

鳥類血液原虫の分子疫学と原虫特異的ゲノムの解析

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

井村 貴之

2013

目次

第1章 序論	1
第2章 定点調査による野鳥の血液寄生原虫保有状況および経年モニタリング	7
2.1 はじめに	8
2.2 材料および方法	9
2.2.1 野鳥の捕獲と血液検体の採取	
2.2.2 サンプルからの DNA 抽出	
2.2.3 PCR による原虫ミトコンドリア遺伝子の増幅	
2.2.4 電気泳動	
2.2.5 ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定	
2.2.6 遺伝子解析	
2.3 成績	14
2.3.1 捕獲した野鳥における原虫特異的 PCR 結果	
2.3.2 検出された配列の分子系統関係	
2.3.3 再捕獲個体における長期的感染状態の推移	
2.4 考察	15
2.5 小括	19
第3章 <i>Leucocytozoon</i> 属原虫の媒介昆虫種の推定	23
3.1 はじめに	24
3.2 材料および方法	26
3.2.1 PCR による吸血源動物ミトコンドリア遺伝子の増幅	
3.2.2 電気泳動	
3.2.3 ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定	
3.3 成績	28
3.3.1 ブユの吸血源動物の遺伝子増幅結果および分子系統関係	
3.4 考察	29
3.5 小括	33

第3章 鳥類血液原虫アピコプラストのゲノム解析	38
4.1 はじめに	39
4.2 材料および方法	42
4.3 成績および考察	43
4.4 小括	47
第4章 総括	51
謝辞	60
引用文献	62
業績一覧	78
受賞等一覧	80

第 1 章

序論

鳥類の血液に寄生する鳥マラリア原虫 (*Plasmodium* spp.)、ヘモプロテウス属原虫 (*Haemoproteus* spp.) およびロイコチトゾーン属原虫 (*Leucocytozoon* spp.) は、蚊やブユ、ヌカカなどの吸血性昆虫により媒介され、全世界の鳥類の半数種以上で感染が認められている (Valkiūnas 2005)。

これら鳥類血液寄生原虫は、これまでに 3 属合わせて 200 種以上が存在することが確認されており、極地を除く世界中に広く分布している (Valkiūnas 2005)。多くは不顕性であるとされるが、調査時に捕獲される宿主鳥類の感染状態は既に急性期を経過し慢性期の状態で観察されている可能性があるため、各種原虫の実際の病原性については不明である。一方で、これら原虫に抵抗性を持たない鳥類に感染した場合、個体に致死的な影響を及ぼすことが知られている。例えば、ハワイ諸島では本来生息していなかった鳥マラリア媒介蚊が侵入し、鳥マラリア原虫が土着鳥類に広がり宿主鳥類群が絶滅したことが知られている (van Riper et al. 1986)。また、日本国内の飼育下ペンギン類における鳥マラリア原虫感染による死亡例や (Shimazu et al. 1994)、欧州の輸入オウムにおける野鳥由来の *Haemoproteus* 属原虫への感染死亡例が報告されている (Olias et al. 2011)。同様に、一部のロイコチトゾーン属原虫も異なる宿主に感染した場合に強毒性を示すことが明らかとなっている (Garnham 1966; Peirce et al. 1997; Valkiūnas, 2005; Forrester and Greiner 2008)。このように、媒介昆虫の侵入や原虫流行地への鳥類の人為的な移

動により、各地の鳥マラリア原虫やロイコトゾーン属原虫が本来の宿主鳥類とは異なる鳥類に感染し、新規の宿主鳥類に対して大きな脅威となることが想定される。また、これらの原虫は国内の各種鳥類でも感染が見られ、養鶏産業への被害 (Morii et al. 1981; Morii 1992) や飼育下鳥類の致死的影響 (Shimazu et al. 1994) が報告されており、獣医学上重要な病原体である。

鳥マラリア原虫およびロイコトゾーン属原虫はベクター媒介性の病原体であるため、その感染動態は原虫 - 鳥類 - 吸血昆虫の三者間で相互に関連し、鳥類と吸血昆虫の生態上、環境の変化に影響される。例えば、近年の地球温暖化に伴い、マラリア原虫や媒介昆虫の発育および活動可能期間の延長と拡大、それに伴う高密度化が鳥類血液原虫の流行に変化を与えることが懸念される。媒介昆虫の生息域や分布量は各種原虫の流行状態と密接に関係しているため (Benning et al. 2002; Arriero and Moller 2008)、媒介昆虫の分布域拡大に伴って原虫の流行地域も同様に拡大する可能性がある。実際にアフリカやニューギニアではこれまでマラリアや媒介蚊が分布していなかった低温高地に媒介蚊が侵入し、マラリア原虫感染が流行し始めた (Forsyth et al. 1989; Lepers et al. 1988; 1990)。また、国内では気温上昇により鳥マラリア原虫などを媒介可能な蚊の生息域が拡大していることが報告されている (Kobayashi et al. 2002)。このように環境変化に伴い媒介昆虫の分布域が変化し、これまで原虫が分布していなかった地域に新たな原虫種が侵入することで、

これらの原虫が地域の鳥類個体群に対して大きな脅威となる可能性がある。そのため、現時点における各地の鳥類に感染する原虫種や分布状況、媒介昆虫種の同定や吸血活動範囲などの情報を収集し、原虫の伝播機序を解明することが重要となる。

近年の急速な塩基配列解析技術の発展により、様々な病原体のゲノム情報が明らかとなっており、感染症の診断や防除に応用されている。原虫では、ヒトやネズミのマラリア原虫をはじめとする各種の血液寄生原虫の全ゲノム情報が明らかにされており(Gardner et al. 2002; 2005; El-Sayed et al. 2005; Brayton et al. 2007; Pain et al. 2008; Carlton et al. 2008; Kappmeyer et al. 2012)、原虫の特異的な生理機構の分子基盤が解明され、弱毒化生ワクチンの開発や薬剤ターゲットの候補分子が選定されている(Haussig et al. 2011; McFadden 2011)。また、これらゲノム情報は媒介昆虫からの原虫遺伝子検出や原虫の多様性、および分子進化の推定にも用いられる(Martinsen et al. 2007; Liu et al. 2010; Ricklefs et al. 2010; Javi et al. 2013)。これまでに鳥類血液原虫では、野鳥や家禽、飼育鳥類などから検出される各種の *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* 属原虫のミトコンドリアゲノムが解明されているが(Beadell and Fleischer 2005; Omori et al. 2007; 2008; Perkins 2008)、その情報の多くは分子疫学的調査に応用されており、ヒトマラリア原虫のようにゲノム全体の構造や遺伝子の構成は明らかにされていない。マラリア原虫やロイコチトゾーン原虫を含むアピコンプレックス門原虫は、核とミトコン

ドリア以外にもゲノムを持つ細胞小器官、アピコプラストを保有している (Wilson et al. 1996; McFadden et al. 1996; Köhler et al. 1997; Douglas and Penny 1999; Cai et al. 2003; Abrahamsen et al. 2004) 。鳥類血液原虫では核やアピコプラストのゲノム情報は部分的に報告されているのみであり、現時点で全ゲノムの解読が終了している原虫種はない。病原体のゲノム情報を基盤としたワクチン開発については、ヒトマラリア原虫では多くの候補分子が検討されているのに対し (Ntumngia et al. 2009; Ahouidi et al. 2010) 、鳥類血液寄生原虫では *L. caulleryi* の遺伝子組み換えワクチン (Isobe et al. 1991; Itoh and Gotanda 2002; Ito and Gotanda 2004; Ito et al. 2005) および鳥マラリア原虫の DNA 組み換えワクチン (Grim et al. 2004) が報告されているのみで、いずれも実用的な普及には至ってはいない。以上のように、鳥類の血液寄生原虫については、ゲノム情報を基盤とした感染制御のために必要な基礎情報がまだほとんど明らかにされていない状況である。

これまで、国内の宿主鳥類およびベクター昆虫における原虫保有状況や吸血活動が明らかにされてきたが (Ejiri et al. 2008; 2009; 2011a; 2011b; 2011c; Kim et al. 2009a; 2009b; 2010; Kim and Tsuda 2012; Sato et al. 2009; Tanigawa et al. 2012; Ejiri 2012; Shirotani et al. 2009) 、原虫の感染動態や希少鳥種における伝播機構は十分に解明されていなかった。原虫の分子生物学的情報を応用することに

より、原虫保有状況を追跡し、ベクターからの原虫 DNA 検出により伝播サイクルが明らかになることが期待される。国内の鳥マラリアについては、主にアカイエカが各種鳥類に原虫を媒介していることが明らかになっているが (Ejiri et al. 2008; 2009; 2011a; 2011b; 2011c) 、ロイコチトゾーンの伝播サイクルについてはまだ十分に明らかになっていない。さらに、哺乳類のマラリア原虫に比べ、鳥類血液寄生原虫では、原虫の生存に関わる分子基盤解明のための基礎情報が不足している。

そこで本研究では、分子疫学的手法による鳥類血液原虫の感染動態 (第 2 章) 、およびロイコチトゾーンの重要なベクターであるブユによる伝播機構の解明 (第 3 章) を試みた。さらに、鳥類血液原虫でまだ全ゲノムが解読されていない原虫特異的オルガネラであるアピコプルストの全塩基配列の決定 (第 4 章) を目的とした。

第2章

定点調査による野鳥の血液寄生原虫保有状況 および経年モニタリング

2.1 はじめに

鳥マラリアなどのベクター媒介性感染症の感染動態は、一般に宿主－節足動物－寄生虫の三者が相互に関係しているため複雑であることが示唆されている (Knowles et al. 2010)。ベクター媒介感染症が分布する地域に生息する節足動物種は多様であり、さらに高度による節足動物分布量の違いは *Plasmodium* 属原虫の流行に違いをもたらすことが知られている (van Riper et al. 1986)。また、温度や湿度などの気候条件の変化は、節足動物や寄生虫の発育速度に影響する (Gubler et al. 2001; Rogers and Randolph 2006)。このように、節足動物により媒介される寄生虫の分布状況は周囲の環境要因と密接に関係している。

主要な鳥類血液原虫である鳥マラリア原虫 (*Plasmodium*) は蚊によって、*Haemoproteus* 原虫はヌカカやシラミハエに、また、*Leucocytozoon* 原虫は主にブユによって鳥類に媒介される (Valkiunas 2005)。環境要因と関連した鳥類血液原虫の感染動態を理解するには、地域の鳥類個体群やベクターとなる節足動物における血液原虫の分布状況を調査することが重要である。さらに、気候の変動は節足動物の分布を変化させ、血液原虫が新たな宿主動物種に感染する恐れがある。これまでに、国内において鳥マラリア原虫を媒介するヒトスジシマカが過去 50 年間で北上していることが示され (Kobayashi et al. 2002)、それに伴い鳥マラリア原虫の分

布域が北上する、もしくは高地へ広がる可能性が考えられる。特定地域に生息する鳥類個体群に感染する血液原虫を長期的にモニタリングすることにより、新規原虫の広がる様子や侵入時期を把握し、病原体分布域の変化を捉えることができる。すなわち、長期的な病原体感染状態のモニタリングは、ベクター媒介性感染症の感染動態に係る有益な情報をもたらす可能性がある。

これまで世界中の様々な地域において、野鳥や飼育下鳥類における多様な血液原虫感染状況が報告されてきた。国内では、Murata (2002)は兵庫県の傷病保護鳥類のうち10.6%が *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* などの血液原虫に感染していることを示した。Hagihara et al (2004)は、日本の高山地域にのみ生息するニホンライチョウの88.9%が *L. lovati* に感染していることを示した。さらにNagata (2006)は、秋田、茨城、福岡、沖縄に生息する鳥類の14.5%が *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* いずれかの血液原虫に感染していることを示した。しかしながら、国内において野鳥の血液原虫感染状態を定点観測し、長期間の感染状態を評価した報告はない。そこで今回、日本の高標高森林地帯に生息する野鳥における血液原虫の長期的な感染動態を調べた。

2.2 材料および方法

2.2.1 野鳥の捕獲と血液検体の採取

2007年から2010年までの5月から11月の間、埼玉県秩父市突出峠（標高1,650m; N 35° 55' 17.6", E 138° 48' 30.8"）の林道に毎月一晚（6～13時間）カスミ網を設置して野鳥を捕獲した。捕獲鳥類は個体識別および体部測定後、翼下静脈から血液を採取して、一部は薄層塗抹標本作製に用い、残りは実験室に持ち帰るまで99%エタノール中に保存した。

2.2.2 サンプルからのDNA抽出

2010年に採取した血液は、DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて、その他の血液はフェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した。

2.2.3 PCRによる原虫ミトコンドリア遺伝子の増幅

抽出したDNAを用いて血液原虫を検出するために、血液原虫のミトコンドリアチトクローム *b* 遺伝子の部分配列を対象にした nested-PCR を実施した(Hellgren et al. 2004)。すなわち、鳥類寄生 *Plasmodium* 属、*Haemoproteus* 属および *Leucocytozoon* 属原虫のミトコンドリア遺伝子のチトクローム *b* (*cytb*) 領域を特異的に増幅する Haem NFI および Haem NR3 (Hellgren et al. 2004)を 1st PCR のプライマーとし、鳥マラリア原虫 (*Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属原

虫) のミトコンドリア DNA の *cytb* 領域を特異的に増幅する Haem F および Haem R2、もしくはロイコチトゾーン属原虫の同領域を特異的に増幅する Haem FL および Haem R2L を 2nd PCR のプライマーとして用いた nested-PCR により原虫遺伝子の検出を試みた。

