

生態区分に基づく国内の鳥類における  
住血原虫感染状況の解明

日本大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻  
博士課程

犬丸 瑞枝

2021

**Elucidation on the status of avian haemosporidia  
in birds of Japan based on ecological classifications**

**Laboratory of Biomedical Science, Department of Veterinary Medicine**

**Graduate School of Veterinary Medicine, Nihon University**

**Doctoral Thesis**

**Mizue Inumaru**

**2021**

## Abstract

Avian haemosporidia are blood parasites that have been reported in both wild and captive birds throughout the world, including Japan. *Plasmodium* (avian malaria) is transmitted by mosquitoes, *Haemoproteus* by biting midges and louse flies, and *Leucocytozoon* by blackflies. Infection is generally thought to be sub-clinical in most bird species but can be lethal in some naïve species. The transmission of avian haemosporidia strongly depend on the ecology of vector insects, birds, and parasites. Changes in vector distributions and avian migratory behaviours due to climate change may also alter distributions of various pathogens.

Infection cycles of avian haemosporidia can be classified into three cycles: 1) "core cycle" maintained between resident birds and vectors, 2) "transboundary transport cycle" caused by haemosporidia transported along with long-distance migratory birds and introduced species, and 3) "leaping fire cycle" in which haemosporidia are transmitted to non-natural hosts (e.g. captive birds outside of their natural habitat).

In Japan, more than 600 species of wild birds have been recorded, and roughly 30% are migratory birds. Additionally, a variety of exotic bird species are kept in zoos and aquariums for *ex-situ* conservation. Although the status of avian haemosporidia in birds of Japan had been previously investigated, few studies had focused on the ecology and infection cycle classification of host birds. Consequently, the role of birds in the distribution and transmission of avian haemosporidia had not been fully understood. In this study, I aim to clarify the status and transmission of avian haemosporidia in birds of different ecological categories in Japan.

### **Chapter 2: Prevalence of avian haemosporidia in rescued birds of the Kanto region (core and transboundary transport cycles)**

Throughout Japan, there are facilities where injured wild birds are treated and returned to the wild. Various bird species are brought to these facilities, and the infection status of avian haemosporidia can be investigated. In chapter 2, the prevalence and phylogenetic relationship of avian haemosporidia among rescued birds in the Kanto area was investigated, and infection trends between resident and migratory birds were compared.

Blood samples were collected from 475 rescued wild birds of 80 species at four facilities located in Tokyo, Chiba and Kanagawa prefectures. After DNA extraction, nested-PCR targeting the mitochondrial DNA *cytb* gene of avian haemosporidia was performed, and if amplification was confirmed, the nucleotide sequence was determined to analyze the molecular phylogeny. Blood smears were also confirmed by microscopy.

The total prevalence was 21.1%, and the large number of lineages detected from resident birds suggested the transmission of avian haemosporidia within Japan (core cycle). Meanwhile, some lineages detected from wintering birds had been previously detected from resident birds of Hokkaido and continental Asia, including one lineage transmitted by *Culiseta* mosquitoes which are only distributed in northern Japan and further north. Therefore, wintering birds at the facilities are thought to have been infected in their breeding grounds further north or in continental Asia, and transported haemosporidia into Japan (transboundary transport cycle).

### **Chapter 3: Prevalence and transmission dynamics of avian haemosporidia in snipe species (genus *Gallinago*) (transboundary transport cycle)**

Snipes (*Gallinago* spp.) are long-distance migratory birds, and five species migrate to or through Japan. Few studies had investigated the prevalence of avian haemosporidia in snipes, and the haemosporidian transmission status during migration was unknown. In this chapter, the prevalence and possible transmission areas of avian haemosporidia were investigated among snipes, to discuss the characteristics of the transboundary transport cycle in Japan.

383 birds of four species were caught at migratory stopover sites in the Kanto and Okinawa regions during the spring and autumn of 2012 to 2018. The obtained blood was used to detect haemosporidia using the same method as chapter 2.

Avian haemosporidia was detected from 68 of 383 snipes (17.8%). Snipes inhabit agricultural fields and wetlands where they are more likely to come in contact with vectors and therefore have a higher parasite prevalence compared to other shorebirds (0-6.2%). The *Plasmodium* prevalence was significantly higher in Swinhoe's snipes, while *Haemoproteus* was higher in Latham's snipes. Furthermore, the *Haemoproteus* prevalence significantly differed between Swinhoe's snipes of Kanto and Okinawa, which are considered to be different populations. These differences are thought to be due to ecological factors such as habitat, distribution, and

migratory routes in relation to contact with vectors. Additionally, lineages detected from juveniles on their first migration are thought to have been transmitted between breeding and capture sites.

The prevalence of avian haemosporidia in *Gallinago* snipes of Japan was investigated for the first time, and it was suggested again that haemosporidia are transported by migratory birds (transboundary transport cycle). In addition, even among closely related bird species and populations, the haemosporidian fauna and prevalence differed due to differences in ecological and other factors.

#### **Chapter 4: Distribution and transmission route of avian haemosporidia in the Ogasawara Islands (core and transboundary transport cycles)**

The Ogasawara Islands are oceanic islands, where organisms evolved uniquely in an isolated environment, creating a unique ecosystem. Meanwhile, exotic species have also been introduced. Like the Hawaiian Islands where several endemic bird species went extinct due to avian malaria introduced along with exotic bird species, there is concern on the impact of introduced species on the ecosystem. In this chapter, the distribution and transmission route of avian haemosporidia in the Ogasawara Islands was investigated.

Bird samples were collected between 2011 and 2019, and mosquitoes in 2015. Haemosporidia were detected using the same method as chapter 2, and a multiplex-PCR protocol. Additionally, haemosporidian prevalence was compared between birds of different ecological classifications.

All three haemosporidian genera were detected from resident birds (prevalence: 50.0%), suggesting that all genera are transmitted within the islands (core cycle). The dominant lineages, *Plasmodium elongatum* GRW06 and *P. relictum* GRW04, are both highly pathogenic to some bird species. *Plasmodium elongatum* GRW06 was also detected from *Culex boninensis* and *Cx. quinquefasciatus*, suggesting that these mosquitoes are vectors of avian malaria in the islands. Few lineages were shared between resident and migratory birds, suggesting transmission of haemosporidia between the two is relatively infrequent. Many lineages detected from resident birds were previously detected in other areas and may have been introduced to the islands relatively recently. Meanwhile, novel lineages from Japanese white-eyes and White's thrush,

which arrived to the islands in the 1900's, are suggested to have been introduced to the islands along with their host birds. Hence, while the establishment of novel lineages transported by migratory birds is relatively unlikely, the establishment of novel host birds may make transmission of novel haemosporidian lineages possible (transboundary transport cycle).

## **Chapter 5: Estimating the route of *Haemoproteus* infection in captive penguins (leaping fire cycle)**

Japan has one of the world's largest captive populations of penguins, and zoos and aquariums play an important role in the *ex-situ* conservation of penguins. Penguins are highly susceptible to avian malaria, and many deaths have been reported. Meanwhile, most reports of *Haemoproteus* had only detected the parasite DNA, and *Haemoproteus* gametocytes, the developmental stage involved in transmission to the next individual, had not been detected from penguins. In other words, it was unclear whether penguins could be competent hosts for *Haemoproteus* parasites and become a source of infection to other individuals. In chapter 5, developmental stages and the transmission route of *Haemoproteus* parasites in captive penguins was investigated.

