

氏名(本(国)籍)	金 京 純(大韓民国)
主指導教員名	岐阜大学 教授 山田章雄
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第310号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Studies on Transmission Cycle of Avian Malaria Parasites in Japan (日本における野生鳥類血液原虫の感染環に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 杉山 誠 副査 帯広畜産大学 教授 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 津田 修治 副査 東京農工大学 教授 白井 淳資 副査 岐阜大学 教授 山田 章雄 副査 国立感染症研究所 昆虫医科学部 第一室長 津田 良夫

論文の内容の要旨

鳥マラリアは、*Plasmodium*属の血液原虫に起因する鳥類の蚊媒介性感染症である。日本では、野鳥における鳥マラリア原虫の感染保有状況などに関する断片的な報告はあるが、その感染環については不明な点が多い。近年国内動物園の飼育鳥類では鳥マラリア原虫感染による重症例や死亡例が報告されており、その背景にわが国の野生鳥類群集における鳥マラリア原虫の感染環の存在が示唆されている。本研究では、日本の野生鳥類群集における鳥マラリア原虫の基本的な感染環を明らかにする目的で、野外捕集蚊からの鳥マラリア原虫検出および吸血源動物同定をPCR法により行った。

第一章ではPCR法を用いて蚊の腹部と胸部を分けて鳥マラリア原虫を検出することにより、蚊体内における鳥マラリア原虫の発育段階が推測可能であるかを調べるため、人為的に感染させた蚊を用いた検証実験を行った。また、PCR法による吸血源動物の同定が、吸血後何日目まで可能であるかも併せて検討した。*Plasmodium gallinaceum*に感染したニワトリを、本原虫のベクターであるネッタイシマカと、非ベクターであるアカイエカに吸血させ、吸血後経過日数に応じて、腹部・胸部からの本原虫遺伝子の検出を行いその結果を2種間で比較した。吸血源動物同定は、鳥類の *cytochrome b* (*cyt b*) 遺伝子特異的プライマーを用いたPCR法で行った。ニワトリ遺伝子は両種ともに吸血後3日目まで検出可能であった。鳥マラリア原虫の検出は、nested-PCR法を用いて鳥マラリア原虫の *cyt b* 遺伝子の部分配列を増幅して

行った。ネッタイシマカでは、本原虫遺伝子は吸血後8日目までは腹部からのみ検出され、それ以降は腹部・胸部の両方から検出された。この結果は、中腸壁のオーシスト、および唾液腺内スポロゾイトの顕微鏡観察結果と一致した。一方、本原虫の非ベクターであるアカイエカでは、吸血後3日目まで腹部から本原虫遺伝子が検出されたが、4日目以降の検出率は著しく低下し、顕微鏡下でもオーシストやスポロゾイトは確認されなかった。以上の結果より、PCR法による蚊の腹部と胸部からの鳥マラリア原虫遺伝子検出法が、蚊体内における鳥マラリア原虫の発育段階を評価する上で有用であり、野外捕集蚊の調査に適用可能であることが証明された。

第二章では野外における鳥マラリア原虫の感染経路を調べるために、東京都立林試の森公園にて2007年4月～12月の間、週2～3回、日の出後1時間にわたり捕虫網を用いた蚊採集を行った。形態的特徴に基づき種同定された11種の蚊のうち、秋季に発生ピークがあり、その吸血嗜好性や鳥マラリア原虫のベクターとしての情報が無い、ヤマトクシヒゲカについて解析を行い、本種の鳥マラリア原虫のベクターとしての可能性について検討した。吸血蚊21匹中、吸血源同定に成功したのは15匹で、このうち13匹は野鳥類を吸血しており、本種は鳥類を主な吸血源としていることが分かった。*Plasmodium*原虫遺伝子は、非吸血蚊からは検出されなかったが、3匹の吸血蚊の腹部から検出され、それぞれハシブトカラス、シジュウカラ、シロハラを吸血していた。これら3検体から得た鳥マラリア原虫の *cyt b* 遺伝子の部分塩基配列を GenBank データベースの配列と比較した結果、2系統は野鳥から検出された鳥マラリア原虫の配列と一致したが、1系統は一致する配列がなく固有の塩基配列であった。ヤマトクシヒゲカの主な吸血源が鳥類であり、宿主鳥類を吸血した蚊から鳥マラリア原虫が検出されたことを考慮すると、本種が秋の鳥マラリア原虫の伝播において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第三章では鳥類群集における鳥マラリア原虫の感染環を調べ渡り鳥によって外来の病原体が日本産鳥類群集に持ち込まれる可能性を検討する目的で、シギ・チドリ類や、ガン・カモなどの渡り鳥が飛来する東京港野鳥公園に生息する蚊群集の季節消長や鳥マラリア原虫の感染保有率、吸血源動物を調べた。2007年4月～10月の間、2日間の調査を毎月2回、ドライアイストラップ12台、BG-sentinelトラップ1台および園内3箇所における90分間の捕虫網採集により行った。蚊の形態分類と分子分類に基づき種同定を行った結果、アカイエカ群、コガタアカイエカ、イナトミシオカ、ヒトスジシマカを優占種とする7種が捕獲され、優占種の季節消長には違いが見られた。吸血源同定の結果、アカイエカ群は鳥類嗜好性、ヒトスジシマカは哺乳類嗜好性を示した。アカイエカ群の鳥マラリア原虫陽性率は、非吸血蚊で21%、吸血蚊で60%であり、他にトラフカクイカで鳥マラリア原虫陽性を示した。増幅された鳥マラリア原虫の塩基配列を比較した結果、5つの系統が得られ、うち3系統はヨーロッパ等で野鳥から検出された原虫のそれと一致した。このうち、日本では夏鳥であるイワツバメを吸血していたアカイエカから検出された原虫系統は、日本の野鳥での感染報告が無く、渡り鳥によって日本に持ち込まれた可能性が示された。今回の調査結果は、東京港野鳥公園において鳥マラリア原虫の主なベクターとなっているのがアカイエカ群で、本種と野鳥との間で感染環が成立していることを示している。またアカイエカ群の発生ピークは8～9月にみられ、夏鳥が多く飛来する時期と対応しており、本種が渡り鳥から吸血することで、日本産鳥類が新規の鳥マラリア原虫もしくは蚊媒介性病原体に暴露される可能性がある。

