., Lebreton, J., 1990. The influence of age and sex on wing‐tip pattern in adult Black‐headed Gulls Larus ridibundus. Ibis 132, 560-567.

Alonso-Alvarez, C., Tella, J.L., 2001. Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. Canadian Journal of Zoology 79, 101-105.

Ameji, N., Sa'idu, L., Abdu, P., 2017. Detection of avian influenza antibodies and antigens in poultry and some wild birds in Kogi state, Nigeria. Sokoto Journal of Veterinary Sciences 15, 62-68.

Ankney, C.D., Afton, A.D., 1988. Bioenergetics of breeding Northern Shovelers: diet, nutrient reserves, clutch size, and incubation. The Condor 90, 459-472.

Arima, H., Sugawa, H., Onishi, N., 2004. Sexual dimorphism in the external form of the black-headed gull Larus ridibundus.

Arsnoe, D.M., 2010. Influence of Body Condition and Homo-Vs. Heterosubtypic Immunity on Influenza A Virus Infection in Mallard Ducks: Experimental Infection Data. Michigan State University. Fisheries and Wildlife.

Arsnoe, D.M., Ip, H.S., Owen, J.C., 2011. Influence of body condition on influenza A virus infection in mallard ducks: experimental infection data. PloS one 6, e22633.

Aydin, S., 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides 72, 4-15.

Badry, A., Krone, O., Jaspers, V.L.B., Mateo, R., García-Fernández, A., Leivits, M., Shore, R.F., 2020. Towards harmonisation of chemical monitoring using avian apex predators: Identification of key species for pan-European biomonitoring. Science of The Total Environment 731, 139198.

Baert, J.M., Stienen, E.W., Heylen, B.C., Kavelaars, M.M., Buijs, R.-J., Shamoun-Baranes, J., Lens, L., Müller, W., 2018. High-resolution GPS tracking reveals sex differences in migratory behaviour and stopover habitat use in the Lesser Black-backed Gull Larus fuscus. Scientific reports 8, 1-11.

Baker, K., 1993. Identification guide to European non-passerines. British Trust for Ornithology.

Barrett, R.T., Camphuysen, K., Anker-Nilssen, T., Chardine, J.W., Furness, R.W., Garthe, S., Hüppop, O., Leopold, M.F., Montevecchi, W.A., Veit, R.R., 2007. Diet studies of seabirds: a review and recommendations. ICES Journal of Marine Science 64, 1675-1691.

Bauchinger, U., Biebach, H., 2001. Differential catabolism of muscle protein in garden warblers (Sylvia borin): flight and leg muscle act as a protein source during long-distance migration. Journal of Comparative Physiology B 171, 293-301.

Bearhop, S., Waldron, S., Votier, S.C., Furness, R.W., 2002. Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers. Physiological and biochemical zoology 75, 451-458.

BEDROSIAN, B., CRAIGHEAD, D., 2009. Blood lead levels of Bald and Golden Eagles sampled during and after hunting seasons in the Greater Yellowstone Ecosystem. Ingestion of Lead from Spent Ammunition: Implications for Wildlife and Humans. The Peregrine Fund, Boise, Idaho, USA. DOI 10.

Beldomenico, P.M., Telfer, S., Gebert, S., Lukomski, L., Bennett, M., Begon, M., 2008. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 275, 1753-1759.

Bellinger, D.C., Stiles, K.M., Needleman, H.L., 1992. Low-Level Lead Exposure, Intelligence and Academic Achievement: A Long-term. Pediatrics 90, 855.

Benaltabet, T., Gutner-Hoch, E., Torfstein, A., 2021. Heavy m*et al*, rare earth element and Pb isotope dynamics in mussels during a depuration experiment in the Gulf of Aqaba, northern Red Sea. Frontiers in Marine Science.

Benkaroun, J., Shoham, D., Kroyer, A.N., Whitney, H., Lang, A.S., 2016. Analysis of influenza A viruses from gulls: An evaluation of inter-regional movements and interactions with other avian and mammalian influenza A viruses. Cogent Biology 2, 1234957.

Berglund, Å.M., Koivula, M.J., Eeva, T., 2011. Species-and age-related variation in m*et al* exposure and accumulation of two passerine bird species. Environmental pollution 159, 2368-2374.

Berglund, Å.M., Rainio, M.J., Eeva, T., 2015. Temporal trends in m*et al* pollution: using bird excrement as indicator. PloS one 10.

Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. Journal of dairy science 88, 2017-2026.

Bernier, J., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Tryphonas, H., Fournier, M., 1995. Immunotoxicity of heavy m*et al*s in relation to Great Lakes. Environmental Health Perspectives 103, 23-34.

Berto, D., Rampazzo, F., Gion, C., Noventa, S., Formalewicz, M., Ronchi, F., Traldi, U., Giorgi, G., 2019. Elemental Analyzer/Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA/IRMS) as a Tool to Characterize Plastic Polymers in a Marine Environment. IntechOpen.

Beyer, W.N., Meador, J.P., 2011. Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations. CRC Press.

Bichet, C., Scheifler, R., Cœurdassier, M., Julliard, R., Sorci, G., Loiseau, C., 2013. Urbanization, Trace M*et al* Pollution, and Malaria Prevalence in the House Sparrow. PLoS ONE 8, e53866.

Bird, B.H., Mazet, J.A., 2018. Detection of emerging zoonotic pathogens: an integrated one health approach.

Blanco, G., Frías, O., 2001. Symbiotic feather mites synchronize dispersal and population growth with host sociality and migratory disposition. Ecography 24, 113-120.

Bobby Fokidis, H., Greiner, E.C., Deviche, P., 2008. Interspecific variation in avian blood parasites and haematology associated with urbanization in a desert habitat. Journal of Avian Biology 39, 300-310.

Bonnedahl, J., Drobni, P., Johansson, A., Hernandez, J., Melhus, A., Stedt, J., Olsen, B., Drobni, M., 2010. Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (Larus ridibundus) extended-spectrum b*et al*actamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden. J Antimicrob Chemother 65, 1939-1944.

Boskabady, M.H., Samarghandian, S., Farkhondeh, T., 2012. Tracheal responsiveness to methacholine and ovalbumin; and lung inflammation in guinea pigs exposed to inhaled lead after sensitization. Ecotoxicology and environmental safety 86, 233-238.

Brooks-Moizer, F., Roberton, S.I., Edmunds, K., Bell, D., 2009. Avian influenza H5N1 and the wild bird trade in Hanoi, Vietnam. Ecology and Society 14.

Brouwer, A., Gonzales, J., Huneau, A., Mulatti, P., Kuiken, T., Staubach, C., Stegeman, A., Antoniou, S.E., Baldinelli, F., Van Der Stede, Y., Aznar, I., 2019. Annual Report on surveillance for avian influenza in poultry and wild birds in Member States of the European Union in 2018. EFSA Journal 17.

Brown, J.D., Goekjian, G., Poulson, R., Valeika, S., Stallknecht, D.E., 2009a. Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. Vet Microbiol 136, 20-26.

Brown, J.D., Stallknecht, D.E., Beck, J.R., Suarez, D.L., Swayne, D.E., 2006. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. Emerging infectious diseases 12, 1663.

Brown, J.D., Stallknecht, D.E., Berghaus, R.D., Luttrell, M.P., Velek, K., Kistler, W., Costa, T., Yabsley, M.J., Swayne, D., 2009b. Evaluation of a commercial blocking enzyme-linked immunosorbent assay to detect avian influenza virus antibodies in multiple experimentally infected avian species. Clin. Vaccine Immunol. 16, 824-829.

Brown, M.E., 1996. Assessing body condition in birds, In: Current ornithology. Springer, pp. 67-135.

Buckley, F.G., 1979. Colony site selection by colonial waterbirds in coastal New Jersey, In: Proceedings of the Colonial Waterbird Group, pp. 17-26.

Buehler, D.M., Encinas-Viso, F., Petit, M., Vézina, F., Tieleman, B.I., Piersma, T., 2009. Limited access to food and physiological trade-offs in a long-distance migrant shorebird. II. Constitutive immune function and the acute-phase response. Physiological and Biochemical Zoology 82, 561-571.

Buehler, D.M., Tieleman, B.I., Piersma, T., 2010. How do migratory species stay healthy over the annual cycle? A conceptual model for immune function and for resistance to disease. Oxford University Press.

Burger, J., 1979. Colony size: a test for breeding synchrony in herring gull (Larus argentatus) colonies. The Auk 96, 694-703.

Burger, J., 1994. Heavy m*et al*s in avian eggshells: another excretion method. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues 41, 207-220.

Burger, J., Gochfeld, M., 2004. Marine birds as sentinels of environmental pollution. EcoHealth 1, 263-274.

Bushnell, P., Jaeger, R., 1986. Hazards to health from environmental lead exposure: a review of recent literature. Veterinary and human toxicology 28, 255-261.

Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1994. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. Nature 372, 255-257.

Cabana, G., Rasmussen, J.B., 1996. Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 10844-10847.

Cai, F., Calisi, R.M., 2016. Seasons and neighborhoods of high lead toxicity in New York City: the feral pigeon as a bioindicator. Chemosphere 161, 274-279.

Çakmak, E., Akın Pekşen, Ç., Bilgin, C.C., 2017. Comparison of three different primer sets for sexing birds. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 29, 59-63.

Campos, F., Gutiérrez-Corchero, F., Hernández, A.M., Lopez-Fidalgo, J., 2008. Seasonal variation in the body size-body mass relationship in the Southern Grey Shrike Lanius meridionalis. Acta Ornithologica 43, 139-143.