Blood samples were collected from two captive African penguins and two Magellanic penguins which were suspected to be infected with *Haemoproteus* parasites. The same method as chapter 4 was used for detection of haemosporidia. Additionally, one black-tailed gull, a species suspected to be the source of infection for penguins, was investigated.

*Haemoproteus laevis* SPMAG12 was detected from all penguins and the gull. Furthermore, *Haemoproteus* gametocytes were detected from penguins for the first time, suggesting that *Haemoproteus* can complete their development within penguins, which may be a source of infection. Previous detections of *H. laevis* from gulls of other countries suggested that gulls are the natural host. This parasite species was classified to the subgenus *Parahaemoproteus*, transmitted by biting midges. It was therefore suggested that *H. laevis* is transmitted from gulls which are the natural host, to captive penguins via biting midges (leaping fire cycle), and may be further transmitted to other individuals.

## **Conclusion**

The present study suggests that the core cycle of avian haemosporidia is established among resident birds and vectors of Japan. Meanwhile, some haemosporidia are transmitted by the transboundary transport cycle, carried by migratory birds. In addition, haemosporidia may be introduced to novel areas by artificial introduction of host species and natural changes in host distributions, suggesting multiple routes exist in the transboundary transport cycle. Furthermore, in the leaping fire cycle, transmission may occur from wild birds to captive birds, as well as from captive birds to other individuals living together. It is hoped that continued research on the status of avian haemosporidia in birds of different ecological categories in Japan will provide further knowledge that will lead to the risk assessment of infectious diseases in the conservation of birds.

## 目次

Abstract .....	i
目次.....	vi
略語一覧.....	x
第1章 序論 .....	1
第2章 関東地方の保護鳥類における住血原虫保有状況 (コアおよび越境運搬サイクル) .....	7
2.1 はじめに.....	8
2.2 材料および方法.....	10
2.2.1 サンプルの採取	
2.2.2 DNA 抽出および鳥類住血原虫 DNA の検出	
2.2.3 渡り区分による統計解析	
2.2.4 住血原虫の形態学的検出	
2.3 成績.....	14
2.4 考察.....	26
2.4.1 保護鳥類における原虫保有状況	
2.4.2 渡り区分による解析	
2.4.3 <i>Plasmodium</i> 属原虫系統の解析	
2.4.4 <i>Haemoproteus</i> 属原虫系統の解析	
2.4.5 <i>Leucocytozoon</i> 属原虫系統の解析	
2.4.6 結論	
2.5 小括.....	35

第3章	タシギ属鳥類における住血原虫保有状況および伝播動態の推定 (越境運搬サイクル) .....	37
3.1	はじめに.....	38
3.2	材料および方法.....	41
3.2.1	サンプルの採取	
3.2.2	DNA 抽出および分子学的雌雄別	
3.2.3	鳥類住血原虫 DNA の検出	
3.2.4	検出された住血原虫の分子系統解析	
3.2.5	統計解析	
3.3	成績.....	45
3.4	考察.....	55
3.4.1	シギ・チドリ類における原虫保有率の比較	
3.4.2	タシギ属鳥種間における原虫保有率の比較	
3.4.3	原虫保有率に関連する他の要因	
3.4.4	住血原虫の分子系統構成	
3.4.5	伝播地域および時期	
3.4.6	結論	
3.5	小括.....	64
第4章	小笠原諸島における鳥類住血原虫の分布状況および伝播経路の推定 (コアおよび越境運搬サイクル) .....	66
4.1	はじめに.....	67
4.2	材料および方法.....	70
4.2.1	調査地および環境	
4.2.2	保護および死亡鳥類のサンプリング	
4.2.3	かすみ網を用いた鳥類のサンプリング	

4.2.4	鳥類血液からの DNA 抽出および住血原虫 DNA の検出	
4.2.5	蚊の捕集	
4.2.6	蚊からの DNA 抽出および住血原虫の分子学的検出	
4.2.7	鳥類住血原虫の分子系統解析	
4.2.8	顕微鏡による原虫検査	
4.2.9	統計解析	
4.3	成績.....	77
4.3.1	鳥類における住血原虫保有状況	
4.3.2	蚊における住血原虫保有状況	
4.4	考察.....	88
4.4.1	渡り鳥による諸島内への住血原虫侵入の可能性	
4.4.2	小笠原諸島における鳥類住血原虫の伝播状況	
4.4.3	小笠原諸島における鳥類住血原虫の起源の推定	
4.4.4	留鳥における住血原虫保有状況	
4.4.5	結論	
5.2	小括.....	96
第5章 飼育下ペンギンにおける <i>Haemoproteus</i> 属原虫感染経路の推定		
	(飛び火サイクル) .....	98
5.1	はじめに.....	99
5.2	材料および方法.....	102
5.2.1	サンプルについて	
5.2.2	原虫 DNA の検出および分子系統解析	
5.2.3	血液塗沫検査	
5.2.4	混合感染の可能性に関する分子学的解析	
5.3	成績.....	107

5.4	考察.....	118
5.4.1	ペンギン類における <i>Haemoproteus</i> 属原虫の発育および検出	
5.4.2	混合感染の検証	
5.4.3	<i>Haemoproteus lae</i> SPMAG12 の形態学および分子系統学的鑑別	
5.4.4	飼育下ペンギン類における <i>Haemoproteus</i> 属原虫の感染経路および伝播状況	
5.4.5	結論	
5.5	小括.....	128
第6章	総括.....	130
	謝辞.....	139
	引用文献.....	142
	業績一覧.....	172
	受賞等一覧.....	175
	付録.....	177
	付録 1：小笠原諸島における鳥類住血原虫に関する補足資料	
	付録 2：飼育下ペンギン類における <i>Haemoproteus</i> 属原虫に関する補足資料	

## 略語一覧

APV : Avipoxvirus

BIC : ベイズ情報量規準 (Bayesian Information Criterion)

CHD : chromo-helicase DNA

cox1 : cytochrome c oxidase

cytb : cytochrome *b*

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

GLM : 一般化線形モデル (General Linear Model)

GTR+ $\Gamma$ +I : ガンマ分布および不変座位率に基づいた一般時間反転可能モデル

MCMC : マルコフ連鎖モンテカルロ (Markov Chain Monte Carlo)

MSP1 : Merozoite Surface Protein 1

PCI 法 : フェノール・クロロホルム法

TAE : Tris-Acetate-EDTA

Tris : トリスヒドロキシメチルアミノメタン

## 第 1 章

### 序論

鳥類に寄生する鳥マラリア原虫 (*Plasmodium* 属原虫)、*Haemoproteus* 属原虫および *Leucocytozoon* 属原虫などの住血原虫の感染は、日本を含む世界各地の野鳥や飼育下鳥類などで報告されている (Atkinson and Lapointe, 2009; Bueno et al., 2010; Imura et al., 2012; Murata, 2002; Nagata, 2006; Olias et al., 2011; Valkiūnas, 2005)。これらの住血原虫はアピコンプレックス門住血胞子虫目 (Apicomplexa; Haemosporidia) に属し、吸血性昆虫 (ベクター) によって媒介され (Valkiūnas, 2005)、*Plasmodium* 属原虫はカ科 (Culicidae、以下蚊)、*Haemoproteus* 属原虫はヌカカ科 (Ceratopogonidae、以下ヌカカ) やシラミバエ科 (Hippoboscidae、以下シラミバエ)、*Leucocytozoon* 属原虫はブユ科 (Simuliidae、以下ブユ) によって宿主鳥類に伝播される。

