

課題名	F-062 渡り鳥によるウエストナイル熱及び血液原虫の感染ルート解明とリスク評価に関する研究		
課題代表者名	桑名 貴（独立行政法人国立環境研究所環境研究基盤技術ラボラトリー生物資源研究室）		
研究期間	平成18-20年度	合計予算額	188,747千円（うち20年度 55,851千円） *上記の合計予算額は、間接経費42,875千円を含む

研究体制

- (1) 渡り鳥（シギ、チドリ類）における病原体感染に関する研究（独立行政法人国立環境研究所）
- (2) 吸血昆虫における病原体のモニタリング調査に関する研究（日本大学）
- (3) 絶滅危惧鳥類を用いた病原体感染リスクの評価に関する研究（酪農学園大学）
- (4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究（独立行政法人国立環境研究所）

研究概要

1. 序

シギ・チドリ類によってウエストナイル熱や血液原虫類が国内に持ち込まれた場合には、容易に我が国の生物多様性に大きな影響を与える可能性がある。この点から、シギ・チドリ類の病原体感染に関するモニタリングを行って感染のリスク評価を行うと共に、感染により絶滅リスクが増大する絶滅危惧鳥類を対象にウエストナイルウイルス（以下WNV）と血液原虫およびこれらと混合感染して致命的因子と成りうる他寄生体の感染状況を明らかにすることは早急には実施しなければならない。

そこで、シギ・チドリ類の渡りの重要な中継地であるとともに絶滅危惧鳥類種が多く分布している北海道と沖縄県において、シギ・チドリ類や絶滅危惧鳥類を対象にWNV、血液原虫および寄生虫等のモニタリング体制を構築する必要がある（図1）。また、滅危惧鳥類と同じ生息域に分布する普通種の鳥獣WNVと血液原虫およびこれらと混合感染して致命的因子と成りうる他寄生体の感染状況を明らかにすることも、病原体の影響を総合的に考察するうえで必要である。

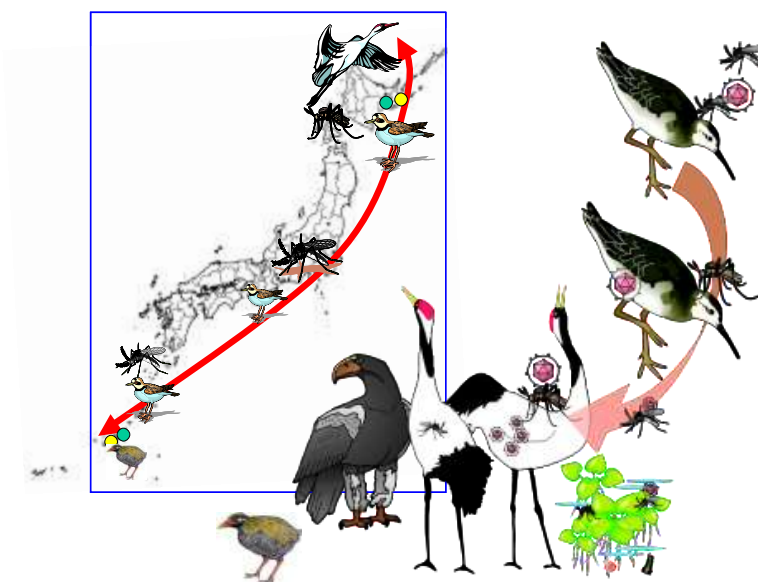


図1 ウエストナイルウイルスや血液原虫がシギ・チドリ類によって国内に持ち込まれ、絶滅危惧鳥類へ感染拡大する可能性がある。

2. 研究目的

(1) 渡り鳥（シギ・チドリ類）における病原体感染に関する研究

ウエストナイル熱は長距離を移動する渡り鳥によって分布を拡大させる可能性が大きく、極東ロシア地域から我が国への分布拡大が懸念されている。しかし、そのモニタリング体制は未整備のままである。そこで、地球を南北に半周する渡りを行うシギ・チドリ類を対象に、国内におけるウエストナイル熱のモニタリング体制を構築するとともに、海外と連携してモニタリングを実施する体制を構築することを本研究の目的とする。