PCR は、 $2.5 \mu\text{l}$ の $10\times$ Ex-Taq buffer (Takara, Ohtsu, Japan)、 2 mM の MgCl_2 、 $200 \mu\text{ M}$ の each deoxynucleotide triphosphate、 $0.6 \mu\text{ M}$ の each primer、 0.625 U の Ex-Taq (Takara)、 $1 \mu\text{l}$ の DNA template を含む $25 \mu\text{l}$ の反応溶液中で行った。

1st PCR 反応は、 94°C で 3 分間熱処理した後、 94°C で 30 秒間の熱変性、 50°C で 30 秒間のアニーリング、および 72°C で 45 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして、20 サイクル行った。また、すべてのサイクルが終了した後、 72°C で 10 分間の最終伸長反応を行った。2nd PCR 反応は 1st PCR 産物を $1 \mu\text{l}$ 使用し、同反応条件で 35 サイクル行った。

2.2.4 電気泳動

TAE buffer を Mupid 電気泳動槽 (Advance 社) に入れた後、 10mg/ml エチジウムブロマイド加 1.5% アガロースゲル (AgaroseS: ニッポン・ジーン社) を泳動槽に設置した。PCR 産物 $20 \mu\text{l}$ に対し $4 \mu\text{l}$ の $6\times$ Loading Buffer Double Dye (ニッポン・ジーン社) を混和し、その全量をゲルのウェル内に添加した。また、DNA

サイズマーカーは 100bp DNA ladder (ニッポン・ジーン社) を 5 μ l 使用した。

100V で約 20 分間電気泳動した後、紫外線ゲル撮影装置 (Atto 社) を用いてゲルの写真を撮影し、増幅産物の有無を確認した。

2.2.5 ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定

PCR により増幅シグナルが認められたサンプルについて、電気泳動後のゲルから目的とする塩基長の PCR 増幅産物バンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN 社) を用いて DNA 抽出し、以下の通りシーケンス反応を行った。

0.2ml の滅菌した PCR 用尖底マイクロチューブに精製 DNA 溶液を 10 μ l、2pM の DNA シーケンス用プライマーを 2 μ l、BigDye (Applied Biosystems 社) を 3 μ l 加え、充分混和した後、滅菌精製水で全量を 20 μ l に調整した。

サイクルシーケンス反応は、96°C で 30 秒間の熱変性、50°C で 15 秒間のアニーリング、および 60°C で 4 分間の伸長反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。サイクルシーケンス反応終了後、反応液全量を 1.5ml 尖底プラスチックチューブに移した。反応液にエタノール沈殿溶液として 95%エタノール を 50 μ l、3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 2 μ l をそれぞれ加えてボルテックスで十分攪拌した後、室温で 15 分間静置した。15,000rpm で 20 分間遠心分離した後、上清を除去し、70%エタノールを 250 μ l 加え、さらに 15,000rpm で 5 分間遠心分離した。再度上

清を除去し、10 分間真空状態にて静置・乾燥させた。完全に乾燥したことを確認した後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 社) を 20 μ l 加え、2 分間 95°C にて反応させ、チューブを氷上にて冷却してから全量を DNA シーケンス用 96 穴プレートに移した。DNA 塩基配列は Applied Biosystems model 3130 genetic Analyzer (Applied Biosystem 社) を用いて決定した。

2.2.6 遺伝子解析

シーケンスデータは Sequencing Analysis (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。得られたシーケンス断片は、SeqMan ソフトウェア (DNASTAR 社) を用いてコンティグ結合した。また、ミトコンドリアゲノム上の各遺伝子との相同性を比較するため、塩基配列の部分配列に基づき Clustal W ソフトウェアを用いてアライメントを行った。さらに Kimura-2-パラメーターを用いて各サンプル間の遺伝子距離を推定し、それに基づき近隣接合法 (Neighbor-joining: NJ) を用いて分子系統樹を作成し、系統樹の内部枝の統計的支持値をブートストラップ法 (1,000 回の反復) により算出した。

なお、比較に用いた原虫種および GenBank アクセッション番号はそれぞれ以下の通りである。*L. majoris* (FJ168563)、*L. fringillinarum* (FJ168564)、*L. sabrazei* (AB299369)、*H. minutus* (DQ630013)、*H. palidus* (DQ630005)、*H. balmorali*

(DQ630014)、*H. lanii* (DQ630012)、*P. gallinaceum* (NC_008288)、*P. cathemerium* (AY377128)、*P. elongatum* (DQ659588)、*P. relictum* (AY733090)

2.3 成績

2.3.1 捕獲した野鳥における原虫特異的 PCR 結果

415 個体、19 種（ウグイス、センダイムシクイ、メボソムシクイ、マミジロ、ソウシチョウ、コマドリ、ルリビタキ、コルリ、エナガ、ヒガラ、ヤマガラ、コガラ、ミソサザイ、クロジ、ウソ、ゴジュウカラ、ノゴマ、ツグミ、ハイタカ）が捕集され、そのうち 62 個体で PCR 陽性であり、内訳は *Plasmodium* もしくは *Haemoproteus* 属原虫が 1.4%、*Leucocytozoon* 属原虫が 13.5%であった(表 2-1)。各種の野鳥において季節や性別によって感染率に有意な差は認められなかった。

2.3.2 検出された配列の分子系統関係

本研究で野鳥から検出された原虫遺伝子の分子系統解析の結果、ルリビタキ 4 個体から検出された配列は *P. gallinaceum* と一致し、また、ウグイスおよびミソサザイの各 1 個体から検出された遺伝子はそれぞれ *Haemoproteus* 属、*Plasmodium* 属に分類された。その他の個体から検出された原虫遺伝子はすべて

Leucocytozoon 属に分類されたが、GenBank に登録されている日本国内の鳥類から検出された原虫のチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列とは一致しなかった。7つの原虫遺伝子型（図 2-1 灰色囲い部分）については多種の鳥類から検出された。

2.3.3 再捕獲個体における長期的感染状態の推移

6 種（ウグイス、ソウシチョウ、ルリビタキ、ヒガラ、コガラ、クロジ）26 個体が調査期間中にカシミ網で再捕獲され、そのうち 6 個体は各捕獲時に PCR 陽性であった。PCR 陽性の再捕獲個体のうち、3 個体（ウグイス、ヒガラ、クロジの各 1 個体ずつ）は最長 14 か月にわたり各捕獲時点で同一の原虫遺伝子型が検出された（図 2-1; Cedi4*, Paat5*, Emva4*）。その他の 3 個体（コガラ 2 個体、クロジ 1 個体）では各捕獲時点で異なる原虫遺伝子型が検出された（図 2-1; Pamo3**, 6**, Emva1**）。また、再捕獲のコガラ 1 個体は PCR 陽性から陰性に転じていた。

2.4 考察

本章では高標高森林地帯に生息する野鳥における鳥類血液原虫の複数年にわたる分布状況を初めて明らかにした。Nagata (2006) は国内各地に生息する野鳥の 14.5% に鳥マラリア原虫 (*Plasmodium* および *Haemoproteus* 属原虫) の感染を

認めた。この感染率はこれまでに報告された国内野鳥の感染率 5.1~11.7% (Ogawa 1911; Kano and Kimura 1950; McClure et al. 1978; Murata 2002) と比べて高い。対して、今回の 415 個体を対象にした鳥マラリア原虫の感染率は 1.4% であり、先行研究よりも低かった。鳥マラリア原虫の主なベクターはイエカ属の蚊であり (Valkiunas 2005)、日本では広く生息しており鳥マラリア原虫を保有していることが知られる (Kamimura 1968; Ejiri et al. 2008; 2009)。しかしながら本調査地ではイエカ属の蚊は確認されていない。本調査地は比較的気温が低い高地であったため、媒介可能な昆虫が少ない、もしくは生息していない可能性があり、鳥マラリア原虫の感染率が比較的lowかったことと関連があると思われる。今回はベクターに関する調査を行っておらず、今後は蚊やブユなどの吸血昆虫の分布や原虫保有状況を検討する必要があると考える。

Kano and Kimura (1950) は、関東地域のスズメ目 41 種のうち 12.3% で、Murata (2002) は兵庫県神戸市郊外で保護されたスズメ目鳥類の 16.3% で *Leucocytozoon* 属原虫の感染を認めた。本章ではスズメ目鳥類の 13.5% で *Leucocytozoon* 属原虫の感染を認めた。とりわけ 10 個体以上捕獲できた鳥種のうち、樹洞営巣性であるヒガラおよびコガラにおける *Leucocytozoon* 属原虫の感染率は、それぞれ 64.3% および 81.8% と比較的高く、これら 2 種の鳥類は、一般にベクターと考えられているブユに吸血されやすい可能性が示唆された。Hellgren et al (2008) は、ベクタ

一の吸血嗜好性は媒介する *Leucocytozoon* 属原虫の系統に関連することを示した。つまり、宿主鳥類種、ブユ種、寄生する原虫系統の三者間で特異な関連性があり、ベクターの吸血嗜好性は宿主鳥類の感染率に影響することを示唆している。本調査地では調査期間にベクター候補となるブユが生息していることは確認したが、捕獲して種同定や原虫保有状況は調べていない。しかしながら、先述の 2 種の鳥類に見られた *Leucocytozoon* 属原虫の高感染率は、森林地帯における特定のブユ種の嗜好性による可能性がある。日本では日本アルプスに生息するブユの吸血対象鳥種が同定され、さらにブユから *Leucocytozoon* 属原虫の DNA が検出されているため、各種のブユが *Leucocytozoon* 属原虫のベクターとなることが示されている (Sato et al. 2009; Imura et al. 2010)。これらの知見から、本調査地に生息するブユからも同様に原虫の遺伝子が検出される可能性がある。*Leucocytozoon* 属原虫の感染を高める機構や要因を明らかにするためには、本調査地のような高標高地において各種ブユの原虫保有状況を明らかにし、ブユの吸血嗜好性を調べる必要がある。

分子系統解析の結果、様々な系統の *Leucocytozoon* 属原虫が森林性鳥類に感染しており、いくつかの宿主-寄生虫間の関連性が明らかになった。例えば、ある系統の *Leucocytozoon* 属原虫が複数種の鳥類から検出され、相対的に宿主特異性が低いことがわかる (図 2-1; 灰色部)。一方で、多くの個体のヒガラから検出される系統が存在し(図 2-1; Paat5-9)、宿主特異性が高いと想定される。Hellgren et al

(2008)はベクターの宿主鳥類に対する吸血嗜好性は寄生虫の伝播域を限定し、特定の原虫-宿主鳥類の関連性を形成すると述べている。今後ブユが保有する原虫の系統を特定し、さらにブユの吸血対象動物を推定することで、本調査地のような森林地帯における寄生虫の複雑な感染動態を解明できると考えられる。今回検出された原虫系統はデータベースに登録されている国内で検出された原虫系統とは一致しなかった。国内各地から検出される原虫の遺伝子情報がさらに充実すれば、これら原虫の系統解析によって地域の宿主鳥類に感染する各種原虫系統の地理的分布と地域環境要因との関連性をより詳細に解明することができると考えられる。

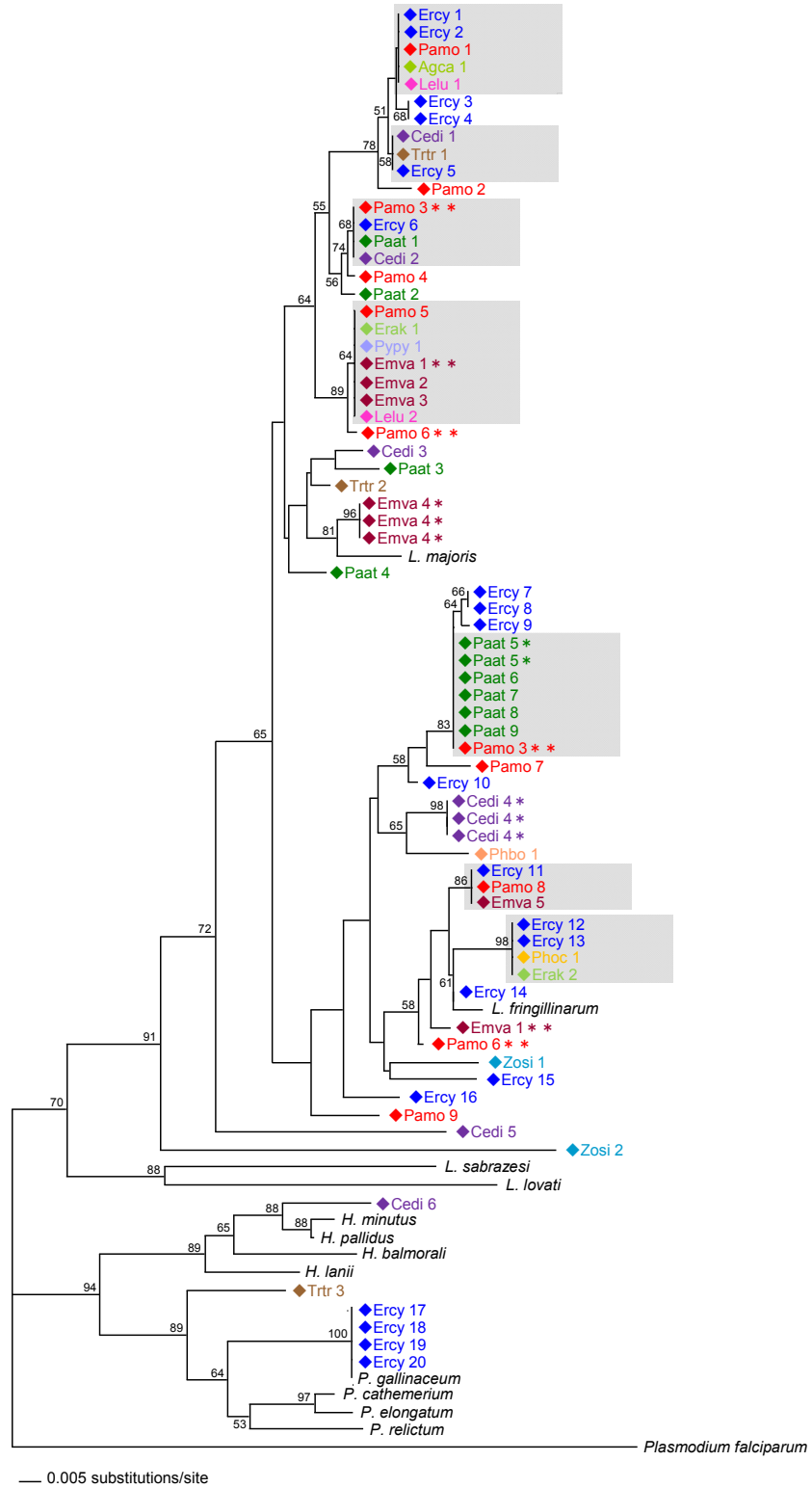
本章では再捕獲個体の原虫感染状態を追跡することで各種 *Leucocytozoon* 属原虫の感染動態について重要な知見が得られた。再捕獲 26 個体のうち、6 個体が PCR 陽性であった。そのうち 3 個体（ウグイス、ヒガラ、クロジの各 1 個体ずつ）において長期的に同一系統の原虫が検出されたことから、これらの鳥類は各原虫の慢性感染状態であると考えられた。ヒガラにおいて最低 14 か月間にわたって同一系統の原虫が検出されたことから(Fig. 1; Paat5, collected dates not shown)、この鳥種は本調査地においてその原虫系統の長期的なレゼルボアとなり得る。ヒガラ 1 個体で再捕獲時に PCR 結果が陰転し、この個体は感染した原虫を排除したか、寄生率が検出限界以下に低下したことを示している (Knowles et al. 2010)。その他の PCR 陽性の再捕獲 3 個体（コガラ 2 個体、クロジ 1 個体）では 2 系統の