住血原虫の病原性はほとんどの野鳥では不明であるが、多くは不顕性であると考えられている。しかし、一部の高感受性の鳥種では、貧血やそれに伴う衰弱、食欲不振などの症状を呈し、死に至ることさえある (Grilo et al., 2016; Olias et al., 2011; Valkiūnas, 2005)。このような重篤な症状は、特に原虫に対する抵抗性を持たない鳥類で多数報告されており、代表的な例としてハワイ諸島の固有鳥類での事例が挙げられる。ハワイ諸島では移入種と共に鳥マラリア原虫および鳥ポックスウイルスが持ち込まれ、それまでこれらの病原体に接触する機会がなく、抵抗性を獲得していなかったハワイミツスイ (*Hemignathus virens*) などの固有種が絶滅したことが知られている (Atkinson and Lapointe, 2009; Beadell et al., 2006; Valkiūnas, 2005; Van Riper et al., 1986)。また、域外保全のために本来の生息地から離れた地域で飼育されているペンギン科 (Spheniscidae) 鳥類なども鳥マラリア原虫に対して高感受性であり、貧血や繁殖能力の低下、肝臓や脾臓の腫大などの症状を呈し、突然死も報告されている (Bennett et al., 1993; Bueno et al., 2010; Fix et al., 1988; Grilo et al., 2016;

Vanstreels et al., 2016)。 *Haemoproteus* 属原虫および *Leucocytozoon* 属原虫も、オウム科 (Cacatuidae) や家禽類を含む飼育下鳥類に対して病原性が高く、幼鳥では高い死亡率を示す (Bennett et al., 1993; Donovan et al., 2008; Earlé et al., 1992; Ferrell et al., 2007; Morii et al., 1986; Olias et al., 2011; Valkiūnas, 2005)。さらに、このような致命的な影響以外にも、体重の減少 (Coon et al., 2016; Fleskes et al., 2017; Marzal et al., 2008)、換羽の遅延 (Morales et al., 2007)、翼長の短縮 (Dunn et al., 2013)、尾羽の生長速度の低下 (Coon et al., 2016; Marzal et al., 2013)、繁殖成功率の低下 (Höglund et al., 2017; Merino et al., 2000)、健康状態の低下 (Merino et al., 2000; Palinauskas et al., 2008)などの身体的および生理的影響が報告されている。このように、鳥類の住血原虫は国内を含む世界各地で伝播され、宿主鳥類に対する病原性や生態への影響もあるため、獣医学および保全医学上重要なベクター媒介性の病原体である。

鳥類の住血原虫はベクター昆虫・宿主鳥類・原虫それぞれの生態に強く依存して伝播・維持されている (Valkiūnas, 2005; Waldenström et al., 2002)。原虫種ごとに宿主特異性や季節性などが異なっており、例えば鳥マラリア原虫では、*Plasmodium juxtannucleare* はニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) やシロミミキジ (*Crossoptilon crossoptilon*) などキジ目に特異的である。一方、*P. relictum* は非常に宿主域が広く、世界各地の 11 目 300 種以上の鳥類から検出されている (Valkiūnas, 2005; Valkiūnas et al., 2018)。また、ベクターとなる吸血昆虫種については、解析手法の制約などから宿主鳥類ほどは解明されていないが、一部の原虫種では媒介可能なベクター種が限られていることが知られている (Santiago-Alarcon et al., 2012; Valkiūnas, 2005)。このように、住血原虫は原虫種ごとに宿主域およびベクター種を含めた伝播戦略が異なっている。この原虫側の要因に加え、宿主鳥類とベクター種の分布に関連して、原虫

種における分布域や伝播動態の違いが見られる。例えば、ハワイ諸島の高標高地帯には移入種であるネツタイイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が分布しないため、鳥類の鳥マラリア原虫感染率も極めて低い (Atkinson and Lapointe, 2009; Van Riper et al., 1986)。また、*Leucocytozoon lovati* はライチョウ科 (Tetraonidae) 鳥類のみを宿主とし、分布もライチョウ科鳥類が生息する地域に限られる (Murata et al., 2007; Valkiūnas, 2005)。近年、気候変動などによりベクターの生息可能範囲や渡り鳥の繁殖地や越冬地の変化などが報告されている (Atkinson and Lapointe, 2009; Elbers et al., 2015; Garamszegi, 2011; Higuchi et al., 2009; Kobayashi et al., 2002)。加えて、グローバル化による国境を越えた人為的な生物の移動速度も上がっており、急速に生物の分布が変化している。これに伴い、病原体の分布も変化し、耐性を持たない鳥類が新たな病原体に暴露される可能性や、未知の病原体が持ち込まれる可能性がある。例えば、チェコ共和国の山地では、気候変動によってダニの分布がより高い標高地まで拡大した結果、ダニ媒介性脳炎ウイルス (Tick borne encephalitis virus) の分布域も拡大した (Danielová et al., 2010)。また、2005年にヨーロッパで確認された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザの集団発生は、宿主であるカモ類が例年と異なる配置となった寒冷前線に密集したことが原因であると考えられている (Reperant et al., 2010)。同様に、宿主鳥類やベクターの分布変化によって、住血原虫の分布も拡大する可能性が懸念されている (Atkinson and Lapointe, 2009; Deksne et al., 2020; Fuller et al., 2012)。よって、感染症のリスク評価および生物多様性の保全を行う上でも、病原体の伝播動態を把握することが必要である。

ベクター媒介性感染症を含む鳥類の感染症の感染サイクルは、鳥類の生態と関連して三つに区分することができる。まず、基本となる「コアサイクル」は在来の留鳥とベクターで構成される。留鳥は移動範囲が制限されていることから地域的な感染状

況が反映される。これは国内の原虫感染の流行および維持を担う感染サイクルと言える。二つ目は国境を越えた病原体の移動による「越境運搬サイクル」である。長距離を移動する渡り鳥は病原体の運搬者として重要な役割を担っていると考えられている (Altizer et al., 2011; Atkinson and Lapointe, 2009; Garamszegi, 2011; Ishtiaq and Renner, 2020)。野鳥の大量死の原因となる高病原性鳥インフルエンザウイルスは、カモ目 (Anseriformes) やチドリ目 (Charadriiformes) などの渡り鳥によって運ばれる (Altizer et al., 2011; Kilpatrick et al., 2006)。そのため、ある地域に分布していない病原体が渡り鳥とともに他の地域から持ち込まれる可能性や、その地域から他の地域へ持ち出される可能性が指摘されており (Murata, 2007)、感染症の侵入リスクを考慮する上で留意が必要なサイクルである。三つ目として、自然宿主ではない種に病原体が伝播される「飛び火サイクル」があり、先に述べた本来の生息地から離れた地域で飼育されているペンギン科鳥類などが飛び火先の宿主となる。このサイクルでは、病原体が非好適宿主に伝播した際の病原性の問題が生じることが想定される。なお、実際には、留鳥・渡り鳥・飼育下鳥類が混在しており、環境や時期などによってこれら 3 種類の感染サイクルも混在し、構成比率が異なることが予想される。例えば、渡り鳥の飛来が少ない場所ではコアサイクルの比重が大きく、渡り鳥の飛来が多い場所では越境運搬サイクルの比重が大きくなると予想される。また、動物園などでは飛び火サイクルの比重が大きいことも想定される。よって、鳥類感染症の伝播動態を把握するためには、様々な環境における感染サイクルの特徴や宿主およびベクターとの関係を明らかにすることが重要である。