(2) 吸血昆虫における病原体のモニタリング調査に関する研究

南北半球を長距離移動するシギ・チドリ類、国内産希少鳥類および普通鳥類種を対象として、鳥類に感染し致死的影響を与えるウエストナイル熱等の節足動物媒介性新興感染症の我が国への侵入リスクを評価する。そのためにWNVと同様の生活環を有する鳥マラリア原虫 (*Plasmodium spp./Haemoproteus spp.*) を指標病原微生物として、両者に共通する媒介昆虫と鳥との関係性 (宿主-媒介生物-寄生体関係) について調査研究を行う。その成果を用いて、国内産希少鳥類の保護管理および生物多様性の維持ならびに健全な生態系の保持に役立てることを目的とする。

(3) 絶滅危惧鳥類を用いた病原体感染リスクの評価に関する研究

シギ・チドリ類の渡りの重要な中継地である、北海道において絶滅危惧鳥類種を対象とするWNVと血液原虫のモニタリングを行う。また、絶滅危惧鳥類と同じ生息域に分布する普通種の鳥獣類を対象としてWNV、血液原虫およびこれらと混合感染して致死因子と成りうる他寄生体の感染状況を明らかにする。

(4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究

WNVおよび血液原虫と混合感染して致死因子と成りうる寄生虫の感染状況を絶滅危惧種で明らかにする方法を開発する。絶滅危惧種のモデルとしてヤンバルクイナを選定し、本種に見られる寄生虫を対象に遺伝子診断法を開発することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法及び結果

(1) 渡り鳥 (シギ・チドリ類) における病原体感染に関する研究

ウエストナイル熱は長距離を移動する渡り鳥によって分布を拡大させる可能性が大きく、極東ロシア地域から我が国への分布拡大が懸念されている。そこで、WNVを媒介する蚊の活動が活発化する時期に極東ロシア地域より飛来するシギ・チドリ類を対象にウエストナイル熱のモニタリング体制の整備と実際の運用を平成18年～平成20年にかけて行った。最初に、バンダーと獣医師が共同し、これまでに別個に実施されていた鳥類の標識調査と感染症調査を連携して行う体制を整えた。次にWNVの各種検査方法を比較・検討した。その結果、野外での一次スクリーニングにはWNV簡易診断キット (VecTest) を、確定用の高感度検査方法としてLAMP法 (栄研化学株式会社) を今回のモニタリングに導入することとした。

シギ・チドリ類の捕獲調査は以下の8ヶ所で行った。北海道根室市春国岱 (平成18年度～平成20年度)、北海道紋別市コムケ湖 (平成18年度～平成20年度)、北海道釧路市釧路湿原 (平成18年度)、北海道苫小牧市ウトナイ湖 (平成18年度)、北海道厚岸町・白浜 (平成19年度)、北海道えりも岬 (平成18年度)、熊本県荒尾市牛水 (平成18年度)、沖縄県 (平成18年度～平成20年度)。また、沖縄県・NPO法人どうぶつたちの病院に収容された傷病鳥もウイルス検査対象とした。最終的に平成18年度から平成20年度にかけて46種1,131個体をよりウイルス検査用の口腔内スワブを採取した。これらの口腔内スワブを使用して、平成18年度はWNV簡易診断キット (VecTest) のみで、平成19年度と20年度についてはウイルス簡易診断キットとLAMP法を併用してWNV検査を行った。その結果、46種1,131個体すべて陰性であることを確認した。