Canfield, R.L., Henderson Jr, C.R., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A., Lanphear, B.P., 2003. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 μg per deciliter. New England journal of medicine 348, 1517-1526.

Cantos, F., Alonso-Gómez, A., Delgado, M., 1994. Seasonal changes in fat and protein reserves of the black-headed gull, Larus ridibundus, in relation to migration. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 108, 117-122.

Cao, J., Xu, X., Zhang, Y., Zeng, Z., Hylkema, M.N., Huo, X., 2018. Increased memory T cell populations in Pb-exposed children from an e-waste-recycling area. Science of the Total Environment 616, 988-995.

Cherel, Y., Hobson, K.A., Weimerskirch, H., 2000. Using stable-isotope analysis of feathers to distinguish moulting and breeding origins of seabirds. Oecologia 122, 155-162.

Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H., Ohkouchi, N., 2009. Determination of aquatic food‐web structure based on compound‐specific nitrogen isotopic composition of amino acids. Limnology and Oceanography: methods 7, 740-750.

Chisholm, B., Koike, H., 1999. Reconstructing prehistoric Japanese diet using stable isotopic analysis. International Research Center for Japanese Studies Kyoto, Kyoto, Japan.

Choi, C., Gan, X., Ma, Q., Zhang, K., Chen, J., Ma, Z., 2009. Body condition and fuel deposition patterns of calidrid sandpipers during migratory stopover. Ardea 97, 61-70.

Clark, G.A., 1979. Body weights of birds: a review. The Condor 81, 193-202.

Colabuono, F.I., Taniguchi, S., Montone, R.C., 2012. Organochlorine contaminants in albatrosses and petrels during migration in South Atlantic Ocean. Chemosphere 86, 701-708.

Coplen, T.B., Böhlke, J.K., De Bievre, P., Ding, T., Holden, N., Hopple, J., Krouse, H., Lamberty, A., Peiser,

H., Revesz, K., 2002. Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report). Pure and applied chemistry 74, 1987-2017.

Coulson, J., Monaghan, P., Butterfield, J., Duncan, N., Ensor, K., Shedden, C., Thomas, C., 1984. Scandinavian herring gulls wintering in Britain. Ornis Scandinavica, 79-88.

Coulson, J.C., 2016. A review of philopatry in seabirds and comparisons with other waterbird species. Waterbirds 39, 229-240.

Cramp, S., Brooks, D., 1992. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. The birds of the western Palearctic, vol. VI. Warblers. oxford university Press, oxford.

Cromie, R., Newth, J., Reeves, J., O'Brien, M., Beckmann, K., Brown, M., 2014. The sociological and political aspects of reducing lead poisoning from ammunition in the UK: why the transition to non-toxic ammunition is so difficult, In: Oxford Lead Symposium, p. 104.

Crossin, G.T., Phillips, R.A., Wynne-Edwards, K.E., Williams, T.D., 2013. Postmigratory body condition and ovarian steroid production predict breeding decisions by female gray-headed albatrosses. Physiological and Biochemical Zoology 86, 761-768.

Cui, B., Wang, L.D.L., Ke, J., Tian, Y., 2019. Chinese poultry farmers' decision‐making for avian influenza prevention: a qualitative analysis. Zoonoses and public health 66, 647-654.

Curran, J.M., Robertson, I.D., Ellis, T.M., Selleck, P.W., O'Dea, M.A., 2013. Variation in the responses of wild species of duck, gull, and wader to inoculation with a wild-bird–origin H6N2 low pathogenicity avian influenza virus. Avian diseases 57, 581-586.

Dauwe, T., Janssens, E., Kempenaers, B., Eens, M., 2004. The effect of heavy m*et al* exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit Parus caeruleus eggs. Environmental Pollution 129, 125-129.

Davis, A., Maney, D., Maerz, J., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology 22, 760-772.

De Francisco, N., Ruiz Troya, J., Agüera, E., 2003. Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. Avian Pathology 32, 3-13.

De Rossi, M., Bernasconi, P., Baggi, F., de Waal Malefyt, R., Mantegazza, R., 2000. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. International immunology 12, 1329-1335.

De Voogt, P., 2015. Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer.

Del Hoyo, J., Elliott, A., 1996. J. Sargatal (1996): Handbook of the Birds of the World, Vol 3: Hoatzin to Auks. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

DeNiro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et cosmochimica acta 42, 495-506.

Dinh, P.N., Long, H.T., Tien, N.T.K., Hien, N.T., Mai, L.T.Q., Phong, L.H., Van Tuan, L., Van Tan, H., Nguyen, N.B., Van Tu, P., 2006. Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. Emerging infectious diseases 12, 1841.

Dinsmore, S.J., Collazo, J.A., 2003. The influence of body condition on local apparent survival of spring migrant sanderlings in coastal North Carolina. The Condor 105, 465-473.

Dolejska, M., Cizek, A., Literak, I., 2007. High prevalence of antimicrobial‐resistant genes and integrons in Escherichia coli isolates from black‐headed gulls in the Czech Republic. Journal of Applied Microbiology 103, 11-19.

Doneley, B., Harrison, G.J., Lightfoot, T.L., 2006. Maximizing information from the physical examination. Spix Publishing.

Dufour, K.W., Ankney, C.D., 1995. Hunting mortality of mallards Anas platyrhynchos in relation to time of day, flocking behaviour, and individual condition. Wildlife Biology 1, 89-96.

Dunn, J.C., Goodman, S.J., Benton, T.G., Hamer, K.C., 2013. Avian blood parasite infection during the non-breeding season: an overlooked issue in declining populations? BMC Ecology 13, 30.

DUTRA, D.D.A., SILVEIRA, P., RAMOS, J.A., SOUSA, J.P., BRAGA, É.M., NORTE, A.C., 2017. Haemosporidian infections affect antioxidant defences in great tits Parus major but are not related to exposure to aerial pollutants. Parasitology Open 3.

Ecke, F., Singh, N.J., Arnemo, J.M., Bignert, A., Helander, B., Berglund, Å.M.M., Borg, H., Bröjer, C., Holm, K., Lanzone, M., Miller, T., Nordström, Å., Räikkönen, J., Rodushkin, I., Ågren, E., Hörnfeldt, B., 2017. Sublethal Lead Exposure Alters Movement Behavior in Free-Ranging Golden Eagles. Environmental Science & Technology 51, 5729-5736.

Eikenaar, C., Hegemann, A., 2016. Migratory common blackbirds have lower innate immune function during autumn migration than resident conspecifics. Biology letters 12, 20160078.

Eikenaar, C., Hegemann, A., Packmor, F., Kleudgen, I., Isaksson, C., 2020. Not just fuel: energy stores are correlated with immune function and oxidative damage in a long-distance migrant. Current Zoology 66, 21-28.

Eising, C.M., Eikenaar, C., Schwabl, H., Groothuis, T.G., 2001. Maternal androgens in black-headed gull (Larus ridibundus) eggs: consequences for chick development. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 268, 839-846.

Elenwo, A., Okafor-Elenwo, E., 2014. Zoonotic Diseases of Poultry: A Threat to Profitable Poultry Production. A Review. Journal of Natural Sciences Research 4, 10-12.

Ellis, T.M., Barry Bousfield, R., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Luk, G.S., Tsim, S., Sturm-Ramirez, K., Webster, R.G., Guan, Y., Peiris, J.M., 2004. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. Avian Pathology 33, 492-505.

Elmquist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., Lowell, B.B., 2005. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. Journal of Comparative Neurology 493, 63-71.

Envirionment, M.o.t., 2015. Technical manual for HPAI in wild birds.

Environment., M.o.t., 2017. Status of occurrence and detection of highly pathogenic avian influenza in Japan. https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/bird_flu/wildbird_past.html (accessed 2020/6/11.

Evseev, D., Magor, K.E., 2019. Innate immune responses to avian influenza viruses in ducks and chickens. Veterinary sciences 6, 5.

Fair, J.M., Myers, O.B., 2002. The Ecological and Physiological Costs of Lead Shot and Immunological Challenge to Developing Western Bluebirds. Ecotoxicology 11, 199-208.

Fair, J.M., Taylor-McCabe, K.J., Shou, Y., Marrone, B.L., 2008. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability. Veterinary immunology and immunopathology 125, 268-273.

Fallon, J.A., Redig, P., Miller, T.A., Lanzone, M., Katzner, T., 2017. Guidelines for evaluation and treatment of lead poisoning of wild raptors. Wildlife Society Bulletin 41, 205-211.

Feng, C., Liang, W., 2020. Behavioral responses of black-headed gulls (Chroicocephalus ridibundus) to artificial provisioning in China. Global Ecology and Conservation 21, e00873.

Fereidouni, S.R., Grund, C., Häuslaigner, R., Lange, E., Wilking, H., Harder, T.C., Beer, M., Starick, E., 2010. Dynamics of specific antibody responses induced in mallards after infection by or immunization with low pathogenicity avian influenza viruses. Avian diseases 54, 79-85.

Figuerola, J., Green, A.J., 2000. Haematozoan parasites and migratory behaviour in waterfowl. Evolutionary Ecology 14, 143-153.

Finkelstein, M.E., Gwiazda, R.H., Smith, D.R., 2003. Lead poisoning of seabirds: Environmental risks from leaded paint at a decommissioned military base. Environmental science & technology 37, 3256-3260.

Fisher, I.J., Pain, D.J., Thomas, V.G., 2006. A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. Biological conservation 131, 421-432.

Flint, P.L., Franson, J.C., 2009. Does influenza A affect body condition of wild mallard ducks, or vice versa? Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 276, 2345-2346.