アジア大陸の東端に位置する日本は、南北に長い島国であるため、多様な自然環境および生態系を有する。国内では 600 種以上の野鳥が記録されており、環境や地域ごとに様々な固有種や固有亜種が生息している (Brazil, 2009; Gill et al., 2021;

Ornithological Society of Japan, 2012)。また、日本で見られる鳥類の約 3 割の種が渡り鳥であり、日本は渡り鳥にとって繁殖地、中継地および越冬地として重要な地域である (Higuchi et al., 2009)。野鳥以外にも、国内では生物多様性の保全および教育や研究を目的に、外来種も含む様々な鳥種が動物園や水族館などの動物展示施設で飼育されている。これまでに、国内では野生下や飼育下の鳥類における住血原虫保有状況が明らかにされてきた (Imura et al., 2012; Kakogawa et al., 2019; Murata, 2007; Sato et al., 2007; Tamura et al., 2018; Tanigawa et al., 2013; 佐藤, 2009)。しかし、未調査の地域や鳥種も多く、国内における鳥類住血原虫の保有状況および伝播動態はまだ検討の余地が残されている。また、宿主鳥類の生態区分 (留鳥・渡り鳥・飼育下鳥類など) および上述の感染サイクル区分に着目した報告は乏しく、鳥類住血原虫の分布および伝播などの生態における鳥類の役割は十分に解明されていない。

そこで、本研究では、国内の異なる生息環境および生態区分の鳥類を対象に、鳥類住血原虫の保有状況および伝播動態を明らかにすることを目的とした。まず、日本本土における原虫保有状況を把握するため、関東地方の留鳥および渡り鳥を含む傷病保護鳥類における原虫保有状況および分子系統関係を調べ、留鳥および渡り鳥における感染傾向を検討した (第 2 章: コアサイクル+越境運搬サイクル)。次に長距離型の渡り鳥であるタシギ属 4 種を対象に原虫保有状況を明らかにし、種間における保有率や原虫系統解析による推定伝播地域などを検討した (第 3 章: 越境運搬サイクル)。さらに、隔離された島嶼環境における原虫保有状況を明らかにするため、海洋島である小笠原諸島の鳥類および蚊を調査し、諸島内の伝播動態の解明を試みた (第 4 章: コアサイクル+越境運搬サイクル)。最後に飼育下のペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の発育ステージおよび感染経路について検討した (第 5 章: 飛び火サイクル)。

## 第2章

関東地方の保護鳥類における住血原虫保有状況

(コアおよび越境運搬サイクル)

## 2.1 はじめに

鳥類の住血原虫は 1884 年にロシアの研究者 Danilewsky によって発見され、以降日本を含む世界各地の野鳥から報告されてきた (Valkiūnas, 2005)。国内では、20 世紀初頭から野鳥における住血原虫保有状況に関する研究が始まり、西日本および東日本を中心に様々な鳥種における感染状況が調査された。加藤・木村 (1950) は関東地方で捕獲した野鳥における住血原虫の保有率は約 20%であることを報告し、永井 (1954) は 1953 年に野鳥を長期間飼育し、原虫の季節消長などの観察を行った。その後、全国的に調査が行われ、調べた野鳥の 10.6~14.9%が 3 属いずれかの原虫に感染していることが示されたが (Imura et al., 2012; Murata, 2002; Nagata, 2006)、北海道のハシボソガラス (*Corvus corone*; 93.2%) やハシブトガラス (*Corvus macrorhynchos*; 95.8%)、南大東島のメジロ (*Zosterops japonicus*; 45.2%) やモズ (*Lanius bucephalus*; 92.2%)、秩父のヒガラ (*Periparus ater*; 64.3%) やコガラ (*Poecile montanus*; 81.8%) など、一部の鳥種では非常に高い原虫保有率であった (Imura et al., 2012; Murata et al., 2008; Yoshimura et al., 2014)。また、日本の高山地域にのみ生息し、絶滅危惧種に指定されているライチョウ (*Lagopus muta japonica*) からは特有の *L. lovati* が検出され、保有率は 78.1%と高いことが報告されている (Murata et al., 2007)。このように、これまでに国内各地の様々な野鳥から住血原虫が検出され、原虫保有状況も徐々に解明されている。しかし、一般に野鳥の捕獲および採血は、調査機会が限定され必要な技術面からも困難であり、住血原虫の保有状況がまだ十分に明らかになっていない地域や鳥種が多い。また、第 1 章で述べたように、近年気候変動など様々な原因により鳥類やベクターの分布が変化しており、これに伴い住血原虫の分布も変化する可能性がある。そのため、継続的な原虫の保有状況のモニタリングに加え、原虫と鳥類やベクターの分布や生態との

関係を把握することが重要となる。

国内各地には野生の傷病鳥類を保護し、治療や野生復帰を目指したりリハビリテーションなどを行う施設がある。また、自治体などに委託され、傷病鳥類の保護活動を行う動物園・水族館や一般の動物病院もある。これらの施設に持ち込まれる野鳥は、窓ガラスへの衝突や交通事故などさまざまな原因で保護され、衰弱、脳震盪や骨折など症状も多岐にわたる。保護に至った各種要因は、総合的に個体の体調不良などの原因となり、住血原虫感染による病原性などの影響を適切に評価する妨げになる可能性がある。また、渡り鳥を含む一部の保護鳥類は施設に長期間飼養保管されることがあり、通常は暴露されない病原体と接する可能性がある。そのため、保護された野鳥の原虫感染状況は、必ずしも自然下の感染状況を反映しているとは限らず留意する必要がある。しかし、渡り鳥などを含む捕獲困難な様々な鳥種が年間を通じて保護されるため、このような施設は住血原虫の感染状況や分布を把握する上では貴重な場である (Murata, 2002; Tanaka et al., 2019; Tanigawa et al., 2013)。特に捕獲が困難なカモ目やタカ目 (Accipitriformes) の鳥類も保護されており、住血原虫の保有状況を明らかにするために適している。

そこで本章では、関東地方で保護された傷病鳥類を対象に、住血原虫の保有状況および分子系統関係を調べた。また、渡りに関する各生態区分における保有状況も把握することで、留鳥および渡り鳥における感染傾向を検討した。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 サンプルの採取

関東にある傷病鳥獣保護施設または動物病院計 4 箇所では保護・治療されていた野鳥 80 種 475 羽からサンプルを採取した。サンプル採取は、それぞれ神奈川県自然環境保全センター (35°26'30.2676"N, 139°17'39.8004"E) では 2015 年 4 月から 2016 年 3 月、いのかしら動物病院 (35°41'32.1036"N, 139°34'10.6716"E) では 2013 年 12 月から 2015 年 3 月、行徳野鳥病院 (35°40'6.024"N, 139°54'56.6964"E) では 2014 年 9 月から 2016 年 2 月、金坂動物病院 (35°32'39.5268"N, 140°12'50.85"E) では 2013 年 8 月から 2015 年 3 月に行った。これらの鳥類は 2004 年 5 月から 2016 年 3 月の間に関東地方の各地で保護された個体を含む。生きている個体の血液は頸静脈または翼下静脈から採取し、70%エタノールが入ったマイクロチューブで保存した。その後、サンプルは日本大学生物資源科学部獣医学科実験動物学研究室に運ばれ、次の工程まで 4°C で保存された。また、血液の一部をスライドグラスに塗抹し、血液塗抹標本を作製した。塗抹標本はメタノールで固定後、ヘマカラー染色液 (Microscopy Hemacolor®: Merck Millipore, Darmstadt, Germany) で染色し、乾いたことを確認した後、封入剤およびカバーグラスを用いて封入した。死亡個体からは肝臓の一部を採取し、DNA 抽出までは -20°C で保存した。