平成18年度にロシア連邦およびタイ王国にもモニタリング地点を設定した。ロシア連邦・ボロンスキー自然保護区ではコウノトリ (*Ciconia boyciana*) 17個体より口腔内スワブを採取し、VecTestによる検査を実施した。その結果、全個体陰性であることを確認した。また、ボロンスキー自然保護区より情報提供を受けたところ、2006年から2007年の間にアジサシ (1個体)、カワウ (1個体)、セグロカモメ (2個体)、マガモ (3個体) でWNV抗体が検出され、セグロカモメ (1個体) およびヨシガモ (1個体) でWNVの遺伝子が検出されていることが分かった。そのため、ボロンスキー自然保護区内においてもWNVが分布している可能性が高いことが明らかになった。タイ王国・カセサート大学構内では20種40個体と種不明2個体、合計42個体の野鳥を捕獲しウイルス検査用の口腔内スワブを採取した。これらのサンプルを使用して簡易診断キットを使用して検査を実施したところ、1個体 (White-thorated kingfisher, *Halcyon smyrnensis*) で陽性反応が見られた。この検体をRT-PCR法およびLAMP法で再検査したところ陰性であった。

(2) 吸血昆虫における病原体のモニタリング調査に関する研究

捕集蚊からWNV抗原は検出されなかった。釧路湿原およびコムケ湖周辺など北海道内の湿地において捕獲されたシギ・チドリ類から採取した血液中に鳥マラリア原虫を確認した。本原虫のmtDNA *cyt b* 遺伝子の塩基配列を解析したところ、釧路湿原のタンチョウ (*Grus japonensis*) から検出された鳥マラリアのものと100%相同であった。このことから、シギ・チドリ類が中継地として利用する国内の湿地において、一時的ではあれ同所的に生息する鳥類との間で蚊を介した病原体の感染が成立する可能性が示唆された。沖縄県漫湖水鳥・湿地センター、東京港野鳥公園および谷津干潟で定

期的に蚊を捕集し、当地に生息する種とその発生時期を調べた。その結果、干潟に生息する蚊のほとんどがWNVを媒介する可能性のある種であることが分かり、さらに一部の蚊からは鳥マラリア原虫遺伝子の断片が検出された。また、干潟において蚊が最も多く発生する時期は、シギ・チドリ類が最も多く飛来する時期と重なっていた。このことから、シベリア地域から渡ってきたシギ・チドリ類が節足動物媒介性感染症の病原体を保有していた場合、国内各地の干潟においてもシギ・チドリ類と留鳥間で蚊を介した病原体感染が起こり得る可能性が示唆された。

(3) 絶滅危惧鳥類などを用いた病原体感染リスクの評価に関する基盤調査研究

- 1) 絶滅危惧鳥類と同じ生息域にいてこれら鳥類の感染源となりうる普通種の鳥獣類を対象としてWNVと他のウイルス・寄生虫の感染状況の一端を明らかにした。
- 2) VecTest応用の可能性については、酪農学園大学野生動物医学センターWAMCに傷病個体や死体などで送付され、冷凍保存された個体から口腔内スワブを採取し、このスワブをキット用サンプルとされた870個体について陰性結果を呈した。
- 3) ウトナイ湖野生鳥獣保護センターで入院した5個体についても陰性結果を呈した。
- 4) 日本脳炎ウイルスの活動が低いことが知られている北海道で捕獲した野生カモ血清中にJEV中和抗体検査を実施したところ、フラビウイルスに暴露された経験がある事が判明した。冬鳥においては極東ロシアにおいてWNVに感染した可能性もあるため、更なる検討の必要性を示した。さらに飼育種でも陽性反応が見られたケースもあり、今後の検討課題とされた。
- 5) 北海道産野生カモ類でフラビウイルスに暴露された経験がある事が判明したが、その感染経路などの背景は不明であったため、野鳥とほぼ同所的に生息する石狩地方のアライグマ血清30サンプルについて、上記同様の方法で抗フラビウイルス中和抗体価測定を行った。その結果、1個体でのみ陽性反応を得た。
- 6) WNV感染の監視システムを確立することを目的として、WNVに感受性の高いカラス類における疫学調査を開始し、北海道内で斃死したカラス11羽、アオサギ4羽、スズメ4羽について試験を行った。筋肉、脳、脾臓あるいは肝臓を摘出し、リン酸緩衝液の10%組織乳剤を作製した。これらのサンプルを用いて、VecTestによるWNV抗原の検出と培養細胞に接種することによりウイルスの分離を試みた。また、各臓器よりRNAを抽出し、WNVに特異的なプライマーを用いたRT-PCR法によりウイルス核酸の検出を行った。全ての検査において、WNVは陰性であった。
- 7) 混合感染で症状を増悪化させる可能性があるほかの病原体、インフルエンザウイルス簡易試験キットを用い検査をした（陰性）。
- 8) 絶滅危惧野生鳥類個体群へのWNV影響をタンチョウをモデルに選定して評価した。その結果、タンチョウのWNVによる死亡率がアメリカガラスと同等であった場合には、絶滅確率が100%となった。絶滅までの期間は、ウイルスが侵入してから最短で24年後、最長で72年後、平均42年後であった。