Florijančić, T., Opačak, A., Bošković, I., Jelkić, D., Ozimec, S., Bogdanović, T., Listeš, I., Škrivanko, M., Puškadija, Z., 2009. Heavy m*et al* concentrations in the liver of two wild duck species: influence of species and gender. Italian Journal of Animal Science 8, 222-224.

Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 79, 2814-2822.

Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Brown, I.H., 2003. Animal influenza virus surveillance. Vaccine 21, 1754-1757.

Fox, A.D., King, R., 2011. Body mass loss amongst moulting pochard Aythya ferina and tufted duck A. fuligula at Abberton Reservoir, south east England. Journal of Ornithology 152, 727-732.

French, S.S., Neuman-Lee, L.A., 2012. Improved ex vivo method for microbiocidal activity across vertebrate species. Biology Open 1, 482-487.

Fridolfsson, A.-K., Ellegren, H., 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. Journal of avian biology, 116-121.

Fry, D.M., 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. Environmental health perspectives 103, 165-171.

Fudge, A., 2000. Laboratory reference ranges for selected avian, mammalian, and reptilian species. Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets. Philadelphia, PA: WB Saunders 375, 400.

Fujimaki, Y., 2010. Check-list of birds in Hokkaido 3rd revised edition. Far East Avian Research Group, Miuta, Hokkaido.

Furness, R.W., 1993. Birds as monitors of pollutants, In: Birds as monitors of environmental change. Springer, pp. 86-143.

Furness, R.W., Camphuysen, K., 1997. Seabirds as monitors of the marine environment. iceS Journal of marine Science 54, 726-737.

Gaidet, N., Newman, S.H., Hagemeijer, W., Dodman, T., Cappelle, J., Hammoumi, S., De Simone, L., Takekawa, J.Y., 2008. Duck migration and past influenza A (H5N1) outbreak areas. Emerging infectious diseases 14, 1164.

Gambaryan, A.S., Matrosovich, T.Y., Boravleva, E.Y., Lomakina, N.F., Yamnikova, S.S., Tuzikov, A.B., Pazynina, G.V., Bovin, N.V., Fouchier, R.A., Klenk, H.-D., 2018. Receptor-binding properties of influenza viruses isolated from gulls. Virology 522, 37-45.

Gangoso, L., Alvarez-Lloret, P., Rodríguez-Navarro, A.A., Mateo, R., Hiraldo, F., Donazar, J.A., 2009. Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. Environmental Pollution 157, 569-574.

Gaunt, A.S., Oring, L.W., Able, K., Anderson, D., Baptista, L., Barlow, J., Wingfield, J., 1997. Guidelines to the use of wild birds in research. Washington, DC: The Ornithological Council.

Getz, L.L., Best, L.B., Prather, M., 1977. Lead in urban and rural song birds. Environmental Pollution (1970) 12, 235-238.

Gibson, D., Chaplin, M.K., Hunt, K.L., Friedrich, M.J., Weithman, C.E., Addison, L.M., Cavalieri, V., Coleman, S., Cuthbert, F.J., Fraser, J.D., 2018. Impacts of anthropogenic disturbance on body condition, survival, and site fidelity of nonbreeding Piping Plovers. The Condor: Ornithological Applications 120, 566-580.

Gittleman, J.L., Thompson, S.D., 1988. Energy allocation in mammalian reproduction. American zoologist 28, 863-875.

Gladyshev, M.I., 2009. Stable isotope analyses in aquatic ecology (a review). Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология 2, 381-402.

Gochfeld, J.B., Michael, 2000. Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews 3, 59-78.

Gorissen, L., Snoeijs, T., Van Duyse, E., Eens, M., 2005. Heavy m*et al* pollution affects dawn singing behaviour in a small passerine bird. Oecologia 145, 504-509.

Gorski, W., Jakuczun, B., Nitecki, C., Petryna, A., 1977. Investigation of oil pollution on the Polish Baltic coast in 1974–1975. Przeglad Zoologiczny 21, 20-23.

Gregory, N.G., Robins, J.K., 1998. A body condition scoring system for layer hens. New Zealand Journal of Agricultural Research 41, 555-559.

Gribble, F., 1976. A census of Black-headed Gull colonies. Bird Study 23, 135-145.

Grillo, T., 2011. NATIONAL AVIAN INFLUENZA WILD BIRD SURVEILLANCE PROGRAM (AUSTRALIA).

Grond, K., Ryu, H., Baker, A.J., Santo Domingo, J.W., Buehler, D.M., 2014. Gastro-intestinal microbiota of two migratory shorebird species during spring migration staging in Delaware Bay, USA. Journal of Ornithology 155, 969-977.

Gross, W., Siegel, H., 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian diseases, 972-979.

Guillemain, M., Fritz, H., Klaassen, M., Johnson, A.R., Hafner, H., 2004. Fuelling rates of garganey (Anas querquedula) staging in the Camargue, southern France, during spring migration. Journal of Ornithology 145, 152-158.

Han, B., García‐Mendoza, D., van den Berg, H., van den Brink, N.W., 2021. Modulatory effects of Pb 2 on Virally Challenged Chicken Macrophage (HD‐11) andB‐Lymphocyte (DT40) CellLinesinvitro.

Hanssen, S.A., Hasselquist, D., Folstad, I., Erikstad, K.E., 2005. Cost of reproduction in a long-lived bird: incubation effort reduces immune function and future reproduction. Proc Biol Sci 272, 1039-1046.

Harmon, B.G., 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Poultry science 77, 972-977.

Harrison, P., 1985. Seabirds: an identification guide. Rev. ed. Croom Helm, London, United Kingdom.

Hawkey, C., Hart, M., Samour, H., 1984. Age‐related haematological changes and haemopathological responses in Chilean flamingos (Phoenicopterus chiliensis). Avian Pathology 13, 223-229.

Haynes, L., Arzey, E., Bell, C., Buchanan, N., Burgess, G., Cronan, V., Dickason, C., Field, H., Gibbs, S., Hansbro, P., 2009. Australian surveillance for avian influenza viruses in wild birds between July 2005 and June 2007. Australian veterinary journal 87, 266-272.

Hegemann, A., Matson, K.D., Both, C., Tieleman, B.I., 2012. Immune function in a free-living bird varies over the annual cycle, but seasonal patterns differ between years. Oecologia 170, 605-618.

Helm, B., 2006. Zugunruhe of migratory and non‐migratory birds in a circannual context. Journal of Avian Biology 37, 533-540.

Hernández, M., Margalida, A., 2009. Assessing the risk of lead exposure for the conservation of the endangered Pyrenean bearded vulture (Gypaetus barbatus) population. Environmental Research 109, 837-842.

Herndler-Brandstetter, D., Ishigame, H., Shinnakasu, R., Plajer, V., Stecher, C., Zhao, J., Lietzenmayer, M.,

Kroehling, L., Takumi, A., Kometani, K., 2018. KLRG1+ effector CD8+ T cells lose KLRG1, differentiate into all memory T cell lineages, and convey enhanced protective immunity. Immunity 48, 716-729. e718.

Hesterberg, U., Harris, K., Stroud, D., Guberti, V., Busani, L., Pittman, M., Piazza, V., Cook, A., Brown, I., 2009. Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. Influenza and Other Respiratory Viruses 3, 1-14.

Hill, S.C., Manvell, R.J., Schulenburg, B., Shell, W., Wikramaratna, P.S., Perrins, C., Sheldon, B.C., Brown, I.H., Pybus, O.G., 2016. Antibody responses to avian influenza viruses in wild birds broaden with age. Proc Biol Sci 283.

Hirata, K., 2007. Report of Black-headed Gulls roosting on the roof of a house in kyoto, western Japan Strix 25, 141-146.

Hirata, K., Hasegawa, M., 2012. The age structure of Black-headed Gulls attracted to artificial feedings – a comparison between different food types: artificial food and fish. Osaka Mus. Nat. Hist. 66, 9-18.

Höfle, U., Van De Bildt, M.W.G., Leijten, L.M., Van Amerongen, G., Verhagen, J.H., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T., 2012. Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (Chroicocephalus ridibundus). Avian Pathology 41, 547-553.

Holladay, J.P., Nisanian, M., Williams, S., Tuckfield, R.C., Kerr, R., Jarrett, T., Tannenbaum, L., Holladay, S.D., Sharma, A., Gogal, R.M., 2012. Dosing of adult pigeons with as little as one# 9 lead pellet caused severe δ-ALAD depression, suggesting potential adverse effects in wild populations. Ecotoxicology 21, 2331-2337.

Honda, K., Min, B.Y., Tatsukawa, R., 1986. Distribution of heavy m*et al*s and their age-related changes in the eastern great white egret,Egretta alba modesta, in Korea. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 15, 185-197.

Hood, L.C., Boersma, P.D., Wingfield, J.C., 1998. The adrenocortical response to stress in incubating Magellanic penguins (Spheniscus magellanicus). The Auk 115, 76-84.

Howlett, J., Samour, J., Bailey, T., Naldo, J., 1998. Age-related haematology changes in captive-reared kori bustards (Ardeotis kori). Comparative Haematology International 8, 26-30.

Hoye, B.J., Munster, V.J., Nishiura, H., Fouchier, R.A., Madsen, J., Klaassen, M., 2011. Reconstructing an annual cycle of interaction: natural infection and antibody dynamics to avian influenza along a migratory flyway. Oikos 120, 748-755.

Hoye, B.J., Munster, V.J., Nishiura, H., Klaassen, M., Fouchier, R.A., 2010. Surveillance of wild birds for avian influenza virus. Emerg Infect Dis 16, 1827-1834.

Hsiao, C.-L., Wu, K.-H., Wan, K.-S., 2011. Effects of environmental lead exposure on T-helper cell-specific cytokines in children. Journal of Immunotoxicology 8, 284-287.