本章における鳥類からのサンプル採取に関するすべての手順は、「動物の愛護および管理に関する法律 (Act on Welfare and Management of Animals 1973)」の倫理基準に準拠して行われ、捕獲およびサンプル採取中に鳥類を傷つけることはなかった。

## 2.2.2 DNA 抽出および鳥類住血原虫 DNA の検出

フェノール・クロロホルム法 (PCI 法) により血液および肝臓から DNA を抽出し、トリスヒドロキシメチルアミノメタン-エチレンジアミン四酢酸 (tris-EDTA) 緩衝液に溶解した。NanoDrop ND-1000 超微量分析分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて吸光度を測定し、最終濃度が 50 ng/μl (±10 ng/μl) になるように調節した。抽出後既報に基づき、鳥類住血原虫 3 属 (*Plasmodium* 属原虫、*Haemoproteus* 属原虫および *Leucocytozoon* 属原虫) のミトコンドリア DNA cytochrome *b* (*cytb*) 遺伝子領域を標的とした nested-PCR を行った (Hellgren et al., 2004)。1st PCR には HaemNFI/HaemNR3 のプライマーセットを用いた。その後、2nd PCR には *Plasmodium* 属原虫および *Haemoproteus* 属原虫を標的とした HaemF/HaemR2、*Leucocytozoon* 属原虫を標的とした HaemFL/HaemR2L のプライマーセットを用いた。PCR にはそれぞれ最終濃度 2 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM の dNTP、10×ExTaq Buffer (Mg<sup>2+</sup> free: Takara, Ohtsu, Japan)、0.625 units の ExTaq® (Takara)、各プライマー 0.6 μM、50 ng のサンプル DNA を含む全量 25 μl の反応液を用いた。PCR の反応条件は既報の通りである (Hellgren et al., 2004)。陽性コントロールとして、実験的に感染させたニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) 由来の *Plasmodium gallinaceum* GALLUS01 と、保護されたハシブトガラス由来の *Leucocytozoon* sp. COCOR10 が検出された血液の抽出 DNA を加えた。また、DNA の代わりに純水を加えた陰性コントロールを準備した。

PCR 反応後、エチジウムブロマイド (nacalai tesque, Nakagyo, Japan) を加えた 1.5% アガロースゲル (AgaroseS: Nippon Gene, Chiyoda, Japan) と Tris-Acetate-EDTA (TAE) 緩衝液を用いて 100 V で約 20 分間泳動し、紫外線照射下で目的遺伝子の増幅の有無を確認した。増幅が認められた場合、増幅産物をゲルから

切り出し、Thermostable  $\beta$ -Agarase (Nippon Gene) を用いて DNA を抽出した。陰性コントロールに増幅が確認された場合、同じゲルのサンプルは全て 1st PCR から再検査した。

その後、ゲルから抽出した DNA は BigDye® terminator cycle sequencing kit (Ver 3.1: Applied Biosystems, Foster City, USA) とサイクルシーケンサー (ABI 3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) を用い、両方向からダイレクトシーケンスした。得られたフォワード (forward) およびリバース (reverse) 波形を SeqMan Pro (DNASTAR, Madison, USA) にてコンティグ結合した。二重塩基の波形 (ダブルピーク) が確認された場合は混合感染とした。得られた塩基配列は Clustal W プログラムを用いてアラインメントを行い、479 bp で Basic Local Alignment Search Tool (Madden, 2013) を用いて GenBank データベースおよび MalAvi データベース (Bensch et al., 2009) の配列と比較した。新規の系統には MalAvi の命名法に基づき系統名を付け、GenBank データベースおよび MalAvi データベースに登録した。

### 2.2.3 渡り区分による統計解析

日本鳥類目録改訂第 7 版に基づき、本章の対象鳥種を関東地方における渡り区分 (冬鳥、夏鳥、旅鳥、留鳥) で分類した (日本鳥学会, 2012)。なお、移入種であるカナダガン (*Branta canadensis*) およびコリンウズラ (*Colinus virginianus*) は留鳥に分類した。また、オオバン (*Fulica atra*) は一部の個体が関東地方で繁殖しているが、冬季に渡ってくる個体が多いため (Hashimoto and Sugawa, 2013)、冬鳥に分類した。保護鳥類の渡り区分による原虫保有率の有意差の有無を  $\chi^2$  検定により検討した。ただし、旅鳥は個体数が少なかったため、検定から除いた。

#### 2.2.4 住血原虫の形態学的検出

血液塗沫標本が得られた場合、光学顕微鏡（OLYMPUS BX43 または OLYMPUS IX71: Olympus, Tokyo, Japan）を用いて 400 倍および 1000 倍視野で観察し、住血原虫の有無を確認した。原虫が認められた場合は cellSens Standard 1.6（Olympus）を用いて画像データを記録し、形態学的に *Plasmodium* 属, *Haemoproteus* 属および *Leucocytozoon* 属に分類した (Valkiūnas, 2005)。

## 2.3 成績

80 種 475 羽中 43 種 100 羽 (21.1%) から 3 属いずれかの原虫 DNA が検出された (表 2.1)。内訳は、*Plasmodium* 属原虫は 28 羽 (5.9%)、*Haemoproteus* 属原虫および *Leucocytozoon* 属原虫は 42 羽 (8.8%) からそれぞれ検出された。また、17 羽からは異なる原虫属による混合感染が確認された。本章で調べた代表的な鳥種を図 2.1 で示す。

渡り区別の原虫保有状況は、冬鳥で 30 羽 (46.0%)、夏鳥で 11 羽 (19.3%)、留鳥で 58 羽 (17.0%)、旅鳥で 1 羽 (33.3%) であった (表 2.2)。冬鳥における原虫保有率は夏鳥および留鳥よりも有意に高かった ( $\chi^2=28.15$ 、d.f.=2、 $p<0.01$ )。また、*Plasmodium* 属原虫と *Leucocytozoon* 属原虫でもそれぞれ冬鳥で有意に保有率が高かった (*Plasmodium* :  $\chi^2=17.28$ 、d.f.=2、 $p<0.01$  ; *Leucocytozoon* :  $\chi^2=32.33$ 、d.f.=2、 $p<0.01$ )。しかし、解析からオオバン (図 2.1a) を除いた場合、*Plasmodium* 属原虫の保有率に有意な差は認められなかった ( $\chi^2=4.20$ 、d.f.=2、 $p=0.12$ )。また、カモ目 (図 2.1b : カモ目の 1 種、オナガガモ) を除いた場合、*Leucocytozoon* 属原虫の保有率に有意な差は認められなかった ( $\chi^2=4.67$ 、d.f.=2、 $p=0.10$ )。加えて、オオバンおよびカモ目の両方を除いた場合、全体の保有率に有意な差は認められなかった ( $\chi^2=3.62$ 、d.f.=2、 $p=0.16$ )。なお、*Haemoproteus* 属原虫の保有率に有意な差は確認されなかった ( $\chi^2=1.78$ 、d.f.=2、 $p=0.41$ )。