(4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究

本研究では、国内の絶滅危惧種の一つであるヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) の消化管内寄生虫を調査し、その寄生虫種を対象とした遺伝子診断法を開発するとともに寄生虫感染をコントロールする方法を開発する。最初にヤンバルクイナ46個体の消化管より内部寄生虫の分離を試みた。線虫類は46個体中26個体より分離され、形態学的観察によって *Heterakis* 属であることが確認された。また別の2個体からは鉤頭虫類 (*Acanthocephala*) を分離した。更に、13個体からは斜嚙吸虫科 (*Plagiorchiida*) と思われる吸虫が分離された（このうちの7検体からは線虫も分離された）。つぎに線虫と吸虫を識別するために、ユニバーサルプライマー-239および240で増幅されたミトコンドリアDNA・チトクロームC・オキシダーゼ・サブユニット1 (COX1) の塩基配列に基づいて、線虫および吸虫の特異的なPCRプライマーを設計した。そして、そのプライマーを使用した nested PCR法を開発した。この nested PCR法を線虫および吸虫の両方の虫卵を含む新鮮な糞便サンプルに応用したところ、今回設計した種特異的プライマーは、寄生虫の同定に使用可能であることが分かった。さらに、ヤンバルクイナの寄生虫の同定をより迅速に行うため、duplex real-time PCRアッセイ法を開発した。非特異的反応を避けるため、プライマー-239と240によって増幅される部分より上流のチトクロームオキシダーゼ・サブユニット1遺伝子の配列を決定し、線虫用と吸虫用のプローブとプライマーをそれぞれ設計した。これらのプライマーとプローブを使用することで、反応回数は一回のみとなり、PCR産物を確認するための電気泳動を実施する必要もなくなった。糞42サンプルについて nested PCRと duplex real-time PCRを適用し、信頼性と有効性の比較を行った。その結果、両方で寄生虫卵から寄生している線虫と吸虫を検出できることが分かった。

4. 考察

(1) 渡り鳥（シギ・チドリ類）における病原体感染に関する研究

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

(2) 吸血昆虫における病原体のモニタリング調査に関する研究

北海道と沖縄の渡り鳥飛来地の重要箇所をモニタリングスポットに設定し、蚊と各種野鳥の血液原虫、microfilariaおよびDNAウイルス保有の有無を本研究で開発した標準化手法を用いて定期的かつ経年的に監視調査すれば、渡り鳥による病原体の感染ルート解明およびリスク評価ならびにリスク管理に有用な情報が得られ、WNV国内侵入時の制御にも役立つと考えた。

(3) 絶滅危惧鳥類などを用いた病原体感染リスクの評価に関する研究

国内産の希少種および普通種の野生（一部飼育）の鳥類材料を用いWNV感染の有無を市販キットおよびウイルス学的手法により詳細な検査を実施し、国内への当該ウイルスの証拠は得られなかったが、過去に感染を経ている可能性があることを明らかにした。これは日本におけるWNV感染症の発生を防止する上で重要な知見である。このように、鳥類に致死的影響を与えるWNVの国内侵入をモニタリングする上で、減序湯における病原体の保有状況と過去の感染経歴を明らかにすることが不可欠であることは自明である。特に、日本への侵入門戸である北海道の水鳥類で大陸での感染経歴のある可能性が証明されたことは、希少種への保全上大変意義深く、今後も同様な体制を継続維持させることを提言したい。

