

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
 (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

日本大学生物資源科学部

動物資源科学科 野生動物学研究室 村田浩一

獣医学科 実験動物学研究室 佐藤雪太

平成 18～20 年度合計予算額	42,740 千円
(うち、平成 20 年度予算額)	10,000 千円)
※上記の合計予算額は、間接経費	9,864 千円を含む

[要旨]シギ・チドリ類の渡りルートの中で希少鳥類の生息する北海道、関東圏、沖縄本島、石垣島、南大東島の湿地や干潟および東南アジア地域のタイ王国ならびに極東ロシアの越冬地と繁殖地を調査地に選定し、シギ・チドリ類がウエストナイルウイルス (WNV) を伝播する可能性の評価のため、当ウイルスと同様の感染環を有する鳥マラリア (*Plasmodium spp./Haemoproteus spp.*)、*Leucocytozoon spp.*、*Trypanosoma spp.*、*microfilaria*、鳥ポックスウイルスを指標病原微生物とし、希少鳥類、野鳥および吸血昆虫 (主に蚊) を対象として調査研究した。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すると、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同様であった。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、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ある。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、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。つまり、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れば、国内各地の干潟でシギ・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ことを示唆するものである。以上から、北海道と沖縄の渡り鳥飛来地の重要拠点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 ウイルスを指標病原微生物として、本研究で開発した標準化手法を用いた定期的かつ経年的な監視調査を実施すれば、渡り鳥による病原体の感染ルート解明、リスク評価、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る。

[キーワード] ウエストナイル熱、吸血昆虫、血液原虫、シギ・チドリ類、渡り鳥

1. はじめに

日本近隣諸国における節足動物媒介性感染症の一種であるウエストナイル熱の野鳥感染例は、シベリアやアラスカの野鳥で確認されている。このことは、北米各地で野鳥もしくは飼育下鳥類の大量死を引き起こしたウエストナイルウイルスが、シベリアもしくはアラスカ地域から渡り鳥を介して我が国に持ち込まれる可能性を示唆している。本高病原性ウイルスが国内へ侵入した場合、我が国の希少鳥類のみならず生態系全体に悪影響を与え、ひいては生物多様性の減少もしくは消失につながることは確実である。

節足動物媒介性感染症による野鳥の大量死には、渡り鳥による病原体の持込と吸血昆虫の存在が大きく関与することが理解されているにもかかわらず、モニタリング対象とするべき鳥種や蚊種さらにそれらが接触する場所や時期については未だに不明確なままである。とくにシベリアから夏季もしくは秋季に飛来するシギ・チドリ類については、病原体保有に関する調査がほとんどなされていない。シギ・チドリ類は、蚊などの吸血昆虫が発生する季節にシベリアから国内の干潟や水田地帯などの湿地に飛来し、その後東南アジア、オーストラリアもしくはニュージーランドまで地球規模で渡りをする種である。また、春季には反対に南半球から繁殖地である北半球へ回帰する。そのため、シベリア地域とオセアニアもしくは東南アジア地域で病原体に感染した場合、渡り途中に中継地である日本へ当該病原体を持ち込む可能性があり得る。持ち込まれる可能性のある感染症が節足動物媒介性であれば、国内における吸血昆虫の種、発生場所、発生時期、生息密度、鳥類吸血嗜好性、病原体保有の有無等の情報を予め蓄積しておくことが、当該感染症の監視と制御ならびにリスク評価と管理において大切である。

以上のことから、シギ・チドリ類によるウエストナイル熱や鳥マラリアなどの節足動物媒介性感染症に対するサーベイランスを包括的計画の下で実施することは、国内の希少鳥類を外来病原微生物から保護する上で極めて重要であると考えられる。

2. 研究目的

南北半球を長距離移動するシギ・チドリ類を主な対象鳥種として、渡り鳥が保有するウエストナイル熱等の節足動物媒介性感染症が我が国へ侵入するリスクを評価する。ウエストナイルウイルスと同様の媒介生物を介した感染環を有する鳥マラリア等の血液原虫、*microfilaria*、鳥ポックスウイルス等を指標病原体として、それらに共通する媒介昆虫（主に蚊）に関する調査研究を併せて行い、国内希少鳥類の保護管理および生物多様性の維持に役立てることを目的とする。

3. 研究方法

(1) 調査地および調査時期

シギ・チドリ類が渡りの中継地として利用し、希少鳥類の重要生息地である国内の湿地、干潟および水田地帯等の水辺を主な調査対象地として選択した。さらに、越冬地のひとつとして利用される東南アジアのタイ王国の干潟および繁殖地のひとつとして極東ロシアのボロンスキー自然保護区においても調査を実施した。主な調査地および調査時期は次のとおりである。(i) 北海道釧路市の釧路湿原、根室市春国岱、苫小牧市ウトナイ湖、紋別市コムケ湖：2006～2008年（検査試料の提供を含む）、(ii) 東京都野鳥公園：2006～2007年、(iii) 千葉県谷津干潟：2006年、(iv) 沖縄県石垣島：2006～2008年、(v) 沖縄県漫湖：2007～2009年、(vi) 沖縄県国頭村（やんばる）：2007～2008年、(vii) 沖縄県南大東島：

2006～2007年、(viii)タイ王国ペチャブuri (Petchaburi)のランパックビア (Laem Phak BIA) およびドンホイロッド(Don Hoy LOD) : 2007年、(ix) 極東ロシアのボロンスキー自然保護区 : 2007年、(x) 日本大学生物資源科学部の校内その他 : 2007～2009年。これ以外の地域については保存試料を用いた解析を行った。

(2) 血液試料の採取

タンチョウ (*Grus japonensis*)、シマフクロウ (*Bubo blakistoni*) 等の希少鳥類を含めた国内産鳥類およびロシア産コウノトリ (*Ciconia boyciana*) から血液を採取し検査に供した。オオミズナギドリ (*Calonectris leucomelas*) 等の国内産鳥類からの採血は環境省の許可を得て行われ、ロシア産コウノトリについてはロシア政府の許可を得て Russian Federation Ministry of Natural Resources の職員が行った。シギ・チドリ類の血液は、北海道内の上記4ヶ所において環境省の許可を得て行われた標識調査の際に採取した。オジロワシ (*Haliaeetus albicilla*)、オオタカ (*Accipiter gentilis*) およびクマタカ (*Spizaetus nipalensis*) の血液は北海道内において保護された際に採取した。それぞれの個体の翼下もしくは脚の伏在静 (*Gallirallus okinawae*)、ノグチゲラ (*Sapheopipo noguchii*)、クロツラヘラサギ (*Platalea minor*)、ミゾゴイ (*Gorsachius goisagi*)、ホントウアカヒゲ (*Erithacus komadori namiyei*) の血液は、沖縄県内で傷病もしくは死体として発見され保護施設へ搬入された個体から採取したものである。北海道内および沖縄県内で希少鳥類から採取された試料は、独立行政法人国立環境研究所を通じて、冷蔵・冷凍保存もしくは綿花に付着した状態の微量試料、また一部はスライド塗抹固定標本として提供された。南大東島で採取された試料は、エタノール液内に浸漬して保存されていたものを用いた。

(3) 蚊の捕集と同定

蚊の捕集に用いた方法は、(i) CO₂を誘引剤 (ドライアイスもしくはイースト菌発酵装置を利用) とした CDC 型捕虫機の設置、(ii) 産卵蚊捕集を目的とした Gravid 型捕虫機の設置、(iii) 捕虫網を用いたスウィーピング法、(iv) 吸血蚊捕集を目的としたバックパックアスピレータによる吸引、および(v) ヒト囷法であった。種の同定は、実体顕微鏡下の観察で形態学的に行った。アカイエカ種群蚊については、分子生物学的手法を用いた分類を行った。

なお、捕集蚊の同定には国立感染症研究所昆虫医科学部の津田良夫室長の協力を得た。

(4) 鳥マラリア等の血液原虫および住血寄生虫の検出

1) 形態観察による検出

採取した血液から薄層塗沫標本の作製し、メタノール (99.5%) 固定を行った。塗沫固定標本は、Giemsa 液 (pH6.4～6.8) またはヘマカラー液 (Hemacolor, Merck KGaA 社) を用いて染色し、オイキット (EUKITTO, Kindler 社) で封入した。

400倍の光学顕微鏡下 (BX51, OLYMPUS 社) で塗沫染色標本を観察し原虫の有無を調べた。感染が認められた場合は、油浸レンズ (×1,000倍) で詳細に形態観察し、顕微鏡用デジタルカメラ (DP71, OLYMPUS 社) で撮影後、原虫細胞および宿主細胞の長短径、面積等の計測を画像解析ソフト (Win Roof, 三谷商事株式会社) を用いて行った。同定には既報を参考にした (Valkiunas, 2004)。

2) 分子生物学的手法による検出

a. 鳥マラリア原虫遺伝子の検出

血液試料もしくは蚊から定法により抽出した DNA を用いて、鳥類マラリア原虫のミトコンドリア DNA チトクローム *b* 遺伝子 (mtDNA *cyt b*) 領域の部分塩基配列 (478~480 bp) を標的とした nested-PCR を行い、血液原虫の遺伝子検出を試みた。

プライマーは 1st PCR では HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') および HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3')、2nd PCR では HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') および HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') を用いた (Hellgren *et al.*, 2004)。その終濃度を 10 μ M とし、全量を 25 μ l の反応系で nested-PCR を実施して特異的増幅を試みた。

反応条件は、DNA 変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 50 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 45 秒を 1 サイクルとし、1st PCR では 20 サイクル、2nd PCR では 35 サイクル行った。1st PCR では血液試料から抽出した DNA 検体 1 μ l、2nd PCR では 1st PCR 後の反応液を 20 倍希釈した溶液 1 μ l をそれぞれテンプレートとして用いた。

2nd PCR 産物は 2.0 %アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液による染色で確認した。遺伝子断片の増幅が確認された検体は、増幅産物を精製後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

得られた塩基配列については、GenBank に登録されている鳥類血液原虫遺伝子の配列と比較した。分子系統解析には MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2008) を用い、近隣結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した。遺伝距離は、同プログラムを用いて p-distance (proportion of different sites) 法により求めた。さらに、1,000 回のブートストラップで系統樹の安定性を検定した。

b. トリパノゾーマ遺伝子の検出

血液試料もしくは培養原虫から定法により抽出した DNA を用いて、small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 領域の部分塩基配列 (326 bp) を標的とした nested-PCR を行い、血液原虫の遺伝子検出を試みた。

プライマーは 1st PCR では S762 (5'-GACTTTTGCTTCCTCTA(A/T)TG-3') および S763 (5'-CATATGCTTGTTC AAGGAC-3')、2nd PCR では S755 (5'-CTACGAACCCTTTAACAGCA-3') および S823 (5'-CGAA(T/C)AACTGC(C/T)CTATCAGC-3') を用いた (Sehgal *et al.*, 2001)。その終濃度を 10 μ M とし、全量を 25 μ l の反応系で nested-PCR を実施して特異的増幅を試みた。

反応条件は、1st PCR では DNA 変性 95 $^{\circ}$ C 60 秒、アニーリング 45 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 65 $^{\circ}$ C 60 秒を 5 サイクルの後、DNA 変性 95 $^{\circ}$ C 60 秒、アニーリング 50 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 60 秒を 35 サイクル、2nd PCR では、DNA 変性 96 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 58 $^{\circ}$ C 60 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 30 秒を 35 サイクルで行った。1st PCR では血液試料から抽出した DNA 検体 1 μ l、2nd PCR では 1st PCR 後の反応液を 20 倍希釈した溶液 1 μ l をそれぞれテンプレートとして用いた。

c. ミクロフィラリア遺伝子の検出

血液試料もしくは感染臓器から上記同様定法により抽出した DNA を用いて、mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI) 領域の部分塩基配列 (688 bp) を標的とした PCR を行い、血

液原虫の遺伝子検出を試みた。

プライマーは COIntF (5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3') および COIntR (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3') を用いた (Merkel *et al.*, 2007)。その終濃度を 10 μ M とし、全量を 25 μ l の反応系で実施して特異的増幅を試みた。

反応条件は、DNA 変性 95 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 52 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 45 秒を 35 サイクルで行った。

(5) ウエストナイルウイルスの検出

南大東島において捕集した一部の蚊を用いて、ウエストナイルウイルス保有の有無を確認するためにスクリーニング試験を行った。試験にはウイルス抗原検出用の簡易キット (VecTest、Medical Analysis System, Inc.) を用いた。さらに精査のため、RT-PCR 法および LAMP 法による検査を実施した。

(6) シギ・チドリ類の飛来数および生息環境調査

ウエストナイル熱や鳥マラリアを媒介すると考えられる蚊の発生時期とシギ・チドリ類の飛来時期との関連を調べ今後のリスク評価に役立てるため、東京港野鳥公園および沖縄県漫湖水鳥・湿地センターにおける個体数調査資料 (東京港野鳥公園環境調査指導等業務委託実施報告書および漫湖水鳥・湿地センター事業報告書) を参考として両者のピーク時期を比較検討した。

シギ・チドリ類と鳥マラリア媒介蚊との接触機会を理解するため、各調査地で鳥の採餌場、埒 (ねぐら)、蚊の発生源、休眠場所などの環境調査を実施した。さらに、調査地に生息する渡り鳥および留鳥の生態観察を行った。

沖縄県漫湖、南大東島およびタイ王国の各調査地においては、蚊捕集期間中にデータロガー (HOBO Pro, Onset Computer Corporation 社) を用いて捕虫機設置場所の温・湿度を経時的に測定記録した。

4. 結果・考察

(1) シギ・チドリ類、希少鳥類および日本産鳥類の鳥マラリア感染

シギ・チドリ類が、春と秋の渡り時期に中継地として利用する北海道内の湿地や干潟で調査捕獲された個体および傷病等が原因で施設に保護されたタンチョウ、シマフクロウ、オジロワシ等の希少鳥類において、形態学的観察もしくは分子生物学的解析により赤血球細胞内の鳥マラリア感染を確認した (図 1)。

関東圏の動物園で保護されたオオジシギ (*Gallinago hardwickii*) においても、血液細胞中に鳥マラリアの存在を認めた (図 1)。形態的特徴および各部位の計測値から *Plasmodium* sp. と考えたが、原虫の各発育ステージが認められず種同定は困難であった。

沖縄県国頭村で傷病が原因で保護もしくは死体収容されたヤンバルクイナの血液細胞内に鳥マラリア原虫を確認した (図 2)。検査した 14 個体中 2 個体 (14.3%) に血液原虫感染が確認され、細胞内寄生率はそれぞれ 0.47% および 0.10% であった。

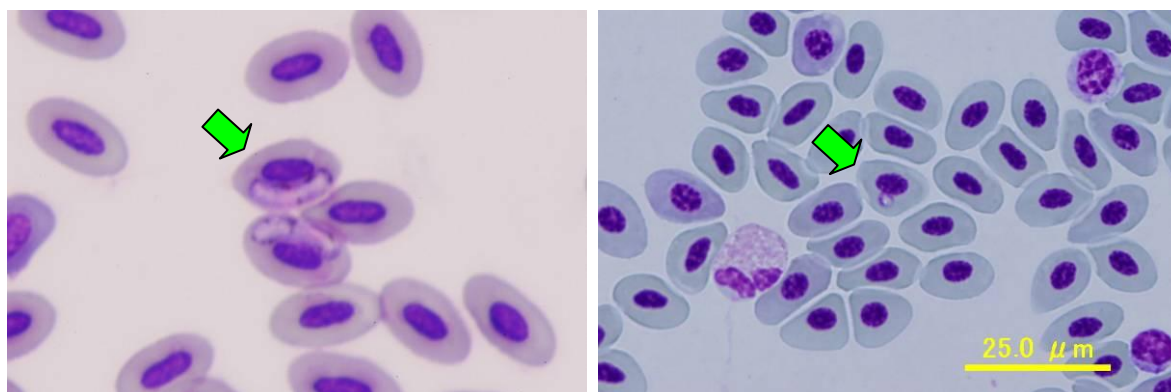


図 1. オオジギ赤血球細胞内の血液原虫（左）とタンチョウの血液原虫（右）。両個体共に形態的特徴から鳥マラリア（*Plasmodium* sp.）と同定され、分子生物学的解析結果からも証明された。

生殖母体は halteridial で宿主細胞の側方に位置し細胞核を扁縁に圧排していた。circumnuclear な形態も認められた。色素顆粒は黄褐色で小さく左右両極に存在し、その数は一細胞あたり雌性生殖母体で 213 ± 1.12 雄性生殖母体では 12.6 ± 1.08 ($n=10$) であった。雌性生殖母体の長短径は $138 \pm 0.78 \mu\text{m}$ と $3.2 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 、雄性生殖母体のそれは $11.1 \pm 2.78 \mu\text{m}$ と $3.9 \pm 0.34 \mu\text{m}$ であった。感染赤血球の長短径は $14.3 \pm 0.84 \mu\text{m}$ と $8.2 \pm 0.66 \mu\text{m}$ であり、非感染血球の $13.3 \pm 0.51 \mu\text{m}$ と $7.9 \pm 0.44 \mu\text{m}$ に比べ差は有意であった ($p < 0.01$)。形態的特徴および各部位の計測値から、バン (*Gallinula chloropus*) での寄生が報告されている *Haemoproteus gallinulae* de Mello, 1935、ヒメクイナ (*Porzana pusilla*) での寄生が報告されている *H. porzanae* に近似すると思われた。しかし、各原虫の計測値を比較検討したところ、統計的に有意な差が認められ、マラリア顆粒の個数にも差が認められた。

30 個体の血液抽出 DNA を用いて、鳥類血液原虫の mtDNA *cytb* 領域の部分塩基配列 (478 bp) を標的とした nested-PCR を行った。遺伝子増幅された検体については、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、DNA データベースに登録されている各種鳥類の血液原虫遺伝子配列と比較した。血液原虫遺伝子の増幅が確認されたのは 30 個体中 6 個体 (20%) で、そのうち 5 個体から得られた原虫遺伝子の塩基配列は 100% 相同であった。鳥類血液原虫遺伝子の登録配列を用いた分子系統解析の結果、*Haemoproteus* 属のクラスターに分類されたが (図 3)、どの登録配列とも相同性は低かった (89% 以下)。