Huang, Z., Fang, D., Lv, P., Bian, X., Ruan, X., Yan, Y., Zhou, J., 2012. Differential cellular immune responses between chickens and ducks to H9N2 avian influenza virus infection. Veterinary immunology and immunopathology 150, 169-180.

Iavicoli, I., Carelli, G., Stanek III, E., Castellino, N., Calabrese, E., 2006. Below background levels of blood lead impact cytokine levels in male and female mice. Toxicology and applied pharmacology 210, 94-99.

Inger, R., Bearhop, S., 2008. Applications of stable isotope analyses to avian ecology. Ibis 150, 447-461.

Ishii, C., Nakayama, S.M., Ikenaka, Y., Nakata, H., Saito, K., Watanabe, Y., Mizukawa, H., Tanabe, S., Nomiyama, K., Hayashi, T., 2017. Lead exposure in raptors from Japan and source identification using Pb stable isotope ratios. Chemosphere 186, 367-373.

Issabayeva, G., Aroua, M.K., Sulaiman, N.M.N., 2006. Removal of lead from aqueous solutions on palm shell activated carbon. Bioresource technology 97, 2350-2355.

IUCN, 2012. Larus ridibundus, Black-headed Gull. online., In: IUCN red list of threatened species. Birdlife international, Cambridge.

Iwamoto, A., 2016. H5N1 高病原性鳥インフルエンザと青海湖. モダンメディア 6, 213-217.

Jabot, F., Giraldo, C., Lefebvre, S., Dubois, S., 2017. Are food web structures well represented in isotopic spaces? Functional Ecology 31, 1975-1984.

Jakubas, D., Indykiewicz, P., Kowalski, J., Iciek, T., Minias, P., 2020. Intercolony variation in foraging flight characteristics of black‐headed gulls Chroicocephalus ridibundus during the incubation period. Ecology and Evolution 10, 5489–5505.

Japan, T.o.s.o., 2012. Check-list of Japanese birds. The ornithological society of Japan, Tokyo.

Jehl Jr, J.R., 1997. Cyclical changes in body composition in the annual cycle and migration of the Eared Grebe Podiceps nigricollis. Journal of Avian Biology, 132-142.

Johnson, C.K., Vodovoz, T., Boyce, W.M., Mazet, J.A., 2007. Lead exposure in California condors and sentinel species in California. Report prepared for the California Department of Fish and Game. University of California, Davis.

Jurinović, L., Savić, V., Balenović, M., Lisičić, D., Lucić, V., 2014. Virological and serological investigation

of avian influenza in black headed gulls captured on a rubbish dump in Zagreb, Croatia. Veterinarski arhiv 84, 521-528.

Källender, H., Lebreton, J.D., 1997. Black-headed Gull (Larus ridibundus). Their Distribution and Abundance, London.

Keawcharoen, J., Van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W.E., Van Lavieren, R., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Kuiken, T., 2008. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). Emerging infectious diseases 14, 600.

Kelly, J.F., 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. Canadian journal of zoology 78, 1-27.

Kendall, R.J., Lacker Jr, T.E., Bunck, C., Daniel, B., Driver, C., Grue, C.E., Leighton, F., Stansley, W., Watanabe, P.G., Whitworth, M., 1996. An ecological risk assessment of lead shot exposure in non‐waterfowl avian species: upland game birds and raptors. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 15, 4-20.

Kim, H., Webster, R.G., Webby, R.J., 2018. Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen. Viral immunology 31, 174-183.

Kim, W.-H., Bae, S.H., Cho, S., 2021. Spatiotemporal Dynamics of Highly Pathogenic Avian Influenza Subtype H5N8 in Poultry Farms, South Korea. Viruses 13, 274.

Kirby, J.S., Stattersfield, A.J., Butchart, S.H., Evans, M.I., Grimmett, R.F., Jones, V.R., O'Sullivan, J., Tucker, G.M., Newton, I., 2008. Key conservation issues for migratory land-and waterbird species on the world's major flyways. Bird Conservation International 18, S49-S73.

Kitowski, I., Indykiewicz, P., Wiącek, D., Jakubas, D., 2017a. Intra-clutch and inter-colony variability in element concentrations in eggshells of the black-headed gull, Chroicocephalus ridibundus, in northern Poland. Environmental Science and Pollution Research 24, 10341-10353.

Kitowski, I., Jakubas, D., Wiącek, D., Sujak, A., 2017b. Concentrations of lead and other elements in the liver of the white-tailed eagle (Haliaeetus albicilla), a European flagship species, wintering in Eastern Poland. Ambio 46, 825-841.

Kleijn, D., Munster, V.J., Ebbinge, B.S., Jonkers, D.A., Müskens, G.J.D.M., Van Randen, Y., Fouchier, R.A.M., 2010. Dynamics and ecological consequences of avian influenza virus infection in greater white-fronted geese in their winter staging areas. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 277, 2041-2048.

Kloubec, B., Švecová, Z., 1990. Changes in the south bohemian population of Black-headed Gull (Larus ridibundus) and their possible causes (in Czech). . South bohemian ornithological conference, České Budějovice Proceedings of the II.

Koch, G., Elbers, A.R., 2006. Outdoor ranging of poultry: a major risk factor for the introduction and development of High-Pathogenicity Avian Influenza. NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences 54, 179-194.

Kothlow, S., Mannes, N.K., Schaerer, B., Rebeski, D.E., Kaspers, B., Schultz, U., 2005. Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. Developmental & Comparative Immunology 29, 733-748.

Koutsakos, M., Kedzierska, K., Subbarao, K., 2019. Immune responses to avian influenza viruses. The journal of immunology 202, 382-391.

Krams, I., Vrublevska, J., Cirule, D., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M.J., Sild, E., Hõrak, P., 2012. Heterophil/lymphocyte ratios predict the magnitude of humoral immune response to a novel antigen in great tits (Parus major). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 161, 422-428.

Kreijtz, J., de Mutsert, G., Van Baalen, C., Fouchier, R., Osterhaus, A., Rimmelzwaan, G., 2008. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. Journal of virology 82, 5161-5166.

Krone, O., 2018. Lead poisoning in birds of prey, In: Birds of Prey. Springer, pp. 251-272.

Krueger, W.S., Wade, T.J., 2016. Elevated blood lead and cadmium levels associated with chronic infections among non-smokers in a cross-sectional analysis of NHANES data. Environmental Health 15.

Kubetzki, U., Garthe, S., 2003. Distribution, diet and habitat selection by four sympatrically breeding gull species in the south-eastern North Sea. Marine Biology 143, 199-207.

Kuchipudi, S.V., Chang, K., 2015. Skel*et al* muscle in influenza virus infection-a key player or a bystander. Br. J. Virol 2, 19-21.

Kuiken, T., Leighton, F.A., Fouchier, R.A., LeDuc, J.W., Peiris, J.S.M., Schudel, A., Stöhr, K., Osterhaus, A., 2005. Pathogen surveillance in animals. Science 309, 1680-1681.

Kusaka, S., Hyodo, F., Yumoto, T., Nakatsukasa, M., 2010. Carbon and nitrogen stable isotope analysis on the diet of Jomon populations from two coastal regions of Japan. Journal of Archaeological Science 37, 1968-1977.

Kwon, J.-S., Lee, H.-J., Lee, D.-H., Lee, Y.-J., Mo, I.-P., Nahm, S.-S., Kim, M.-J., Lee, J.-B., Park, S.-Y.,

Choi, I.-S., 2008. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. Virus research 133, 187-194.

La Sorte, F.A., Fink, D., Hochachka, W.M., Kelling, S., 2016. Convergence of broad-scale migration strategies in terrestrial birds. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 283, 20152588.

Lamb, J.S., Satgé, Y.G., Jodice, P.G., 2017. Influence of density‐dependent competition on foraging and migratory behavior of a subtropical colonial seabird. Ecology and evolution 7, 6469-6481.

Lanctot, R.B., Weatherhead, P.J., Kempenaers, B., Scribner, K.T., 1998. Male traits, mating tactics and reproductive success in the buff-breasted sandpiper, Tryngites subruficollis. Animal Behaviour 56, 419-432.

Lanphear, B., Dietrich, K., Auinger, P., Cox, C., 2000. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations< 10 μg/dL in US children and adolescents Public Health Rep 115: 521–529. Find this article online.

Lee, K.A., 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. Integrative and comparative biology 46, 1000-1015.

Leighton, A., 1995. Surveillance of wild animal diseases in Europe. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 14, 819-830.

Leonzio, C., Fossi, C., Focardi, S., 1986. Lead, mercury, cadmium and selenium in two species of gull feeding on inland dumps, and in marine areas. Science of the total environment 57, 121-127.

LePage, H., 2020. Comparison of Migratory and Resident Bird Species in a Contaminated Environment.

Levin, R., Vieira, C.L.Z., Rosenbaum, M.H., Bischoff, K., Mordarski, D.C., Brown, M.J., 2020. The urban lead (Pb) burden in humans, animals and the natural environment. Environmental Research, 110377.

Lewis, N.S., Javakhishvili, Z., Russell, C.A., Machablishvili, A., Lexmond, P., Verhagen, J.H., Vuong, O., Onashvili, T., Donduashvili, M., Smith, D.J., 2013. Avian influenza virus surveillance in wild birds in Georgia: 2009–2011. PloS one 8, e58534.

Linden, M., Møller, A.P., 1989. Cost of reproduction and covariation of life history traits in birds. Trends in Ecology & Evolution 4, 367-371.

Locke, L.N., Bagley, G.E., 1967. Case report: coccidiosis and lead poisoning in Canada geese. Chesapeake Science 8, 68-69.