Leucocytozoon 属原虫が検出されたため、混合感染の状態にあることが示唆された。今回の調査ではそれぞれの原虫種を形態的に同定するには至らなかったが、DNAの塩基配列解読時に部分的なダブルピークが見られたため混合感染であると考えた。

2.5 小括

本章では3年間にわたる日本国内の高標高森林地域に生息する野鳥における3属原虫の保有状況を明らかにした。今回のような定点長期観測の分析情報は、鳥類個体群における原虫保有状況だけでなく、血液原虫の感染状況とベクターとなる節足動物のような環境要因との関連性を明らかにする。さらに本調査環境は個体ごとの観察と再捕獲が可能であり、森林地帯の野鳥における個体ごとの長期的な感染状態を知ることができる。特定の地域における原虫感染状況の長期的モニタリングにより、血液原虫の季節変動や新たな原虫の侵入時期および伝播様式などの情報が得られ、新興のベクター媒介性感染症の発生や伝播に関連する重要な知見を得ることができる。環境要因と血液原虫感染の関連性をさらに理解するには、ベクターの分布状況など環境の変化を含めた血液原虫の長期的変動を調査することが必要となる。

図 2-1. 秩父の森林地帯に生息する野鳥から検出された原虫の分子系統関係



系統樹は *cytb* 部分遺伝子(305bp)に基づいて作製した。原虫のシーケンス名は検出された宿主鳥類の種名と個体番号で示す。略称は以下の通り ; Cedi; *C. diphone*, Phoc; *Phylloscopus occipitalis*, Phbo†; *Phylloscopus borealis* or *P. xanthodryas* (Alstrom et al., 2011), Zosi; *Zoothera sibiricus*, Lelu; *Leiothrix lutea*, Erak; *Erithacus akahige*, Ercy; *Erithacus cyanurus*, Agca; *Aegithalos caudatus*, Paat; *Parus ater*, Pamo; *Parus montanus*, Trtr; *Troglodytes troglodytes*, Emva; *Emberiza variabilis*, and Pypy; *Pyrrhula pyrrhula*.

表 2-1. 秩父の森林地帯に生息する鳥類における原虫 PCR 結果

Order	Bird species		Number of birds examined	Number of PCR positive	Parasite	
	Family	Species			<i>Plasmodium/Haemoproteus</i>	<i>Leucocytozoon</i>
Passeriformes	Muscicapidae	<i>Cettia diphone</i>	66	8	1	7
		<i>Phylloscopus occipitalis</i>	15	1		1
		<i>Phylloscopus borealis</i>	6	1		2
		<i>Zoothera sibiricus</i>	2	2		2
		<i>Leiothrix lutea</i>	66	2		2
	Prunellidae	<i>Erithacus akahige</i>	10	2		2
		<i>Erithacus cyanurus</i>	214	20	4	16
		<i>Erithacus cyane</i>	11	1		
	Aegithalidae	<i>Aegithalos caudatus</i>	53	22		22
	Paridae	<i>Parus ater</i>	24	18		18
		<i>Parus varius</i>	1	0		
		<i>Parus montanus</i>	21	18		18
	Troglodytidae	<i>Troglodytes troglodytes</i>	14	3	1	2
	Emberizidae	<i>Emberiza variabilis</i>	14	5		5
	Fringilidae	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	1	1		1
	Sittidae	<i>Sitta europaea</i>	1	0		
	Turdidae	<i>Erithacus calliope</i>	1	0		
<i>Turdus naumanni</i>		1	0			
Falconiformes	Accipitridae	<i>Accipiter nisus</i>	1	0		
total		19 species	522	105	8 (1.5%)	98 (18.8%)

第 3 章

Leucocytozoon 属原虫の媒介昆虫種の推定

3.1 はじめに

鳥類血液原虫は各種節足動物により伝播されるが、*Leucocytozoon* 属原虫は双翅目のブユ (Simuliidae) やヌカカ (Ceratopogonidae) などの吸血性昆虫がベクターとなり鳥類に感染する (Atkinson and van Riper 1991; Valkiunas 2005)。日本ではニワトリにおける *L. caulleryi* の感染が獣医学上問題となっており、ニワトリヌカカ (*Culicoides arakawae*) により媒介されることが明らかになっている (Akiba 1960)。国内に生息する各種野鳥には *L. caulleryi* 以外の *Leucocytozoon* 属原虫が感染しており (Murata 2002; Hagihara et al. 2004; Murata et al. 2007)、第 2 章で示したように高標高森林地帯に生息する野鳥にも多様な *Leucocytozoon* 属原虫が感染することが明らかになっている (Imura et al. 2012)。海外では野鳥におけるロイコチトゾーンの感染サイクルが明らかになっており、宿主鳥類、原虫および媒介昆虫 (ブユ) との間にある程度の特異的關係が認められている (Hellgren et al. 2008)。しかしながら、国内ではロイコチトゾーンの媒介昆虫種はニワトリヌカカを除いて未だ十分に明らかにされていない。

鳥マラリア原虫 (*Plasmodium*)、*Haemoproteus* 原虫および *Leucocytozoon* 属原虫では、ベクターが感染鳥類を吸血し、感染血液がベクター体内に取り込まれ、原虫が感染期虫体であるスポロゾイトへ発育し、次回吸血時に新たな宿主鳥類へ原

虫を伝播する (Valkiunas 2005)。そのため、鳥類血液寄生原虫のベクター候補となる節足動物が病原体を媒介することを明らかにするためには、1) 節足動物がスプロゾイトのような感染期の原虫虫体を保有すること、2) 病原体の宿主となる鳥類種を吸血すること、をそれぞれ確認する必要がある。

これまで、国の特別天然記念物であるニホンライチョウ (*Lagopus mutus japonicus*) にロイコチトゾーン原虫の一種、*Leucocytozoon lovati* の感染が認められ (Hagihara et al. 2004; Murata et al. 2007)、ニホンライチョウが生息する山系に分布するアシマダラブユ (*Simulium japonicus*)、ウチダツノマユブユ (*S. uchidai*) およびオオブユ群 (*Prosimulium hirtipes* group) に分類されるブユから、*L. lovati* の DNA が検出された (Sato et al. 2009)。よって、これらのブユ類がニホンライチョウに寄生する *L. lovati* のベクターである可能性が示唆されたが、ブユ類がニホンライチョウを吸血していることは確認されていない。国内のロイコチトゾーン原虫については、鳥類における感染は数多く報告されているが、*L. caulleryi* および *L. lovati* 以外のベクターに関する情報、特にベクター候補であるブユにおける吸血対象動物についてはほとんど知られていない。ロイコチトゾーン原虫を含む鳥類血液原虫の感染サイクルの解明は、ニホンライチョウなどの希少鳥類の保全における感染症の影響を評価する際や、国外から持ち込まれた展示鳥類が国内で新たに血液寄生原虫に感染するリスクを考える際に重要な情報となる。そこ

で本章では、ニホンライチョウが分布する北アルプスに生息するブユを採取し、吸血対象動物を明らかにすることにより、*L. lovati*の感染サイクルの解明を試みた。

3.2 材料および方法

ブユの捕集 2004年から2007年の間、日本アルプスの7つの山系（朝日岳、蝶が岳、立山、爺が岳、乗鞍、北岳、仙丈ヶ岳）で人囿法によりブユを捕集した。捕集したブユは形態的に同定し、DNAを抽出するまでエタノール中に保存した。サンプルからのDNA抽出 DNA抽出の際は1%SDS溶液に浮遊させ、顕微鏡下で個体ごとに解剖し、外殻を取り除いて虫体内容物を回収した。DNAの抽出はDNAeasy kit (QIAGEN)を用いた。

3.2.1 PCRによる吸血源動物ミトコンドリア遺伝子の増幅

3.2.2で抽出したDNAのうち、蝶が岳で捕集した一部のブユに由来するDNAを用いて鳥類のミトコンドリアチトクローム *b* 遺伝子部分領域を標的にした nested-PCRを行った。F1: 5' -GAC TGT ATA AAA TTC CAT TCC ACC CAT AC-3' および R1: 5' -CTT TGG TTT ACA AGA CCA ATG TTT T-3' を1st PCRプライマーに用い、F2: 5' -CCC CAG CAA ACC CAC TAG TAA CCC C-3'

および R1 を 2nd PCR プライマーに用いた。これらのプライマーセットはデータベースに登録されている鳥類ミトコンドリアチトクローム *b* 遺伝子の部分塩基配列を比較して、保存性の高い領域から設計した。また、哺乳類の同遺伝子領域を標的にした PCR も実施した。使用したプライマーは Sawabe et al 2010 により設計された。

PCR は、 $2.5 \mu\text{l}$ の $10\times$ Ex-Taq buffer (Takara, Ohtsu, Japan)、 2.5 mM の MgCl_2 、 $400 \mu\text{M}$ の each deoxynucleotide triphosphate、 $0.4 \mu\text{M}$ の each primer、 1 U の Ex-Taq (Takara)、 $1 \mu\text{l}$ の DNA template を含む $25 \mu\text{l}$ の反応溶液中で行われた。PCR 反応は、 94°C で 2 分間熱処理した後、 94°C で 30 秒間の熱変性、 55°C で 30 秒間のアニーリング、および 72°C で 60 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして、30 サイクル行った。また、すべてのサイクルが終了した後、 72°C で 10 分間の最終伸長反応を行った。2nd PCR 反応は 1st PCR 産物を $1 \mu\text{l}$ 使用し、同反応条件で 35 サイクル行った。

3.2.2 電気泳動

電気泳動は 2.2.4 に準じ、増幅産物の有無を確認した。

3.2.3 ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定

PCRにより原虫および吸血源動物のミトコンドリア遺伝子の増幅が認められたサンプルについて、2.2.5に準じてDNAの塩基配列を決定した。遺伝子解析原虫遺伝子のシーケンスデータは2.2.6に準じてコンティグ結合し、分子系統樹の作製および内部枝の支持値を算出した。吸血源動物のシーケンスデータについても同様にコンティグ結合し、決定された塩基配列をBLASTn searchesにてGenBank nucleic acid sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)に登録されている塩基配列のデータと比較し、塩基配列の相同性と吸血蚊が捕集された調査地周辺の動物相を考慮し、増幅された塩基配列の脊椎動物種を決定した。さらにKimura-2-パラメーターを用いて各サンプル間の遺伝子距離を推定し、それに基づき近隣接合法 (Neighbor-joining: NJ) を用いて分子系統樹を作成し、系統樹の内部枝の統計的支持値をブートストラップ法 (1,000回反復) により算出した。

3.3 成績

ブユの捕集結果捕集されたブユは合計 490 個体であった。形態学的にすべて雌成虫であり、6種 (*Prosimulium hirtipes* group オオブユ群(n=59), *P. mutata* ツバメハルブユ (n=13), *P. jezonicum* キタオオブユ (n=24), *P. yezoense* キアシオオブユ (n=10), *Simulium japonicum* アシマダラブユ(n=359), *S. uchidai* ウチダツ

ノマユブユ(n=39), および *Twinnia japonensis* クロオオブユ (n=10) (Table 1)が存在することが分かった。*P. hirtipes* group には *P. kiotoense* および *P. jezonicum* が含まれるが (Umemoto et al. 1973)、今回はそれらを分類することができず、*P. hirtipes* group とした。