形態学および分子生物学的解析結果から、ヤンバルクイナに認められた *Haemoproteus* 属原虫は新種である可能性が高い。ヤンバルクイナは無飛翔性の鳥類で、進化的にも古いタイプの鳥類であると考えられているため、本血液原虫はヤンバルクイナと共進化した新種の可能性がある。すなわち、ヤンバルクイナは本原虫に対してある程度の抵抗性を獲得しており、少なくとも免疫能が十分に発達した成鳥段階では、感染しても症状を現さない不顕性感染状態を呈するのではないかと考えられた。

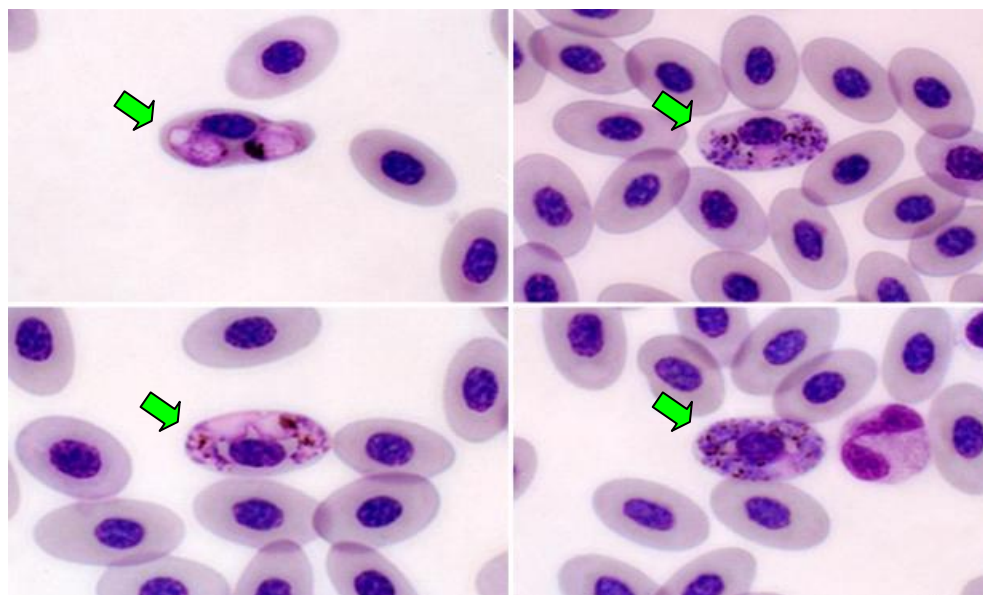


図 2. ヤンバルクイナの赤血球細胞内に認められた血液原虫 (*Haemoproteus* sp.). 形態的特徴および各部位の計測値から、バン (*Gallinula chloropus*) やヒメクイナ (*Porzana pusilla*) から検出されている同属の血液原虫とは異なる種で、新種である可能性が示唆された。左上写真は幼弱な血液原虫ガメートサイト (生殖母体)、右上および右下はマクロガメートサイト (雌性生殖母体)、左下はミクロガメートサイト (雄性生殖母体)。

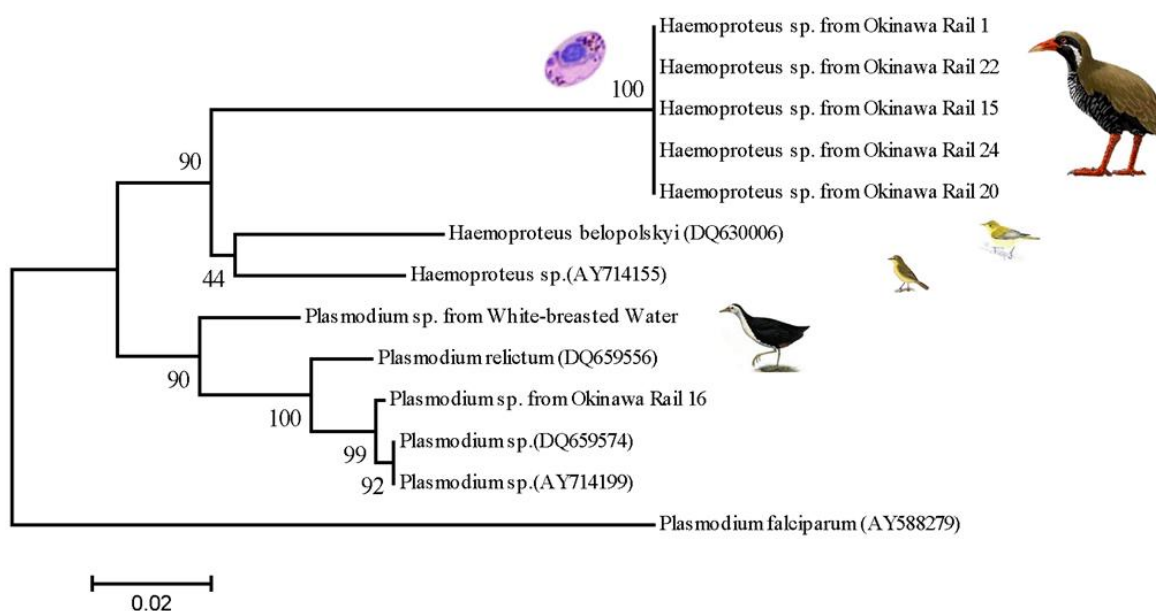


図 3. ヤンバルクイナから検出された *Haemoproteus* sp. の mtDNA *cyt b* 領域部分塩基配列 (478 bp) を用いた分子系統解析では、他の鳥類寄生の *Haemoproteus* spp. と異なるクラスターに分類された。

紋別市コムケ湖で捕獲されたオオジシギ、アオアシシギ (*Tringa nebularia*) およびタシギ (*Gallinago*) と釧路湿原で保護されたタンチョウから検出された鳥マラリア mtDNA *cytb* 遺伝子の部分塩基配列 (480bp) は、100%相同であった (図 4, 5)。このことは、一時的ではあれ同所的に生息する鳥類間で、節足動物媒介性感染症が伝播する可能性を示唆している。北米のニューヨーク市に侵入し、野鳥に甚大な被害を与えたウエストナイルウイルスの高病原性株がシギ・チドリ類によって国内に持ち込まれた場合、湿地に生息する国内産希少鳥類が被る悪影響は大きいであろう。

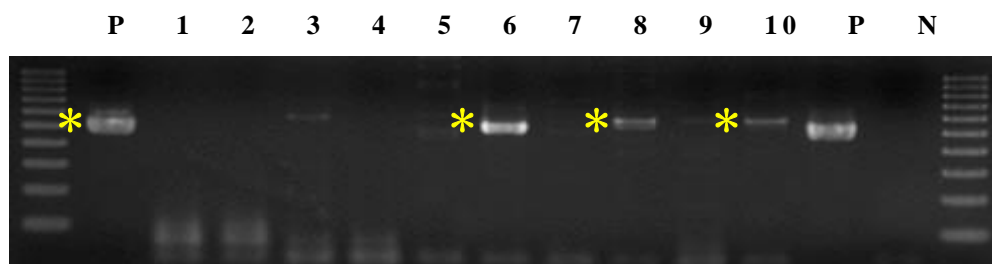


図 4. シギ・チドリ類の血液試料から PCR 法で増幅された鳥マラリア (*Plasmodium* spp.) の遺伝子断片 (*印)。P は陽性コントロール、N は陰性コントロール。

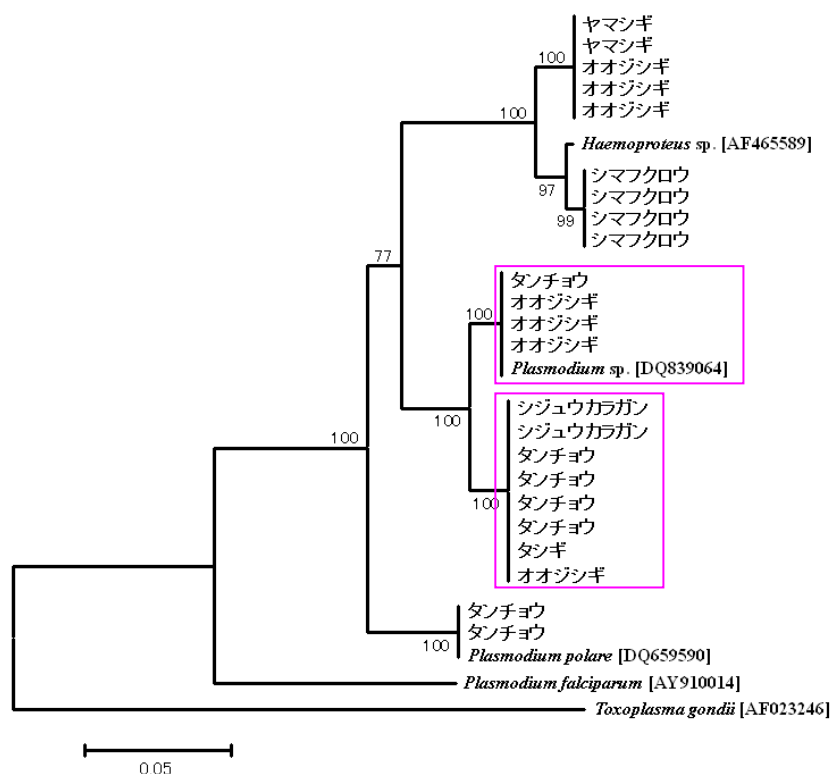


図 5. 北海道の湿地に生息する各種鳥類から検出された鳥マラリア原虫遺伝子の分子系統関係。タンチョウ、オオジシギ、シジュウカラガン等の鳥類間で塩基配列が 100% 相同な鳥マラリア原虫遺伝子が検出されたことから (枠内)、一時的ではあれ同所的に生息する鳥類の間で媒介昆虫による病原体の伝播が起こる可能性が示唆された。近隣結合法 (NJ 法) により作成。ブートストラップ値は 1,000 回。

国内の野鳥における鳥マラリア感染状況については未だ十分に調査されていない。これまでの調査のほとんどは、血液塗抹標本の観察によるものであり、真の感染状況を捉えていなかった可能性がある。そこで、国内に生息する鳥類を対象とした鳥マラリアの感染状況の詳細を分子生物学的手法を用いて明らかにした。

沖縄県（本島および石垣島）、本州および北海道で採取された 12 目 27 科 85 種 595 個体の試料を対象とし分子生物学的手法を用いて解析したところ、29.2%（173/593）に鳥マラリア原虫遺伝子の存在が確認された。高率に検出されたのはハト目（56.0%）とスズメ目（61.4%）で、なかでもスズメ（*Passer montanus*）およびハシブトガラス（*Corvus macrorhynchos*）のように集団増殖を形成する野鳥において顕著であった（図 6）。

北海道のタンチョウやシマフクロウ、沖縄県のカンムリワシやヤンバルクイナ、ホントウアカヒゲなどの希少鳥類に原虫遺伝子が確認されたため、生息域内保全を計画する上では鳥マラリア感染の影響評価も重要であると考えた。

通常は検出率が低下する冬季の試料からも、比較的高い割合で原虫遺伝子が増幅された。供試個体は傷病保護されたものが多く、衰弱や免疫低下もしくは飼育等によるストレスの影響を受け、血液中に原虫が出現した可能性がある。

検査対象鳥に最も多く認められた原虫種は *P. relictum* であった。*P. relictum* は宿主特異性が低く、病原性が高い住血原虫であるとされており、今後、生態学的観点から野鳥の生存率や繁殖成功率に与える影響の有無を調べる必要がある。同一個体群の鳥が保有する *Plasmodium* 属原虫遺伝子の塩基配列が 100%一致したことから、吸血昆虫を介した原虫の相互感染が推察された。分子系統解析より、地域および宿主特異的な原虫の存在や、同所性鳥類間での宿主転換（Host-Switching）が示唆された。

北海道のコムケ湖で捕獲されたオオジシギ、タシギおよびシジュウカラガン（*Branta canadensis*）と釧路湿原で保護されたタンチョウから検出された鳥マラリア原虫 mtDNA *cyt b* 遺伝子の部分塩基配列（480bp）は 100%相同であった。ヤマシギ（*Scolopax mira*）とオオジシギから検出された鳥マラリア原虫遺伝子の配列も同様であった（図 6）。このことは、先述したように湿地において同所的に生息する鳥類間で節足動物媒介性病原体が相互感染している可能性が考えられる。

ヤンバルクイナに対する血液原虫感染の影響については更なる継続研究が必要だが、希少種に対する獣医学的保全の観点からは、他の節足動物媒介性感染症を含めた調査研究が求められる。シギ・チドリ類の飛来は、沖縄本島北部の海岸でも観察されている。極東地域や東南アジアに存在する高病原性の節足動物媒介性病原体が彼らによって運搬されてきた場合、亜熱帯という吸血昆虫が周年活動できる地域に定着し拡散する可能性は十分に考えられる。

沖縄本島北部には『やんばるの森』と呼称される生物多様性に富んだ亜熱帯性照葉樹林帯があり、ヤンバルクイナ、ノグチゲラ、ホントウアカヒゲなどの希少鳥類が生息している。生物多様性保全を計画する上で、より広範囲な血液原虫感染のモニタリング調査が求められる。

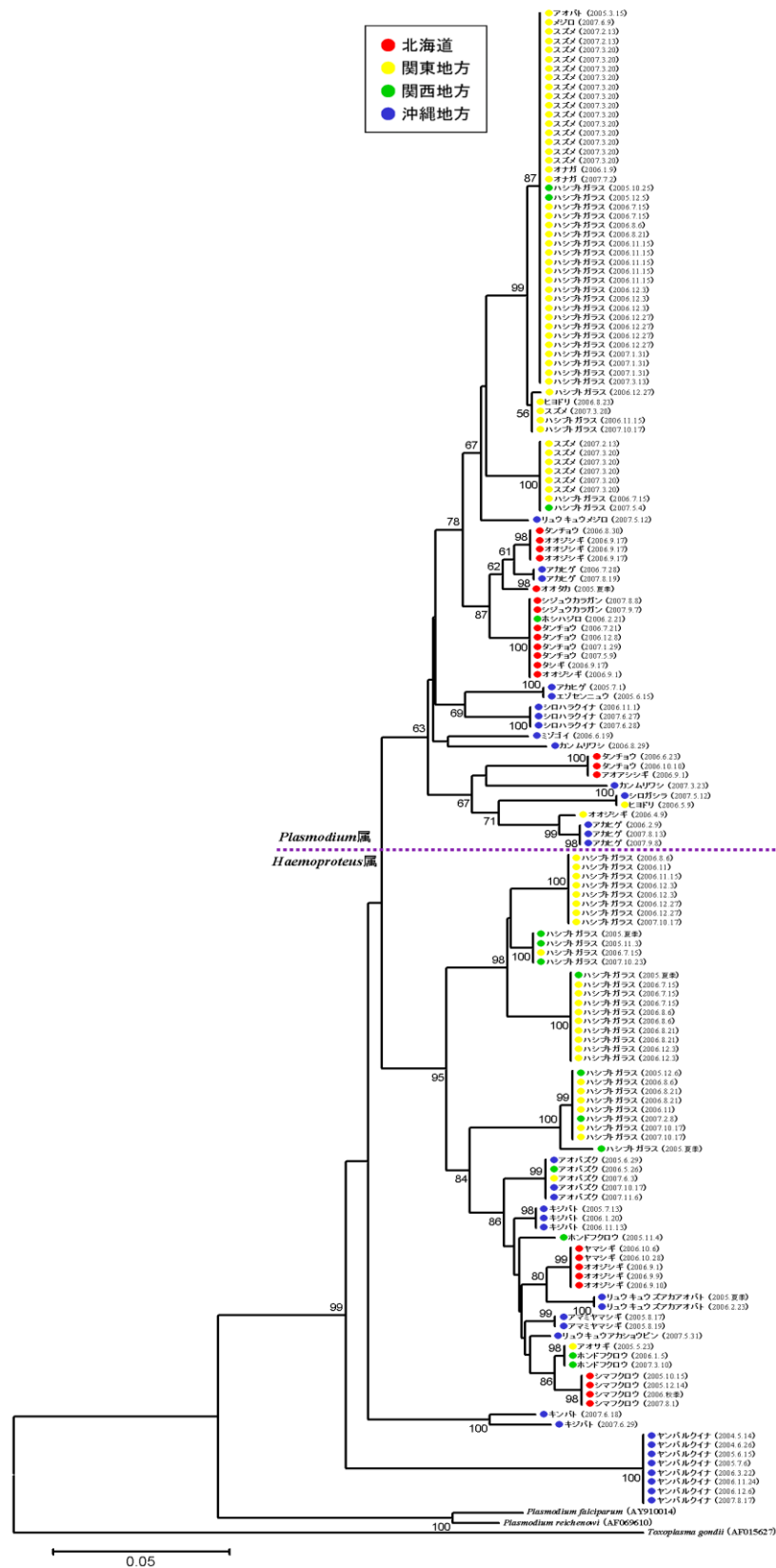


図 6. 国内産野鳥における鳥マラリア原虫遺伝子の保有状況。29.2%（173/593 個体）に鳥マラリア原虫遺伝子の存在が確認された。

2007年10月に岩手県釜石市沖約10kmに位置する無人島の三貫島でオオミズナギドリ39羽から採血し、血液原虫保有の有無を顕微鏡学および分子生物学的に検査した。本島はオオミズナギドリとヒメクロウミツバメ (*Oceanodroma monorhis*) の繁殖地として国の天然記念物に指定されているため、調査は文化庁と環境省の許可を得て行った。三貫島のオオミズナギドリは、繁殖期に採餌のため北海道以北の海域まで飛行し、冬季にはフィリピン周辺の海域まで渡って越冬する。長距離の渡りをする点ではシギ・チドリ類と同様であるが、オオミズナギドリは繁殖期以外のほとんどを洋上で過ごすため、吸血昆虫との接触機会は繁殖地である島内が中心となる。このような生態から、三貫島の個体が節足動物媒介性病原体を海外から持ち込む可能性は低く、もし保有していれば国内感染が示唆される。シギ・チドリ類とオオミズナギドリが保有する血液原虫の分子系統を比較することは、原虫の出自を推察する上で有用であると考えられる。しかし、今回の調査では、39羽すべてに原虫感染を認めなかった。島内に捕虫機を設置したが、吸血昆虫は採集されなかった。同時に実施した簡易キット、RT-PCRおよびLAMP法によるウエストナイルウイルスと鳥インフルエンザの検査もすべて陰性であった。限られた病原体を対象とした調査ではあったが、三貫島の個体群は健全であると考えられた。