Loria, D.E., Moore, F.R., 1990. Energy demands of migration on red-eyed vireos, Vireo olivaceus. Behavioral Ecology 1, 24-35.

Lucia, M., André, J.-M., Gontier, K., Diot, N., Veiga, J., Davail, S., 2010. Trace element concentrations (mercury, cadmium, copper, zinc, lead, aluminium, nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the Southwest Atlantic Coast of France. Archives of environmental contamination and toxicology 58, 844-853.

Luna, N., Varela, A.I., Luna-Jorquera, G., Brokordt, K., 2020. Effect of predation risk and ectoparasitic louse flies on physiological stress condition of the red-tailed tropicbird (Phaethon rubricauda) from Rapa Nui and Salas & Gómez islands. PeerJ 8, e9088.

Lundgren, B.O., Kiessling, K.-H., 1985. Seasonal variation in catabolic enzyme activities in breast muscle of some migratory birds. Oecologia 66, 468-471.

Maciusik, B., Lenda, M., Skórka, P., 2010. Corridors, local food resources, and climatic conditions affect the utilization of the urban environment by the Black-headed Gull Larus ridibundus in winter. Ecological research 25, 263-272.

Maggini, I., Bairlein, F., 2011. Body condition and stopover of trans-Saharan spring migrant passerines caught at a site in southern Morocco. Ringing & Migration 26, 31-37.

Makaroff, L.E., Hendricks, D.W., Niec, R.E., Fink, P.J., 2009. Postthymic maturation influences the CD8 T cell response to antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 4799-4804.

Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. Environmental Monitoring and Assessment 71, 187-205.

Martin II, L.B., Navara, K.J., Bailey, M.T., Hutch, C.R., Powell, N.D., Sheridan, J.F., Nelson, R.J., 2008. Food restriction compromises immune memory in deer mice (Peromyscus maniculatus) by reducing spleen-derived antibody-producing B cell numbers. Physiological and Biochemical Zoology 81, 366-372.

Martinez-Haro, M., Green, A.J., Mateo, R., 2011. Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field. Environmental research 111, 530-538.

Masindi, V., Muedi, K.L., 2018. Environmental contamination by heavy m*et al*s. Heavy M*et al*s 19, 2019.

Mateo, R., 2009a. Lead poisoning in wild birds in Europe and the regulations adopted by different countries. Ingestion of lead from spent ammunition: implications for wildlife and humans, 71-98.

Mateo, R., 2009b. Lead poisoning in wild birds in Europe and the regulations adopted by different countries. Ingestion of lead from spent ammunition: implications for wildlife and humans 2009, 71-98.

Mateo, R., Kanstrup, N., 2019. Regulations on lead ammunition adopted in Europe and evidence of

compliance. Ambio 48, 989-998.

Matson, C.A., Choi, S., Livak, F., Zhao, B., Mitra, A., Love, P.E., Singh, N.J., 2020. CD5 dynamically calibrates basal NF-κB signaling in T cells during thymic development and peripheral activation. Proceedings of the National Academy of Sciences 117, 14342-14353.

Matsubara, T., Minami, H., 1998. Stable Isotope Analysis in Avian Ecology Present and Future Perspective. Journal of the Yamashina Institute for Ornithology 30, 59-82.

Mawhinney, K., Diamond, A., Kehoe, F., 1999. The use of energy, fat, and protein reserves by breeding Great Black-backed Gulls. Canadian Journal of Zoology 77, 1459-1464.

Maxwell, M., Robertson, G., 1995. The avian basophilic leukocyte: a review. World's Poultry Science Journal 51, 307-325.

Maxwell, M., Robertson, G., 1998. The avian heterophil leucocyte: a review. World's Poultry Science Journal 54, 155-178.

Mazerolle, D., Hobson, K., Wassenaar, L., 2005. Stable isotope and band-encounter analyses delineate migratory patterns and catchment areas of white-throated sparrows at a migration monitoring station. Oecologia 144, 541-549.

McWilliams, S.R., Whitman, M., 2013. Non-destructive techniques to assess body composition of birds: a review and validation study. Journal of Ornithology 154, 597-618.

Meier, R.E., Votier, S.C., Wynn, R.B., Guilford, T., McMinn Grivé, M., Rodríguez, A., Newton, J., Maurice, L., Chouvelon, T., Dessier, A., 2017. Tracking, feather moult and stable isotopes reveal foraging behaviour of a critically endangered seabird during the non‐breeding season. Diversity and Distributions 23, 130-145.

Melville, D.S., Shortridge, K.F., 2006. Migratory waterbirds and avian influenza in the East Asian–Australasian Flyway with particular reference to the 2003–2004 H5N1 outbreak. Waterbirds around the world, 432-438.

Metryka, E., Chibowska, K., Gutowska, I., Falkowska, A., Kupnicka, P., Barczak, K., Chlubek, D., Baranowska-Bosiacka, I., 2018. Lead (Pb) Exposure Enhances Expression of Factors Associated with Inflammation. International Journal of Molecular Sciences 19, 1813.

Migula, P., Augustyniak, M., Kowalczyk, K., 2000. Heavy M*et al*s, Resting Metabolism Rates and Breeding Parameters in Two Populations of Black-Headed GullLarus ridibundusfrom the Industrially Polluted Areas of Upper Silesia, Poland. Acta Ornithologica 35, 159-172.

Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of 15N along food chains: further evidence and the relation between δ15N and animal age. Geochimica et cosmochimica acta 48, 1135-1140.

Minias, P., 2019. Evolution of heterophil/lymphocyte ratios in response to ecological and life‐history traits: A comparative analysis across the avian tree of life. Journal of Animal Ecology 88, 554-565.

Ministry of Agriculture, F.a.F., 2019 分析法の妥当性確認に関するガイドライン, pp. 1-57.

Mohanraj, T., Sheeba, M., Cross, S.R.T.S., Rajathy, T.J., 2021. Seasonal Variation of Heavy M*et al*s in the Intertidal Gastropod Trochus radiatus of Gulf of Mannar. Open Journal of Marine Science 11, 92-102.

Møller, A.P., Christe, P., Erritzøe, J., Mavarez, J., 1998. Condition, disease and immune defence. Oikos, 301-306.

Møller, A.P., de Lope, F., Saino, N., 2004. Parasitism, immunity, and arrival date in a migratory bird, the barn swallow. Ecology 85, 206-219.

Møller, A.P., Erritzøe, J., 1998. Host immune defence and migration in birds. Evolutionary Ecology 12, 945-953.

Monteiro, L., Furness, R., 1995. Seabirds as monitors of mercury in the marine environment, In: Mercury as a Global Pollutant. Springer, pp. 851-870.

Moon, J.A., Haukos, D.A., 2009. Factors affecting body condition of Northern Pintails wintering in the Playa Lakes region. Waterbirds 32, 87-95.

Moreira, F., 1995. Diet of Black-headed Gulls Larus ridibundus on emerged intertidal areas in the Tagus estuary (Portugal): predation or grazing? Journal of Avian Biology, 277-282.

Moriguchi, S., Amano, T., Ushiyama, K., Fujita, G., Higuchi, H., 2006. The relationship between abdominal profile index and body condition of Greater White-fronted Geese Anser albifrons. Ornithological Science 5, 193-198.

Moriguchi, S., Hosoda, R., Ushine, N., Kato, T., Hayama, S.-i., 2021. Surveillance system for avian influenza in wild birds and implications of its improvement with insights into the highly pathogenic avian influenza outbreaks in Japan. Preventive Veterinary Medicine 187, 105234.

Moser, T.J., Rusch, D.H., 1988. Indices of structural size and condition of Canada Geese. The Journal of Wildlife Management, 202-208.

Moynihan, M., 1955. Some aspects of reproductive behavior in the Black-headed Gull (Larus ridibundus ridibundus L.) and related species. Behaviour. Supplement, III-201.

Muller, W., Dijkstra, C., Groothuis, T.G.G., 2003. Inter-sexual differences in T-cell-mediated immunity of

black-headed gull chicks (Larus ridibundus) depend on the hatching order. Behavioral Ecology and Sociobiology 55, 80-86.

Munster, V., Wallensten, A., Olsen, B., Rimmelzwaan, G., Osterhaus, A., Fouchier, R., 2005. Influenza A virus surveillance in wild birds. Frontis, 25-30.

Muth, J.P. 2012. Viral shedding and antibody response of mallard ducks to avian influenza viruses, Colorado State University.

Naguib, M.M., Verhagen, J.H., Mostafa, A., Wille, M., Li, R., Graaf, A., Järhult, J.D., Ellström, P., Zohari, S., Lundkvist, Å., 2019. Global patterns of avian influenza A (H7): virus evolution and zoonotic threats. FEMS microbiology reviews 43, 608-621.

Nain, S., Smits, J., 2011. Subchronic lead exposure, immunotoxicology and increased disease resistance in Japanese quail (Corturnix coturnix japonica). Ecotoxicology and environmental safety 74, 787-792.

Nakata, H., Nakayama, S.M., Oroszlany, B., Ikenaka, Y., Mizukawa, H., Tanaka, K., Harunari, T., Tanikawa, T., Darwish, W.S., Yohannes, Y.B., 2017. Monitoring lead (Pb) pollution and identifying Pb pollution sources in Japan using stable Pb isotope analysis with kidneys of wild rats. International journal of environmental research and public health 14, 56.

Newth, J., Rees, E., Cromie, R., McDonald, R., Bearhop, S., Pain, D., Norton, G., Deacon, C., Hilton, G., 2016. Widespread exposure to lead affects the body condition of free-living whooper swans Cygnus cygnus wintering in Britain. Environmental pollution 209, 60-67.