(4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究

今回開発したnested PCR法および real-time PCRアッセイ法による診断方法は、擬陽性反応を伴うことも無く、ヤンバルクイナの寄生虫種の識別が可能であった。さらに糞便サンプル内の寄生虫卵の識別に対しても応用可能であった。したがって、本研究で開発した手法を用いることで、ヤンバルクイナの寄生虫感染状況を短時間に検査できる。これは、現在実施されている飼育下繁殖事業の寄生虫モニタリングにも応用可能である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 渡り鳥（シギ・チドリ類）における病原体感染に関する研究

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

大規模なモニタリングを実施する場合の効率的な検査方法についても検討することができた。VecTest は種によって疑陽性反応が観察されやすいことが報告されている。しかしながら、今回対象としたシギ・チドリ類では診断が困難な疑陽性反応は観察されなかった。したがって、VecTest はシギ・チドリ類を対象に WNV のモニタリングを実施する場合に有用な診断キットであることが確認できた。また、平成 19 年度より導入した LAMP 法は検体中に 50 コピーのウイルスが存在すれば検出可能である。国内において高感度検出法による WNV のモニタリング体制を構築したことは、WNV の疫学調査・研究をするうえで非常に意義がある。

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

2) 吸血昆虫における病原体のモニタリング調査に関する研究

これまでほとんど研究されていなかった国内産鳥類における血液原虫感染の詳細な分布状況を分子生物学的手法を用いて明らかにし、血液原虫検出の標準化を行うことができた。湿地や干潟において同所的に生息する在来鳥と渡り鳥であるシギ・チドリ類との間で血液原虫の宿主転換が起こっている可能性を示すことができた。沖縄本島や関東圏の湿地において蚊の発生時期と飛来ピークが一致していることが判明した。さらに湿地で捕集された蚊の体内から鳥類血液原虫遺伝子が検出され、蚊を介した血液原虫感染が鳥類間で起こっていることが明らかとなった。野鳥と蚊との間で鳥マラリアの感染環が成立していることを明らかにし、鳥マラリアと同様の伝播経路を持つウエストナイル熱の病原体伝播が国内で起こり得る可能性を示すことができた。

3) 絶滅危惧鳥類などを用いた病原体感染リスクの評価に関する研究

絶滅危惧鳥類と同じ生息域にいて、これら鳥類の感染源となりうる普通種の鳥獣類を対象としてWNVと他のウイルス・寄生虫の感染状況をモニタリングできる体性を整備することに成功した。また、WNVの国内侵入によってタンチョウが絶滅する可能性があることを確認した。

4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究

ヤンバルクイナの寄生虫を形態学的に観察し、線虫 (*Heterakis*属)、鈎頭虫類 (*Acanthcephala*) および斜睾吸虫科 (*Plagiorchiida*) 吸虫を確認した。これらの結果は初報告であり、非常に重要な知見である。また、今回開発したnested PCR法および real-time PCRアッセイ法による診断方法は、擬陽性反応を伴うことも無く、寄生虫の種の識別が可能であり、糞便サンプル内の寄生虫卵の識別に対しても応用可能であった。国内絶滅危惧鳥類を対象にした類似の研究成果はなく、絶滅危惧鳥類を対象にした寄生虫診断学的に貴重な結果である。

(2) 地球環境政策への貢献

1) 渡り鳥 (シギ・チドリ類) における病原体感染に関する研究

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

2) 吸血昆虫における病原体のモニタリング調査に関する研究

本研究の総括として、鳥類に致死的影响を与えるWNVの国内侵入をモニタリングする上で、WNVと同様の節足動物媒介性病原体であり同じ生活環をもつ血液原虫を指標病原微生物とした本調査研究方法が有用であることを示すことができた。すなわち、鳥を吸血源とする媒介昆虫 (とくに蚊) から原虫および原虫遺伝子を検出して解析することで、病原体の相互伝播を可能とする蚊と鳥との関係を明らかにすることができた。さらに、WNV侵入のモニタリング地域としてシギ・チドリ類が渡りの中継地として利用する北海道、関東圏および沖縄県の湿地や干潟が適所であることが本研究から示唆された。とくに夏の渡りの当初にシギ・チドリ類が飛来する北海道の釧路湿原やコムケ湖では、鳥類間で血液原虫の宿主転換が起こっていることが推察されたため、当地がWNV侵入の「北の水際」として重要監視地域になると考えた。本研究手法を将来的に展開することで、WNV侵入のリスク評価(地球環境政策)に必要な「宿主-媒介昆虫-病原体関係」に関する具体的情報の提供が可能となる。