(2) 東京港野鳥公園および谷津干潟における蚊捕集調査

東京港野鳥公園および千葉県の谷津干潟は、関東圏におけるシギ・チドリ類の渡り中継地として重要な湿地となっているため、両地での蚊相を知ることは節足動物媒介性感染症をモニタリングする上で重要である。そこで、両地において主に蚊の発生時期に合わせて捕集調査を実施した。

2006年の5ヶ月間に毎月行った調査では、計7種(1種群を含む)1,550匹の蚊を捕集した。その内訳は、アカイエカ種群蚊が759匹、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) が142匹、カラツイエカ (*Cx. bitaeniorhynchus*) が29匹、コガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*) が97匹、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) が412匹、イナトミシオカ (*Cx. modestus inatomii*) が110匹、キンイロヤブカ (*Aedes vexans nipponii*) が1匹であった。これらすべての種は、ウエストナイルウイルスを媒介することが野外もしくは実験室内で証明されている。捕集数が最も多かったのは8月の824匹で、次いで多かったのは9月の469匹であった。調査を終了した10月にも57匹が捕集された。

2007年の7ヶ月間に毎月行った調査では、計5種(1種群を含む)約3,280匹の蚊を捕集した。その内訳は、アカイエカ種群蚊が1,636匹、ヒトスジシマカが1,040匹、イナトミシオカが47匹、コガタアカイエカが207匹、カラツイエカが50匹であった。捕集数が最も多かったのは8月で、次いで9月と10月に多くの蚊の生息が確認された。各月毎のシギ・チドリ類の飛来数を、蚊捕集数と比較検討したところ、シギ・チドリ類の飛来ピークと蚊の発生ピークが8月で一致した(図7)。極東ロシアもしくはアラスカで繁殖を終えたシギ・チドリ類が国内に飛来する時期が当地の蚊の発生時期に合致していることは、節足動物媒介性感染症の拡散を考える上で留意されるべき事実である。

東京港野鳥公園における蚊とシギチドリ類の季節的消長関係

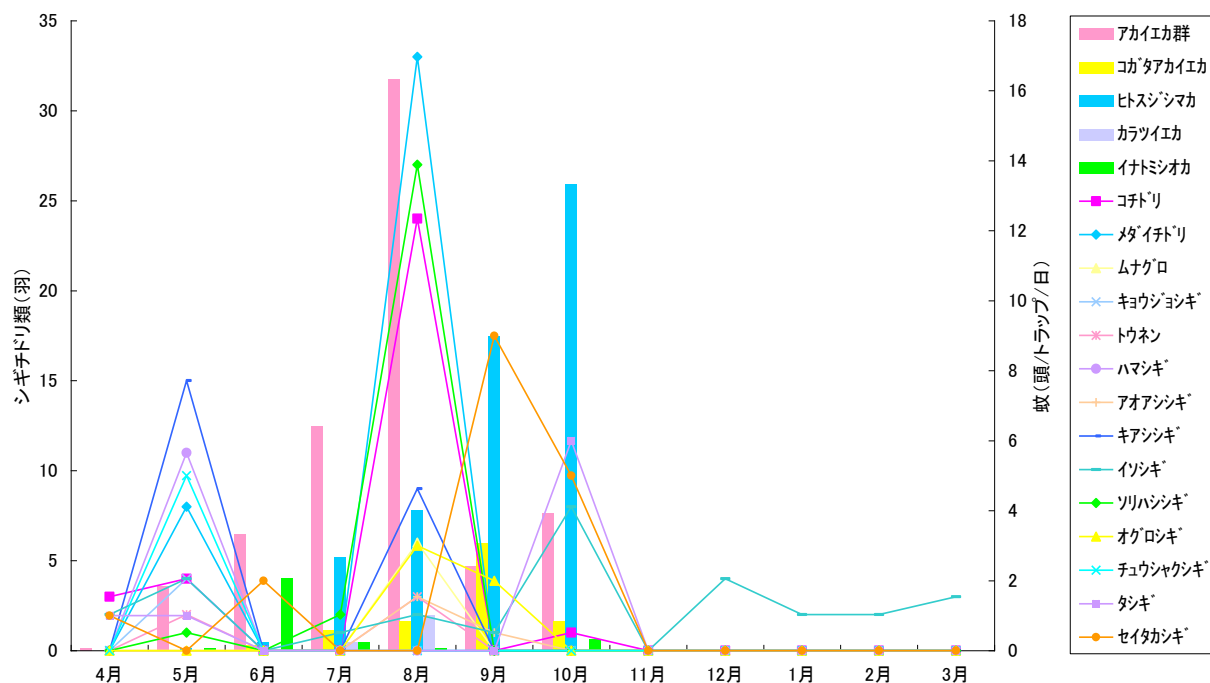


図7. 東京港野鳥公園におけるシギ・チドリ類の飛来数と蚊の捕集数の関係。8月に両者のピークが重なっており、この時期に吸血機会が増すことが予測された。10月にはタシギとヒトスジシマカのピークが一致している。

千葉県谷津干潟では、8月に1回のみ蚊の捕集調査を実施したが、4種（1種群を含む）257匹を捕集した。その内訳は、アカイエカ種群蚊が240匹、コガタアカイエカが8匹、ヒトスジシマカが7匹、イナトミシオカが2匹であった。

東京港野鳥公園で捕集した6種1,550匹の蚊をプールして95検体分のDNAサンプルとした。同様に谷津干潟で捕集した4種類257匹の蚊をプールして15検体分のDNAサンプルとした。PCRにより鳥マラリア原虫遺伝子断片の増幅が認められたのは、東京港野鳥公園のヒトスジシマカおよびアカイエカの2種から抽出したDNAサンプルからで、陽性検体数は13であり、陽性率は全体で0.9%と推定された。一方、谷津干潟ではアカイエカから抽出したDNAサンプルのみがPCR陽性で、陽性検体数は1であり、陽性率は全体で0.4%と推定された（表1, 2）。

表 1. 東京港野鳥公園における捕集蚊の鳥マラリア原虫保有状況

和名	種名	個体数	DNA抽出用 プール数	陽性数	推定陽 性率(%)
ヒトスジシマカ	<i>Aedes albopictus</i>	412	22	1	0.2
カラツイエカ	<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	29	5	0	0
イナトミシオカ	<i>Cx. modestus inatomii</i>	110	7	0	0
アカイエカ	<i>Cx. pipiens pallens</i>	901	51	12	1.5
コガタイエカ	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	97	9	0	0
キンイロヤブカ	<i>Ae. vexans nipponii</i>	1	1	0	0
総計		1,550	95	13	0.9

表 2. 谷津干潟における捕集蚊の鳥マラリア原虫保有状況

蚊の種名	個体数	DNA抽出用 プール数	陽性数	推定陽性率 (%)
ヒトスジシマカ	7	1	0	0
イナトミシオカ	2	1	0	0
アカイエカ	240	12	1	0.4
コガタイエカ	8	1	0	0
総計	257	15	1	0.4

また、遺伝子型の比較により、蚊から検出された鳥マラリア原虫はいずれも既報の日本に生息する野鳥または飼育下鳥類に見られた原虫と非常に近縁であることが示唆された。すなわち、シギ・チドリ類が飛来する少なくとも 2 箇所の関東の地域において、病原体の伝播可能なベクターが存在していることが示唆された。

関東圏の干潟は、住宅地に接して位置する場合が多く、節足動物媒介性病原体の国内産野鳥への感染のみならずヒトへの感染についても留意する必要があると考えた。また、東京港野鳥公園は羽田国際空港や大田市場と隣接しているため、航空機もしくは輸入貨物に紛れて海外から病原体保有蚊が侵入した場合、定着する可能性がある場所として、モニタリングを継続することが大切であると思われた。

(3) 沖縄県漫湖における蚊捕集調査

渡り鳥によって伝播される鳥マラリアやウエストナイル熱等の節足動物媒介感染症の国内産鳥類への影響を評価するには、鳥の飛来時期と媒介昆虫の発生時期との関係を理解することが重要である。シギ・チドリ類は南北半球間を長距離移動し、その中継地として国内の湿地や干潟を春と夏に利用している。夏の渡りは蚊の発生時期と重なっており、越冬地としても利用される沖縄島内の湿地では蚊が周年発生している。そのような時期と場所へ国内に存在しない節足動物媒介感染症が侵入した場合

は、蚊の媒介によって感染拡大する可能性がある。そこで、沖縄島の湿地周辺における蚊と渡り鳥とくにシギ・チドリ類飛来数との関係を調査すると共に、蚊および野鳥の鳥マラリア原虫 (*Plasmosium* spp./*Haemoproteus* spp.) 遺伝子保有について研究し、当地における感染環成立の可能性とリスクを評価した。

2007年5月から2008年3月までの毎月、沖縄県那覇市漫湖周辺でCDCトラップを用いた蚊の捕集もしくは採集を行なった。採集された蚊は、実体顕微鏡下で形態学的に種同定した後、鳥マラリア原虫のmtDNA cyt *b* 部分領域を標的とした nested-PCR を行った。蚊の月別採集数と資料調査によるシギ・チドリ類の飛来数との関係を調べた。同県沖縄市比屋根湿地において環境省の許可を得て捕獲されたシギ・チドリ類等の渡り鳥ならびに留鳥から得られた血液試料を用い、同様の方法で鳥マラリア原虫遺伝子の検出を試みた。標的遺伝子の増幅が認められた場合は、増幅産物の塩基配列をダイレクト・シーケンス法で決定し、DNA データベースに登録された配列と比較検討した。

漫湖周辺の周年調査で、7種 758頭の蚊が採集された。その内訳は、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が83頭、ヒトスジシマカが663頭、フタクロホシチビカ (*Uranotaenia novobscura*) が3頭、シロハシイエカ (*Culex pseudovishnui*) が3頭、コガタアカイエカが2頭、キンイロヤブカが4頭、オオクロヤブカ (*Armigeres subalbatus*) が2頭であった。ヒトスジシマカが88%、ネッタイエカが11%と大半を占めていた。最も多くの蚊が採集されたのは7月から9月で、キアシシギ (*Tringa brevipes*) 飛来数のピークと重なっていた (図7)。12月と1月の飛来時期における蚊採集数は少なかった。今回、吸血蚊は採集されなかったため、吸血源となる鳥種は特定できなかった。また、蚊体内から鳥マラリア原虫遺伝子は検出されなかった。比屋根湿地で捕獲された8種39個体の鳥類のうちリュウキュウメジロ (*Zosterops japonicus loochoensis*) やアオアシシギ (*T. nebularia*) など4種4個体 (10.3%) から鳥マラリア原虫遺伝子が検出された。沖縄島の留鳥からのみ検出される遺伝子配列が認められた一方で、本州の野鳥から一般的に検出される配列も認められた。

漫湖の干潟は後述するタイ王国ペチャブリの干潟と類似した環境で、マングローブ林に辺縁を囲まれていた。この林内にアカアシシギ (*T. totanus*) が隠れる様子や、夕方には林内で多数の鳥の鳴き声が聞かれたことから、鳥類が罅や隠れ場としてマングローブ林を利用していることが推察された。今年度の調査では諸種の都合により実施できなかったが、マングローブ林内で蚊捕集を行えば鳥類と吸血蚊の関係がより明確になると思われた。

温湿度データロガーによる15分毎の経時的記録では、捕集を行った午後4時から翌朝の午前9時30分までの間で、最高気温は午後4時の21.7℃、最低気温は午前1時55分の12.6℃、平均気温は14.1℃を記録した。当日は曇天もしくは雨天で、平均気温が蚊の活動低下をもたらす15℃を下回っていたにもかかわらず、比較的多くの蚊がCDC型捕虫機で捕集されたことは、マングローブ林内が鳥のみならず蚊にとっても良好な生息環境になっていることを推察させる。渡り中継地の沖縄島内では、マングローブ林内の蚊が感染症の媒介に重要な役割を担っていると考えられるため、今後のモニタリングでは林内の蚊に重点を置いて捕集計画を立てる必要がある。

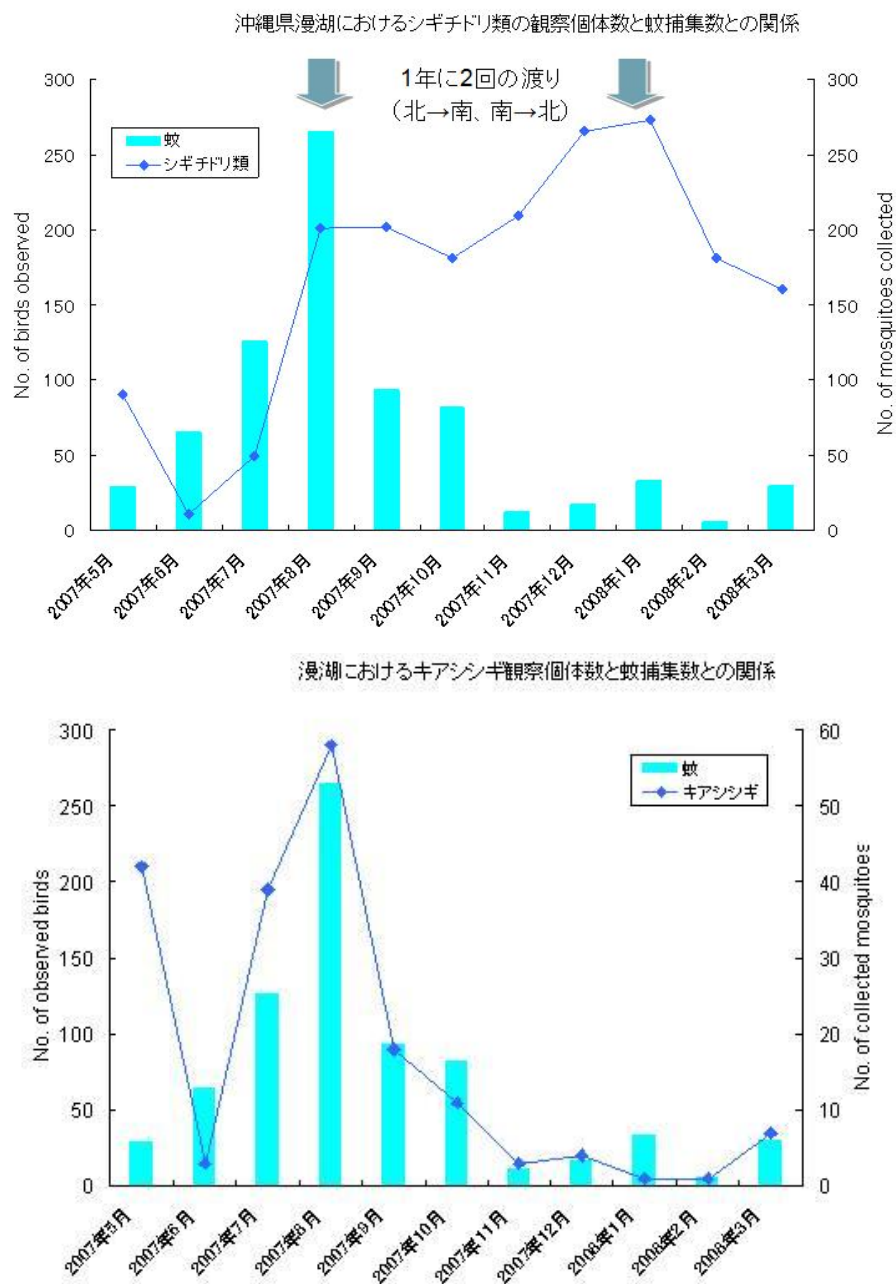


図 8. 漫湖水鳥・湿地センターにおける蚊発生時期とシギ・チドリ類飛来数との関係。シギ・チドリ類の飛来ピークは年に2回（夏と冬）あり、夏の渡り時期は当地における蚊発生時期のピークと重なっている（上）。シギ・チドリの種別でみるとキアシシギの飛来時期が蚊発生時期のピークと重なっていた（下）。

（4）沖縄県国頭村における蚊捕集調査

「やんばる」と呼称される沖縄島北部地域は、ヤンバルクイナ、ノグチゲラ、ホントウアカヒゲなどの希少鳥類が生息し、生物多様性に富んだ地域である。本地域の鳥類に鳥マラリア感染は確認されているが、そのベクターに関する調査はない。そこで本住血原虫のベクターの特定と感染状況把握を目的として調査研究した。

調査は2007年と2008年の7月～8月、沖縄県国頭郡国頭村安田区および同村伊部においてスウィーピング法とドライアイストラップ法を用いて蚊を採集した。最大5匹を1プールとしDNA抽出後、鳥マラリアのmtDNA cyt b 部分領域を標的に nested-PCR をおこなった。陽性サンプルはダイレクトシーケンス法による塩基配列決定後、分子系統解析を行った。

2年間で10属25種4,272頭の蚊が採集された(表3)。各採集地点の種構成を比較すると、集落内と集落外では種構成が異なっていた。集落内ではオオクロヤブカ (*Armigeres (Armigeres) subalbatus*) が63.8%、ヒトスジシマカが33.5%を占め、ついでイエカ亜属に属する種が0.8%を占めていた。集落外ではオオハマハマダラカ (*Anopheles (Anopheles) saperoi*) が63.6%、オキナワヤブカ (*Aedes okinawanus*) が12.2%、ついでリバーシマカ (*St. riversi*) が8.64%を占めていた(図9)。鳥マラリアの陽性反応が認められた種は、オオハマハマダラカ、オオクロヤブカ、ヒトスジシマカ、リバーシマカの4種であった。それぞれの最小感染率(MIR)は0.20%、1.27%、0.58%、1.19%、全体の感染率(MIR)は0.86%であった。

過去にヤンバルクイナから検出された *Haemoproteus* sp. と今回オオクロヤブカから検出された同原虫遺伝子の配列は241塩基中240塩基が一致したことや(図10)、雌オオクロヤブカの捕集率(50.5%)と原虫遺伝子検出率(1.27%)が共に高い数値を示したことから、原虫の感染環にオオクロヤブカが関与している可能性が示唆された。