分子系統解析の結果、*Plasmodium* 属原虫 12 系統、*Haemoproteus* 属原虫 18 系統、*Leucocytozoon* 属原虫 26 系統が検出された。それらのうち、35 系統は初めて検出され、それらの系統には MalAvi データベースに基づく系統名および GenBank データベースのアクセッション番号が付与された (表 2.3、2.4、2.5)。

血液塗抹標本が得られた 337 羽中 48 羽から原虫虫体が検出され (図 2.2)、すべ

て PCR 陽性であった。一方、PCR 陽性だった 12 羽の血液塗抹標本では虫体は確認されなかった。また、PCR 陽性個体中、40 羽からは血液塗抹標本が得られなかった。観察された原虫虫体の一部は形態学的に *Plasmodium relictum*、*P. circumflexum*、*Haemoproteus minutus* などの原虫種に分類され、分子系統も一致していた (図 2.2 b, c, f) (Valkiūnas, 2005)。

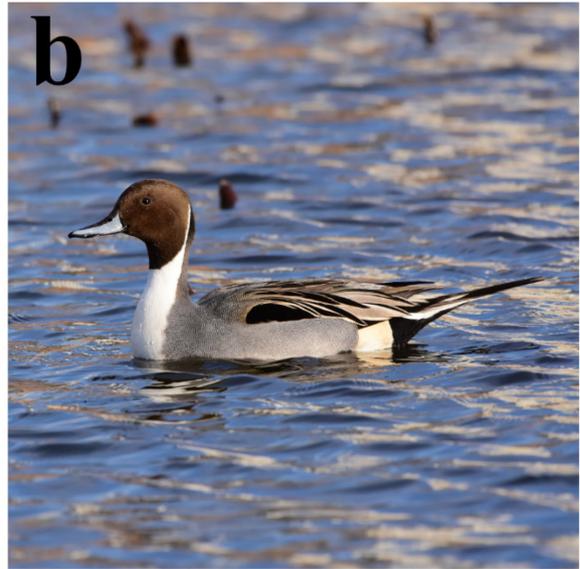


図 2.1. 本章で調べた鳥種 (一部). (a) オオバン (*Fulica atra*)、(b) オナガガモ (*Anas acuta*)、(c) フクロウ (*Strix uralensis*)、(d) ツグミ (*Turdus eunomus*).

Fig. 2.2. Some of the bird species investigated in this chapter. (a) *Fulica atra*, (b) *Anas acuta*, (c) *Strix uralensis*, (d) *Turdus eunomus*.

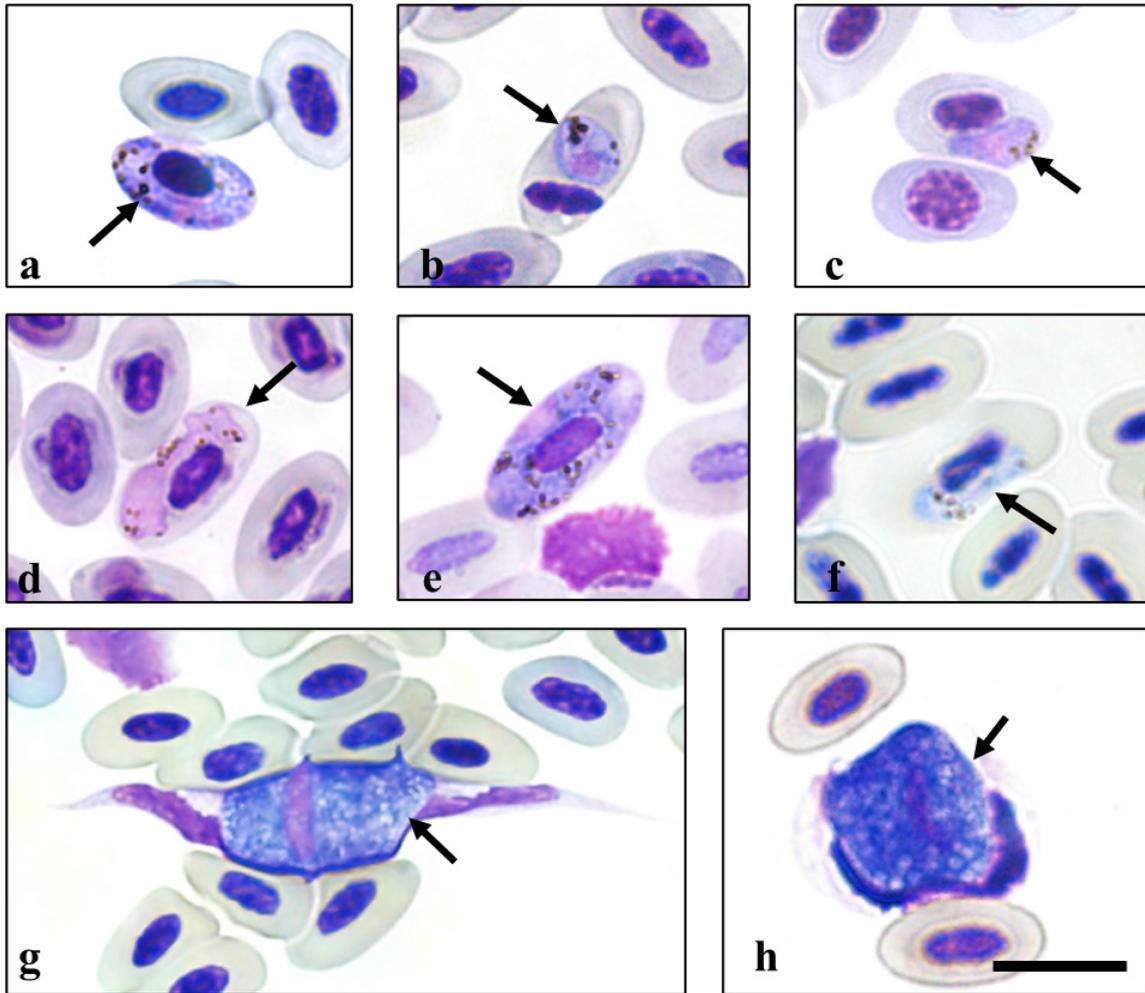


図 2.2. 関東地方の保護鳥類の血液中に見られた住血原虫（Hemacolor®染色；以下鳥種・原虫種）：(a) オナガ（*Cyanopica cyanus*）・*Plasmodium* sp.、(b) ヒヨドリ（*Hypsipetes amaurotis*）・*P. relictum*、(c) オオバン（*Fulica atra*）・*P. circumflexum*、(d) ヒヨドリ・*Haemoproteus* sp.、(e) カモメ（*Larus canus*）・*Haemoproteus* sp.、(f) クロツグミ（*Turdus cardis*）・*H. minutus*、(g) オナガガモ（*Anas acuta*）・*Leucocytozoon* sp.、(h) スズガモ（*Aythya marila*）・*Leucocytozoon* sp.. スケールバー：10  $\mu$ m.