本研究は鳥マラリア原虫の感染環においてベクターとして重要な役割を担う蚊群集の季節消長、病原体保有率、吸血源動物種を併せて調査することにより、野生鳥類における鳥マラリア原虫の伝播経路を解明することが可能であることを示した。本研究結果は、ウエストナイルウイルスや日本脳炎ウイルスなど、鳥類が感染源となる蚊媒介性の人獣共通感染症の疫学

的研究のモデルとしても役立つと考えられる。また、外来の鳥マラリア原虫系統に感染した渡り鳥と日本産蚊との間で直接的接触があるという事実は、野鳥群集におけるモニタリングの必要性を示唆している。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、日本の野鳥における鳥マラリア原虫の基本的な感染環を知る目的で、野外捕集蚊からの原虫遺伝子検出および吸血源動物同定を試みた。

まず申請者は原虫感染ニワトリを実験的に蚊に吸血させた。本原虫のベクターであるネッタイシマカでは、原虫遺伝子は吸血8日後までは腹部から、その後は腹部・胸部から検出された。非ベクターのアカイエカでは、吸血3日後までは腹部から検出されたが、4日目以降の検出率は著しく低下した。これらの結果は、顕微鏡観察結果とも一致した。吸血源のニワトリ遺伝子は両種ともに吸血後3日まで検出できた。以上の結果は、蚊を腹部と胸部に分離し、鳥マラリア原虫遺伝子をPCR法で検出することにより、蚊体内における鳥マラリア原虫の発育段階を評価できることを示している。

次に申請者は秋季に発生ピークがあるヤマトクシヒゲカについて検討し、本種が鳥類を主な吸血源としていることを明らかにした。野鳥を吸血していた蚊の腹部から原虫遺伝子を検出し、塩基配列を決定したところ、2系統はこれまでに報告されている配列と一致したが、1系統は固有の塩基配列だった。ヤマトクシヒゲカの主な吸血源が鳥類であり、吸血蚊から原虫が検出されたことは、本種が秋の鳥マラリア原虫の伝播において重要な役割を担っていることを示唆している。

続いて申請者は、渡り鳥によって外来病原体が国内に持ち込まれる可能性について東京港野鳥公園を調査地とし検討した。アカイエカ群の鳥マラリア原虫陽性率は、非吸血蚊で21%、吸血蚊で60%であり、増幅された原虫遺伝子の塩基配列を比較したところ、5系統が得られ、うち3系統はヨーロッパ等で報告されたものと一致した。夏鳥のイワツバメを吸血していたアカイエカから検出された原虫系統は、日本の野鳥での感染報告が無く、渡り鳥によって日本に持ち込まれた可能性が示された。これらの成績はアカイエカ群が鳥マラリア原虫の主なベクターで、本種と野鳥との間で感染環が成立していることを示している。またアカイエカ群の発生ピークが夏鳥の多い8~9月であることから、本種が国外からの新規鳥マラリア原虫の伝播に関わる可能性を示唆している。

本研究の成果は鳥類を感染源とする蚊媒介性人獣共通感染症の疫学的研究のモデルとしても役立つと考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan
著 者 名 : Kim, K. S., Tsuda, Y. and Yamada, A.
学術雑誌名 : Journal of Medical Entomology
巻・号・頁・発行年 : 46(5):1230-1234, 2009
- 2) 題 目 : Mosquito blood-meal analysis for avian malaria study in wild bird communities: laboratory verification and application to *Culex sasai* (Diptera: Culicidae) collected in Tokyo, Japan
著 者 名 : Kim, K. S., Tsuda, Y., Sasaki, T., Kobayashi, M. and Hirota, Y.

學術雜誌名 : Parasitology Research
卷・号・頁・発行年 : 105(5):1351-1357, 2009

既発表學術論文

- 1) 題 目 : Sudden autumnal appearance of adult *Culex tritaeniorhynchus*
(Diptera: Culicidae) at a park in urban Tokyo: First field evidence
for prediapause migration
著 者 名 : Tsuda, Y. and Kim, K. S.
學術雜誌名 : Journal of Medical Entomology
卷・号・頁・発行年 : 45(4):610-616, 2008