表3. 国頭村安田区の集落内(A～E)および集落外(F～I)で採集された蚊の種と頭数。

Species	Study site										Total		
	In the settlement					Out of the settlement							
	A	B	C	D	E	Sub Total	F	G	H	I		Sub Total	
<i>Anopheles (Anopheles) saperoi</i>	0	0	0	0	0	0	499	0	0	0	0	499	863
<i>Armigeres (Armigeres) subalbatus</i>	0	1373	1	26	207	1607	59	0	1	0	60	60	87
<i>Coquillettidia (Coquillettidia) crassipes</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	4	4	111
<i>Culex (Culex) bitaeniorhynchus</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	4
<i>Culex (Cux) pipines quinquefasciatus</i>	0	14	0	0	6	20	0	0	0	0	0	0	2
<i>Cx. (Cux.) sitiens</i>	0	4	0	0	1	5	1	0	0	0	1	1	1667
<i>Cx. (Cux.) tritaeniorhynchus</i>	0	0	0	3	2	5	0	0	0	0	0	0	499
<i>Cx. (Culicomyia) pallidothorax</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	3	20
<i>Cx. (Culicomyia) ryukyensis</i>	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	15	15	5
<i>Cx. (Eumelanomyia) brevipalpis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2
<i>Cx. (Eum.) hayashii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	6
<i>Cx. (Lophoceraomyia) infantulus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	15
<i>Cx. (Lop.) rubithorax</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	3
<i>Cx. (Lutzia) halifaxii</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	1
<i>Ochlerotatus (Bruceharrisonius) okinawanus</i>	0	12	0	3	0	15	87	0	0	9	96	96	2
<i>Orthopodomyia anopheloides</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>Stegomyia albopictus</i>	2	334	18	114	375	843	19	0	1	0	20	20	4
<i>St. riversi</i>	0	6	0	0	12	18	65	0	0	4	69	69	1
<i>Tanakaius togoi</i>	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	3
<i>Uranotaenia (Pseudoficalbia) bimaculata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	2
<i>Ur. (Pse.) nivipleura</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	2
<i>Uranotaenia (Uranotaenia) annandalei</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	3	1
<i>Verrallina (Harbachius) nobukonis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	2	1
Female Total	2	1744	19	146	607	2518	763	1	3	17	784	784	3302
<i>An. (Ano.) saperoi</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	420
<i>Ar. (Arm.) subalbatus</i>	0	462	0	8	28	498	1	0	0	0	1	1	8
<i>Cx. (Cux.) bitaeniorhynchus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	7
<i>Cx. (Cul.) pallidothorax</i>	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	5	499
<i>Cx. (Cul.) ryukyensis</i>	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	7	7	2
<i>Cx. (Eum.) hayashii</i>	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	7	7	1
<i>Oc. (Bru.) okinawanus</i>	0	1	0	0	0	1	5	0	0	1	6	6	7
<i>St. albopictus</i>	3	258	7	11	138	417	2	0	1	0	3	3	5
<i>St. riversi</i>	0	3	0	0	2	5	3	0	0	0	3	3	11
<i>Ur. (Pse.) jacksoni</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2
<i>Ur. (Ura.) annandalei</i>	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	11	11	7
<i>Ur. (Ura.) macfarlanei</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	1
Male total	3	724	7	19	168	921	47	0	1	1	49	49	970
Total	5	2468	26	165	775	3439	810	1	4	18	833	833	4272

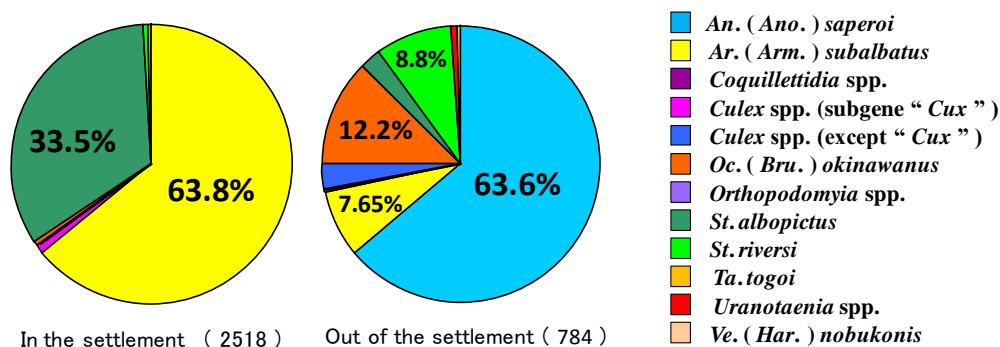
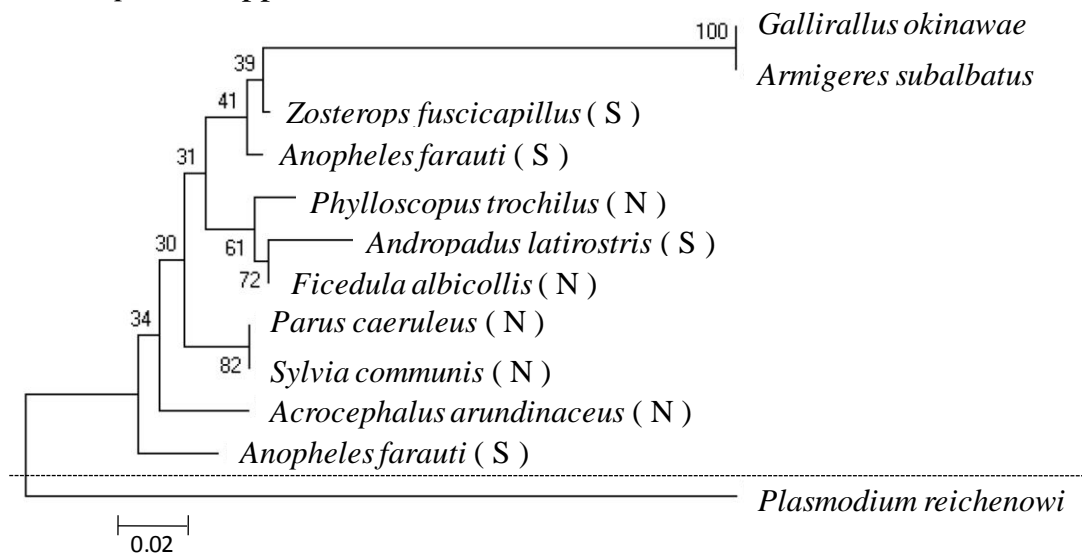


図 9. 沖縄県国頭村安田区の集落内（左）と集落外（右）で採取された蚊種の構成比。集落内ではオオクロヤブカが 63.8%、ヒトスジシマカが 33.5%を占めていた。集落外ではオオハマハマダラカが 63.6%、オキナワヤブカが 12.2%を占めていた

Haemoproteus spp.



Plasmodium spp.

(S) : From South (N) : From North

図 10. オオクロヤブカ体内から得られた鳥マラリア遺伝子断片の塩基配列および DNA データベースの登録配列から作成した分子系統樹。ヤンバルクイナから検出された *Haemoproteus* sp.とオオクロヤブカから検出された同原虫遺伝子の配列は 241 塩基中 240 塩基が一致した。

(5) 南大東島における蚊捕集調査

我々のこれまでの研究から、南大東島に生息する固有亜種のダイトウメジロ、ダイトウヒヨドリおよび島外から飛来したモズやスズメには、鳥マラリア感染が高率に認められることが分かっている。また、本島は、小規模ではあるがシギ・チドリ類に渡り中継地として利用されている。パプアニューギニアからホウロクシギが飛来し、その後和歌山県の吉野川河口へ移動したことが、色別標識個体の調査で確認されている。本島に生息するダイトウメジロなど固有希少鳥類の保全のためにも、シギ・チドリ類が運搬する可能性のある鳥マラリアやウエストナイルウイルスの媒介昆虫を探ることは有意義であると考え、本島での蚊捕集調査を実施した。

島内各所において CDC 型捕虫機、Gravid 型捕虫機、バックパックアスピレータおよび捕虫網を用いたスウィーピング法で蚊を捕集し、簡易型実体顕微鏡（ファーブル、NIKON 社）下で形態学的に種同定を行った。鳥マラリア原虫遺伝子検出のために 1~5 匹をプールして DNA 抽出した。鳥マラリア原虫の mtDNA *cyt b* 遺伝子を標的に nested-PCR を行い、増幅が確認されたサンプルはダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定して、島内に生息する野鳥から検出された鳥マラリア原虫の配列と比較した。

簡易キット（VecTest）を用いたウエストナイルウイルスのスクリーニング試験では、対象とした 318 匹の捕集蚊からウイルス抗原は検出されなかった（表 4）。

表 4. 南大東島に生息する蚊のウエストナイルウイルス保有状況調査

No.	Species	Scientific Name	Sex	Number of capture	Place of Trapping	Date of Trapping	Method of Trapping	Test Results
1	アシマダラヌマカ	<i>Mansonia uniformis</i>	♀	12	湿地	6/7	human bait	陰性
2	オオクロヤブカ	<i>Armigeres subalbatus</i>	♀	6	大東神社	6/7	Gravid	陰性
3	オオクロヤブカ	<i>Armigeres subalbatus</i>	♀	28	大東神社	6/7-6/8	Gravid	陰性
4	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♀	13	大東神社	6/7-6/8	Gravid	陰性
5	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♀	13	大東神社	6/7-6/8	Gravid	陰性
6	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♀	6	大東神社	6/7	human bait	陰性
7	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♀	50	大東神社	6/9	human bait	陰性
8	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♀	50	大東神社	6/9	human bait	陰性
9	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♂	24	大東神社	6/7-6/8	Gravid	陰性
10	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♂	50	大東神社	6/9	human bait	陰性
11	ダイトウシマカ	<i>Aedes daitensis</i>	♂	10	大東神社	6/9	human bait	陰性
12	ネッタイエカ	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	♀	6	奥山寮(コノハズケージ)	6/7	human bait	陰性
13	ネッタイエカ	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	♀	10	ミカン坂+奥山寮(コノハ)	6/7,6/9	CDC+Gravid	陰性
14	ヒトスジシマカ	<i>Aedes albopictus</i>	♀	10	大東神社	6/7	human bait	陰性
15	ヒトスジシマカ	<i>Aedes albopictus</i>	♀	7	大東神社	6/7-6/8	CDC+Gravid	陰性
16	ヒトスジシマカ	<i>Aedes albopictus</i>	♂	23	大東神社+奥山寮(コノハ)	6/7	CDC+sweeping	陰性
			Total	318				

採取された蚊の総数は 1,255 頭であった。同定された 9 種の大半はネッタイエカであった。PCR により、ネッタイエカの 1.2% (12/1,060)、サキジロカクイカの 20% (1/5)、ヒトスジシマカの 1.3% (1/78) およびキンイロヌマカの一種の 2.7% (1/36)、計 15 サンプルに増幅が認められ、全体の最小保有率 (MIR) は 1.2% であった (15/1,255) (表 5)。

また、ヒトスジシマカおよびサキジロカクイカと南大東島のモズから検出された鳥マラリア原虫の塩基配列は 100% 相同であり、ネッタイエカから検出された配列と *P. gallianceum* の塩基配列も 100% 相同であった。さらに、他のネッタイエカ、キンイロヌマカの一から検出された配列も既報の鳥マラリア原虫に近縁であった (図 11)。以上より、ヒトスジシマカ、サキジロカクイカ、ネッタイエカおよびキンイロヌマカの一が南大東島における鳥マラリア原虫のベクターである可能性が示唆された。

現地で鳥類生態を研究している研究者の協力を得て、年間を通して捕集を行った結果からは、ほぼ

周年にわたり蚊の発生が認められており、3月から4月にかけてネッタイエカの発生ピークがあることが分かっている。3月に行った調査では比較的気温が低く、当初期待された捕集数には達しなかったものの、東京港野鳥公園など本州における同時期の蚊の発生状況を考えると、亜熱帯の島嶼における温度環境が蚊の生息にとっていかに好適であるかがよく理解できた。

以上の結果から、高病原性鳥マラリアのみならずウエストナイルウイルス等の節足動物媒介性病原体が渡り鳥によって海外から運ばれて来た場合、南大東島や八重山諸島に生息する蚊の媒介によって島の鳥類相が影響を受ける危険性が推察された。今後は、希少鳥類保全を目的とした渡り鳥によるウエストナイル熱および高病原性鳥マラリアの国外からの侵入をモニタリングし迅速に対応するため、北海道と共に沖縄諸島を南の水際として監視地域に設定し、長期的にサーベイランスを実施する必要があると考えた。

蚊から鳥マラリア原虫が検出されたことにより、島内において節足動物媒介性感染症が留鳥と渡り鳥の間で相互に伝播し得る可能性が示唆された。とくに、気温が高い亜熱帯の島では、年間を通して蚊の発生が認められるため、本州地域よりも効率よく伝播が起こるものと考えられる。近年、地球温暖化による各種環境の悪化が危惧されているが、気温上昇時の野生動物とくに希少種における病原体伝播や感染症拡大を予測する上で、南大東島や沖縄島での鳥マラリアと媒介蚊の研究成果は大いに役立つものと思われた。

吸血源動物の確認や原虫感染および蚊発生の季節的变化など詳細な検討が更に必要であるが、本研究成果から隔離生態系である島嶼における希少鳥類の感染症サーベイランスおよびモニタリング手法について、今後参考となる知見が得られたと考える。

表 5. 南大東島における採集蚊の種類および各種蚊における鳥マラリア PCR 陽性率

蚊の種名	捕集個体数	DNA抽出用 プール数	陽性数	推定陽性率 (%)
ネッタイエカ	1,060	288	12	1.2
ヒトスジシマカ	78	43	1	1.3
アシマダラヌマカ	63	22	0	0
キンイロヌマカの種類	36	20	1	2.7
サキジロカクイカ	5	5	1	20
オオクロヤブカ	4	4	0	0
アカツノフサカ	4	3	0	0
ダイトウシマカ	3	3	0	0
トウゴウヤブカ	2	2	0	0
総計	1,255	390	15	1.2

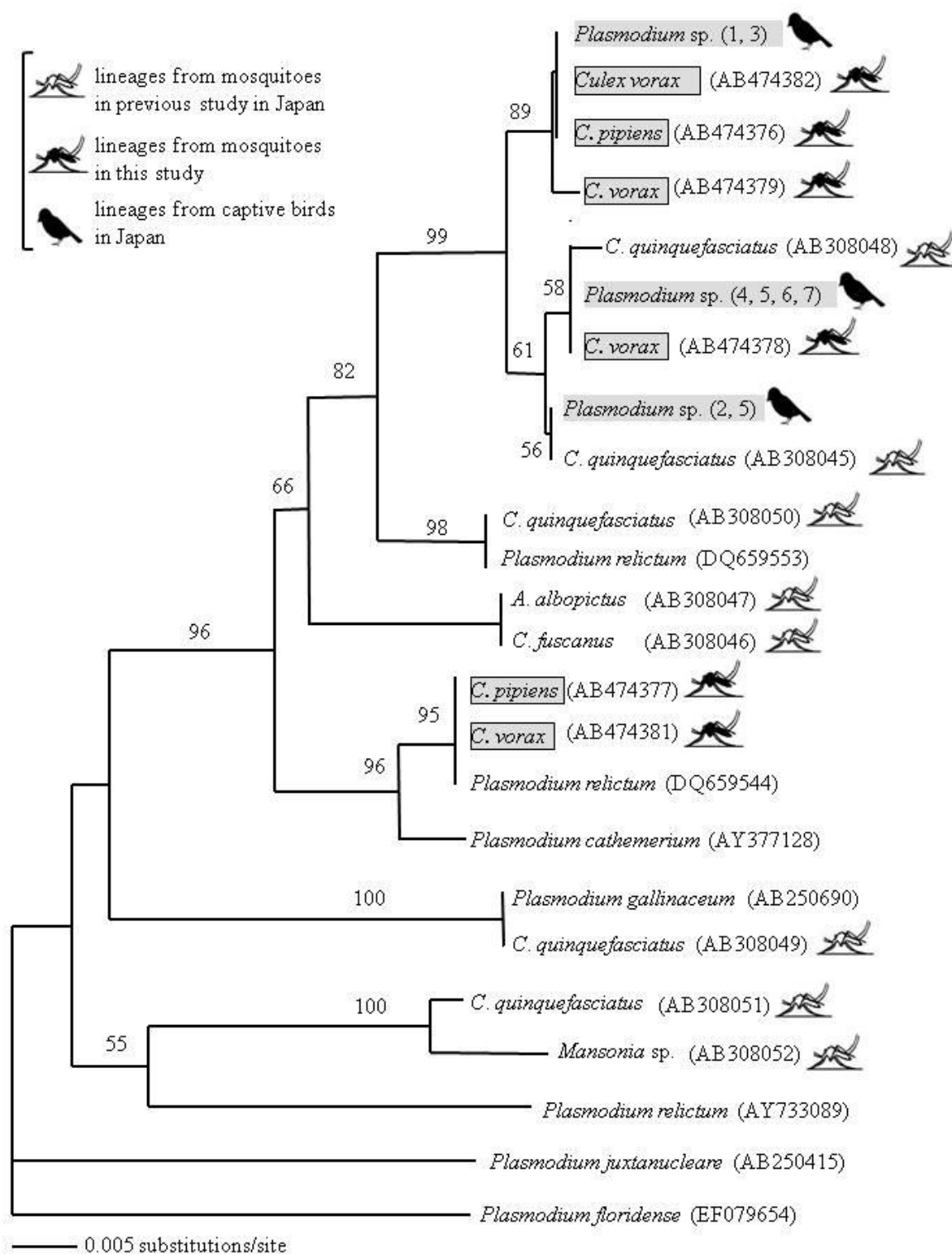


図 11. 南大東島に生息する蚊および鳥類から検出された鳥マラリア原虫の分子系統関係

沖縄県南大東島に生息する鳥類には、鳥マラリア原虫が高率に感染していることが分かっている。そこで、本島の固有鳥種であるダイトウメジロおよび島外から飛来し定着したモズとスズメにそれぞれ認められた鳥マラリア原虫の遺伝子多型を調べ、島内における血液原虫の分子系統ならびに異種間での宿主転換 (Host-Switching) について検討を加えた。2003 年から 2006 年の 4 年間に調査捕獲されたダイトウメジロ (62 個体)、モズ (483 個体)、スズメ (20 個体) から採取し保存されていた血液試料を用いた。鳥マラリア原虫遺伝子の増幅が確認された試料について、ダイレクトシーケンスおよびサブクローニング法により塩基配列を決定し分子系統解析を行った。その結果、ダイトウメジロで 4 種類、モズで 4 種類、スズメで 2 種類の計 10 種類のハプロタイプが確認された (図 12)。ダイトウメジロとスズメに認められたハプロタイプ (mejiro-D と suzume-J) の塩基配列は 100% 相同であった。ダイトウメジロに多く確認されたタイプは、*Haemoproteus* sp. の登録配列と相同性が高かった。以上のことから、南大東島には少なくとも *Plasmodium* 属の原虫 2 系統と *Hemoproteus* 属の 1 系統が存在し、蚊やシラミバエなどの吸血昆虫を介して鳥類間で相互感染している可能性が示唆された。南大東島のような隔離生態系における鳥マラリア原虫、媒介昆虫および宿主鳥類に関する研究は、節足動物媒介性病原体の拡散モデルとして有用であると考えられる。