3.3.1 ブユの吸血源動物の遺伝子増幅結果および分子系統関係

捕集されたブユのうち、本章では 3 属 5 種 144 個体 (*S. japonicum* (n=87), *P. hirtipes* (n=48), *P. yezoense* (n=3), *Cnephia mutata* (n=3), および *P. novum* (n=3) について吸血源動物を検討した (表 3-1)。144 個体のうち、34 個体において鳥類の遺伝子が検出され、哺乳類の遺伝子は検出されなかった。増幅された鳥類遺伝子の塩基配列は 5 つに分類され (図 3-1)、1 つ(type 1; 11/34)はニホンライチョウと高い類似性を示し、その他の系統(types 2-5; 23/34)は登録されているどの鳥類遺伝子とも一致しなかったが、Type 2,3,4 はキジ科に、Type 5 はキツツキ目に分類された。

3.4 考察

L. caulleryi を除く国内のロイコチトゾーン原虫のベクターについては、これま

でアシマダラブユ、ウチダツノマユブユおよびオオブユから *L. lovati* の遺伝子が検出されたことから、これらのブユがニホンライチョウに原虫を媒介している可能性が示唆されている (Sato et al. 2009)。ヨーロッパでは PCR 法により吸血ブユから多系統の *Leucocytozoon* 属原虫が検出されており、原虫保有率は 62% で、宿主鳥類、寄生虫、ベクターの三者間に特異な関連性を見出した (Hellgren et al. 2008)。国内ではブユの吸血源動物については十分に明らかにされておらず、ブユにおける原虫保有状況のみでは感染サイクルを確認できなかった。今回、144 個体の雌成虫ブユのうち、4 種 34 個体において 5 つの型の鳥類遺伝子が検出され、一つはニホンライチョウと高い相同性を示した。日本には 60 種以上のブユが生息しており、これまでに 15 種のブユが哺乳類および鳥類を吸血することが示唆されてきた (Sasaki et al. 1985; 1986; 1988)。今回新たに 3 種 (ツバメハルブユ、オオブユ、クロオオブユ) のブユが鳥類を吸血していることが示唆され、さらに 3 種 (アシマダラブユ、ツバメハルブユ、オオブユ) のブユが *L. lovati* の宿主であるニホンライチョウを吸血していることが示唆された。これまでに、日本アルプスに生息するニホンライチョウが *L. lovati* に感染しており (Hagihara et al. 2004; Murata et al. 2007)、同地域のブユから *L. lovati* およびニホンライチョウの遺伝子が検出され (Sato et al. 2009)、さらに今回ブユがニホンライチョウを吸血したことが示唆された。よって、調査地域では、原虫に感染したニホンライチョウをブ

ユが吸血して *L. lovati* を媒介していることが強く示唆された。各種ブユから *L. lovati* の遺伝子が検出されているが、さらにニホンライチョウにおける *L. lovati* のベクター種を明確に示すためには、ブユ体内においてスポロゾイト期原虫を確認する必要がある。

Hellgren et al.(2008)は、吸血ブユから原虫遺伝子を検出することで *Leucocytozoon* 属原虫のベクターであるブユと宿主鳥類の間の感染サイクルを明らかにし、各種の宿主鳥類-ベクター-原虫の特異な関係を示した。本章で吸血源動物種が推定できたブユのうち、2種からはこれまでに *L. lovati* の遺伝子が検出されているが (Sato et al. 2009)、同一個体から原虫遺伝子は検出されていないため、既報のような直接的な宿主-原虫間の関連性を示すことはできなかった。

これまでに PCR 法や抗体を利用した手法によりベクターとなる節足動物の吸血源動物種が推定されてきた (Malmqvist et al. 2004; Sasaki et al. 1988)。ニュージーランドでは蚊から吸血源動物の遺伝子を検出することで移入鳥類から留鳥への鳥マラリア原虫伝播経路が同定されている (Massey et al. 2007)。ベクター節足動物の吸血嗜好性は病原体の伝播に大きく関連するため、ベクターの吸血嗜好性は多くの野生動物の感染症疫学にとって重要な要因と考えられる。本章では PCR によりブユから検出した鳥類チトクローム *b* 遺伝子のすべてを種まで同定できなかったが、データベース上で一致する鳥類遺伝子配列が存在しなかったためであり、日

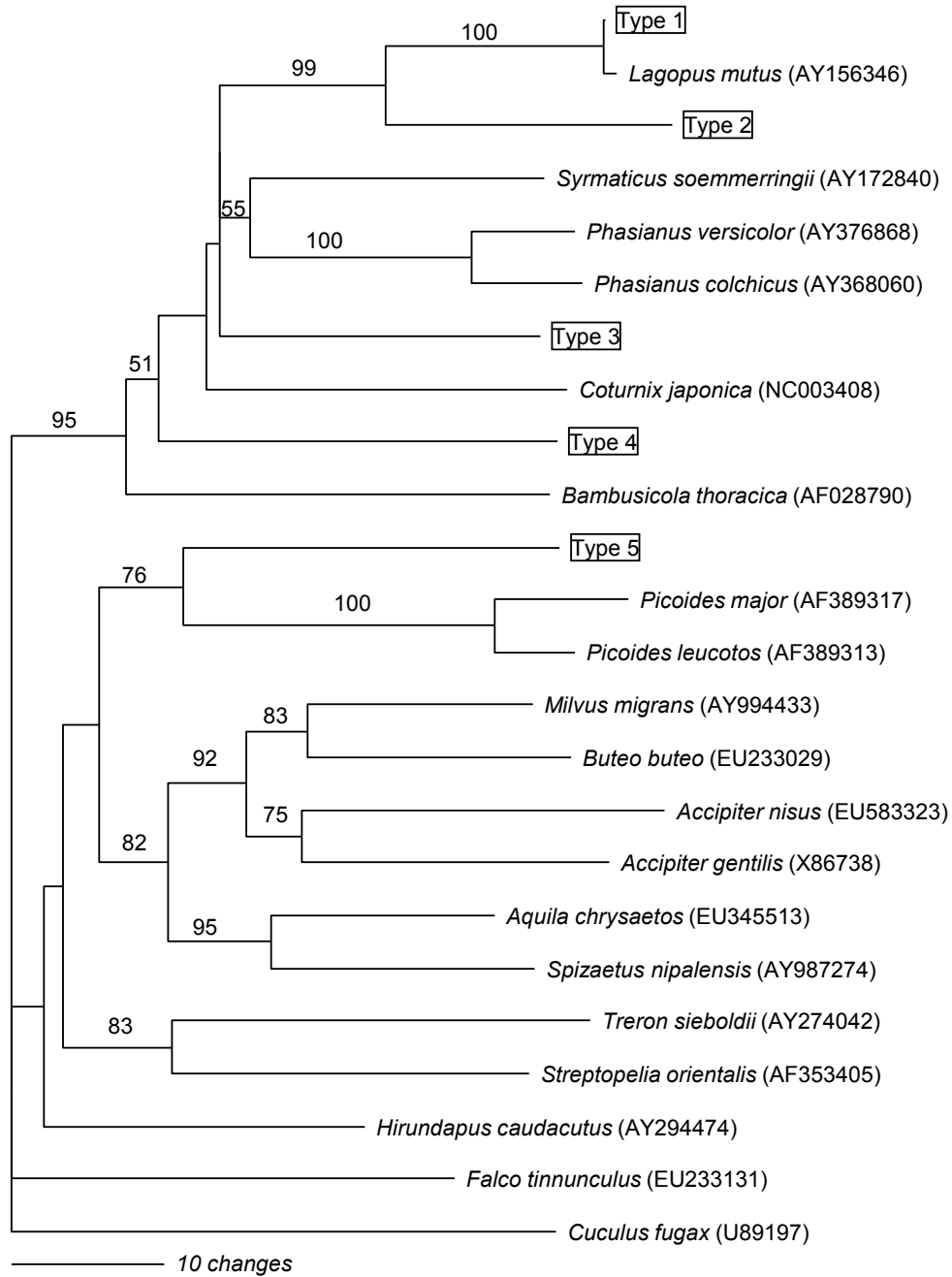
本アルプスに生息する各種鳥類のゲノム情報を収集することで、吸血源鳥種の同定が可能になると考えられる。国内のブユは、ロイコチトゾーン原虫だけではなく、各種フィラリア線虫を媒介することが示唆されている (Takaoka 1994; Takaoka and Bain 1990; Takaoka et al. 1989; 1992; Fukuda et al. 2005)。媒介されるフィラリア線虫には、人獣共通感染性の *Onchocerca dewitiei japonica* が明らかになっており (Takaoka et al. 2012)、ブユの吸血対象動物種を明らかにすることは、野生動物の保全にだけでなく、公衆衛生学的な観点からも重要な知見が得られるため、今後も各地におけるブユについて各種調査を続けることが必要と考える。また、ニホンライチョウの生息域におけるベクターとなるブユ種の季節変動を調べることで、宿主に *L. lovati* を伝播する時期、すなわち感染リスクが高い時期を推定できる可能性がある。ブユの吸血嗜好性を理解することにより、病原体の宿主動物を吸血対象とするブユ種を特定して、効率良くブユが保有する病原体の疫学調査が可能になると考えられる。さらに、吸血源動物種の分布域は地域によっては明らかになっているため、ブユから検出される吸血源動物の DNA を指標に、ブユの活動(飛翔) 範囲を推定できる可能性もある。このことはブユによる病原体の拡散範囲を推定することにもつながるため、継続的に宿主の生息域で宿主とベクターの持つ病原体の分布状況を監視することが必要である。

3.5 小括

本章では、分子生物学的手法により国内のブユの吸血源動物種を初めて明らかにし、ブユが分布する山系に生息しているニホンライチョウなどの鳥類を吸血していることを示した。これらのブユからはニホンライチョウに寄生するロイコチトゾーン原虫 (*L. lovati*) の遺伝子が検出されており、ブユが本原虫のベクターとなることが強く示唆された。ニワトリで問題となる高病原性のロイコチトゾーン原虫 (*L. caulleryi*) 以外の本属原虫において、今回初めてベクター昆虫種が推定され、北アルプスにおける *L. lovati* の感染サイクルを明らかになった。これらのブユにおける原虫媒介能力を確認するためには、ブユ体内における感染期原虫（オーシストやスポロゾイト）の発育を確認する必要がある、今後の課題である。ベクター媒介性感染症の分布は、宿主動物およびベクターの生息環境と密接に関係しており、特にベクターの生息可能条件は地球温暖化による温度変化の影響を受けやすい。温暖化に伴いベクターの生息可能域が変化すれば、媒介される病原体の分布も広がる可能性があり、移動先でベクターが在来動物を吸血して感染症が拡大することも考えられる。その際に、ベクターとなる吸血昆虫の吸血行動などの基本的な生態を明らかにしておくことは感染症の予防のために重要であり、本研究成果は、ブユの吸血生態を解明することにより、ベクター媒介性感染症の制御に役立つ知見を提供したと

考える。

図 3-1. 蝶が岳に生息する鳥類およびブユから検出された鳥類遺伝子の系統関係



各シーケンス名を由来する鳥種名で示す。蝶が岳に生息する鳥類 *cytb* 遺伝子の部分配列を用い、近隣接合法により類縁関係を見た。四角で囲まれた Type1~5 は本調査でブユから検出された系統を示す。

表 3-1. 蝶が岳に生息するブユにおける鳥類および哺乳類遺伝子を 標的にした

PCR 結果

種	解析数	PCR陽性数	推定される吸血源動物種		
			ニホンライチョウ	その他の鳥類	哺乳類
アシマダラブユ (<i>Simulium japonicum</i>)	87	19	8	11	0
ツバメハルブユ (<i>Cnephia mutata</i>)	3	2	2	0	0
オオブユ (<i>Prosimulium hirtipes</i>)	48	12	1	11	0
クロオオブユ (<i>P. novum</i>)	3	1	0	1	0
キアシオオブユ (<i>P. yezoense</i>)	3	0	0	0	0
計	144	34	11	23	0

第4章

鳥類血液原虫アピコプラストのゲノム解析

4.1 はじめに

アピコンプレクス門 (Phylum Apicomplexa) は、マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum* など)、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*)、コクシジウム (*Eimeria tenella* など)、ピロプラズマ (*Theileria* や *Babesia* など) 等、医学および獣医学上重要な原虫種を含む分類群である。これらの原虫は、共通して特徴的な細胞内小器官、アピコプラスト (Apicoplast) と呼ばれる色素体遺残物を持っている (Foth and McFadden 2003; McFadden 2011)。このアピコプラストは藻類 (Algae) が原虫細胞内に共生した結果であると考えられており (Köhler et al. 1997)、ヘムやイソプレノイドなどの原虫の生存に必須な化合物の合成の場として重要であることが示されている (McFadden 2011; Ralph et al. 2004)。すなわち、アピコプラストを欠損させた *P. falciparum* は、イソプレノイド生合成産物やイソペンテニルピロリン酸を培地へ加えなければ生存できない (Yeh and DeRisi 2011)。よって、アピコプラストはマラリア原虫に対する有効な薬剤ターゲットになると考えられてきた。