Newton, I., 2006. Can conditions experienced during migration limit the population levels of birds? Journal of Ornithology 147, 146-166.

Nicita, A., 2008. Avian influenza and the poultry trade. The World Bank.

Nikolich-Žugich, J., Li, G., Uhrlaub, J.L., Renkema, K.R., Smithey, M.J., 2012. Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection, In: Seminars in immunology, pp. 356-364.

Nochi, T., Jansen, C.A., Toyomizu, M., Eden, W.v., 2018. The well-developed mucosal immune systems of birds and mammals allow for similar approaches of mucosal vaccination in both types of animals. Frontiers in nutrition 5, 60.

Okamatsu, M., Hiono, T., Kida, H., Sakoda, Y., 2016. Recent developments in the diagnosis of avian influenza. The Veterinary Journal 215, 82-86.

Okamatsu, M., Ozawa, M., Soda, K., Takakuwa, H., Haga, A., Hiono, T., Matsuu, A., Uchida, Y., Iwata, R., Matsuno, K., 2017. Characterization of highly pathogenic avian influenza virus A (H5N6), Japan,

November 2016. Emerging infectious diseases 23, 691.

Okino, C.H., Alessi, A.C., Montassier, M.d.F.S., Rosa, A.J.d.M., Wang, X., Montassier, H.J., 2013. Humoral and cell-mediated immune responses to different doses of attenuated vaccine against avian infectious bronchitis virus. Viral immunology 26, 259-267.

Oleksyn, J., Reich, P.B., 1994. Pollution, habitat destruction, and biodiversity in Poland. Conservation Biology 8, 943-960.

Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2006. Global patterns of influenza a virus in wild birds. Science 312, 384-388.

Onuma, M., Kakogawa, M., Yanagisawa, M., Haga, A., Okano, T., Neagari, Y., Okano, T., Goka, K., Asakawa, M., 2017. Characterizing the temporal patterns of avian influenza virus introduction into Japan by migratory birds. J Vet Med Sci 79, 943-951.

ORŁOWSKI, G., POLECHOŃSKI, R., DOBICKI, W., ZAWADA, Z., 2007. Heavy m*et al* concentrations in the tissues of the black-headed gull Larus ridibundus L. nesting in the dam reservoir in south-western Poland. Pol. J. Ecol 55, 783-793.

Ornithology, Y.I.f., 2002. Atlas of Japanese migratory birds from 1961 to 1995. Yamashina Institute for Ornithology Chiba (in Japanese).

Owen, J.C., Moore, F.R., 2006. Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. The Condor 108, 389-398.

Ozawa, M., 2015. Establishment and application of a detection system of anti-influenza virus antibodies in crane sera. Bulletin of the Sankei Science Scholarship Foundation 25, 17-26.

Pain, D.J., Fisher, I., Thomas, V.G., 2009. A global update of lead poisoning in terrestrial birds from ammunition sources. Ingestion of lead from spent ammunition: implications for wildlife and humans, 99-118.

Pain, D.J., Mateo, R., Green, R.E., 2019. Effects of lead from ammunition on birds and other wildlife: A review and update. Ambio 48, 935-953.

Pandiyan, J., Jagadheesan, R., Karthikeyan, G., Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Al-Misned, F., Ahmed, Z., Krishnappa, K., Elumalai, K., Govindarajan, M., 2020. Probing of heavy m*et al*s in the feathers of shorebirds of Central Asian Flyway wintering grounds. Scientific Reports 10, 1-13.

Pap, P.L., Vágási, C.I., Tökölyi, J., Czirják, G.Á., Barta, Z., 2010. Variation in haematological indices and immune function during the annual cycle in the Great Tit Parus major. Ardea 98, 105-112.

Parrish, J.D., 1997. Patterns of frugivory and energetic condition in Nearctic landbirds during autumn migration. The Condor 99, 681-697.

Paruk, J.D., Adams, E.M., Uher-Koch, H., Kovach, K.A., Long IV, D., Perkins, C., Schoch, N., Evers, D.C., 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons in blood related to lower body mass in common loons. Science of the Total Environment 565, 360-368.

Pérez-López, M., Cid, F., Oropesa, A.L., Fidalgo, L.E., Beceiro, A.L., Soler, F., 2006. Heavy m*et al* and arsenic content in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain). Science of the total environment 359, 209-220.

Petersen, B., Exo, K.-M., 1999. Predation of waders and gulls on Lanice conchilega tidal flats in the Wadden Sea. Marine ecology progress series 178, 229-240.

Phillips, R., Furness, R., 1998. Repeatability of breeding parameters in Arctic skuas. Journal of Avian Biology, 190-196.

Pickard, K. 2010. Heavy m*et al* pollution and blackheaded gull (larus ridibundus L.) breeding ecology, University of Southampton.

Piersma, T., 1990. Pre‐migratory "fattening" usually involves more than the deposition of fat alone. Ringing & Migration 11, 113-115.

Piersma, T., Bruinzeel, L., Drent, R., Kersten, M., Van der Meer, J., Wiersma, P., 1996. Variability in basal metabolic rate of a long-distance migrant shorebird (red knot, Calidris canutus) reflects shifts in organ sizes. Physiological Zoology 69, 191-217.

Piersma, T., Davidson, N.C., 1991. Confusions of mass and size. The Auk 108, 441-443.

Pinowski, J., Kendeigh, S.C., 2012. Granivorous birds in ecosystems: their evolution, populations, energetics, adaptations, impact and control. Cambridge University Press.

Poovorawan, Y., Pyungporn, S., Prachayangprecha, S., Makkoch, J., 2013. Global alert to avian influenza virus infection: from H5N1 to H7N9. Pathogens and global health 107, 217-223.

Popp, B.N., Graham, B.S., Olson, R.J., Hannides, C.C., Lott, M.J., López‐Ibarra, G.A., Galván‐Magaña, F., Fry, B., 2007. Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, Thunnus albacares, from compound‐specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. Terrestrial Ecology 1, 173-190.

Poprach, K., Machar, I., Maton, K., 2016. Long-term decline in breeding abundance of Black-headed Gull (Chroicocephalus ridibundus) in the Czech Republic: a case study of a population trend at the Chomoutov

lake. Ekológia (Bratislava) 35, 350-358.

Portugal, S.J., Green, J.A., Butler, P.J., 2007. Annual changes in body mass and resting metabolism in captive barnacle geese (Branta leucopsis): the importance of wing moult. Journal of Experimental Biology 210, 1391-1397.

Postnikova, Y., Treshchalina, A., Boravleva, E., Gambaryan, A., Ishmukhametov, A., Matrosovich, M., Fouchier, R.A., Sadykova, G., Prilipov, A., Lomakina, N., 2021. Diversity and Reassortment Rate of Influenza A Viruses in Wild Ducks and Gulls. Viruses 13, 1010.

Poulin, R., Closs, G.P., Lill, A.W.T., Hicks, A.S., Herrmann, K.K., Kelly, D.W., 2012. Migration as an escape from parasitism in New Zealand galaxiid fishes. Oecologia 169, 955-963.

Provencher, J.F., Borrelle, S.B., Bond, A.L., Lavers, J.L., Van Franeker, J.A., Kühn, S., Hammer, S., Avery-Gomm, S., Mallory, M.L., 2019. Recommended best practices for plastic and litter ingestion studies in marine birds: Collection, processing, and reporting. Facets 4, 111-130.

Qin, X., Rui, L., Zhang, W., Qiu, Z., Li, Z., 2017. Quantitative variations of CD4⁺CD25⁺ cells in Peking duckwhite leghorn chimeras based on bone marrow mesenchymal stem cells. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 16.

Rahman, F., Ismail, A., Omar, H., Hussin, M.Z., 2017. Exposure of the endangered Milky stork population to cadmium and lead via food and water intake in Kuala Gula Bird Sanctuary, Perak, Malaysia. Toxicology reports 4, 502-506.

Ramis, A., Van Amerongen, G., Van De Bildt, M., Leijten, L., Vanderstichel, R., Osterhaus, A., Kuiken, T., 2014. Experimental infection of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in black-headed gulls (Chroicocephalus ridibundus). Veterinary Research 45.

Redfern, C.P., Slough, A.E., Dean, B., Brice, J.L., Jones, P.H., 2000. Fat and body condition in migrating redwings Turdus iliacus. Journal of Avian Biology 31, 197-205.

Reese, S., Dalamani, G., Kaspers, B., 2006. The avian lung-associated immune system: a review. Veterinary research 37, 311-324.

Registry, A.f.T.S.a.D., 2020. Toxicological profile for lead, pp. 1-583.

Reid, C., McInnes, K., McLelland, J.M., Gartrell, B.D., 2012. Anthropogenic lead (Pb) exposure in populations of a wild parrot (kea Nestor notabilis). New Zealand Journal of Ecology, 56-63.

Rhind, S., Evans, N., Bellingham, M., Sharpe, R., Cotinot, C., Mandon-Pepin, B., Loup, B., Sinclair, K., Lea, R., Pocar, P., 2010. Effects of environmental pollutants on the reproduction and welfare of ruminants.

Animal 4, 1227-1239.

Rising, J.D., Somers, K.M., 1989. The measurement of overall body size in birds. The Auk 106, 666-674.

Rocke, T.E., Samuel, M.D., 1991. Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. Journal of Wildlife Diseases 27, 1-9.

ROLOFF, G., 2003. Blood chemistry, cytology, and body condition in adult northern goshawks (Accipiter gentilis). J. Raptor Res 37, 299-306.