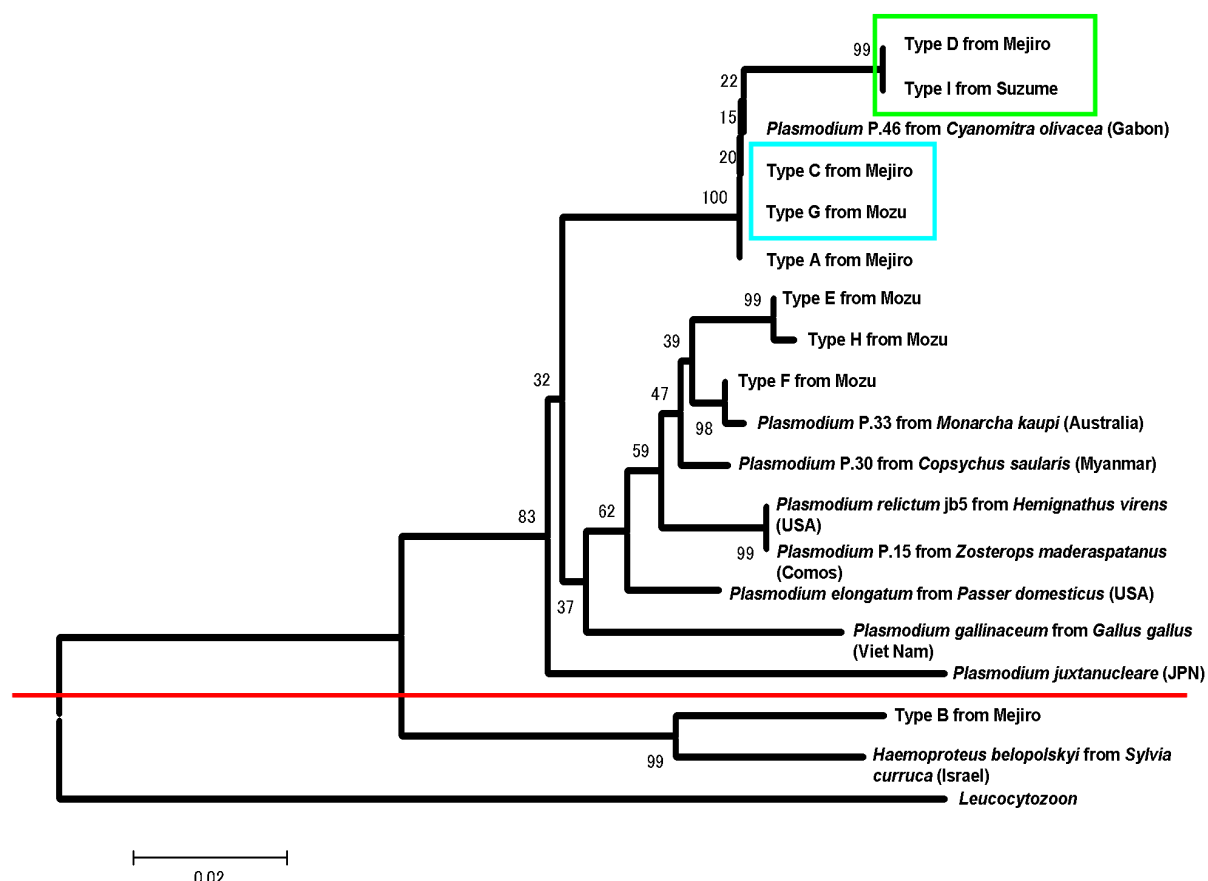


図 12. 沖縄県南大東島に生息する 3 種の鳥類から検出された鳥マラリア原虫遺伝子の分子系統樹。ダイトウメジロで 4 種類、モズで 4 種類、スズメで 2 種類の計 10 種類のハプロタイプが確認された。ダイトウメジロとスズメに認められた原虫遺伝子の塩基配列は 100% 相同であった (黄緑色の枠内)。ダイトウメジロとモズに認められた原虫遺伝子の塩基配列も 100% 相同であった (水色の枠内)。近隣結合法 (Kimura-2-parameter) により作成。ブートストラップ値は 1,000 回。

(6) 石垣島における蚊捕集調査

シギ・チドリ類が渡り中継地として利用する沖縄諸島において、石垣島の湿地は大切な役割を担っている。とくに、アンパルの干潟はシギ・チドリ類の採餌場として重要な湿地となっている。そこで、石垣島でシギ・チドリ類の飛来が確認されている湿地や干潟を中心として、そこに生息する蚊の捕集調査および生息環境調査を行った。

島内における調査地選択のため、現地の鳥類愛好家および保健所職員からシギ・チドリ類の飛来場所を聞き取り、さらに島の海辺および島内の水田地帯を探索した。海岸地帯の干潟は、マングローブ林とかなりの距離があるため、蚊が林内から飛来して干潟で採餌中の鳥を吸血する率は高いと考えられた（図 13）。そこで、シギ・チドリ類が休息もしくは罅として利用していると思われる島内にある元名蔵の水田地帯で蚊の捕集を試みた（図 13）。

蚊捕集には、CDC 型捕虫機、Gravid 型捕虫機を用い、吸血蚊を対象とした捕集には、バックバックアスピレータおよび捕虫網によるスウィーピング法を用いた。調査期間中は雨天もしくは曇天であったが、計 10 種（未同定種を含む）70 匹の蚊が捕集された。内訳は、ヒトスジシマカ 11 匹、オオクロヤブカ 3 匹、ネッタイエカ 9 匹、ニセシロハシエカ 8 匹、オビナシエカ 5 匹、オオツルハマダラカ 1 匹、シナハマダラカ 4 匹、カニアナツノフサカ 26 匹、キンイロヤブカ 1 匹、同定困難種 2 匹であった。また、地域では捕集されたことのなかった *Icosta* 属のシラミバエが CDC 型捕虫機で採集された（図 14）。最近、北米のシラミバエからはウエストナイルウイルスの RNA 遺伝子が検出されており、蚊と同様に本病原微生物の媒介昆虫として、今後、国内においても留意する必要があると思考した。



図 13. 石垣島でシギ・チドリ類が採餌場として利用しているアンパルの干潟（左）および休息もしくは罅として利用している元名蔵の水田（右）。



図 14. 石垣島の水田地帯に設置した CDC 型捕虫機で採取された *Icosta* 属のシラミバエ。鳥マラリアの一種である *Haemoproteus* spp. を媒介する節足動物として知られているが、石垣島でどのような鳥類を吸血しているかについては不明である。北米では、シラミバエからウエストナイルウイルスの RNA が検出されている。

(7) 鳥類寄生の *Trypanosoma* に関する研究

Trypanosoma spp. は、哺乳類を含むほぼすべての脊椎動物に感染が認められる住血原虫である。鳥類の *Trypanosoma* 感染については、*T. gallinarum*、*T. avium*、*T. corvi* などが知られているが、その他の種や系統の詳細については未だ明らかでない。近年、鳥類寄生の *Trypanosoma* spp. に対して分子生物学的手法を用いた系統解析が試みられている。しかし、日本産鳥類寄生の本原虫に関する類似研究は知る限りない。そこで、北海道の野鳥から得られた *Trypanosoma* spp. の分子系統解析を試みた。2007年～2008年に北海道内の動物園で収容された傷病鳥類のうち鏡検で *Trypanosoma* spp. 感染が認められた5種9羽(ハシブトガラス1羽、エゾフクロウ (*Strix uralensis japonica*) 3羽、オオコノハズク (*Otus lempiji*) 1羽、キンメフクロウ (*Aegolius funereus magnus*) 1羽、カケス (*Garrulus glandarius*) 3羽) の末梢血を供試した。血液もしくは継代培養した原虫細胞から DNA 抽出し、*Trypanosoma* の 18S rDNA 部分配列を標的とした PCR を行った。増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し系統解析した。5種6羽の試料で増幅に成功し、その塩基配列 (310bp) を決定した。相同性検索し系統樹作成を行った結果、Trypa. 1 (ハシブトガラス由来)、Trypa. 2 と Trypa. 3 (エゾフクロウ由来)、Trypa. 6 (キンメフクロウ由来)、Trypa. 9 (カケス由来) に関しては、*T. avium* APO1 株および *T. gallinarum* と塩基配列が完全一致していた。また、Trypa. 5 (オオコノハズク由来) に関しては、*T. bennetti* (ハヤブサ (*Falco peregrinus*) に寄生) と完全一致していた。これらの結果から、道内の野鳥には少なくとも2種以上の *Trypanosoma* が感染しており、それらは目レベルで相互感染する可能性が示唆された (図 15)。

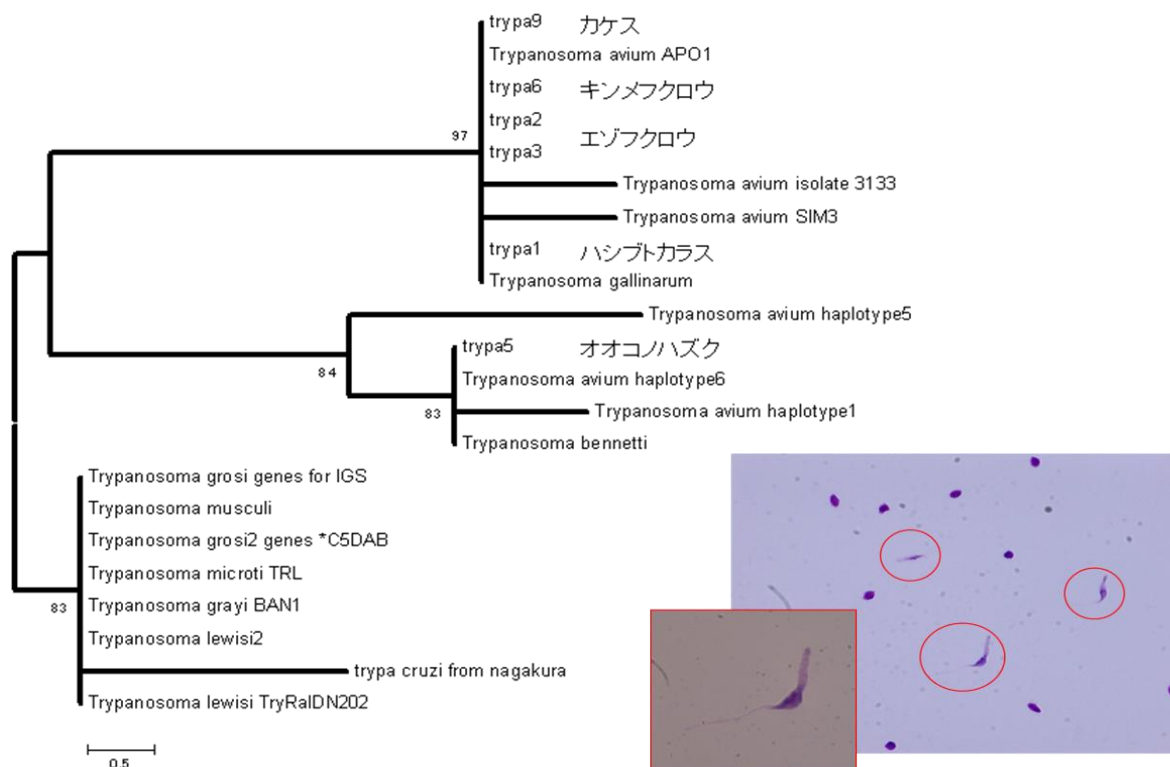


図 15. 北海道の動物園で傷病保護もしくは飼育されている鳥類から検出された *Trypanosoma* の分子系統。

(8) 鳥類寄生の microfilaria (MF) に関する研究

鳥類寄生のフィラリアは、Spirurida 目 Onchocercidae 科に属し、これまでに 16 属約 160 種が報告されている。マイクロフィラリア (MF) 寄生についても海外の鳥類で多く観察されている。国内産鳥類においても MF 感染についていくつかの報告がある。しかし、鳥類のフィラリアおよび MF の感染状況、感染環、媒介昆虫、系統分類などについては未だ不明な点が多い。

そこで、傷病保護鳥における MF の感染状況、MF 虫体の形態的特徴および分子系統を調べ、国内における鳥類寄生フィラリアの詳細を明らかにすることを目的とした。

2007 年 4 月から 2009 年 3 月の 2 年間に、神奈川県自然保全センター（神奈川県伊勢原市）に保護収容された野鳥 250 個体（15 目 23 科 50 種）を対象とした。採血は、搬入されてから 20 日以内（平均 6 日）に行った。

被検血液をヘマトクリット管に採取し、12,000rpm で 5 分間遠心分離後、バフィーコート部を低倍率の光学顕微鏡下（ $\times 200$ ）で観察した。また、薄層血液塗抹標本を作製し、ヘマカラー（MERCK 社）で染色した後、中倍率（ $\times 400$ ）で 25 視野以上を鏡検した。以上の 2 法で MF が観察された場合を陽性とした。

オオコノハズクに濃厚感染していた MF を精査した。血液塗抹標本上の虫体形態を光学顕微鏡下（ $\times 1,000$ 倍）で観察し、画像解析ソフト（Winroof®、三谷商事）を用いて、神経輪、排泄孔、排泄細胞、生殖細胞、肛門孔および最終核の体長に対する頭端からの相対距離を求めた。また、アセトン集虫法で伸展させた湿性標本と乾燥標本のそれぞれで体長と体幅を測定した。なお、本個体は 2008 年 11 月 18 日に相模原市松ヶ枝で保護され、当センターに持ち込まれた。保護時の体重は 124.6g で、やや削瘦していた。目立った外傷はなかったが 11 月 20 日に死亡したため、死亡直後に心臓から採取した採取した血液を供試した。

検出個体の血液または肝臓からフェノール・クロロフォルム法で DNA 抽出し、線虫類の mtDNA cytochrome CO1 領域（688bp）を標的とした PCR を行った。電気泳動で遺伝子の増幅が確認された 3 種 4 個体からの試料について、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。これらの遺伝子と相同な配列をデータベース検索し、それらに基づいて分子系統解析を行った。近隣結合法（Kimura-2-parameter）で分子系統樹を作成した。ブートストラップは 1,000 回とした。

3 属 3 科 3 種 5 個体（全体の 2.0%）から MF が検出された（図 16）。幼鳥に比べ成鳥の検出率が有意に高かった（ $P < 0.01$ ）。検出された時期は 11 月～3 月であった。2007 年度と 2008 年度の検出率の間に有意差は認められなかった。

オオコノハズクから検出された MF は被鞘しておらず、頭端は幅広く平坦で、尾部は肛門部より後方で徐々に細くなり、先端がやや鈍円に終わっていた。アセトン集虫法による湿層標本での体長（平均±標準偏差）は $233.9 \pm 7.99 \mu\text{m}$ 、体幅は $8.3 \pm 0.96 \mu\text{m}$ で、乾燥標本では体長 $196.4 \pm 6.28 \mu\text{m}$ 、体幅 $5.8 \pm 0.63 \mu\text{m}$ であった（図 17）。血液塗抹標本観察では、*Haemoproteus* sp. と *Leucocytozoon* sp. の重複感染が認められた。

PCR 増幅された 549bp の塩基配列を決定し相互比較した。本研究で鳥類から検出された MF は、哺乳類寄生のものとは異なるクラスターに位置した。オオコノハズクから得られた 2 検体の塩基配列は相同で、その一致率は 99.6% であった（図 18）。

海外における鳥類からの MF 検出率は、高いものでコロンビアでの 48.2%、低いものではカメルーンでの 1% などが報告されており、地域によって検出率が異なっている。国内においては、兵庫県下の

鳥類において 0.29%の検出率が報告されているが (Murata, 2002)、これに比べると今回の結果は有意に高かった ($P<0.05$)。過去に神奈川県と同所で行われた調査では 2.42%であり (萩原ら, 2005)、今回の結果との間に有意差は認められなかった。国内でも地域もしくは調査時期によって差のあることが推察される。

MF陽性個体情報

目	科	種	学名	個体No.	保護地域	搬入日
スズメ目	ツグミ科	ツグミ	<i>Turdus naumanni</i>	080651	秦野市	2008/11/11
スズメ目	ツグミ科	ツグミ	<i>Turdus naumanni</i>	090062	伊勢原市	2009/3/6
フクロウ目	フクロウ科	オオコノハズク	<i>Otus lempiji</i>	080660	相模原市	2008/11/18
フクロウ目	フクロウ科	オオコノハズク	<i>Otus lempiji</i>	090009	厚木市	2009/1/7
キジ目	キジ科	キジ	<i>Phasianus colchicus</i>	080079	愛川町	2008/3/10

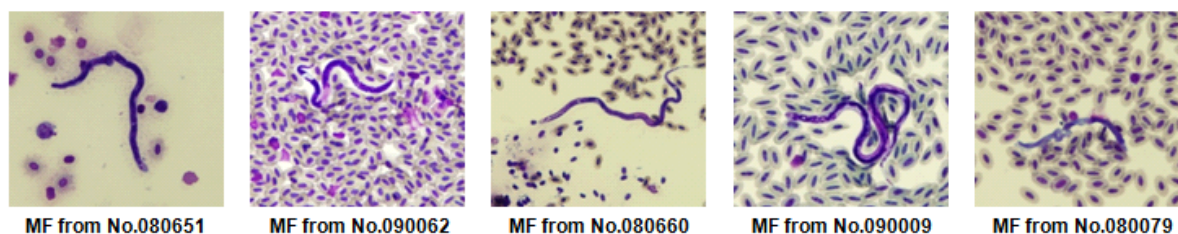


図 16. 3 属 3 科 3 種 5 個体 (全体の 2.0%) の鳥類から microfilaria が検出された。幼鳥に比べ成鳥の検出率が有意に高かった ($P<0.01$)。検出された時期は 11 月～3 月であった。2007 年度と 2008 年度の検出率の間に有意差は認められなかった。