アピコプラストはミトコンドリアと同様に独自のゲノムを保有しており、現在までに9種のマラリア原虫、さらに *T. gondii*, *E. tenella*, *Theileria parva*, および *Babesia bovis* のアピコプラストゲノムDNAの塩基配列が解明されている (Arisue

et al. 2012; Brayton et al. 2007; Cai et al. 2003; Gardner et al 2005; Lau et al. 2009; Williamson et al. 2001)。これまでに配列が明らかとなった *Plasmodium* 種 (*P. chabaudi chabaudi*を除く) のアピコプラストゲノムには、2つの rRNA 遺伝子(rrl, rrs)と 9つの tRNA(trnA(UGC), trnI(GAU), trnL(UAG), trnM(CAU), trnN(GUU), trnR(ACG), trnR(UCU), trnT(UGU), trnV(UAC))のセット が互いに逆向きに反復している特徴的な配列 (逆位反復配列、Inverted repeat; IR)が認められている(Arisue et al. 2011; Sato et al. 2013)。ピロプラズマ原虫 (*Babesia*, *Theileria*) では IR 構造は見られないが、コクシジウム類では確認されている。よって、アピコプラストの IR は現存するアピコンプレクス?門原虫の共通祖先が保有し、IR の片方はピロプラズマ目および *P. chabaudi chabaudi*に分岐する際に欠落した可能性が考えられる (Sato et al. 2013)。

鳥に寄生する *Leucocytozoon* 属原虫はアピコンプレクス門に属し、中でもニワトリで致死的な高病原性を示す *L. caulleryi*は養鶏産業に甚大な経済被害をもたらし、日本を含むアジア諸国を中心に分布している(Morii et al. 1981; Morii 1992)。近年の急速な分子生物学的解析手法の発展により、ヒトを含め様々な生物の全ゲノム情報が明らかになり、中でも病原体のゲノム情報は、感染症の診断・予防・治療薬の開発などに広く応用されている。原虫では熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) などの全ゲノムが解読され、解明されたゲノムの

塩基配列には治療薬やワクチンの開発に有用な情報が含まれていると期待されている (Gardner et al. 2002; Carlton et al. 2008)。一方、鳥類の血液寄生原虫については、*L. caulleryi*を含めて全ゲノムが明らかになった種はなく、ゲノム情報を基盤とした感染制御のために必要なデータがほとんど蓄積されていない。病原体のゲノム情報は、病原体の生物学的特徴を明らかにするだけでなく、遺伝子組み換えワクチンや遺伝子標的薬剤などの感染制御へ向けた技術開発基盤となる。*L. caulleryi*では、組み換えタンパクの接種による原虫に対する免疫賦与効果がニワトリで認められているが、抗原タンパクをコードするゲノム情報は明らかになっていない(Ito and Gotanda 2004; Ito et al. 2005)。また、これまで *L. caulleryi*のミトコンドリア全ゲノム情報およびアピコプラストゲノムの一部の配列情報が報告されているが(Omori et al. 2008)、マラリア原虫に比べ明らかになっているゲノム情報量は非常に少ない。原虫特有のアピコプラストのゲノム情報が明らかになれば、原虫の発育や生存に必須な分子機構を解明でき、宿主鳥類への影響が少ない薬剤ターゲットの候補分子の選定や有効なワクチンの開発など、原虫の感染制御へ向けた技術開発が可能になると期待される。そこで本章では、*L. caulleryi*を対象に、アピコンプレクス門原虫に特徴的な細胞小器官であるアピコプラストゲノムの全容解明を試みた。

4.2 材料および方法

新潟県の養鶏場で飼育されていた *L. caulleryi* 感染ニワトリ血液から抽出した DNA を材料とした。これまでに、Omori et al. (2008)が明らかにした *L. caulleryi* のアピコプラストゲノムの部分配列およびデータベースに登録されている既知の *Plasmodium* spp. のアピコプラスト DNA の塩基配列を参照して設計したプライマーを用いて、*L. caulleryi* DNA からアピコプラストの DNA 部分配列を PCR により増幅した。各増幅断片の塩基配列は既報と同様にダイレクトシーケンスにより決定した(Omori et al. 2008)。

PCR で増幅されなかった領域については、Paired End Sample Prep Kit (Illumina)を用いてゲノムライブラリを構築し、Genome Analyzer IIx (Illumina)を用いたハイスループットシーケンシング法により配列を決定した。多数得られたシーケンスリードから、特に配列決定が困難な IR 部分について、この領域の末端に位置する t RNA (trnI) に一致するリードを NCBI のデータベースから BLASTN プログラムで検索した。得られたリードは Clustal X プログラムによりアライメントを行い、既報の配列断片および前述の PCR ダイレクトシーケンス法で得られた塩基配列も加え、全領域の推定配列を構築した。

既報種との比較により、今回構成した *L. caulleryi* のアピコプラストゲノム全塩

基配列上にコードされていると考えられる各tRNAの位置とアンチコドンは、tRNAscan-SE server (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)により推定した。その他のすべての遺伝子は*P. falciparum*との相同性からアノテーションを付与した。今回得られた*L. caulleryi*のアピコプラストゲノムと7種のアピコンプレクス門原虫(*P. falciparum*, *P. gallinaceum*, *P. berghei*, *Theileria parva*, *B. bovis*, *E. tenella*, および *Toxoplasma gondii*)の分子系統関係は、紅藻の一種 (*Chromera velia*) をアウトグループにして10の遺伝子 (rpl 2, 6, 14, 16, rps 2, 3, 11, 12, tufA, および rpoB) を連結させた2,478個のアミノ酸配列を用いて作成した。Clustal Wプログラムにより配列のアライメントを行い、系統樹はMEGA5 (<http://www.megasoftware.net>)ソフトウェア上でJTT+G+ Γ モデルを用いた最尤法 (Maximum likelihood method) により作製した。系統樹の内部枝の統計的支持値はブートストラップ法 (1,000回反復) により算出した。

4.3 成績および考察

今回、*Leucocytozoon caulleryi*のアピコプラスト全ゲノムの塩基配列が明らかになったなお得られた塩基配列情報はGenBankに登録しアクセッション番号(AP01307)を取得した。今回明らかになった*L. caulleryi*のアピコプラストゲノム

DNA は全長 34,779 塩基対であり、AT 含量は 85.1%であった(表 4-1)。この AT 含有量は既報の他のアピコンプレックス門原虫のアピコプラストゲノムと同様であった。ゲノム構造が明らかになっている *P. falciparum* と遺伝子の配置が同様であったことから、*L. caulleryi* のアピコプラストゲノムは *T. gondii* などのように直鎖状の繰り返し配列ではなく、環状 DNA 構造であると推定された(Williamson et al. 2001; 2002)。また、*Plasmodium* や *Eimeria* と同様に、*L. caulleryi* は全体の 3 分の 1 を占める IR 領域が認められた (図 4-1)。今回、*L. caulleryi* のアピコプラストの全ゲノム領域のほとんどを PCR 法により増幅することができたが、2 つの IR が連結する領域は増幅が認められなかった。この領域が PCR 反応における伸長反応を妨げるような特異な構造をしている可能性が考えられ、*E. tenella* でも同様に増幅が認められず、“tip region”として言及されている(Cai et al. 2003)。今回はこの領域については PCR 法によらず、ハイスループットシーケンシング技術を用いて抽出した原虫の全ゲノムのシーケンスを得られたため、IR 末端 (tip region) に一致するシーケンスリードを見出すことができた。確認されたリード配列は IR 間の 13 塩基対のギャップに相当し、完全長のアピコプラストゲノム配列が得られた。*L. caulleryi* の各 IR 領域の塩基長は 5,253 塩基対であり、1 つの large ribosomal RNA および small ribosomal RNA、9 つの tRNA (trnA(UGC), trnI(GAU), trnL(UAG), trnM(CAU), trnN(GUU), trnR(ACG), trnR(UCU),

trnT(UGU), and trnV(UAC))がコードされていると推定されたが、蛋白をコードする遺伝子は認められなかった。これらの特徴は既報の IR 領域を持つすべてのアピコンプレクサ門原虫に共通している。*L. caulleryi* のアピコプラストゲノム全体では、30 個の蛋白をコードする遺伝子、そして IR 領域の外に 16 個の tRNA が認められた。また、本ゲノム中の遺伝子の種類構成と配置は *P. falciparum* とほぼ同じであり、唯一 *P. falciparum* で rps5 と rpl36 の遺伝子間に認められる ORF91 遺伝子(Wilson et al. 1996)は *L. caulleryi* では認められなかった。興味深いことに、この ORF91 は各種 *Plasmodium* 原虫でアミノ酸配列が完全に保存されている一方、*Eimeria tenella* やピロプラズマ原虫、さらに今回明らかになった *L. caulleryi* のアピコプラストゲノムでは欠落している (表 4-1)。ORF91 の遺伝子としての機能や発現は不明であるが、マラリア原虫では核外ゲノムの遺伝子が核ゲノム上に移転し、その遺伝子産物をミトコンドリアやアピコプラストへ供給していることが知られている (Waller et al. 1998; Jomaa et al. 1999; Surolia and Surolia 2001; Roos et al. 2002)。 *Plasmodium* 以外の原虫種のアピコプラストゲノムに ORF91 が存在しないことは、ORF91 が関係する機能が喪失している可能性が示唆され、種の生物学的特徴の違いに関係していることも考えられる。既知のアピコプラストゲノムにも認められているが、*L. caulleryi* においても、複数のサブユニットタイプからなる RNA ポリメラーゼである rpoC2 のオープンリーディングフレーム内

には UGA コドン (終止コドン) が認められ、転写が中断される可能性が示唆される。*P. falciparum* の rpoC2 は、翻訳時に連続したポリペプチドを産生することが示唆されている (Wilson et al. 1996)。トキソプラズマ原虫

(<http://roos.bio.upenn.edu/~rooslab/jkissing/toxomap.html>) や *Eimeria tenella* (Cai et al. 2003) とは異なり、*L. caulleryi* のアピコプラストゲノム内には ORF91 以外にオープンリーディングフレーム内に終止コドンは認められなかった。

連結アミノ酸配列を用いた系統解析により *L. caulleryi* のアピコプラストゲノムは *Plasmodium* と最も近縁であることが示唆された (図 4-2)。さらに本原虫のゲノム内の遺伝子の種類および配置が *Plasmodium* と類似していることから、*L. caulleryi* のアピコプラストは *Plasmodium* と同様の機能を持つ可能性が高いと考えられる。アピコプラストは、ヘムやイソプレノイドのような原虫の生存に重要な化合物合成の場となっている。ヘムは呼吸鎖を構成するシトクロム類などのヘムタンパク質の構成に重要な補欠分子族で、細胞内で産生される (Hamza and Dailey 2012)。一般に動植物では細胞質とミトコンドリアでヘム合成が行われているのに対し、マラリア原虫ではアピコプラストが合成経路の一端を担っている (Sato et al. 2004)。この宿主には存在しない細胞内小器官における特異的なヘム合成経路は、抗原虫薬のターゲットとなり得ると考えられる。ヘム合成系に対するアピコプラストゲノム遺伝子の関与はマラリア原虫においても不明であり、今後は本ゲノムの機

能について解析する必要がある。マラリア原虫と比べて、鳥類血液寄生原虫はゲノム情報の解析が不十分であり、本研究は感染防御の標的となる有用遺伝子検索のための基礎情報の蓄積に貢献したと考える。

4.4 小括

本章では鳥類血液原虫の1つである *L. caulleryi* のアピコプラストゲノムの全塩基配列を初めて決定し、遺伝子の構成や配置などゲノムの全容を明らかにした。

L. caulleryi のアピコプラストゲノム DNA は全長 34,779 塩基対であり、これまで全配列が明らかになっている熱帯熱マラリア原虫のアピコプラストゲノムとほとんど同一の遺伝子構成であることが示唆された。また、本ゲノムで特徴的な構造である逆位反復配列 (Inverted repeat; IR) が認められ、さらに熱帯熱マラリア原虫では確認されていなかった2つの IR 間の塩基配列も決定され、完全長のアピコプラストゲノム DNA の塩基配列が得られたと考えられた。これらのゲノム情報は原虫の分子疫学や分子進化を推定する際に有用であり、今後はまだほとんど解析されていない鳥類血液原虫の核ゲノム情報を収集することにより、鳥類血液原虫の生存機能の分子基盤の解明につながり、感染制御を目指したワクチン開発や有望な薬剤ターゲットの候補を選定することが可能となると期待される。