3) 絶滅危惧鳥類などを用いた病原体感染リスクの評価に関する研究

鳥類に致死的影响を与えるWNVの国内侵入をモニタリングする上で、現状における病原体の保有状況と過去の感染経歴を明らかにすることが不可欠であることは自明である。特に、日本への侵入門戸である北海道の水鳥類で大陸での感染経歴のある可能性が証明されたことは、希少種への保全上、大変意義深い。

4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究

ヤンバルクイナの飼育下繁殖においては感染症および寄生虫病のコントロールプログラムが非常に重要になると予想される。今回開発した方法を飼育下繁殖における衛生管理プログラムに導入することで、寄生虫感染の蔓延を早期に防止できることが期待される。

6. 研究者略歴

課題代表者：桑名 貴

1950年生まれ、熊本大学大学院医学研究科修了、医学博士、熊本大学医学部助手、講師、国立水俣病総合研究センター室長、現在、国立環境研究所環境研究基盤技術ラボラトリー長

主要参画研究者

(1) : 桑名 貴 (同上)

(2) : 村田浩一

1952年生まれ、宮崎大学農学部卒業、神戸市立王子動物園獣医師、獣医学博士、現在、日本大学生物資源科学部教授

(3) : 浅川満彦

1959年生まれ、酪農学園大学酪農学部(現 獣医学部)卒業、ロンドン大学Royal Veterinary College野生動物医学修士課程修了、MSc Wild Animal Health、博士(獣医学)、現在、酪農学園大学獣医学部 教授

7. 成果発表状況(本研究課題に係る論文発表状況。)