Ruhs, E.C., Martin, L.B., Downs, C.J., 2020. The impacts of body mass on immune cell concentrations in birds. Proceedings of the Royal Society B 287, 20200655.

Saito, K., 2009. Lead poisoning of Steller's sea-eagle (Haliaeetus pelagicus) and whitetailed eagle (Haliaeetus albicilla) caused by the ingestion of lead bullets and slugs. Ingestion of lead from spent ammunition: implications for wildlife and humans.

Sakate, S., Kei, C., Kobayashi, M., Murata, K., Sakagami, K., Kimura, T., 2003. Study on the Mass-Screening of after-meal serum triglyceride concentration. Journal of Japan Society for Occupational Health 45, 201-205.

Sánchez-Guzmán, J.N., Losada-Prado, S., 2019. Body Condition in Birds in Two Landscapes of the Upper Magdalena Valley, Colombia. Revista de Ciencias 23, 25-40.

Sarasua, S.M., Vogt, R.F., Henderson, L.O., Jones, P.A., Lybarger, J.A., 2000. Serum immunoglobulins and lymphocyte subset distributions in children and adults living in communities assessed for lead and cadmium exposure. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 60, 1-15.

Saugier, B., Ehleringer, J.R., Hall, A.E., Farquhar, G.D., 2012. Stable isotopes and plant carbon-water relations. Elsevier.

Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Tanabayashi, K., Hotta, A., Saito, T., 2006. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. The American journal of tropical medicine and hygiene 75, 327-332.

Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Kim, K.S., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Kobayashi, M., 2011. Blow flies were one of the possible candidates for transmission of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus during the 2004 outbreaks in Japan. Influenza research and treatment 2011.

Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E., 2007. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Medicine 4, e115.

Schamber, J.L., Esler, D., Flint, P.L., 2009. Evaluating the validity of using unverified indices of body condition. Journal of Avian Biology 40, 49-56.

Scheuhammer, A., 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. Environmental Pollution 46, 263-295.

Scheuhammer, A., 1991. Effects of acidification on the availability of toxic m*et al*s and calcium to wild birds and mammals. Environmental Pollution 71, 329-375.

Scheuhammer, A., Norris, S., 1996. The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. Ecotoxicology 5, 279-295.

Schmidt-Wellenburg, C.A., Visser, G.H., Biebach, B., Delhey, K., Oltrogge, M., Wittenzellner, A., Biebach, H., Kempenaers, B., 2008. Trade-off between migration and reproduction: does a high workload affect body condition and reproductive state? Behavioral Ecology 19, 1351-1360.

Schultz, U., Magor, K.E., 2014. Comparative immunology of agricultural birds, In: Avian Immunology. Elsevier, pp. 363-389.

Scott, I., Mitchell, P.I., Evans, P.R., 1994. Seasonal changes in body mass, body composition and food requirements in wild migratory birds. Proc Nutr Soc 53, 521-531.

Sellers, R.M., 2009. Ageing Black‐headed Gulls on leg and bill colour‐a cautionary note.

Shamoun‐Baranes, J., Burant, J.B., van Loon, E.E., Bouten, W., Camphuysen, C., 2017. Short distance migrants travel as far as long distance migrants in lesser black‐backed gulls Larus fuscus. Journal of Avian Biology 48, 49-57.

Sharma, J., 1991. Overview of the avian immune system. Veterinary immunology and immunopathology 30, 13-17.

Sharma, J., 1997. The structure and function of the avian immune system. Acta Veterinaria Hungarica 45, 229-238.

Sharshov, K., Silko, N., Sousloparov, I., Zaykovskaya, A., Shestopalov, A., Drozdov, I., 2010. Avian influenza (H5N1) outbreak among wild birds, Russia, 2009. Emerging infectious diseases 16, 349.

Sheridan, P.A., Paich, H.A., Handy, J., Karlsson, E.A., Hudgens, M.G., Sammon, A.B., Holland, L.A., Weir, S., Noah, T.L., Beck, M.A., 2012. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. International Journal of Obesity 36, 1072-1077.

Skalny, A.V., Lima, T.R.R., Ke, T., Zhou, J.-C., Bornhorst, J., Alekseenko, S.I., Aaseth, J., Anesti, O., Sarigiannis, D.A., Tsatsakis, A., 2020. Toxic m*et al* exposure as a possible risk factor for COVID-19 and

other respiratory infectious diseases. Food and Chemical Toxicology 146, 111809.

Smith, A.D., McWilliams, S.R., 2014. What to do when stopping over: behavioral decisions of a migrating songbird during stopover are dictated by initial change in their body condition and mediated by key environmental conditions. Behavioral Ecology 25, 1423-1435.

Smith, K.J., Trueman, C.N., France, C.A., Sparks, J.P., Brownlow, A.C., Dähne, M., Davison, N.J., Guðmundsson, G., Khidas, K., Kitchener, A.C., 2021. Stable isotope analysis of specimens of opportunity reveals ocean-scale site fidelity in an elusive whale species. Frontiers in Conservation Science 2, 13.

Smith, R.J., Moore, F.R., 2003. Arrival fat and reproductive performance in a long-distance passerine migrant. Oecologia 134, 325-331.

Snoeijs, T., Dauwe, T., Pinxten, R., Darras, V.M., Arckens, L., Eens, M., 2005. The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the zebra finch (Taeniopygia guttata). Environmental Pollution 134, 123-132.

Sockman, K.W., Schwabl, H., 2001. Plasma corticosterone in nestling American kestrels: effects of age, handling stress, yolk androgens, and body condition. General and comparative endocrinology 122, 205-212.

Somveille, M., 2016. The global ecology of bird migration: patterns and processes. Frontiers of Biogeography 8.

Stallknecht, D.E., 2003. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. Avian diseases 47, 61-69.

Stearns, B.D., 2010. Diet reconstruction of wild Rio-Grande turkey of central Utah using stable isotope analysis. Brigham Young University.

Stefan, L.M., Gomez-Diaz, E., Mironov, S., 2013. Three new species of the feather mite subfamily Ingrassiinae (Acariformes: Xolalgidae) from shearwaters and petrels (Procellariiformes: Procellariidae). Zootaxa 3682, 105-120.

Sugawa, H., 1984. Increasing population of Black-headed gulls in Far East Asia. Marine sciences monthly 16, 194-198.

Sugawa, H., 2005. Theory and practice of biocompatible cities. Kyoto University Press, Kyoto, Japan.

Swain, S.L., McKinstry, K.K., Strutt, T.M., 2012. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. Nature Reviews Immunology 12, 136-148.

Swayne, D.E., Suarez, D.L., Spackman, E., Jadhao, S., Dauphin, G., Kim-Torchetti, M., McGrane, J., Weaver, J., Daniels, P., Wong, F., 2015. Antibody titer has positive predictive value for vaccine protection against challenge with natural antigenic-drift variants of H5N1 high-pathogenicity avian influenza viruses from Indonesia. Journal of virology 89, 3746-3762.

Takano, S., Taniguchi, T., Anzai, H., Kanouchi, T., Tanaka, K., 2007. Field guide of Japanese birds. Wild Bird Society of Japan, Tokyo, Tokyo, Japan.

Tanimura, N., Tsukamoto, K., Okamatsu, M., Mase, M., Imada, T., Nakamura, K., Kubo, M., Yamaguchi, S., Irishio, W., Hayashi, M., 2006. Pathology of fatal highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection in large-billed crows (Corvus macrorhynchos) during the 2004 outbreak in Japan. Veterinary Pathology 43, 500-509.

Tasker, M.L., Jones, P.H., Blake, B.F., Dixon, T.J., Wallis, A.W., 1986. Seabirds associated with oil production platforms in the North Sea. Ringing & Migration 7, 7-14.

Thomas, V.G., 1997. Attitudes and issues preventing bans on toxic lead shot and sinkers in North America and Europe. Environmental Values 6, 185-199.

Thomas, V.G., 2010. Achieving uniform regulation of environmental lead exposure and poisoning in wildlife and humans. The Environmentalist 30, 206-210.

Thomas, V.G., Guitart, R., 2010. Limitations of European Union policy and law for regulating use of lead shot and sinkers: Comparisons with North American regulation. Environmental Policy and Governance 20, 57-72.

Thomas, V.G., Guitart, R., 2013. Transition to non-toxic gunshot use in Olympic shooting: policy implications for IOC and UNEP in resolving an environmental problem. Ambio 42, 746-754.

Thompson, D.R., Furness, R.W., 1995. Stable-isotope ratios of carbon and nitrogen in feathers indicate seasonal dietary shifts in northern fulmars. The Auk 112, 493-498.

Tønnessen, R., Kristoffersen, A.B., Jonassen, C.M., Hjortaas, M.J., Hansen, E.F., Rimstad, E., Hauge, A.G., 2013. Molecular and epidemiological characterization of avian influenza viruses from gulls and dabbling ducks in Norway. Virology journal 10, 1-10.

Torimoto, R., Ishii, C., Sato, H., Saito, K., Watanabe, Y., Ogasawara, K., Kubota, A., Matsukawa, T., Yokoyama, K., Kobayashi, A., 2021. Analysis of lead distribution in avian organs by LA-ICP-MS: Study of experimentally lead-exposed ducks and kites. Environmental Pollution 283, 117086.

Torres, M.A., Jones, J.D., Dangl, J.L., 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase–derived reactive oxygen

intermediates suppress spread of cell death in Arabidopsis thaliana. Nature genetics 37, 1130-1134.

Totzke, U., Fenske, M., Hüppop, O., Raabe, H., Schach, N., 1999. The influence of fasting on blood and plasma composition of herring gulls (Larus argentatus). Physiological and Biochemical Zoology 72, 426-437.