Fig. 2.1. Haemosporidian parasites detected from rescued birds of the Kanto region (Hemacolor®-stained): (a) *Plasmodium* sp. from *Cyanopica cyanus*, (b) *P. relictum* from *Hypsipetes amaurotis*, (c) *P. circumflexum* from *Fulica atra*, (d) *Haemoproteus* sp. from *Hypsipetes amaurotis*, (e) *Haemoproteus* sp. from *Larus canus*, (f) *H. minutus* from *Turdus cardis*, (g) *Leucocytozoon* sp. from *Anas acuta*, (h) *Leucocytozoon* sp. from *Aythya marila*. Scale-bar: 10  $\mu$ m.

表 2.1. 4 施設における住血原虫検出状況. Table 2.1. Detection results of avian haemosporidia from 4 facilities.

目 Order	種 Species	渡り区分 Migratory status <sup>a</sup>	個体数 (塗抹) No. sampled (smears)	PCR陽性数 PCR positive (%)	PCR陽性数 PCR positive (塗抹 microscopy)			Mix <sup>b</sup>
					<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	
カモ Anseriformes	カナダガン <i>Branta canadensis</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-
	コハクチョウ <i>Cygnus columbianus</i>	W	1 (1)	-	-	-	-	-
	オシドリ <i>Aix galericulata</i>	W	3 (3)	2 (66.7)	-	-	2 (2)	-
	ヨシガモ <i>Anas falcata</i>	W	1 (0)	1 (100)	-	-	1 (0)	1 (0)
	カルガモ <i>Anas zonorhyncha</i>	R	9 (7)	-	-	-	-	-
	マガモ <i>Anas platyrhynchos</i>	W	2 (2)	1 (50.0)	1 (1)	-	-	-
	オナガガモ <i>Anas acuta</i>	W	4 (3)	4 (100)	-	-	4 (3)	-
	コガモ <i>Anas crecca</i>	W	3 (1)	3 (100)	-	-	3 (0)	2 (0)
	ホシハジロ <i>Aythya ferina</i>	W	1 (1)	1 (100)	1 (1)	-	-	-
	キンクロハジロ <i>Aythya fuligula</i>	W	6 (6)	2 (33.3)	-	-	2 (2)	-
キジ Galliformes	スズガモ <i>Aythya marila</i>	W	2 (2)	2 (100)	-	-	2 (2)	-
	コリンウズラ <i>Colinus virginianus</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-
ヨタカ Caprimulgiformes	キジ <i>Phasianus versicolor</i>	R	1 (0)	-	-	-	-	-
	ヨタカ <i>Caprimulgus jotaka</i>	S	1 (1)	-	-	-	-	-
カッコウ Cuculiformes	ツツドリ <i>Cuculus optatus</i>	P	1 (1)	-	-	-	-	-
ハト Colombiformes	キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	R	34 (20)	6 (17.6)	1 (0)	2 (1)	3 (1)	-
	アオバト <i>Treron sieboldii</i>	R	10 (9)	2 (20.0)	-	-	2 (1)	-
	ドバト <i>Columba livia</i> var. <i>domestica</i>	R	34 (26)	-	-	-	-	-
ツル Gruiformes	クイナ <i>Rallus indicus</i>	W	1 (0)	1 (100)	1 (0)	-	-	-
	オオバン <i>Fulica atra</i>	W	10 (8)	6 (60.0)	6 (4)	-	-	-
カイツブリ Podicipediformes	カンムリカイツブリ <i>Podiceps cristatus</i>	W	3 (2)	1 (33.3)	1 (0)	-	1 (0)	1 (0)
	ハジロカイツブリ <i>Podiceps nigricollis</i>	W	1 (0)	-	-	-	-	-
チドリ Charadriiformes	チュウシャクシギ <i>Numenius phaeopus</i>	S	1 (1)	1 (100)	-	1 (1)	-	-
	ヤマシギ <i>Scolopax rusticola</i>	W	3 (1)	2 (66.7)	-	2 (0)	1 (0)	1 (0)
	イソシギ <i>Actitis hypoleucos</i>	R	1 (0)	-	-	-	-	-
	ユリカモメ <i>Chroicocephalus ridibundus</i>	W	2 (2)	-	-	-	-	-
	ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	R	6 (6)	3 (50)	-	3 (3)	-	-
	カモメ <i>Larus canus</i>	W	1 (1)	1 (100)	-	1 (1)	-	-
ミズナギドリ Procellariiformes	セグロカモメ <i>Larus vegae</i>	W	9 (6)	1 (11.1)	1 (0)	-	-	-
	コアホウドリ <i>Phoebastria immutabilis</i>	W	1 (1)	-	-	-	-	-
	ハイイロウミツバメ <i>Oceanodroma furcata</i>	W	2 (0)	-	-	-	-	-
	オオミズナギドリ <i>Calonectris leucomelas</i>	R	1 (0)	1 (100)	1 (0)	-	-	-
カツオドリ Suliformes	ハシボソミズナギドリ <i>Ardenna tenuirostris</i>	P	1 (0)	-	-	-	-	-
	カワウ <i>Phalacrocorax carbo</i>	R	15 (7)	-	-	-	-	-

表 2.1. 4 施設における住血原虫検出状況 (続き) .

Table 2.1. Detection results of avian haemosporidia from 4 facilities (continued).

サンプル採取した鳥類 Birds sampled		渡り区分	個体数 (塗抹)	PCR陽性数	PCR陽性数 PCR positive (塗抹 microscopy)			
目 Order	種 Species	Migratory status <sup>a</sup>	No. sampled (smears)	PCR positive (%)	<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>Leucocytozoon</i> sp.	Mix <sup>b</sup>
ペリカン Pelecaniformes	クロツラヘラサギ <i>Platalea minor</i>	P	1 (0)	1 (100)	-	1 (0)	-	-
	ヨシゴイ <i>Ixobrychus sinensis</i>	S	1 (0)	1 (100)	1 (0)	-	-	-
	ミゾゴイ <i>Gorsachius goisagi</i>	S	1 (1)	1 (100)	-	-	1 (1)	-
	ゴイサギ <i>Nycticorax nycticorax</i>	R	11 (8)	1 (9.1)	1 (1)	-	-	-
	アマサギ <i>Bubulcus coromandus</i>	S	1 (1)	-	-	-	-	-
	アオサギ <i>Ardea cinerea</i>	R	12 (4)	1 (8.3)	-	1 (0)	-	-
	ダイサギ <i>Ardea alba</i>	R	2 (2)	-	-	-	-	-
	チュウサギ <i>Ardea intermedia</i>	S	5 (4)	-	-	-	-	-
	コサギ <i>Egretta garzetta</i>	R	3 (1)	-	-	-	-	-
タカ Accipitriformes	ツミ <i>Accipiter gularis</i>	S	8 (6)	-	-	-	-	-
	ハイタカ <i>Accipiter nisus</i>	W	1 (1)	-	-	-	-	-
	オオタカ <i>Accipiter gentilis</i>	R	6 (4)	-	-	-	-	-
	トビ <i>Milvus migrans</i>	R	14 (9)	-	-	-	-	-
	サシバ <i>Butastur indicus</i>	S	1 (1)	-	-	-	-	-
	ノスリ <i>Buteo japonicus</i>	W	3 (3)	-	-	-	-	-
フクロウ Strigiformes	アオバズク <i>Ninox japonica</i>	S	4 (2)	2 (50.0)	-	2 (0)	2 (0)	2 (0)
	オオコノハズク <i>Otus semitorques</i>	R	7 (3)	5 (71.4)	-	2 (0)	4 (2)	1 (0)
	コミミズク <i>Asio flammeus</i>	W	1 (1)	1 (100)	-	-	1 (1)	-
	フクロウ <i>Strix uralensis</i>	R	9 (5)	8 (88.9)	-	8 (4)	-	-
ブッポウソウ Coraciiformes	カワセミ <i>Alcedo atthis</i>	R	2 (0)	-	-	-	-	-
キツツキ Piciformes	コゲラ <i>Yungipicus kizuki</i>	R	3 (3)	-	-	-	-	-
	アオゲラ <i>Picus awokera</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-
ハヤブサ Falconiformes	チョウゲンボウ <i>Falco tinnunculus</i>	R	12 (10)	1 (8.3)	-	1 (0)	-	-
	ハヤブサ <i>Falco peregrinus</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-
スズメ Passeriformes	モズ <i>Lanius bucephalus</i>	R	1 (0)	1 (100)	-	1 (0)	-	-
	カケス <i>Garrulus glandarius</i>	R	1 (0)	1 (100)	-	-	1 (0)	-
	オナガ <i>Cyanopica cyanus</i>	R	2 (1)	2 (100)	2 (1)	-	-	-
	ハシボソガラス <i>Corvus corone</i>	R	12 (7)	6 (50.0)	2 (2)	4 (0)	1 (0)	1 (0)
	ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R	10 (7)	7 (70.0)	1 (0)	6 (3)	2 (1)	2 (1)
	シジュウカラ <i>Parus minor</i>	R	15 (15)	1 (6.7)	-	-	1 (0)	-
	ヒバリ <i>Alauda arvensis</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-
	ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R	21 (14)	6 (28.6)	4 (4)	2 (1)	2 (2)	2 (2)