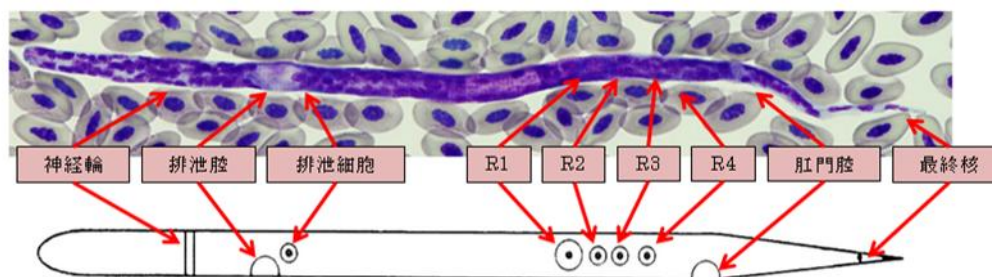


図 17. オオコノハズクから検出されたマイクロフィラリア (MF)。MF は被鞘しておらず、頭端は幅広く平坦で、尾部は肛門部より後方で徐々に細くなり、先端がやや鈍円に終わっていた。アセトン集虫法による湿層標本での体長 (平均±標準偏差) は $233.9 \pm 7.99 \mu\text{m}$ 、体幅は $8.3 \pm 0.96 \mu\text{m}$ で、乾燥標本では体長 $196.4 \pm 6.28 \mu\text{m}$ 、体幅 $5.8 \pm 0.63 \mu\text{m}$ であった。血液塗抹標本観察の結果、オオコノハズクの血中には MF の他に *Leucocytozoon danilewskyi* と *Haemoproteus noctuae* との重複感染が認められた。

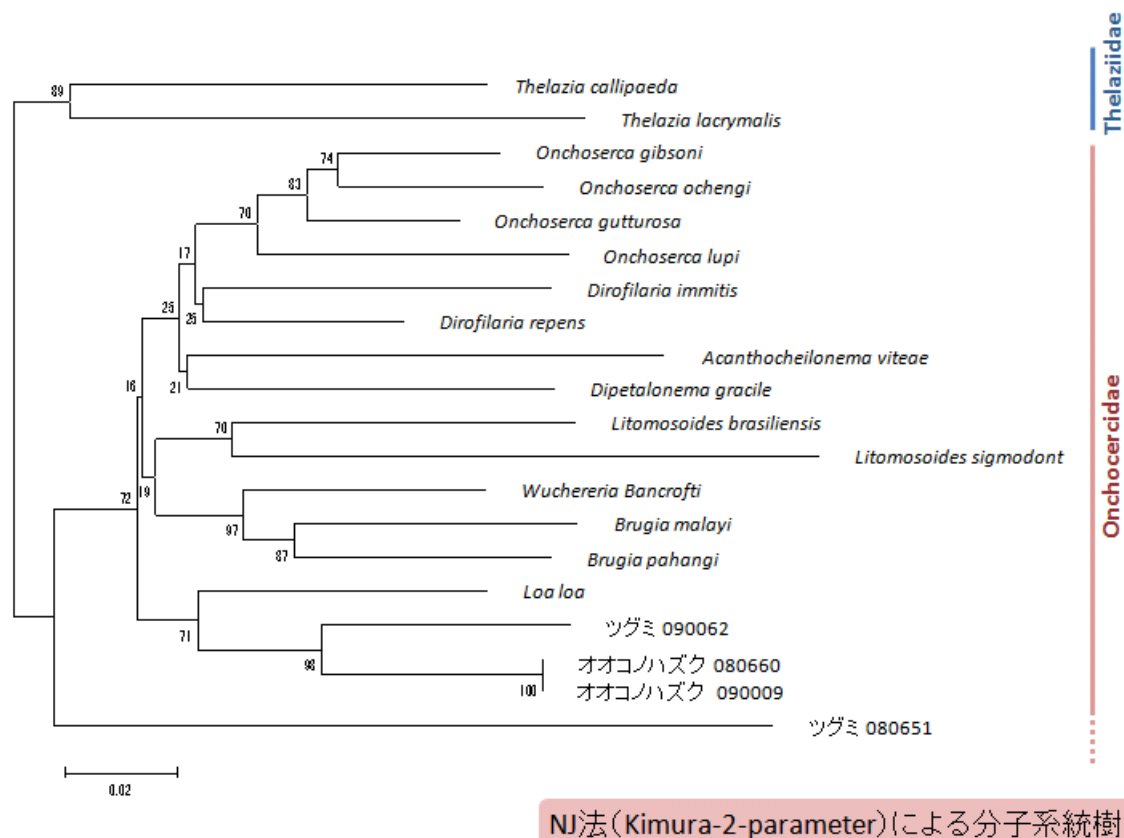


図 18. 鳥類寄生 microfilaria の mtDNA CO1 遺伝子 (549 bp) の塩基配列と DNA データベース登録の配列情報を用いて作成した分子系統樹。今回解析した鳥類の MF 遺伝子配列は、哺乳類寄生のものとは異なるクラスターに位置した。オオコノハズクから得られた 2 検体の MF の塩基配列は相同で、その一致率は 99.6%であった。

フィラリアは、ハエ目のブユ科、カ科およびヌカカ科ならびにシラミ目の吸血性節足動物によって媒介されると考えられている。そのため、昆虫が活発に活動する夏季に MF の検出率が高まることが予想されたが、今回の調査における陽性検体は全て冬から春にかけてのものであった。

分子系統解析では、ツグミ (*Turdus naumanni*) から検出された MF (No. 080651) は他の 3 検体とは異なるクラスターに位置していた。この MF は形態的にも他と異なっており、別属である可能性が高い。

今回、オオコノハズクより検出した MF は、坂本ら (1981) がハシブトガラスから検出したものと比べ小型で、萩原ら (2005) がカラスバト (*Columba janthina*) から検出したものとは形態的に異なっていた。しかし、MF を形態から種同定することは難しく、宿主から同時検出された成虫を供試すべきである。とはいえ MF と成虫が同時に検出できる機会はきわめて稀であるため、血液試料を用いた分子生物学的解析は種同定の参考になる。さらに宿主-媒介昆虫-寄生虫の相互関係を理解する上でも有用である。

今後は、CO1 以外の領域を用いたより詳細な系統解析や感染環の解明、媒介節足動物の特定および病原性の解明が課題となろう。

(9) 動物飼育施設における鳥マラリア保有状況調査

動物園等の飼育下鳥類に感染が見られる鳥マラリア原虫のベクターが不明であったため、動物飼育施設内で蚊を採集し、PCRにより原虫の遺伝子検出を試みた。

よこはま動物園ズーラシア(神奈川県横浜市都筑区)において捕集された11種の蚊1,361個体から、169のDNAサンプルを得た。そのうち8サンプルがPCR陽性であり(最小陽性率:0.6%) (表6)、塩基配列を比較した結果、園内で感染が確認された鳥類寄生の鳥マラリア原虫と100%相同の系統が認められた。このことから、これらの蚊種が本症を媒介している可能性が強く示唆された。

表6. 関東圏の動物園で捕集された蚊の種類、頭数およびPCR法による鳥マラリア原虫遺伝子の検出率(陽性率)。

蚊の種名	頭数	DNA抽出用 プール数	陽性数	推定陽性率 (%)
ヒトスジシマカ	330	40	0	0
ヤマトヤブカ	104	19	0	0
オオクロヤブカ	39	13	0	0
カラツイエカ	11	5	0	0
アカイエカ群	763	63	4	0.5
ヤマトクシヒゲカ	12	3	0	0
コガタイエカ	7	4	0	0
クシヒゲカの一種	6	3	0	0
トラフカクイカ	78	12	4	5.1
キンバラナガハシカ	10	6	0	0
フタクロホシチビカ	1	1	0	0
総計	1,361	169	8	0.6

(10) 高山帯における吸血昆虫の血液原虫遺伝子保有

鳥マラリア原虫と同様に、吸血昆虫によって媒介されるロイコチトゾーン属原虫は、国の特別天然記念物であり準絶滅危惧種にも指定されているニホンライチョウ (*Lagopus mutus japonicus*) において感染が確認されている (Hagihara *et al.*, 2004)。その原虫の種は *Leucocytozoon lovati* と同定されており、南北アルプスに生息するニホンライチョウにおいて高率に感染していることが分かっている (Murata *et al.*, 2007)。

しかし、ベクターとなる吸血昆虫種が不明であったため、ニホンライチョウが生息する日本アルプス山系の朝日岳、爺ヶ岳、立山室堂平、乗鞍岳、蝶ヶ岳、北岳および仙丈ヶ岳において、捕虫網によるスリーピングによりブユを採集し形態学的に分類した後、ブユ虫体内容物からDNA抽出を行い、ロイコチトゾーンのミトコンドリアゲノム *cyt b* 遺伝子部分配列を標的としたPCR増幅を試みた (Sato *et al.*, 2007)。次いで増幅産物の塩基配列を決定し、他の鳥類寄生原虫との系統関係を検討した。

その結果、ライチョウが生息する山系で採集した各種ブユから、*L. lovati* と同一の配列を示すDNA

断片が増幅され、陽性率は 1.6% (8/490) であった (表 7)。PCR 陽性個体の調査山岳別内訳は、立山室堂平のアシマダラブユ (n=1) およびウチダツノマユブユ (n=2)、乗鞍岳のアシマダラブユ (n=2)、蝶ヶ岳のオオブユ (n=2) およびアシマダラブユ (n=1) の 4 種であった。

さらに、一部のブユ (蝶ヶ岳) について、虫体内容物から抽出した DNA を用いて鳥類のミトコンドリア *cyt b* 遺伝子部分配列を標的とした nested PCR を行ったところ、解析したブユ 144 検体中 34 検体 (23.6%) で増幅が見られた。増幅配列は 5 つの遺伝子型に分類され、1 つはニホンライチョウと完全に一致し、他もすべてライチョウ以外の鳥類 (キジ目と推定) と相同性が高かった。よって、これらのブユが各種鳥類を吸血していることが示唆された。

日本のブユにおけるロイコチトゾーン原虫の発育については不明であるが、各種ブユがベクターとなっていると考えられた。以上のことから、今回検査した各種ブユが *L. lovati* のベクターである可能性が示唆され、本手法によりロイコチトゾーン感染における病原体保有状況をより詳細に把握することがベクター昆虫においても可能になると考えた。

表 7. ライチョウ生息域で採集されたブユの種類と個体数および原虫保有状況.

種名	捕集個体数	陽性数	陽性率(%)
アシマダラブユ	359	4	1.1
オオブユ	59	2	3.4
ウチダツノマユブユ	39	2	5.1
キアシオオブユ	13	0	0
クロオオブユ	10	0	0
ツバメハルブユ	10	0	0
総計	490	8	1.6

(11) タイ王国における蚊捕集調査

シギ・チドリ類の東南アジアにおける越冬地の一角であるタイ王国中部に位置するペチャブリの干潟において蚊の捕集を試み、併せてシギ・チドリ類の生息状況調査を行った。当地では、北海道のコムケ湖で標識されたトウネンの飛来が観察されており (山階鳥類研究所標識研究室HP)、本種が東南アジアから日本へ渡りを行っていることは確実である。このことから、トウネンを含むシギ・チドリ類が東南アジアに存在する各種病原体を、春の渡り時期に日本へ持ち込むことは考えられ得る。国内の希少鳥類へ影響を与える節足動物媒介性病原体の感染ルート解明とリスク評価を行う上で、東南アジア地域におけるシギ・チドリ類の越冬地を調査することは重要と考え、本調査の実施を計画した。

調査対象地選択のため、現地の鳥類専門家からシギ・チドリ類の飛来状況を聞き取り、さらにタイ王国中部の海岸地域を車で探索して、村長、役場職員、漁民などの付近住民から当該鳥類に関する情報を収集した。その結果、ロイヤルプロジェクト (The Royal Project) 地区のひとつであるペチャブリのランパックビアおよびドンホイロードを調査地に選定し (図 19)、蚊の捕集および生息鳥類調査を

実施した。両地域共、干潟はマングローブ林に接しているため、鳥が夜間に埒もしくは休息場として利用する林内において捕集を行った。

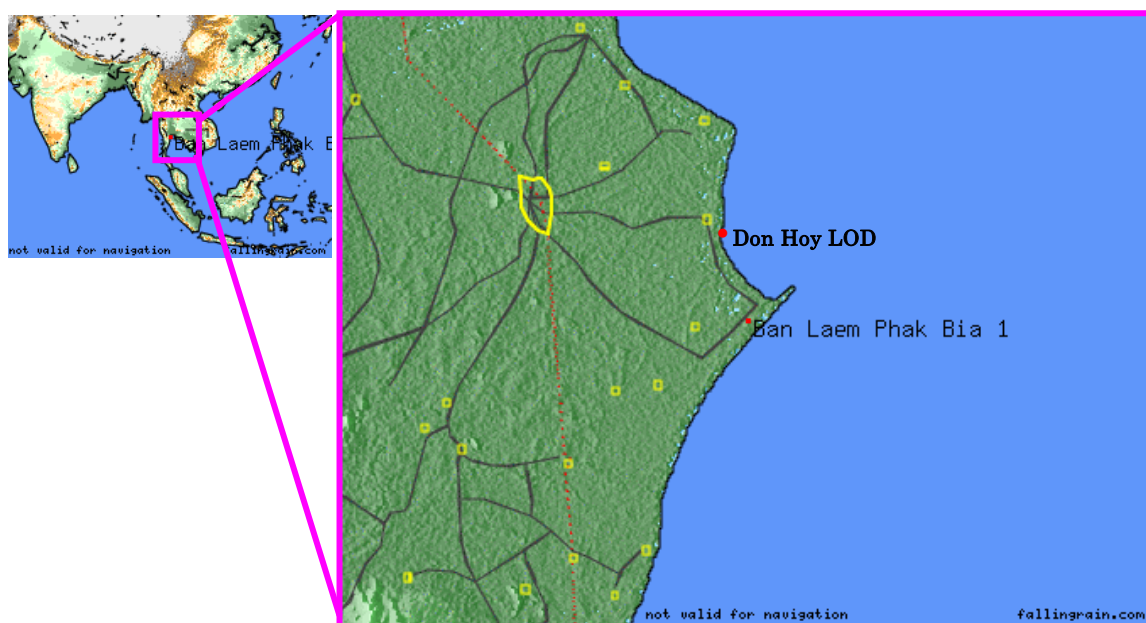


図 19. タイ王国ペチャブuriにおける 2ヶ所の調査地（ランパックビアおよびドンホイロッド）

蚊の捕集は、CDC 型捕虫機 10 台を用いて行った。現地においてドライアイスの入手が困難であったため、イーストと砂糖の混合液から生じる CO₂ を誘引剤とした。捕虫網を用いたスウィーピングも行った。また、現地にあるマラリアセンター（Vector Born Disease Control Office in Phetchaburi Province）に協力を仰ぎ、当所職員 4 名によるヒト囷法で 3 日間にわたり夜間の蚊捕集を実施した。

捕集された蚊の同定は、現地においてチェンマイ大学のプラディア教授および国立感染症研究所昆虫医学部の津田良夫室長の協力を得て行った。ランパックビアで捕集された蚊は 5 種 1,557 匹、ドンホイロッドで捕集された蚊は 3 種 704 匹、計 5 種 2,261 匹であった。各調査地における捕集蚊の種類および捕集数を表に示す（表 8, 9）。本結果からマングローブ林内の蚊相は比較的単純であり、ヨツボシイエカ（*Culex sitiens*）が優先種であると考えられた。今後、ヨツボシイエカがどのような鳥を吸血源とし、どのような病原体を媒介する可能性を有するのかを調査する必要がある。

蚊は同定後、宿舎の冷蔵庫内で保存し、帰国時にドライアイスで冷凍状態にして持ち帰った。蚊体内からの鳥マラリア遺伝子断片の検出および解析を行ったところ、ヨツボシイエカから増幅産物が得られた。その塩基配列は南大東島のネッタイエカおよび東京港野鳥公園のアカイエカの体内から得られた鳥マラリア遺伝子断片の配列と類似しており、同じクラスターに分類された（図 20）。

表 8. タイ王国ランパックピアにおける捕集蚊の種と個体数

No.	蚊の種名	学名	捕集個体数
1	ヨツボシイエカ	<i>Culex sitiens</i>	1,472
2	ニセシロハシイエカ	<i>Culex vishnui</i>	42
3	キンイロヤブカ	<i>Aedes vexans</i>	40
4	ネッタイエカ	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1
5	和名なし	<i>Culex gelidius</i>	2
計			1,557

表 9. タイ王国ドンホイロッドにおける捕集蚊の種と個体数

No.	蚊の種名	学名	捕集個体数
1	ヨツボシイエカ	<i>Culex sitiens</i>	589
2	キンイロヤブカ	<i>Aedes vexans</i>	16
3	ネッタイエカ	<i>Culex quinquefasciatus</i>	99
計			704