Tournadre, A., Miossec, P., 2007. Cytokine response in inflammatory myopathies. Current rheumatology reports 9, 286-290.

Tulli, F., Moreno-Rojas, J.M., Messina, C.M., Trocino, A., Xiccato, G., Muñoz-Redondo, J.M., Santulli, A., Tibaldi, E., 2020. The Use of Stable Isotope Ratio Analysis to Trace European Sea Bass (D. labrax) Originating from Different Farming Systems. Animals 10, 2042.

Tveraa, T., Sæther, B.-E., Aanes, R., Erikstad, K.E., 1998. Body mass and parental decisions in the Antarctic petrel Thalassoica antarctica: how long should the parents guard the chick? Behavioral Ecology and Sociobiology 43, 73-79.

USEPA, 2011. USEPA regional screening level (RSL) summary table. USEPA, Washington, DC.

Ushine, N., Kato, T., Hayama, S.-i., 2016. Sex identification in Japanese birds using droppings as a source of DNA. Journal of Japanese Bird Banding Association 28, 51-70.

Ushine, N., Kurata, O., Tanaka, Y., Sato, T., Kurahashi, Y., Hayama, S.-I., 2020. The effects of migration on the immunity of Black-Headed Gulls (Chroicocephalus ridibundus: Laridae). Journal of Veterinary Medical Science, 20-0339.

Ushine, N., Sato, T., Kato, T., Hayama, S.-i., 2017. Analysis of body mass changes in the Black-Headed Gull (Larus ridibundus) during the winter. Journal of Veterinary Medical Science, 17-0099.

Vallverdú-Coll, N., 2016. Immunotoxic and reproductive effects of lead on avifauna affected by shot ingestion.

Vallverdú-Coll, N., Mateo, R., Mougeot, F., Ortiz-Santaliestra, M.E., 2019. Immunotoxic effects of lead on birds. Science of the total environment 689, 505-515.

Vallverdú‐Coll, N., Mougeot, F., Ortiz‐Santaliestra, M.E., Rodriguez‐Estival, J., López‐Antia, A., Mateo, R., 2016. Lead exposure reduces carotenoid‐based coloration and constitutive immunity in wild mallards. Environmental toxicology and chemistry 35, 1516-1525.

Van Dijk, J.G., Matson, K.D., 2016. Ecological immunology through the lens of exercise immunology: new perspective on the links between physical activity and immune function and disease susceptibility in wild animals. Integrative and comparative biology 56, 290-303.

van Dijk, J.G.B., Stienen, E.W.M., Gerritsen, S., Majoor, F.A., 2009. Reproduction of the Black-headed gull in coastal and inland colonies. (In Dutch). Limosa 82, 13-22.

Van Gils, J.A., Munster, V.J., Radersma, R., Liefhebber, D., Fouchier, R.A.M., Klaassen, M., 2007. Hampered Foraging and Migratory Performance in Swans Infected with Low-Pathogenic Avian Influenza A Virus. PLoS ONE 2, e184.

Van Ginkel, F.W., Padgett, J., Martinez-Romero, G., Miller, M.S., Joiner, K.S., Gulley, S.L., 2015. Age-dependent immune responses and immune protection after avian coronavirus vaccination. Vaccine 33, 2655-2661.

Verhagen, J.H., Majoor, F., Lexmond, P., Vuong, O., Kasemir, G., Lutterop, D., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Kuiken, T., 2014. Epidemiology of influenza A virus among black-headed gulls, the Netherlands, 2006–2010. Emerging infectious diseases 20, 138.

Vernasco, B.J., Sillett, T.S., Marra, P.P., Ryder, T.B., 2018. Environmental predictors of nestling condition, postfledging movement, and postfledging survival in a migratory songbird, the Wood Thrush (Hylocichla mustelina). The Auk: Ornithological Advances 135, 15-24.

Vernon, J., 1972. Feeding habitats and food of the black-headed and common gulls. Part 2-food. Bird Study 19, 173-186.

Walters, J., 1982. Completion of primary moult in the Black-headed Gull Larus ridibundus. Bird Study 29, 217-220.

Walters, J.R., Derrickson, S.R., Michael Fry, D., Haig, S.M., Marzluff, J.M., Wunderle Jr, J.M., 2010. Status of the California Condor (Gymnogyps californianus) and efforts to achieve its recovery. The Auk 127, 969-1001.

Wang, D., DuBois, R.N., 2015. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. Carcinogenesis 36, 1085-1093.

Wang, I.-J., Karmaus, W.J., Yang, C.-C., 2017. Lead exposure, IgE, and the risk of asthma in children. Journal of exposure science & environmental epidemiology 27, 478-483.

Warnock, N., 2010. Stopping vs. staging: the difference between a hop and a jump. Journal of Avian Biology 41, 621-626.

Weber, T.P., Stilianakis, N.I., 2007. Ecologic immunology of avian influenza (H5N1) in migratory birds. Emerging infectious diseases 13, 1139.

Wiemeyer, S.N., Scott, J.M., Anderson, M.P., Bloom, P.H., Stafford, C.J., 1988. Environmental

contaminants in California condors. The Journal of Wildlife Management, 238-247.

Williams, R.J., Holladay, S.D., Williams, S.M., Gogal, R.M., 2017. Environmental lead and wild birds: a review, In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 245. Springer, pp. 157-180.

Witeska, M., Kondera, E., Szymanska, M., Ostrysz, M., 2010. Hematological changes in common carp (Cyprinus carpio L.) after short-term lead (Pb) exposure. Polish Journal of Environmental Studies 19, 825-831.

Wolfe, M.F., Schwarzbach, S., Sulaiman, R.A., 1998. Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 17, 146-160.

Xing, M., Jin, X., Wang, J., Shi, Q., Cai, J., Xu, S., 2018. The antagonistic effect of selenium on lead-induced immune dysfunction via recovery of cytokine and heat shock protein expression in chicken neutrophils. Biological trace element research 185, 162-169.

Yamaguchi, N., Hiraoka, E., Fujita, M., Hijikata, N., Ueta, M., Takagi, K., Konno, S., Okuyama, M., Watanabe, Y., Osa, Y., 2008. Spring migration routes of mallards (Anas platyrhynchos) that winter in Japan, determined from satellite telemetry. Zoological science 25, 875-881.

Yang, Y., Bazhin, A.V., Werner, J., Karakhanova, S., 2013. Reactive oxygen species in the immune system. International reviews of immunology 32, 249-270.

Yathapu, S.R., Kondapalli, N.B., Srivalliputturu, S.B., Hemalatha, R., Bharatraj, D.K., 2020. Effect of lead exposure and nutritional iron-deficiency on immune response: A vaccine challenge study in rats. Journal of Immunotoxicology 17, 144-152.

Yong, W., Finch, D.M., 1997. Migration of the Willow Flycatcher along the middle Rio Grande. The Wilson Bulletin, 253-268.

Yoon, S., Mitra, S., Wyse, C., Alnabulsi, A., Zou, J., Weerdenburg, E.M., M. van der Sar, A., Wang, D., Secombes, C.J., Bird, S., 2015. First demonstration of antigen induced cytokine expression by CD4-1+ lymphocytes in a poikilotherm: Studies in zebrafish (Danio rerio). PloS one 10, e0126378.

Zera, A.J., Harshman, L.G., 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. Annual review of Ecology and Systematics 32, 95-126.

Zhao, M., Christie, M., Coleman, J., Hassell, C., Gosbell, K., Lisovski, S., Minton, C., Klaassen, M., 2017. Time versus energy minimization migration strategy varies with body size and season in long-distance migratory shorebirds. Movement Ecology 5.

伊藤宜則, 村井佳幸, 新谷良英, 長尾文隆, 島正吾, 皿井進, 1984. 鉛暴露作業者になける血清過酸化脂質とスーパーオキサイドディスムターゼ活性の検討. 労働科学 60, 53.

押味和夫, 1989. 血液腫瘍の免疫学的診断. 東京女子医科大学雑誌 59, 1-11.

経済産業省製造産業局科学物質管理課, 2007. 化学物質のリスク評価のためのガイドブック, 東京, pp. 1-77.

高畑悟郎, 宮脇龍介, 2010. 千葉県中北部で観察された冬鳥.

高病原性鳥インフルエンザ疫学調査チーム, 2018. 平成29年度における高病原性鳥インフルエンザの発生に係る疫学報告書, pp. 1-37.

杉崎宏哉, 2017. 窒素・炭素の安定同位体を用いた海洋の生態系構止研究. 日本技術士会水産部会講演要旨.

中西 準子, 小林 憲弘, 内藤 航, 2006. 鉛, In: 詳細リスク評価書シリーズ, Tokyo.

道川慧太, 渡邉哲弘, 豊原容子, 佐藤敦政, 豊原治彦, 2014. タテボシガイ貝殻を用いた鉛吸着剤の開発. 日本水産学会誌 80, 589-593.

独立行政法人科学技術振興機構, 2004. 鳥インフルエンザウイルスの脅威, In: JST ニュース, pp. 14-15.

内山巌雄, 東賢一, 2009. 環境中の鉛による健康影響について. モダンメディア.

平田和彦, 2007. 日本におけるユリカモメ Larus ridibundus の陸上ねぐら. Strix 25, 141-146.

立木清廣, 1990. 自動車産業における技術紹介と将来展望講座 (III) 自動車用燃料とその将来動向. 燃料協会誌 69, 1160-1168.

力石嘉人, 小川奈々子, 高野淑識, 土屋正史, 大河内直彦, 2010. アミノ酸の窒素同位体比を用いた水棲生物の栄養段階の解析. 地球化学 44, 233-241.