図 4-1. *L. caulleryi* のアピコプラストゲノム構造

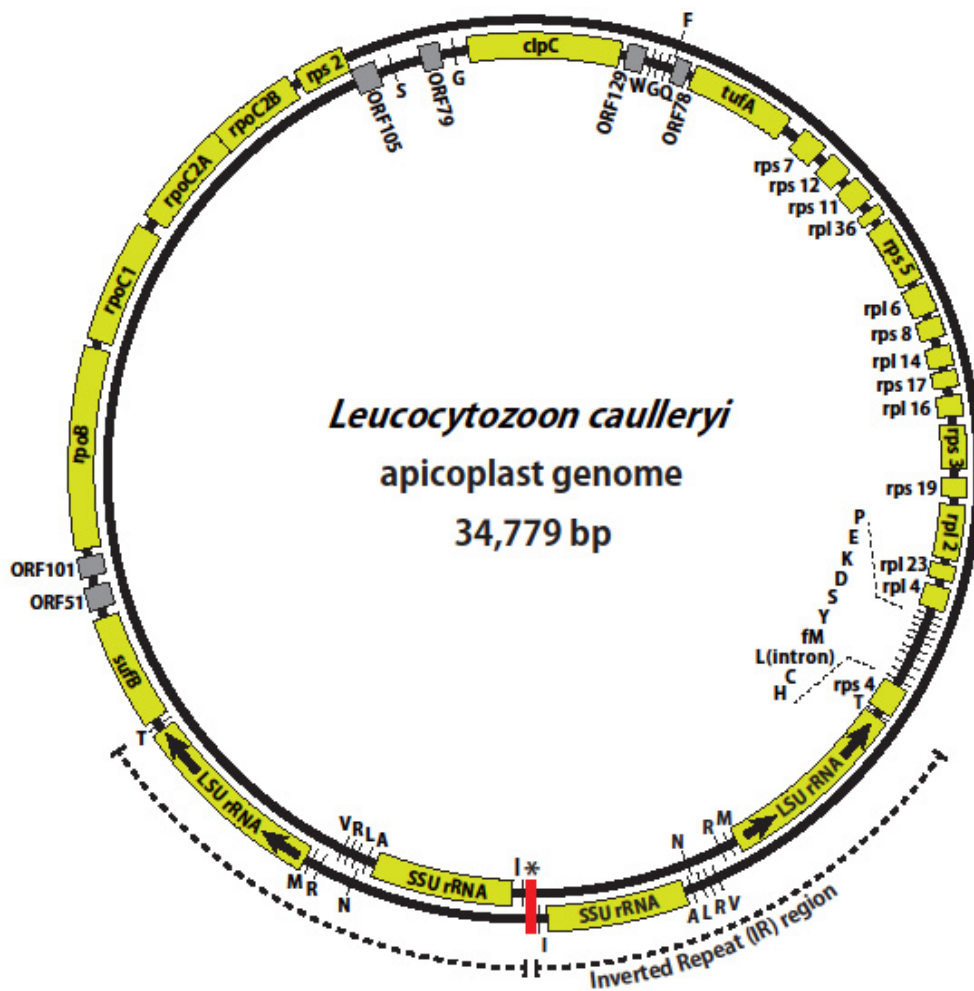


図 4-2. アピコプラストゲノムの系統関係

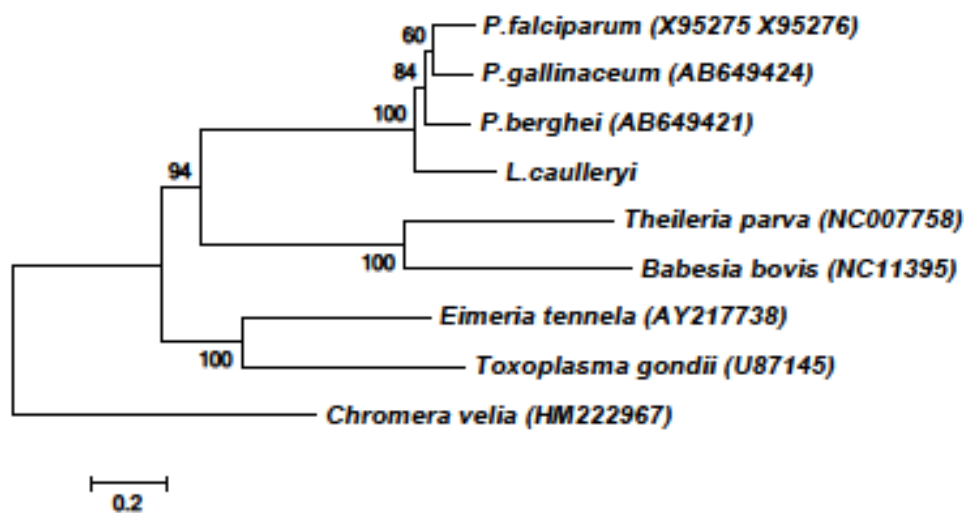


表 4-1. アピコンプレクサ門原虫のアピコプラストゲノム構成の比較

Table 1. Comparison of apicomplast genomes.

Species	<i>Leucocytozoon caulleryi</i> Niigata	<i>Plasmodium falciparum</i> C10	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> CB	<i>Toxoplasma gondii</i> RH	<i>Eimeria tenella</i> Penn State	<i>Theileria parva</i> Muguga	<i>Babesia bovis</i> T2Bo
Complete/partial	Complete	Partial	Complete	Complete	Complete	Complete	Complete
Size (bp)	34,779	34,682	29,623	34,996	34,750	39,579	33,351
A+T(%)	85.1	86.9	86.3	78.6	79.4	80.5	78.2
IR ^z	+ ^a	+	-	+	+	-	-
Protein ^{b,c}	30	31	31	29	29	32 ^d	30 ^e
<i>clpC</i> ^b	1	1	1	1	1	2	2
<i>stfB</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>rpl23</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>ORF91</i>	-	+	+	-	-	-	-
rRNA ^b	2 ^f	2 ^f	2	2 ^f	2 ^f	2	2
tRNA ^b	25 ^g	25 ^g	26 ^h	24 ^g	24 ^g	24 ⁱ	24
<i>trnG</i> (ACC)	+	+	+	-	-	-	-
Intron in <i>trnL</i> (UUA)	+	+	+	+	-	+	+
In-frame stop codon ^j	-	-	-	+	+	-	-
Coding strand	Both	Both	Both	Both	Both	One	One
Accession number	AP013071	X95275, X95276	HF563595	U87145	AY217738	NC 007758	NC 011395

z Inverted repeat.

a +, present; -, absent.

b Number of different products encoded.

c *rpoC2* is counted as two separate proteins (*rpoC2A* and *rpoC2B*).

d Excluding those specified by 12 repetitive genes predicted between *rpoC1* and *rpoC2A*.

e Excluding products of repetitive genes BBOV_V000300, BBOV_V000310, BBOV_V000320, BBOV_V000180, BBOV_V000200 and BBOV_V000210.

f The gene for each is present in IR and duplicated.

g Genes specifying 9 tRNA species (tRNA-Ala(UGC), Arg(ACG), Arg(UCU), Asn(GUU), Ile(GAU), Leu(UAG), Met(CAU), Thr(UGU) and Val(UAC)) are present in IR and duplicated.

h Two genes encode different versions of tRNA-Thr. The gene for tRNA-Met is duplicated.

i Five genes encode the same tRNA-Met(CAU).

j Exclude the hypothetical one connecting *rpoC2A* and *rpoC2B*

第5章

総括

鳥類の血液に寄生する鳥マラリア(*Plasmodium*, *Haemoproteus*)原虫やロイコチトゾーン(*Leucocytozoon*)属原虫は、蚊やブユなどの吸血性昆虫により媒介され、原虫種によっては感染した宿主鳥類が貧血や衰弱などの症状を呈し死亡することもある。これらの原虫は国内の各種鳥類でも感染が見られ、養鶏産業への被害や飼育下鳥類の致死的影響が報告されており、獣医学上重要な病原体である。

鳥類血液原虫は、これまでに 200 種以上が世界中の宿主鳥類で感染が認められている。多くは不顕性であると考えられているが、抵抗性を持たない鳥類に原虫が感染した場合、個体群に壊滅的な影響を及ぼすことが知られている。近年の地球温暖化によるベクター昆虫の生息可能範囲拡大に伴い、媒介される原虫の分布状況も変化し、原虫との接点がなかった地域の鳥類個体群への影響が懸念される。そのため、現時点における各地の鳥類に感染する原虫種や分布状況、媒介昆虫種などの情報を収集し、原虫の伝播機序を解明することが重要となる。

近年、ヒトマラリア原虫の全ゲノム情報が明らかになり、原虫の生存に関わる様々な分子機構が解明され、分子疫学的調査や原虫特異的分子機構を標的としたワクチン開発などの感染防除対策に応用されている。一方、鳥類血液原虫では、一部の種でミトコンドリアゲノム情報が調べられているが、ヒトマラリア原虫に比べて原虫の生物学を理解するための分子基盤の解明は進んでいない。原虫の分子生物学的特徴が明らかになれば、分子マーカーを用いて原虫の感染状況を調査したり、効

率的に原虫の発育を制御する手法の開発が可能となるなど、原虫の伝播機構および感染制御へ向けた分子基盤の解明につながると期待される。

これまで、国内の宿主鳥類およびベクター昆虫における原虫保有状況や吸血活動が明らかにされてきたが、原虫の感染動態や希少鳥種における伝播機構は十分に解明されていなかった。原虫の分子生物学的情報を応用することにより、原虫保有状況を追跡し、ベクターからの原虫 DNA 検出により伝播サイクルが明らかになることが期待される。さらに、鳥類血液寄生原虫の生存に関わる分子基盤解明のための基礎情報が不足している。

そこで本研究では、分子疫学的手法による鳥類血液原虫の感染動態および伝播機構の解明と、原虫特異的オルガネラのゲノム解析を目的とした。第 2 章では原虫遺伝子をマーカーとして、高標高地に生息する野鳥における原虫感染動態を定点調査し、第 3 章では原虫の伝播経路の推定のためにベクターにおける原虫保有状況と吸血源動物種を特定して伝播サイクルの解明を試みた。第 4 章では原虫感染制御への応用を視野に、原虫の特異的オルガネラが持つゲノム情報の解明を試みた。

5.1 定点調査による野鳥の鳥類血液原虫保有状況および経年モニタリング

国内の野鳥における鳥類血液原虫感染については、分子生物学的解析法を用いた

原虫保有状況や分子系統解析などの疫学的知見が蓄積されているが、ある地域における経年的な感染状況に関する情報はきわめて少ない。そこで定点観測が可能な環境における野鳥の鳥類血液原虫感染状況を経年的に調査し、感染動態と環境要因との関係を推定した。

2007年から2010年の間、5月～11月に月1回ずつ、埼玉県内の東京大学秩父演習林（標高1,650m付近）において、霞網で捕獲した鳥類を個体識別後、翼下静脈から採血した。原虫感染の有無を、血液塗抹による原虫の形態学的検索および原虫 mtDNA *cytb* 遺伝子を標的とした nested-PCR 法により確認した。原虫の分子系統関係は検出された DNA の塩基配列を決定して解析した。

調査したスズメ目鳥類 522 個体の血液原虫感染率は 20.1%であった。内訳は *Plasmodium* 属原虫が 1.5%、*Leucocytozoon* 属原虫が 18.8%であった。鳥種別の感染率は、コガラ(*Parus montanus*)が 85.7% (18/21 羽)、ヒガラ(*P. ater*)が 75% (18/24 羽) と比較的高率であった。

今回、再捕獲された個体から興味深い原虫感染動態が明らかになった。すなわち、継続的な原虫感染が認められた個体（継続感染）や、二回目以降に検出された原虫系統が以前の系統と異なっていた個体（系統の転換）、さらに長期に渡る持続感染個体（最長 14 ヶ月間）および混合感染個体の存在が示唆された。今回の調査地のような個体識別が可能な環境において、野鳥の血液原虫の分子マーカーを用いた経

年モニタリングを継続することにより、鳥類と寄生原虫の相互関係の解析が進展すると考えられた。

5.2 *Leucocytozoon* 属原虫の媒介昆虫種の推定

鳥類血液原虫は吸血性昆虫によって媒介されるが、国内の野鳥における *Leucocytozoon* 属原虫のベクターとなる昆虫は同定されていない。一般に *Leucocytozoon* 属原虫はブユ類の吸血によって伝播されることが知られている。ある昆虫が原虫のベクターであることを示すためには、その昆虫が原虫を保有しており、宿主鳥類を吸血していることを明らかにする必要がある。北アルプスに生息するニホンライチョウ (*Lagopus muta japonicus*) では *Leucocytozoon lovati* の感染が認められており、同山系に分布する各種ブユからは *L. lovati* の DNA が検出されている。しかしこれらのブユがニホンライチョウを吸血しているかは不明であった。そこで、北アルプスに生息する各種ブユを採取し、分子生物学的手法を用いて吸血対象動物を調べた。

ブユの虫体内容物から DNA を抽出し、PCR により脊椎動物遺伝子の増幅を試みた。その結果、アシマダラブユ (*Simulium japonicum*)、およびオウブユ群 (*Prosimulium hirtipes* group) からニホンライチョウの DNA が検出された。また、

アシマダラブユがもっとも多くニホンライチョウを吸血していることが示唆された。これまでに、アシマダラブユ、ウチダツノマユブユ(*S. uchidai*)およびオウブユからライチョウが保有する *L. lovati* と同一の塩基配列が検出されている。よって、調査山系では、主にアシマダラブユがニホンライチョウの *Leucocytozoon* 属原虫のベクターとなっている可能性が示唆された。このように、宿主鳥類およびベクター候補昆虫から原虫 DNA を検出して分子系統関係を比較することにより、国内のニホンライチョウ以外の野鳥にも見られる *Leucocytozoon* 属原虫の感染サイクルが明らかになると期待される。

5.3 鳥類血液原虫アピコプラストのゲノム解析

Leucocytozoon 属原虫および鳥マラリア原虫は、宿主にはない原虫特有の細胞小器官であるアピコプラストを持つアピコンプレクス門 (Apicomplexa) 原虫に分類される。アピコプラストは、このグループの原虫の進化の過程で、光合成細菌を取り込んだ紅藻類 (Algae) の祖先由来の二次共生色素体と考えられている。ヒトマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) では、アピコプラストは原虫の生存に必須なヘムを合成する重要な代謝経路の場であることが知られている。マラリア原虫では、ヘム生合成に関わる遺伝子群は核にコードされているが、発現したタンパク

はミトコンドリアとアピコプラストに輸送されてヘム合成が行われる。ミトコンドリアもアピコプラストもそれぞれゲノム DNA を持っており、原虫の増殖時には複製される。アピコプラストの機能やゲノム DNA 複製のコントロールが可能になれば、原虫の感染戦略を効果的に調節できる可能性がある。ヒトマラリア原虫のアピコプラストは、アピコンプレクス門原虫に共通する薬剤標的として注目されており、アピコプラストゲノム DNA もすべて解読されている。しかし、鳥類のアピコンプレクス門原虫のアピコプラストに関しては、機能の解析以前にゲノム DNA がほとんど明らかになっておらず、一部のアピコプラストゲノム DNA のみが報告されている。そこで本章では、鳥類のアピコンプレクス門原虫である *L. caulleryi* のアピコプラストゲノム DNA の全塩基配列を明らかにすることを目的とした。