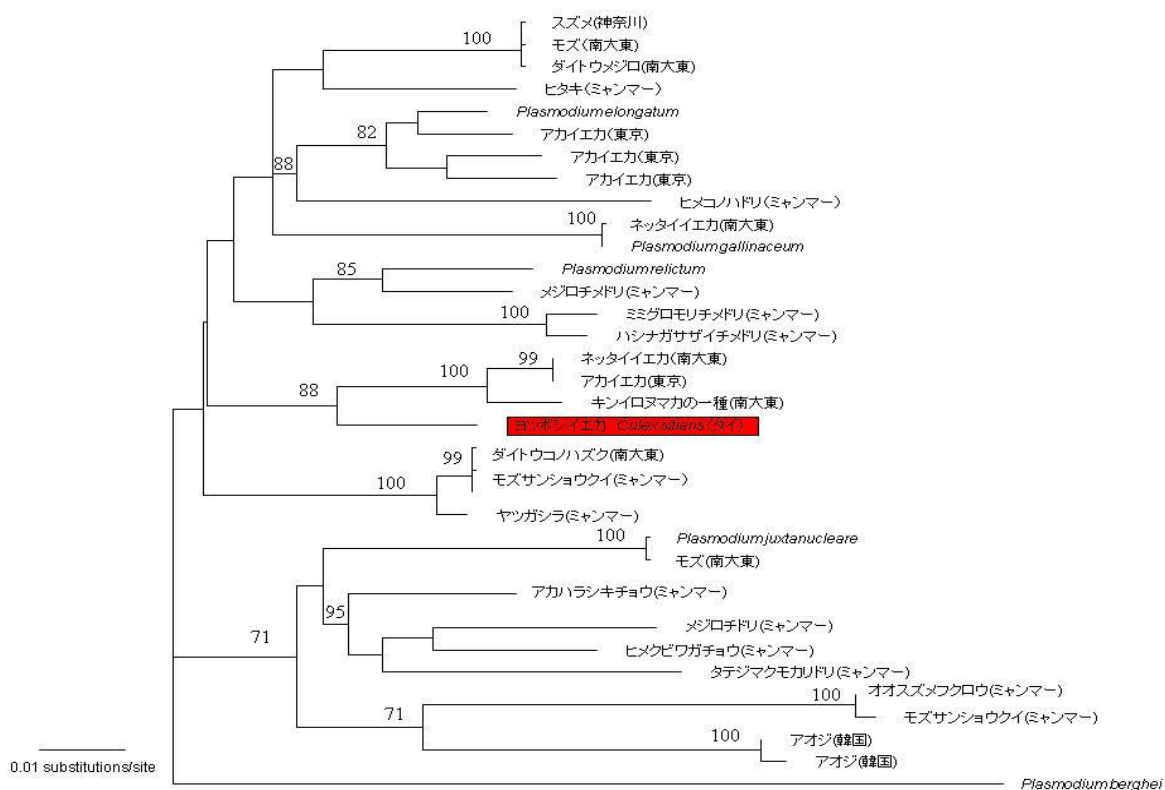


図 20. タイ王国で採集された蚊体内からの鳥マラリア遺伝子断片配列および DNA データベース登録の配列情報を用いて作成した分子系統樹 (NJ 法)。ヨツボシイエカから得られた増幅遺伝子の塩基配列は、南大東島のネッタイエカおよび東京港野鳥公園のアカイエカの体内から得られた鳥マラリア遺伝子断片の配列と類似しており、同じクラスターに分類された。

ランパックピアおよびドンホイロッドで蚊捕集を行った期間中の天候は穏やかで、気温も熱帯地域としては低く感じられたが、温度データロガーで記録された気温は最低気温が 21℃、最高気温は 31℃、

平均気温は 25°C で、蚊の周年発生が可能な地域であると考えた。

ランパックビアおよびドンホイロッドで主に観察されたシギ・チドリ類は、セイタカシギ、キアシシギ、イソシギ、アカアシシギ、キアシシギ、クサシギ、コチドリであった。中でもセイタカシギは頻りに観察された。他の鳥類としてはコサギ、ダイサギ、アオサギ、チュウゴクサギ、カワウ、シロハラクイナ、シロガシラトビ、アオショウビン、インドトサカゲリ、ツバメ等が観察された。とくにツバメの生息密度は高く、日本脳炎等の節足動物媒介性病原体を運搬する渡り鳥としての役割に留意する必要がある。

(12) ロシアにおける鳥類血液原虫調査

ロシア連邦ハバロフスク地方のボロン自然保護区は広大な湿地で構成され、多くの鳥類が生息し一部は日本へも飛来している。初夏には、シギ・チドリ類のみならず日本では絶滅したコウノトリが繁殖している。ボロン自然保護区では鳥類保全を目的として毎年コウノトリの捕獲調査が行われており、今回はその調査に同行し試料採取を行った。

自然保護区内に点在するコウノトリの巣 4 箇所から巣立ち前の幼鳥（約 40 日齢）16 羽を捕獲し、計測および健康診断の際に血液を採取した。調査中に巣周辺および湿地 4 箇所においてスウィーピング法で蚊およびブユを採集した。採集された計 1,305 匹の吸血昆虫のうち蚊 650 匹を簡易キット

(VecTest) を用いた WNV 検査に供した。結果はすべて陰性であった。検査に用いた蚊の溶液を国内に持ち帰り RT-PCR 法および LAMP 法で WNV 保有の確認試験を行ったが、同様の結果であった。コウノトリの血液は現地で塗抹固定標本を作製すると共にエタノール液に浸漬し保存した。これらの試料は、ワシントン条約による許可が下りた時点で国内へ輸送し、大学研究室で検査に供した。

顕微鏡下で塗抹染色標本を観察したところ 16 羽の幼鳥すべてに *Leucocytozoon* sp. 感染が認められた (図 21)。血液細胞 5,000 個中の感染細胞率 (パラシテミア) は 0.19–4.61% であった。原虫形態は、ヨーロッパコウノトリ (*Ciconia ciconia*) から検出されている *L. leboeufi* と類似していたが、マクロガメートサイトの計測値間に有意な差が認められた ($P < 0.01$)。一方、コウノトリ目のサギ科鳥類から検出されている *L. nycticoraxi* とは、形態的にも計測値にも大きな違いは認められなかった。

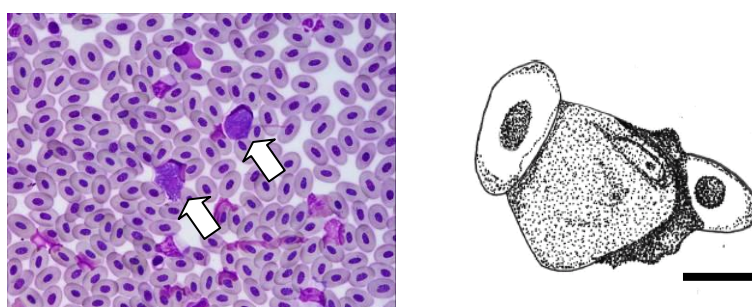


図 21. コウノトリから検出された *Leucocytozoon* sp. の顕微鏡写真 (左白矢印) と描画図 (右)。原虫形態は、ヨーロッパコウノトリ (*Ciconia ciconia*) から検出されている *L. leboeufi* と類似していた。パラシテミアは 0.19–4.61%。Bar = 10 μ m。

Leucocytozoon sp. の mtDNA *cyt b* 部分領域の塩基配列をホモロジー検索したところ、キツツキ目のアリスイから分離された *L. squamatus* とワシタカ目のヨーロッパチュウヒから分離された *Leucocytozoon* sp. と 100% 相同であった (図 22)。本原虫と *L. squamatus* との形態は近似しており、短径の計測値間に

有意差は認められなかった。

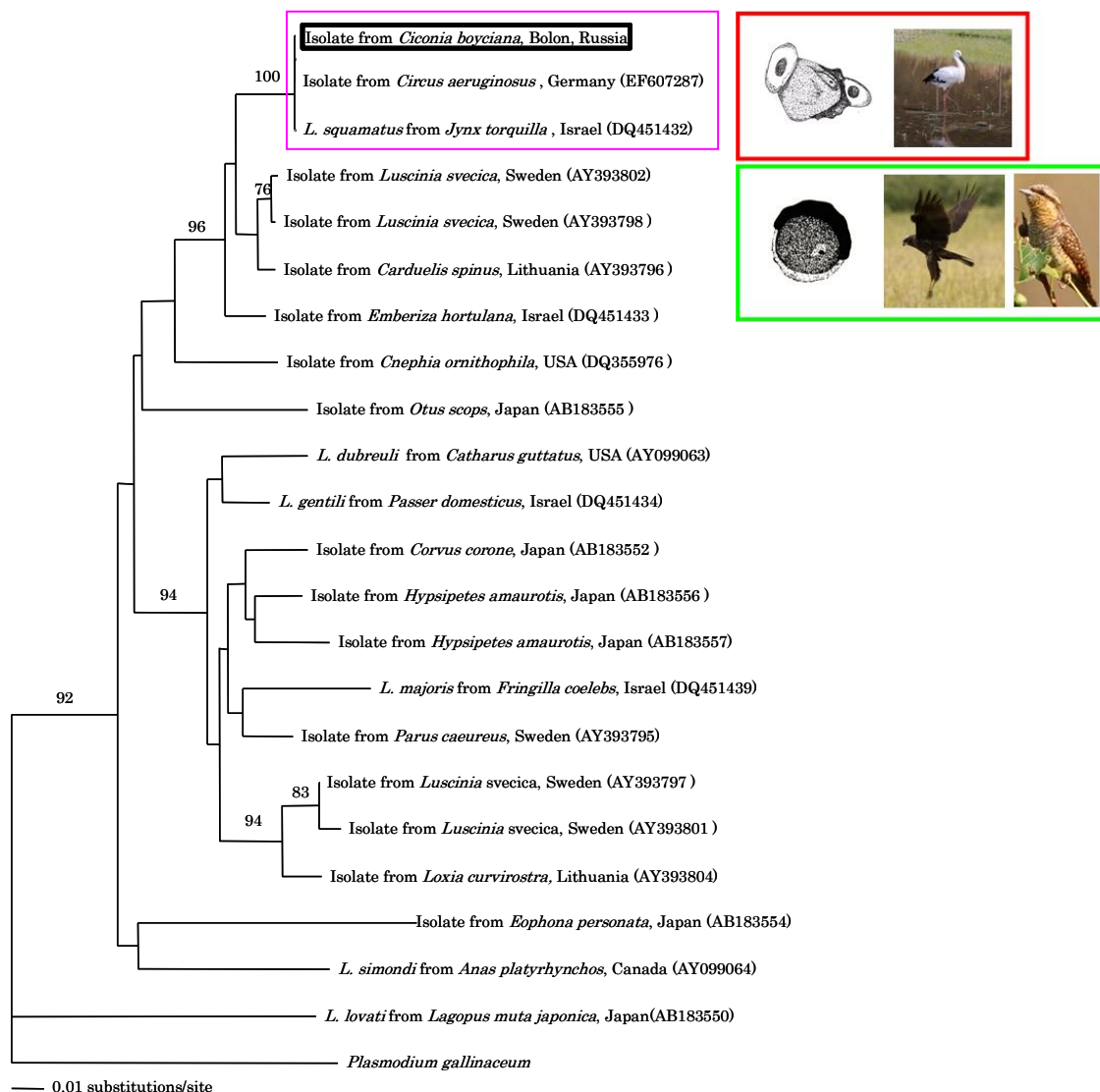


図 22. コウノトリから検出された *Leucocytozoon* sp. の分子系統。mtDNA *cyt b* 部分領域の塩基配列は、キツツキ目のアリスイから分離された *L. squamatus* とワシタカ目のヨーロッパチュウヒから分離された *Leucocytozoon* sp. と 100% 相同であった (紫色の枠内)。近隣結合法 (Kimura-2-parameter) により作成。ブートストラップ値は 1,000 回。

Leucocytozoon spp. は、鳥類を中間宿主とする血液原虫で、終宿主はブユやヌカカ等の節足動物である。現在まで 60 種以上のロイコチトゾーン属原虫が、南極以外の動物地理区に生息する 14 目 31 科 145 種の鳥類から検出されている。このうち、コウノトリ目の鳥類に感染が確認されているのは、*L. nycticoraxi* と *L. leboeufi* の 2 種である。近年までロイコチトゾーン属原虫の分類は、主に被感染血球細胞の測定値、ガメトサイトの形態や大きさなどの形態的特徴および宿主鳥類や媒介昆虫を指標として行われてきた。とくに宿主特異性を重視し、鳥類の属もしくは科毎に新種記載される傾向があった。しかし、多くの血液原虫で分子系統学的解析と形態学的解析による分類が一致しないことが分かって

きている。コウノトリ目に感染する *Leucocytozoon* も、これまで考えられていたような宿主特異性をもたず、吸血昆虫を介して宿主転換している可能性がある。このことは、吸血昆虫によって原虫以外の節足動物媒介性病原体がコウノトリと他の鳥類間で感染することを示唆している。兵庫県豊岡市ではコウノトリの野生復帰が順調に進んでいる。また新潟県ではトキに対して同様の計画がある。このような飼育下繁殖の希少鳥類を野外へ放逐する際には、国外から飛来する鳥類に随伴する節足動物媒介性病原体の感染にも留意する必要があることを本結果は示している。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 病原体検出に係る標的ゲノムの検索

鳥マラリア原虫を検出する際には血液塗沫観察による直接的手法が **gold standard** であるが、PCR による原虫遺伝子の検出も有用である。PCR により検体から病原体の検出および同定を行う際に、ゲノム情報が蓄積されていることが必要であるが、特に鳥マラリア原虫については比較的用いる塩基配列情報が不足していることに加え、ゲノム構造自体がまだ明らかにされていない。そこで本小課題研究では、鳥マラリア原虫 2 種 (*Plasmodium gallinaceum* および *P. juxtannucleare*) についてミトコンドリアゲノム構造の解明を試みた。

原虫から抽出した DNA を用い、既に明らかになっているヒトマラリア原虫などで相同性の高い領域から作成したプライマーを用いて PCR および塩基配列を決定し、プライマーウォーキングによりミトコンドリアの全ゲノム構造を推定した。その結果、*P. gallinaceum* および *P. juxtannucleare* のミトコンドリアゲノムの全長は各々、6,002bp および 6,014bp であり、CO1、CO3 および *cyt b* の 3 種の遺伝子と 15 個の rRNA が認められ、これらの遺伝子の種類や配置は、他のマラリア原虫と同様であった。さらに、いくつかのマラリア原虫のミトコンドリアゲノムに見られるタンデムリピート構造が同様に認められた。

今回、鳥マラリア原虫において、初めてミトコンドリアゲノムの全塩基配列およびゲノム構造が明らかにされ、ゲノムの構成が宿主動物種を問わず共通に保存されていることが示唆された。今後は、ミトコンドリアゲノム全塩基配列を用いたマラリア原虫の遺伝的変異を的確に反映した分子系統解析が可能になると考えられる。すなわち、野鳥やベクター昆虫から検出された原虫の遺伝的背景を解析することにより、近縁関係が明らかになり、伝播ルートの解明に役立つと思われる。

2) 血液原虫モニタリング手法の標準化

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、本法による本原虫検出法の標準化を行った。

渡り鳥であるシギ・チドリ類と短期間ではあれ湿地や干潟において同所的に生息する在来鳥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唆した。このことは、WNV 等の節足動物媒介性病原体が国内侵入すれば、鳥嗜好性のある吸血昆虫を介して感染症拡大が起こることを意味している。

ハワイ諸島の固有鳥類を絶滅の危機に陥れている *Plasmodium relictum* のような一部の種を除いて、多くの血液原虫は宿主特異性が強く種や科の壁を容易に越えないと考えられていた。とくに *Leucocytozoon* spp. は宿主特異性が分類の基礎とされており、種もしくは科毎に新種記載される傾向があった。しかし、ロシア産コウノトリから検出された *Leucocytozoon* sp. の分子生物学的解析により、

本原虫が科のみならず目レベルで感染していることが本研究で示唆された。これは原虫分類研究の展開における新たな布石となる成果である。

関東圏の湿地における蚊の生息調査を実施し、シギ・チドリ類の飛来数との関係を比較検討した結果から、関東圏では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。さらに関東圏の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、当地において蚊を介した血液原虫感染が鳥類間で生じていることが明らかとなった。

沖縄の湿地における蚊の生息調査では、関東圏とはやや異なる結果が得られた。漫湖水鳥湿地センターで実施した周年調査では、蚊から原虫遺伝子が検出されなかった。吸血昆虫の活動に適した亜熱帯環境であっても、鳥マラリアの検出率に地域差があることが推察され、蚊と鳥との接触機会を知る上で有用な情報となった。なお、沖縄本島北部の国頭村安田区で捕集された蚊の中にクロコガタフトオヤブカ (*Aedes (Verrallina) nobukonis*, Yamada 1932) が確認された。本種は、これまで長崎県と沖縄県の石垣島や西表島において数例が記録されているのみで、沖縄本島における生息は70年以上もの間確認されていなかった。本研究により初記録種となった。今後は、本種が鳥を吸血源にしているか否か、とくに固有種から吸血し原虫を媒介しているか否かを研究する必要がある。

本研究の調査対象地域では、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が示唆され、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起り得ることが予想された。さらに、鳥マラリアが蚊を介して種間感染 (Host Switch) する可能性が改めて示めされた。このことは、高い病原性を有する節足動物媒介性感染症が国外から侵入した場合、国内に生息する蚊が橋渡し役 (ブリッジベクター) となって、タンチョウやヤンバルクイナなどの希少鳥類を含め多種の野鳥に当該病原体を蔓延させる危険性を示唆している (図 23)。また、その病原体がウエストナイルウイルスのような人獣共通感染症を起こすのであれば、鳥のみならずヒトにも悪影響を与えることは必至である。このような感染環が成立する場として、シギ・チドリ類が飛来する関東圏の干潟に留意する必要があることも、本研究で得られた成果のひとつである。

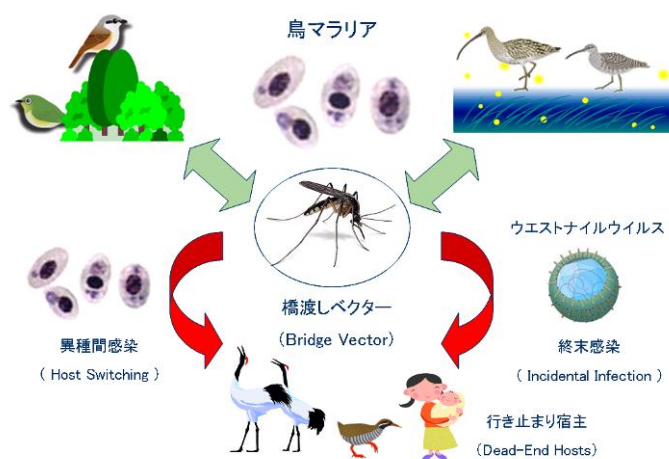


図 23. 吸血昆虫の蚊が橋渡し役となって、鳥マラリアやウエストナイルウイルス等の高病原性微生物を「鳥一鳥」間で伝播させる可能性がある。人獣共通感染症である場合はヒトに与える影響も大きい。