(1)査読付き論文

- 1) Sato, Y., Hagihara, M., Yamaguchi, T., Yukawa, M. and Murata, K. 2007. Phylogenetic comparison of *Leucocytozoon* spp. from wild birds of Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 69:1,55-59.
- 2) Omori, S., Sato, Y., Isobe, T., Yukawa, M. and Murata, K. 2007. Complete nucleotide sequences of the mitochondrial genomes of two avian malaria protozoa, *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium juxtannucleare*. *Parasitol. Res.*, 100:3,661-664.
- 3) Kobayashi, T., Kanai, Y., Ono, Y., Matoba, Y., Suzuki, K., Okamoto, M., Taniyama, H., Yagi, K., Oku, Y., Katakura, K. and Asakawa, M. 2007. Epidemiology, histopathology, and muscle distribution of *Trichinella* T9 in feral raccoons (*Procyon lotor*) and wildlife of Japan. *Parasitol Res.*, 100: 1287-1291.
- 4) Murata, K., Tamada, A., Ichikawa, Y., Hagihara, M., Sato, Y., Nakamura, H., Nakamura, M., Sakanakura T. and Asakawa M. 2007. Geographical Distribution and Seasonality of the Prevalence of *Leucocytozoon lovati* in Japanese Rock Ptarmigans (*Lagopus mutus japonicus*) found in the Alpine Regions of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 171-176.
- 5) Murata, S., Chang, K-S., Yamamoto, Y., Okada, T., Lee, S-I., Konnai, S., Onuma, M., Osa, Y., Asakawa, M., and Ohashi, K. 2007. Detection of the Marek's disease virus genome from feather tips of wild geese in Japan and the Far East region of Russia. *Arch. Virol.*, 152(8):1523-1526.
- 6) Someya, M., Kunisue, T., Tashiro, Y., Asakawa, M., Iwata, H., Tanabe, S. 2007. Contamination status and accumulation features of dioxins and related compounds in terrestrial mammals from Japan. *Organohalogen Compounds*, 69: 1721-1724.
- 7) Ejiri H, Sato Y, Sasaki E, Sumiyama D, Tsuda Y, Sawabe K, Matsui S, Horie S, Akatani K, Takagi M, Omori S, Murata K, Yukawa M. 2008. Detection of avian *Plasmodium* spp. DNA sequences from mosquitoes captured in Minami Daito Island of Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 70:11,1205-1210.
- 8) Omori S, Sato Y, Hirakawa S, Isobe T, Yukawa M, Murata K. 2008. Two extra chromosomal genomes of *Leucocytozoon caulleryi*; complete nucleotide sequences of the mitochondrial genome and existence of the apicoplast genome. *Parasitol Res.* 103(4):953-7.
- 9) Murata K., Itoh K., Sasaki E., Sato Y., Kinjo T., Amano Y. and Nagamine T. 2008. Avian piroplasm *Babesia* sp. isolated from crested serpent eagles (*Spilornis cheela*) in Yaeyama Archipelago. *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 13 (1): 29-33.
- 10) Murata, K., Nii, R., Sasaki, E., Ishikawa, S., Sato, Y., Sawabe, K., Tsuda, Y., Matsumoto, R., Suda, A. and Ueda, M. 2008. *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* infection in a captive white eared-pheasant (*Crossoptilon crossoptilon*) at a Japanese zoo. *Journal of Veterinary Medical Science* 70 (2): 203-205.
- 11) Yoshino, T., Onuma, M., Nagamine, T., Inaba, M., Kawashima, T., Murata, K., Kawakami, K., Kuwana, T. and Asakawa, M. 2008. First record of the genus *Heterakis*(Nematoda: Heterakidae) obtained from two scarce avian species, Japanese rock ptarmigan (*Lagopus mutus japonicus*) and Okinawa rails (*Gallirallus okinawae*), in Japan. *Jpn. J. Nematol.*, 38 (2), 89-92.
- 12) Asakawa, M., Onuma, M., Yoshino, T., Aizawa, K., Sasaki, H. Maeda, A., Saito, M., Kato, N., Morita, T., Murata, K., Kuwana, T. 2008. Risk Assessment of Japanese Avian Infectious Diseases Performed by the Wild Animal Medical Center (WAMC), Rakuno Gakuen University, Japan" *J. Vet. Epidemiol.* 12: 25-26.
- 13) Zhao, C., Onuma, M., Asakawa, M. and Kuwana, T. 2009. Preliminary studies on developing a nested PCR assay for molecular diagnosis and identification of nematode (*Heterakis isolonche*) and trematode (*Glaphyrostomum* sp.) in Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*). *Vet Parasitol.* in press.

- 1 4) Yoshino, T., Nakamura, S., Endoh, D., Onuma, M., Osa, Y., Teraoka, H., Tenora, F., Barus, V., Kuwana, T. and Asakawa, M. 2009. A helminthological survey in the waterfowls including Ardeidae, Rallidae and Scolopacidae of Hokkaido, Japan. J. Yamashina. in press.
- 1 5) Yoshino, T., Shingaki, T., Onuma, M., Kinjo, T., Yanai, T., Fukushi, H., Kuwana, T. and Asakawa, M. 2009. Parasitic helminths and arthropods of the Crested Serpent Eagle, *Spilornis cheela perplexus* Swann, 1922 from the Yaeyama Archipelago, Okinawa, Japan. J. Yamashina, in press
- 1 6) Sato, Y., Tamada, A., Mochizuki, Y., Nakamura, S., Okano, E., Yoshida, C., Ejiri, H., Omori, S., Yukawa, M. and Murata, K. 2009. Molecular detection of *Leucocytozoon lovati* from probable vectors, black flies (Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. Parasitol. Res, 104:2,251-5.
- 1 7) Ejiri, H., Sato, Y., Sawai, R., Sasaki, E., Matsumoto, R., Ueda, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Omori, S., Murata, K. and Yukawa, M. 2009. Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. Parasitol. Res, in press