L. caulleryi 感染ニワトリ血液から、遠心分離により感染血液と比重が近いと考えられる白血球層を回収し、蛍光二重染色を行った。染色した細胞群をフローサイトメトリーにより分離し、非感染血液と比較して感染血液特異的な分画を採取した。分画には *L. caulleryi* のガメトサイトが多数認められ、ゲノム解析のために DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより網羅的に塩基配列を決定した。得られたゲノム DNA 断片を用いて、すでに明らかになっている *L. caulleryi* アピコプラストゲノム DNA の部分配列や、同じアピコンプレクス門原虫である熱帯熱マラリア原虫のアピコプラスト全ゲノム DNA をリファレンスシーケンスとしてマッピングし、

L. caulleryi アピコプラストの全ゲノム DNA の構成を試みた。その結果、*L. caulleryi* アピコプラストゲノム DNA は全長 34,779 bp の環状構造を持つ分子である可能性が示唆された。また、推定コード遺伝子の種類は、一つの ORF を除いて熱帯熱マラリア原虫と同様であった。すなわち、*L. caulleryi* のアピコプラストゲノムは、熱帯熱マラリア原虫と遺伝子構成が近似し、分子系統関係も近縁であった。よって、*L. caulleryi* のアピコプラストも、熱帯熱マラリア原虫アピコプラストと類似する機能を持つ可能性があると考えられる。

本研究では鳥類血液原虫に関する分子疫学的手法による感染動態および伝播機構の解明と、原虫特異的オルガネラのゲノム解読を目的とした各種解析を行った。第 2 章では、原虫遺伝子をマーカーに、定点捕獲が可能な調査地における野鳥の鳥類血液原虫の保有状況を検討し、長期間持続感染している例や、異なる系統の再感染例など、自然界における鳥類血液原虫の様々な感染動態が明らかになった。第 3 章では、国内のブユが *Leucocytozoon* 属原虫に感染している宿主鳥類を吸血していることを分子生物学的に解明し、本原虫の国内における媒介昆虫種を推定した。第 3 章では、*L. caulleryi* において初めてアピコプラストゲノムの全長を明らかにした。塩基長や遺伝子の種類など、ゲノム構造は既知のヒトマラリア原虫とほぼ同様であることが示唆された。

以上、病原体の分子生物学的特徴を用いて、野外における原虫の感染動態や、感染サイクルが明らかになり、さらに原虫特異的な生理機構の解明やゲノム基盤創薬に応用可能な基礎的情報が得られた。よって、本研究成果は今後の鳥類血液原虫の感染制御へ向けた研究に貢献すると思われる。

謝辞

本研究を完遂するに至るまで終始ご指導を賜りました日本大学大学院獣医学研究科 湯川眞嘉 教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究に対して多くの有益な御助言を賜りました同研究科 野上貞雄 教授ならびに本学大学院生物資源科学研究科 村田浩一 教授に心より御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり特別な御配慮とご助言ならびに献身的な御指導を賜りました本学大学院獣医学研究科 佐藤雪太 准教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、長期に亘り貴重な血液試料およびDNA試料をご提供くださいました独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 企画管理部 研究調整役 磯部 尚 博士、株式会社 科学飼料研究所 開発センター ワクチン開発課 向井哲也 課長、同研究所 大田原工場 柴田勲工場長、同工場 増 洵啓一 工場長代理、同工場 製造課 佐々木一枝氏、東京大学大学院農学生命科学研究科 石田 健 准教授、同大秩父演習林 職員の皆様、また、吸血昆虫試料をご提供くださいました山岳環境研究所 代表理事 肴倉孝明 博士、および媒介昆虫に係るご指導と試料提供を賜りました大分大学 医学部 感染予防医学講座 大塚 靖 助教、さらに媒介昆虫の吸血源動物種同定に際してご指導、ご助言を賜りました国立感染症研究所 昆虫医科学部 澤辺 京子 部長、同部 第二室 伊澤 晴彦 室長に心か

ら御礼申し上げます。

最後に、各種実験を実施するにあたり、様々な形にて御協力をいただいた実験動物学研究室室員諸氏に対し、厚く感謝致します。

なお、本研究の一部は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成事業「人獣共通感染症の戦略的国際疫学研究の推進と若手研究者の育成」（研究代表者：酒井健夫 日本大学名誉教授）、日本学術振興会 科学研究補助金 基盤研究（C）No. 21580406（研究代表者：佐藤雪太 日本大学准教授）および同補助金 特別研究員奨励費（研究代表者：井村貴之 本論文執筆者）による助成を得て行われました。

引用文献

Arisue N, Hashimoto T, Mitsui H, Palacpac NM, Kaneko A, Kawai S, Hasegawa M, Tanabe K, Horii T, The *Plasmodium* apicoplast genome: conserved structure and close relationship of *P. ovale* to rodent malaria parasites. *Mol Biol Evol.* 2012 Sep;29(9):2095-9.

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V, Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 2004 Apr 16;304(5669):441-5.

Ahouldi AD, Bei AK, Neafsey DE, Sarr O, Volkman S, Milner D, Cox-Singh J, Ferreira MU, Ndir O, Premji Z, Mboup S, Duraisingh MT, Population genetic analysis of large sequence polymorphisms in *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens. *Infect Genet Evol.* 2010 Mar;10(2):200-6.

Akiba K, Studies on the *Leucocytozoon* found in the chicken, in Japan: II. On the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. *Jpn J Vet Sci.* 1960;22:309-319

Arriero E, Møller AP, Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. *J Evol Biol.* 2008 Nov;21(6):1504-13.

Atkinson CT, van Riper C III, Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: Loye, J. E., Zuk, M. Bird-parasite interactions: Ecology, evolution, and behavior. London: Oxford University Press. 1991;19-48.

Beadell JS, Fleischer RC, A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians. *J Parasitol.* 2005 Jun;91(3):683-5.

Benning TL, LaPointe D, Atkinson CT, Vitousek PM, Interactions of climate change with biological invasions and land use in the Hawaiian Islands: Modeling the fate of endemic birds using a geographic information system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14246-9.

Brayton KA, Lau AO, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, Brown WC, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Forberger HA, Haas BJ, Howell JM, Khouri H, Koo H, Mann DJ, Norimine J, Paulsen IT, Radune D, Ren Q, Smith RK Jr, Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles DP Jr, McElwain TF, Nene VM, Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathog.* 2007 Oct 19;3(10):1401-13.

Cai X, Fuller AL, McDougald LR, Zhu G, Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene.* 2003 Dec 4;321:39-46.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli SV, Merino EF, Amedeo P, Cheng Q, Coulson RM, Crabb BS, Del Portillo HA, Essien K, Feldblyum TV, Fernandez-Becerra C, Gilson PR, Gueye AH, Guo X, Kang'a S, Kooij TW, Korsinczky M, Meyer EV, Nene V, Paulsen I, White O, Ralph SA, Ren Q, Sargeant TJ, Salzberg SL, Stoeckert CJ, Sullivan SA, Yamamoto MM, Hoffman SL, Wortman JR, Gardner MJ, Galinski MR, Barnwell JW, Fraser-Liggett CM, Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008 Oct 9;455(7214):757-63.

Douglas SE, Penny SL, The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia*

theta: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. J Mol Evol. 1999 Feb;48(2):236-44.

Ejiri H, Genetic diversity and distribution of avian malaria parasites in mosquitoes, in Japan. Journal of animal protozooses. 2012;27 14-20.

Ejiri H, Sato Y, Kim KS, Hara T, Tsuda Y, Imura T, Murata K, Yukawa M, Entomological study on transmission of avian malaria parasites in a zoological garden in Japan: bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite DNA from blood-fed mosquitoes. J Med Entomol. 2011a May;48(3):600-7.

Ejiri H, Sato Y, Kim KS, Tamashiro M, Tsuda Y, Toma T, Miyagi I, Murata K, Yukawa M, First record of avian *Plasmodium* DNA from mosquitoes collected in the Yaeyama Archipelago, southwestern border of Japan. J Vet Med Sci. 2011b Nov;73(11):1521-5.

Ejiri H, Sato Y, Kim KS, Tsuda Y, Murata K, Saito K, Watanabe Y, Shimura Y, Yukawa M., Blood meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro wetland, a subarctic zone of Japan. J Med Entomol. 2011c Jul;48(4):904-8.

Ejiri H, Sato Y, Sasaki E, Sumiyama D, Tsuda Y, Sawabe K, Matsui S, Horie S, Akatani K, Takagi M, Omori S, Murata K, Yukawa M, Detection of avian *Plasmodium* spp. DNA sequences from mosquitoes captured in Minami Daito Island of Japan. J Vet Med Sci. 2008 Nov;70(11):1205-10.

Ejiri H, Sato Y, Sawai R, Sasaki E, Matsumoto R, Ueda M, Higa Y, Tsuda Y, Omori S, Murata K, Yukawa M, Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. Parasitol Res. 2009

Sep;105(3):629-33.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Wortley EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):409-15.

Forrester DJ, Greiner EC, Leucocytozoonosis. In *Parasitic diseases of wild birds*, C. T. Atkinson, N. J. Thomas, and D. B. Hunter (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 2008;54–107.

Forsyth KP, Anders RF, Cattani JA, Alpers MP, Small area variation in prevalence of an S-antigen serotype of *Plasmodium falciparum* in villages of Madang, Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1989 Apr;40(4):344-50.

Foth BJ, McFadden GI, The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol*. 2003;224:57-110.

Fukuda M, Bain O, Aoki C, Otsuka Y, Takaoka H, Natural infections of *Simulium (Nevermannia) uchidai* (Diptera: Simuliidae) with infective filarial

larvae, probably from a bird, in Oita, Japan. *Med Entomol Zool.* 2005;56:93-98.

Gardner MJ, Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, Hall N, Ren Q, Paulsen IT, Pain A, Berriman M, Wilson RJ, Sato S, Ralph SA, Mann DJ, Xiong Z, Shallom SJ, Weidman J, Jiang L, Lynn J, Weaver B, Shoaibi A, Domingo AR, Wasawo D, Crabtree J, Wortman JR, Haas B, Angiuoli SV, Creasy TH, Lu C, Suh B, Silva JC, Utterback TR, Feldblyum TV, Perteau M, Allen J, Nierman WC, Taracha EL, Salzberg SL, White OR, Fitzhugh HA, Morzaria S, Venter JC, Fraser CM, Nene V, Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science.* 2005 Jul 1;309(5731):134-7.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Perteau M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B, Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002 Oct 3;419(6906):498-511.

Garnham PCC, *Malaria parasites and other Haemosporidia.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. 1966 1,114 p.

Grim KC, McCutchan T, Li J, Sullivan M, Graczyk TK, McConkey G, Cranfield M, Preliminary results of an anticircumsporozoite DNA vaccine trial for protection against avian malaria in captive African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *J Zoo Wildl Med.* 2004 Jun;35(2):154-61.

Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R, Patz JA, Climate variability and

change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ Health Perspect.* 2001 May;109 Suppl 2:223-33.

Hagihara M, Yamaguchi T, Kitahara M, Hirai K, Murata K, *Leucocytozoon lovati* infections in wild rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in Japan. *J Wildl Dis.* 2004 Oct;40(4):804-7.

Hamza I, Dailey HA, One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep;1823(9):1617-32.

Haussig JM, Matuschewski K, Kooij TW, Inactivation of a *Plasmodium* apicoplast protein attenuates formation of liver merozoites. *Mol Microbiol.* 2011 Sep;81(6):1511-25.

Hellgren O, Bensch S, Malmqvist B, Bird hosts, blood parasites and their vectors associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals. *Mol Ecol.* 2008 Mar;17(6):1605-13.

Hellgren O, Waldenström J, Bensch S, A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol.* 2004 Aug;90(4):797-802.

Imura T, Sato Y, Ejiri H, Tamada A, Isawa H, Sawabe K, Omori S, Murata K, Yukawa M, Molecular identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. *Parasitol Res.* 2010 Jan;106(2):543-7.

Imura T, Suzuki Y, Ejiri H, Sato Y, Ishida K, Sumiyama D, Murata K, Yukawa M, Prevalence of avian haematozoa in wild birds in a high-altitude forest in

Japan. Vet Parasitol. 2012 Feb 10;183(3-4):244-8

Isobe T, Suzuki K, Yoshihara S, Protection against chicken leucocytozoonosis provided by immunization with spleen homogenate infected with *Leucocytozoon caulleryi*. Avian Dis. 1991 Jul-Sep;35(3):559-62.

Ito A, Gotanda T, Field efficacy of recombinant R7 vaccine against chicken leucocytozoonosis. J Vet Med Sci. 2004 May;66(5):483-7.

Ito A, Gotanda T, Kobayashi S, Kume K, Sugimoto C, Matsumura T, Increase of antibody titer against *Leucocytozoon caulleryi* by oral administration of recombinant R7 antigen. J Vet Med Sci. 2005 Feb;67(2):211-3.

Itoh A, Gotanda T, The correlation of protective effects and antibody production in immunized chickens with recombinant R7 vaccine against *Leucocytozoon caulleryi*. J Vet Med Sci. 2002 May;64(5):405-11.

Jarvi SI, Farias ME, Lapointe DA, Belcaid M, Atkinson CT, Next-generation sequencing reveals cryptic mtDNA diversity of *Plasmodium relictum* in the Hawaiian Islands. Parasitology. 2013 Dec;140(14):1741-50.

Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Türbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D, Beck E, Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. Science. 1999 Sep 3;285(5433):1573-6.

Kamimura K, The distribution and habit of medically important mosquitoes of Japan. Med. Entomol. Zool. 1968;19 15-34.

Kano R, Kimura M, Natural infection of blood parasites in Japanese wild birds.

Jpn. J. Bact. 1950;5 103-104

Kappmeyer LS, Thiagarajan M, Herndon DR, Ramsay JD, Caler E, Djikeng A, Gillespie JJ, Lau AO, Roalson EH, Silva JC, Silva MG, Suarez CE, Ueti MW, Nene VM, Mealey RH, Knowles DP, Brayton KA, Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. BMC Genomics. 2012 Nov 9;13:603.

Kim KS, Tsuda Y, Avian Plasmodium lineages found in spot surveys of mosquitoes from 2007 to 2010 at Sakata wetland, Japan: do dominant lineages persist for multiple years? Mol Ecol. 2012 Nov;21(21):5374-85.

Kim KS, Tsuda Y, Sasaki T, Kobayashi M, Hirota Y, 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. Parasitol Res. 2009a Oct;105(5):1351-7.

Kim KS, Tsuda Y, Seasonal changes in the feeding pattern of *Culex pipiens pallens* govern the transmission dynamics of multiple lineages of avian malaria parasites in Japanese wild bird community. Mol Ecol. 2010 Dec;19(24):5545-54.

Kim KS, Tsuda Y, Yamada A, Bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan. J Med Entomol. 2009b Sep;46(5):1230-4.

Knowles SC, Wood MJ, Alves R, Wilkin TA, Bensch S, Sheldon BC, Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. Mol Ecol. 2011 Mar;20(5):1062-76.

Kobayashi M, Nihei N, Kurihara T, Analysis of northern distribution of *Aedes*

albopictus (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. J Med Entomol. 2002 Jan;39(1):4-11.

Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS, A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Science. 1997 Mar 7;275(5305):1485-9.

Lau AO, McElwain TF, Brayton KA, Knowles DP, Roalson EH, *Babesia bovis*: a comprehensive phylogenetic analysis of plastid-encoded genes supports green algal origin of apicoplasts. Exp Parasitol. 2009 Nov;123(3):236-43.

Lepers JP, Deloron P, Andriamagatiana-Rason MD, Ramanamirija JA, Coulanges P, Newly transmitted *Plasmodium falciparum* malaria in the central highland plateaux of Madagascar: assessment of clinical impact in a rural community. Bull World Health Organ. 1990;68(2):217-22.

Lepers JP, Deloron P, Fontenille D, Coulanges P, Reappearance of falciparum malaria in central highland plateaux of Madagascar. Lancet. 1988 Mar 12;1(8585):586.

Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, Ndjango JB, Sanz CM, Morgan DB, Locatelli S, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Georgiev AV, Muller MN, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Rayner JC, Hahn BH, Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. Nature. 2010 Sep 23;467(7314):420-5.

Malmqvist B, Strasevicius D, Hellgren O, Adler PH, Bensch S, Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. Proc Biol Sci. 2004 May 7;271 Suppl 4:S152-5.

Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ, A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol.* 2008 Apr;47(1):261-73.

Massey B, Gleeson DM, Slaney D, Tompkins DM, PCR detection of *Plasmodium* and blood meal identification in a native New Zealand mosquito. *J Vector Ecol.* 2007 Jun;32(1):154-6.

McClure HE, Poonswas P, Greiner EC, Laird M, Haematozoa in the Birds of Eastern and Southern Asia, Memorial University of Newfoundland, Canada. 1978.

McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N, Plastid in human parasites. *Nature.* 1996 Jun 6;381(6582):482.

McFadden GI, The apicoplast. *Protoplasma.* 2011 Oct;248(4):641-50.

Morii T, A review of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens. *J Protozool Res.* 1992;2 128-133.

Morii T, Shiihara T, Lee YC, Manuel MF, Nakamura K, Iijima T, Hoji K, Seroimmunological and parasitological surveys of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens in several Asian countries. *Int J parasitol.* 1981;11 187-190.

Murata K, Prevalence of blood parasites in Japanese wild birds. *J Vet Med Sci.* 2002 Sep;64(9):785-90.

Murata K, Tamada A, Ichikawa Y, Hagihara M, Sato Y, Nakamura H, Nakamura M, Sakanakura T, Asakawa M, 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. 2007 Feb;69(2):171-6.

Nagata H, Reevaluation of the prevalence of blood parasites in Japanese Passerines by using PCR based molecular diagnostics. Ornithol Sci. 2006;5 105-112

Ntumngia FB, McHenry AM, Barnwell JW, Cole-Tobian J, King CL, Adams JH, Genetic variation among *Plasmodium vivax* isolates adapted to non-human primates and the implication for vaccine development. Am J Trop Med Hyg. 2009 Feb;80(2):218-27.

Ogawa M, Notizen über die blutparasitischen Protozoen bei japanischen Vögeln. Arch Protist Jena. 1911;24 119–126.

Olias P, Wegelin M, Zenker W, Freter S, Gruber AD, Klopffleisch R, Avian malaria deaths in parrots, Europe. Emerg Infect Dis. 2011 May;17(5):950-2.

Omori S, Sato Y, Hirakawa S, Isobe T, Yukawa M, Murata K, Two extra chromosomal genomes of *Leucocytozoon caulleryi*: complete nucleotide sequences of the mitochondrial genome and existence of the apicoplast genome. Parasitol Res. 2008 Sep;103(4):953-7.

Omori S, Sato Y, Isobe T, Yukawa M, Murata K, Complete nucleotide sequences of the mitochondrial genomes of two avian malaria protozoa, *Plasmodium gallinaceum* and *Plasmodium juxtannucleare*. Parasitol Res. 2007 Feb;100(3):661-4.

Pain A, Böhme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD, Jackson AP, Mourier T,

Mistry J, Pasini EM, Aslett MA, Balasubrammaniam S, Borgwardt K, Brooks K, Carret C, Carver TJ, Cherevach I, Chillingworth T, Clark TG, Galinski MR, Hall N, Harper D, Harris D, Hauser H, Ivens A, Janssen CS, Keane T, Larke N, Lapp S, Marti M, Moule S, Meyer IM, Ormond D, Peters N, Sanders M, Sanders S, Sargeant TJ, Simmonds M, Smith F, Squares R, Thurston S, Tivey AR, Walker D, White B, Zuiderwijk E, Churcher C, Quail MA, Cowman AF, Turner CM, Rajandream MA, Kocken CH, Thomas AW, Newbold CI, Barrell BG, Berriman M, The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):799-803.

Peirce MA, Greenwood AG, Swinnerton K, Pathogenicity of *Leucocytozoon marchouxi* in the pink pigeon (*Columba mayeri*) in Mauritius. *Vet Rec*. 1997 Feb 8;140(6):155-6.

Perkins SL, Molecular systematics of the three mitochondrial protein-coding genes of malaria parasites: corroborative and new evidence for the origins of human malaria. *Mitochondrial DNA*. 2008 Dec;19(6):471-8.

Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI, Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Mar;2(3):203-16.

Ricklefs RE, Outlaw DC, A molecular clock for malaria parasites. *Science*. 2010 Jul 9;329(5988):226-9.

Rogers DJ, Randolph SE, Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol*. 2006;62:345-81.

Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Fraunholz M, Harb OS, He CY, Kissinger

JC, Shaw MK, Striepen B, Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002 Jan 29;357(1417):35-46.

Sasaki H, Nishijima Y, Ono H, Blood sources of two major *Simulium* species in Hokkaido, Japan (Diptera, Simuliidae). *Jpn J Sanit Zool.* 1988;39 87-90

Sasaki H, Nishijima Y, Ono H, Studies on the relation between blood sources and the shape of fore tarsal claw of the female black flies in Hokkaido (Diptera: Simuliidae). *J Coll Dairying.* 1985;11 187-192.

Sasaki H, Nishijima Y, Ono H, Note on the blood source of black flies (Diptera: Simuliidae) collected at the Onnebetsu-dake area. *J Sanit Zool.* 1986;37 41-45.

Sato S, Clough B, Coates L, Wilson RJ, Enzymes for heme biosynthesis are found in both the mitochondrion and plastid of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protist.* 2004 Mar;155(1):117-25.

Sato S, Sesay AK, Holder AA, The unique structure of the apicoplast genome of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *PLoS One.* 2013 Apr 16;8(4):e61778.

Sato Y, Tamada A, Mochizuki Y, Nakamura S, Okano E, Yoshida C, Ejiri H, Omori S, Yukawa M, Murata K, Molecular detection of *Leucocytozoon lovati* from probable vectors, black flies (Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. *Parasitol Res.* 2009 Jan;104(2):251-5.

Sawabe K, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Roychoudhury S, Higa Y, Kasai S, Tsuda Y, Nishiumi I, Hisai N, Hamao S, Kobayashi M. Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban

and suburban residential areas of Japan. J Med Entomol. 2010 May;47(3):442-50.

Shimazu M, Tatara S, Kinuta T, Avian Malaria (*Plasmodium* sp.) in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) and a Rockhopper Penguin (*Eudyptes chrysocome*) in Captivity. Assoc Zool Aqua. 1994;35(4) 107-117.

Shirotani A, Shibata A, Ejiri H, Sato Y, Tsuda Y, Hatakeyama Y, Iwano H, Murata K, Yukawa M, Detection of Avian Malaria DNA from Mosquitoes in Kanagawa in Japan. J Vet Med Assoc. 2009;62 73-79.

Surolia N, Surolia A, Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. Nat Med. 2001 Feb;7(2):167-73.

Takaoka H, Aoki C, Hayakawa H, (1992) Natural infections of blackflies with larvae of zoonotic *Onchocerca* spp. in northeast Japan. Jpn J Trop Med Hyg, 1992;20 1-9.

Takaoka H, Baba M, Bain O, Natural infections of *Simulium bidentatum* (Diptera: Simuliidae) with larvae of *Onchocerca* spp. in relation to a human zoonotic onchocerciasis in Oita, Japan. Jpn J Trop Med Hyg. 1989;17 279-284.

Takaoka H, Bain O, Infections of blackflies (Diptera: Simuliidae) with three types of zoonotic *Onchocerca* larvae in Oita, Jpn J Trop Med Hyg. 1990;18 1-10.

Takaoka H, Fukuda M, Otsuka Y, Aoki C, Uni S, Bain O, Blackfly vectors of zoonotic onchocerciasis in Japan. Med Vet Entomol. 2012 Dec;26(4):372-8.

Takaoka H, Natural vectors of three bovine *Onchocerca* species (Nematoda:

Onchocercidae) and seasonal transmission by three blackfly species (Diptera: Simuliidae) in central Kyushu, Japan. *J Med Entomol.* 1994 May;31(3):404-16

Tanigawa M, Sato Y, Ejiri H, Imura T, Chiba R, Yamamoto H, Kawaguchi M, Tsuda Y, Murata K, Yukawa M, Molecular identification of avian haemosporidia in wild birds and mosquitoes on Tsushima Island, Japan. *J Vet Med Sci.* 2013;75(3):319-26.

Uemoto K, Onishi O, Orii T, Revision of the Genus *Prosimulium* Roubaud (Diptera, Simuliidae) of Japan: I. hirtipes-group in the Subgenus *Prosimulium*. *Jpn J Sanit Zool.* 1973;24 27 –46.

Valkiūnas G, Avian malaria parasites and other Haemosporidia. CRC, Boca Raton. 2005.

van Riper C III, S van Riper, Goff M, Laird M. 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs.* 1986;56 327–344.

Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI, Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12352-7.

Williamson DH, Denny PW, Moore PW, Sato S, McCready S, Wilson RJ, The in vivo conformation of the plastid DNA of *Toxoplasma gondii*: implications for replication. *J Mol Biol.* 2001 Feb 16;306(2):159-68.

Williamson DH, Preiser PR, Moore PW, McCready S, Strath M, Wilson RJ, The plastid DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is replicated by

two mechanisms. *Mol Microbiol.* 2002 Jul;45(2):533-42.

Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH, Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol.* 1996 Aug 16;261(2):155-72.

Yeh E, DeRisi JL, Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 2011 Aug;9(8):e1001138.

業績一覽

本論文に関わる研究業績は以下に示すとおりである。

1. **Imura T**, Sato S, Sato Y, Sakamoto D, Isobe T, Murata K, A. A. Holder, Yukawa M. (2013): The apicoplast genome of *Leucocytozoon caulleryi*, a pathogenic apicomplexan parasite of the chicken. Parasitol. Res.
2. **Imura T**, Suzuki Y, Ejiri H, Sato Y, Ishida K, Sumiyama D, Murata K, Yukawa M.(2012): Prevalence of avian haematozoa in wild birds in a high-altitude forest in Japan. Vet. Parasitol. 183:244-248.
3. **Imura T**, Sato Y, Ejiri H, Tamada A, Isawa H, Sawabe K, Omori S, Murata K, Yukawa M. (2010): Molecular identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. Parasitol. Res. 106:543-547.

受賞等一覧

本論文に係る受賞および表彰等は以下に示すとおりである。

1. 第 145 回日本獣医学会学術集会（寄生虫分科会）

ベストプレゼンテーション賞

受賞研究課題

「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」

受賞年月・会場

2008 年 4 月・麻布大学

2. 平成 23 年度 日本学術振興会 特別研究員 DC1(農学)採用

研究課題

「ゲノム機能解析による鳥類血液原虫の感染制御へ向けた基盤研究」

採用期間

2011 年 4 月～2014 年 3 月（3 年間）