(2) 地球環境政策への貢献

媒介昆虫 (蚊) からの原虫検出および検出遺伝子解析により、調査地域において鳥マラリアが蚊と渡り鳥との間で相互に伝播する可能性のあることが示唆された。蚊の吸血源動物を確認することや、保有する原虫の遺伝子型の詳細な解析、原虫保有状況の季節的变化などの検討が今後必要ではあるが、本研究成果により年間を通じてのモニタリング手法について次年度以降参考になる知見が得られたと

考える。すなわち、ベクター調査に関して、(i) 原虫遺伝子検出による迅速な保有状況調査手法、(ii) 調査ポイントの選定および継続調査体制が確立できたと考える。

本調査研究を通して、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を行うには、国内産鳥類における血液原虫保有の状況把握およびその媒介蚊の特定といった基礎的情報を蓄積することの必要性が示唆された。今後は、希少鳥類を含めた野鳥からのより多くの試料採取を試み、高度な検出手法で鳥マラリアの検出に努めると共に、蚊および野鳥からのウエストナイルウイルス遺伝子検出を行い、鳥類血液原虫を指標とした病原体のモニタリングを行うことで、国内外の野鳥間における節足動物媒介性感染症の動態把握に役立てる必要がある。

本研究期間では、それぞれの調査地での調査時期が限られていたが、今後は鳥および蚊における感染状況の調査に加え、野鳥と蚊の間での伝播時季や気候との関係について検討を加えることで、地球温暖化に伴う節足動物媒介性感染症のリスク評価が可能になると思考する。

本研究の総括として、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、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。

6. 引用文献

- 1) Hagihara, M., Yamaguchi, T., Kitahara, M., Hirai, K., Murata, K. (2004) *Leucocytozoon lovati* infections in wild rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in Japan. *Journal of Wildlife Disease* 40(4): 804-807.
- 2) Hellgren, O., Waldenström, J. and Bensch, S. (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90 (4): 797-802.
- 3) Kumar, S., Dudley, J., Nei, M. and Tamura, K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- 4) 漫湖水鳥・湿地センター管理運営協議会, 平成 19 年度漫湖水鳥・湿地センター事業報告書, pp.58, 2007.
- 5) Merkel, J., Jones, H.I., Whiteman, N.K., Gottdenker, N., Vargas, H., Travis, E.K., Miller, R.E. and Parker, P.G. (2007) Microfilariae in Galápagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) and flightless cormorants (*Phalacrocorax harrisi*): genetics, morphology, and prevalence. *Journal of Parasitology* 93 (3): 495-503.
- 6) Murata, K. (2002) Prevalence of blood parasites in Japanese wild birds. *Journal of Veterinary Medical Science* 64(9): 785-790.
- 7) Sehgal, R.N., Jones, H.I. and Smith, T.B. (2001) Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in

some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* 10 (9): 2319-27.

- 8) Valkiunas, G. (2004) *Avian malaria parasites and other haemosporidia*, pp. 932, CRC Press.

7. 国際共同研究等の状況

- (1) タイ王国におけるシギ・チドリ類の血液原虫および WNV 感染に関する共同研究
節足動物媒介性感染症研究を目的とした国内の野鳥および渡り鳥からの血液採取・保存 (Dr. Kongsak Thiangtum: カセサート大学獣医学部)
- (2) タイ王国における血液原虫および WNV 媒介蚊に関する共同研究
蚊からの血液原虫および WNV 遺伝子検出を目的とした国内の干潟に生息する蚊の捕集・同定・保存 (Dr. Pradya Somboon: チェンマイ大学医学部)
- (3) ロシアにおける血液原虫媒介蚊に関する共同研究
鳥類からの血液原虫および WNV 遺伝子検出を目的とした国内の湿地に生息する蚊の捕集・同定・保存 (Dr. Kocherga Margarita: ボロン自然保護区)
- (4) 韓国における鳥類の血液原虫感染に関する共同研究
鳥類からの血液原虫検出を目的とした国内の干潟に生息する蚊の捕集・同定・保存 (Dr. Hang Lee: ソウル大学獣医学部)

8. 研究成果の発表状況

- (1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) 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, *Journal of Veterinary Medical Science* 69 (2): 171-176.
- 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*, *Parasitology Research* 100 (3): 661-664.
- 3) Sato, Y., Hagihara, M., Yamaguchi, T., Yukawa, M. and Murata, K. (2007) Phylogenetic comparison of *Leucocytozoon* spp. from wild birds of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 69 (1): 55-59.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Murata, K., Nii, R., Yui, S., Sasaki, E., Ishikawa, S., Sato, Y., Matsui, S., Horie, S., Akatani, K., Takagi, M., Sawabe, K. and Tsuda, Y. (2008) Avian haemosporidian parasites infection in wild birds inhabiting Minami-daito Island of the northwest pacific, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 70 (5): 501-503.

- 7) Omori, S., Sato, Y., Hirakawa, S., Isobe, T., Yukawa, M. and Murata, K. (2008) Two extra chromosomal genomes of *Leucocytozoon caulleryi*; complete nucleotide sequences of the mitochondrial genome and existence of the apicoplast genome. *Parasitology Research* 103, 953-957.
- 8) Ejiri, H., Sato, Y., Sasaki, E., Sumiyama, D., Tsuda, Y., Sawabe, K., Matsui, S., Horie, S., Akatani, K., Takagi, M., Omori, S., Murata, K. and Yukawa, M. (2008) Detection of Avian *Plasmodium* spp. DNA sequences from mosquitoes captured in Minami Daito Island of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 70 (11): 1205-1210.
- 9) 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. *Parasitology Research* 104: 215-255.
- 10) Hatakeyama, Y., Sato, Y., Murata, K., Yukawa, M. and Iwano, H. (2009) Search for and detection of specific DNA fragments in high- and low-virulent strains of *Nosema bombycis* (Microsporida : Nosematidae). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 78 (1): 17-21.
- 11) 城谷歩惟、柴田明弘、江尻寛子、佐藤雪太、畠山吉則、岩野秀俊、津田良夫、村田浩一、湯川眞嘉 (2009) 神奈川県の大田農場における蚊の分布および鳥マラリア原虫保有状況, *日本獣医師会雑誌* 62 (1): 73-79.
- 12) 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, *Japanese Journal of Nematology* 38 (2): 89-92.
- 13) 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. *Parasitology Research* DOI 10.1007/s00436-009-1434-9.
- 14) Kikkawa, E.F., Tsuda, T.T., Sumiyama, D., Naruse, T.K., Fukuda, M., Kurita, M., Wilson, R.P., LeMaho, Y., Miller, G. D., Tsuda, M., Murata, K., Kulski, J.K., Inoko, H. (2009) Trans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (genus *Spheniscus*), *Immunogenetics*, DOI 10.1007/s00251-009-0363-1.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 松本令以、植田美弥、佐藤雪太、比嘉由紀子、津田良夫、澤邊京子、村田浩一. (2006) よこはま動物園における鳥マラリアの発生と対策. *獣医畜産新報* 59 (10): 827-830.
- 2) 村田浩一 (2007) 野生鳥類における血液原虫症研究の現状と課題—ニホンライチョウのロイコトゾーン感染に関する研究を例に—. *全国環境研究会誌* 32 (4): 178-183.
- 3) 佐藤雪太 (2007) ニホンライチョウの原虫感染症. *獣医畜産新報* 61 (5): 373-378.
- 4) 村田浩一 (2008) 日本産野鳥の血液原虫感染に関する研究, *動物の原虫病* 22 (1): 1-8.
- 5) 村田浩一、佐藤雪太、津田良夫、沢辺京子、齊藤慶輔、渡邊有希子、浅川満彦、大沼 学、桑名 貴 (2008) シギ・チドリ類の血液原虫感染を指標とした節足動物媒介感染症モニタリング. *日本獣医寄生虫学会誌* 6 (1): 42.
- 6) 朝比奈礼子、佐藤雪太、佐々木絵美、澤邊京子、伊澤晴彦、比嘉由紀子、津田良夫、松本令以、植田美弥、湯川眞嘉、村田浩一(2008) 動物園における鳥マラリア媒介昆虫の吸血源動物の

検索. 日本獣医寄生虫学会誌 6 (1): 40.

- 7) 江尻寛子、佐藤雪太、佐々木絵美、仁井亮介、津田良夫、松井 晋、高木昌興、湯川眞嘉、村田浩一 (2008) 南大東島で採集された蚊における鳥マラリア原虫遺伝子の検出. 日本獣医寄生虫学会誌 6 (1): 38.
- 8) 大森澄枝、佐藤雪太、磯辺 尚、湯川眞嘉、村田浩一 (2008) 鳥マラリア原虫 (*Plasmodium gallinaceum* および *Plasmodium juxtannucleare*) のミトコンドリアゲノム構造. 日本獣医寄生虫学会誌 6 (1): 33.
- 9) 中村紫乃、玉田明日美、望月弥生、佐藤雪太、湯川眞嘉、村田浩一 (2008) ライチョウ寄生ロイコトゾーンを媒介する昆虫種の同定と原虫保有状況調査. 日本獣医寄生虫学会誌 6 (1): 41.
- 10) 芳我彩佳、佐藤雪太、佐々木絵美、津田良夫、湯川眞嘉、村田浩一 (2008) 国内の動物園における鳥マラリア感染サイクルについて. 日本獣医寄生虫学会誌 6 (1): 39.
- 11) 村田浩一 (2008) ライチョウの現状と獣医学的保護管理、獣医畜産新報 61 (5): 361-366.
- 12) 柳井徳磨、村井厚子、山口剛士、岡野 司、福士秀人、酒井洋樹、柵木利昭、清水博文、村田浩一: (2008) 野外および飼育下ニホンライチョウにおける背景病変、獣医畜産新報 61 (5): 379-386.

(2) 口頭発表 (学会)

- 1) 伊藤加奈, 佐々木絵美, 金城輝雄, 長嶺 隆, 天野洋祐, 村田浩一 (2006) 野生および飼育下鳥類のバベシア感染ならびに八重山産カンムリワシ (*Spilornis cheela*) における新宿主記録, 第12回日本野生動物医学会大会・岐阜大学21世紀COEプログラム国際シンポジウム.
- 2) 仁井亮介, 由井沙織, 松井 晋, 堀江明香, 高木昌興, 佐藤雪太, 津田良夫, 沢辺京子, 村田浩一 (2006) 南大東島に生息する固有および非固有鳥類の鳥マラリア感染と遺伝子解析, 第12回日本野生動物医学会大会・岐阜大学21世紀COEプログラム国際シンポジウム.
- 3) 村田浩一, 伊藤加奈, 佐々木絵美, 佐藤雪太, 長嶺 隆, 金城輝雄 (2006) カンムリワシ (*Spilornis cheela*) に認められた *Babesia* sp.感染, 第142回日本獣医学会学術集会(2006)
- 4) 佐々木絵美, 佐藤雪太, 村田浩一 (2006) 鳥マラリア遺伝子検出による飼育下ペンギン類およびその他鳥類の血液原虫保有状況, 第12回日本野生動物医学会大会.
- 5) Sasaki, E., Sato, Y., Murata, K. (2006) Prevalence of avian malaria in wild and captive birds including penguins from Japan by molecular biological techniques. International Symposium of the 21st Century COE Program of Gifu University-Evaluation of Environmental Condition Based on Ecology and Pathology of Wild Animals (Gifu, Japan).
- 6) Ito, K., Sasaki, E., Kinjo, T., Nagamine, T., Amano, Y., Murata, K. (2006) Study on the avian piroplasma in wild and captive birds in Japan with a new host record from the crested serpent eagle (*Spilornis cheela*) inhabits Yaeyama Archipelagos. International Symposium of the 21st Century COE Program of Gifu University-Evaluation of Environmental Condition Based on Ecology and Pathology of Wild Animals (Gifu, Japan).
- 7) Nii, R., Yui, S., Matsui, S., Horie, S., Takagi, M., Sato, Y., Tsuda, Y., Sawabe, K., Murata, K. (2006) Prevalence of avian malaria from native and non-native birds inhabit Minami Daito (South Borodino) Island with its molecular analysis. International Symposium of the 21st Century COE Program of Gifu

University-Evaluation of Environmental Condition Based on Ecology and Pathology of Wild Animals
(Gifu, Japan).

- 8) 朝比奈礼子、佐藤雪太、佐々木絵美、澤邊京子、比嘉由紀子、津田良夫、長塚信幸、松本令以、植田美弥、湯川眞嘉、村田浩一 (2007) 動物園および水族館における鳥マラリア媒介昆虫の吸血源動物の探索, 第 143 回日本獣医学会学術集会.
- 9) 芳我彩佳、佐藤雪太、佐々木絵美、湯川眞嘉、村田浩一 (2007) 国内の動物園における鳥マラリア感染サイクルについて, 第 143 回日本獣医学会学術集会.
- 1 0) 江尻寛子、佐藤雪太、佐々木絵美、仁位亮介、津田良夫、松井晋、高木昌興、湯川眞嘉、村田浩一 (2007) 南大東島で採集された蚊における鳥マラリア原虫遺伝子の検出, 第 143 回日本獣医学会学術集会.
- 1 1) 中村紫乃、玉田明日美、望月弥生、佐藤雪太、湯川眞嘉、村田浩一 (2007) ライチョウ寄生ロイコトゾーンを媒介する昆虫種の同定と原虫保有状況調査, 第 143 回日本獣医学会学術集会.
- 1 2) 石川智史、加藤千晴、福富 潤、炭山大輔、佐藤雪太、村田浩一 (2008) 神奈川県内で保護された野鳥の鳥マラリア原虫および *Leucocytozoon spp.* の感染状況, 第 14 回日本野生動物医学会大会.
- 1 3) 佐々木絵美、佐藤雪太、村田浩一 (2008) 国内の動物園・水族館におけるペンギンマラリアの分子系統解析, 第 14 回日本野生動物医学会大会.
- 1 4) 村田浩一、佐藤雪太、當間孝子、宮城一郎、津田良夫、佐々木絵美、江尻寛子、湯川眞嘉 (2008) 沖縄の渡り鳥飛来地における蚊発生の年変動と鳥マラリアとの関係, 第 14 回日本野生動物医学会大会.
- 1 5) 佐々木絵美、佐藤雪太、桑名 貴、大沼 学、村田浩一 (2008) 国内の野鳥における鳥マラリアの感染状況および分子系統, 第 145 回日本獣医学会学術集会.
- 1 6) 炭山大輔、佐々木絵美、佐藤雪太、津田良夫、澤邊京子、松井 晋、堀江明香、高木昌興、猪子英俊、村田浩一 (2008) 南大東島における鳥マラリアの分子系統と宿主転換, 第 145 回日本獣医学会学術集会.
- 1 7) 井村貴之、佐藤雪太、玉田明日美、岡野恵美子、吉田千紘、大森澄枝、江尻寛子、湯川眞嘉、村田浩一 (2008) 日本アルプスに生息するブユにおける吸血源動物の探索, 第 145 回日本獣医学会学術集会.
- 1 8) 村田浩一、佐々木絵美、石川智史、佐藤雪太、澤邊京子、津田良夫、松本令以、須田朱美、植田美弥 (2008) 飼育下のシロミキジに認められた *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* 感染, 第 145 回日本獣医学会学術集会.
- 1 9) 江尻寛子、葉山政治、佐藤雪太、佐々木絵美、津田良夫、湯川眞嘉、村田浩一 (2008) 関東圏の野鳥公園で採集された蚊の鳥マラリア原虫遺伝子保有状況, 第 146 回日本獣医学会学術集会.
- 2 0) 村田浩一、佐藤雪太、當間孝子、宮城一郎、津田良夫 (2008) 沖縄県の湿地におけるシギ・チドリ類と蚊との関係および鳥マラリア原虫保有について, 第 146 回日本獣医学会学術集会.
- 2 1) Murata, K., 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. The 4th Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine (Bogor, Indonesia).

- 2 2) 森田結希、城谷歩惟、松戸藍子、柴田明弘、水村亮平、江尻寛子、佐藤雪太、津田良夫、澤邊京子、村田浩一、湯川眞嘉 (2009) 神奈川県内の大学農場における鳥マラリア感染サイクル, 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 3) 江尻寛子、佐藤雪太、玉城美加子、當間孝子、宮城一郎、津田良夫、村田浩一、湯川眞嘉 (2009) 沖縄県西表島で採集された蚊における鳥マラリア原虫遺伝子の検出, 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 4) 平野文哉、石川智史、佐藤雪太、加藤千晴、福富 潤、炭山大輔、村田浩一、湯川眞嘉 (2009) 神奈川県内の野鳥における血液寄生原虫の感染状況, 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 5) 根上泰子、有井鈴江、宇田川麻衣、小田谷嘉弥、川崎武志、天白牧夫、葉山久世、原田健一、水上昌也、村田浩一 (2009) 神奈川県内の農業用水池で確認されたサギ類の大量死に対する保全医学的調査研究 (予報), 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 6) 炭山大輔、福井大祐、石川智史、永倉貢一、佐藤雪太、猪子英俊、村田浩一 (2009) 北海道の野鳥に認められた *Trypanosoma* spp. の分子系統解析, 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 7) 佐々木絵美、村田浩一 (2009) 飼育下タンチョウの血液中に認められた *Eimeria* 属原虫の分子生物学的解析, 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 8) 大森澄枝、佐藤雪太、磯部 尚、村田浩一、湯川眞嘉 (2009) 鳥類血液寄生原虫類の核外ゲノム解析の展開: 発現解析と原虫検出の標的としての可能性, 第 147 回日本獣医学会学術集会.
- 2 9) 石川智史、加藤千晴、福富 潤、炭山大輔、佐藤雪太、村田浩一 (2009) 各種野鳥からのミクロフィラリア検出状況およびオオコノハズクから検出された同虫体の形態学的特徴, 第 147 回日本獣医学会学術集会.

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム, セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

- 1) 第 145 回日本獣医学会学術集会 (2008) 寄生虫分科会 ベストプレゼンテーション賞受賞井村貴之, 佐藤雪太, 玉田明日美, 岡野恵美子, 吉田千紘, 大森澄枝, 江尻寛子, 湯川眞嘉, 村田浩一 「日本アルプスに生息するブユにおける吸血源動物の探索」