表 2.1. 4 施設における住血原虫検出状況（続き）。

Table 2.1. Detection results of avian haemosporidia from 4 facilities (continued).

サンプル採取した鳥類 Birds sampled		渡り区分 Migratory status <sup>a</sup>	個体数 (塗抹) No. sampled (smears)	PCR陽性数 PCR positive (%)	PCR陽性数 PCR positive (塗抹 microscopy)			Mix <sup>b</sup>	
目 Order	種 Species				<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>Leucocytozoon</i> sp.		
スズメ Passeriformes	ツバメ <i>Hirundo rustica</i>	S	37 (26)	2 (5.4)	-	1 (0)	1 (0)	-	
	ウグイス <i>Horornis diphone</i>	R	2 (0)	-	-	-	-	-	
	エゾムシクイ <i>Phylloscopus borealoides</i>	S	1 (0)	1 (100)	-	1 (0)	-	-	
	メジロ <i>Zosterops japonicus</i>	R	3 (3)	-	-	-	-	-	
	ムクドリ <i>Spodiopsar cineraceus</i>	R	41 (36)	3 (7.3)	3 (1)	-	1 (0)	2 (0)	
	クロツグミ <i>Turdus cardis</i>	S	1 (1)	1 (100)	-	1 (1)	1 (1)	1 (1)	
	シロハラ <i>Turdus pallidus</i>	W	1 (0)	-	-	-	-	-	
	ツグミ <i>Turdus eunomus</i>	W	3 (3)	1 (33.3)	-	-	1 (1)	-	
	キビタキ <i>Ficedula narcissina</i>	S	3 (1)	2 (66.7)	-	1 (0)	1 (1)	-	
	スズメ <i>Passer montanus</i>	R	31 (23)	3 (9.7)	1 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (1)	
	ハクセキレイ <i>Motacilla alba</i>	R	2 (2)	-	-	-	-	-	
	カワラヒワ <i>Chloris sinica</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-	
	ホオジロ <i>Emberiza cioides</i>	R	1 (1)	-	-	-	-	-	
	アオジ <i>Emberiza spodocephala</i>	R	2 (0)	-	-	-	-	-	
				475 (337)	100 (21.1)	28 (16)	42 (15)	42 (21)	17 (5)

<sup>a</sup> 渡り区分: R=留鳥、M=夏鳥、W=冬鳥、P=旅鳥. Migratory status: R=resident breeder, M=migrant (summer) breeder, W=winter visitor, P=passage visitor.

<sup>b</sup> 混合感染. Co-infection.

表 2.2. 渡り区分ごとの PCR 陽性数.

Table 2.2. Number of PCR positive birds by migration status.

	原虫属 parasite genus	冬鳥 Winter visitor	夏鳥 Migrant breeder	留鳥 Resident breeder	$\chi^2$	$p$
個体数 No. sampled		65	65	342	-	-
陽性数 No. positive	<i>Plasmodium</i> sp.	11*	1	16	17.28	<0.01 0.12 <sup>a</sup>
	<i>Haemoproteus</i> sp.	4	7	30	0.88	0.64
	<i>Leucocytozoon</i> sp.	18*	6	19	32.33	<0.01 0.10 <sup>b</sup>
	合計 Total (%)	30(46.2)*	11(16.9)	58(17.0)	28.83	<0.01

\* 有意差あり ( $p>0.05$ ) . Significant difference ( $p>0.05$ ).

<sup>a</sup> オオバン (*Fulica atra*) を除いた場合の *Plasmodium* sp.  $p$  値.

$p$ -value of *Plasmodium* sp. when *Fulica atra* is removed from analysis.

<sup>b</sup> カモ目を除いた場合の *Leucocytozoon* sp.  $p$  値.

$p$ -value of *Leucocytozoon* sp. when Anseriiformes is removed from analysis.

表 2.3. 検出された *Plasmodium* 属系統および宿主情報. Table 2.3. Detected *Plasmodium* lineages and host information.

系統名 (陽性率) Lineage name (prevalence)	GenBank accession number <sup>a</sup>	本章 This chapter		既報 (MalAviから抜粋) Previous reports (excerpt from MalAvi)		
		鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	国 (地域) Country (region)
CXPIP09 (21.4%)	-	セグロカモメ <i>Larus vegae</i>	W	ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R	Japan (Tokyo)
		オナガ <i>Cyanopica cyanus</i>	R	アオサギ <i>Ardea cinerea</i>	R	Japan (Nagasaki)
		ハシボンガラス <i>Corvus corone</i>	R			
		ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R			
CXPIP10 (3.6%)	-	ヨシゴイ <i>Ixobrychus sinensis</i>	S			
CXPIP12 (7.1%)	-	ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R	ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R	Japan (Nagasaki)
FULATR01* (3.6%)	LC230121	オオバン <i>Fulica atra</i>	W			
NYCNYC02* (3.6%)	LC230120	ゴイサギ <i>Nycticorax nycticorax</i>	R			
PADOM02 (3.6%)	-	スズメ <i>Passer montanus</i>	R	イエスズメ <i>Passer domesticus</i>	×	France
				コウライキジ <i>Phasianus colchicus</i>	×	South Korea
SGS1 (14.3%)	-	ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R	アカマシコ <i>Carpodacus erythrinus</i>	×	Russia
		ムクドリ <i>Spodiopsar cineraceus</i>	R	イエスズメ <i>Passer domesticus</i>	×	France
STVAR04 (3.6%)	-	ホシハジロ <i>Aythya ferina</i>	W	アメリカフクロウ <i>Strix varia</i>	×	United States
				ミカヅキシマアジ <i>Anas discors</i>	×	United States
SW2 (3.6%)	-	クイナ <i>Rallus indicus</i>	W	アオジ <i>Emberiza spodocephala</i>	W	South Korea
				モリフクロウ <i>Strix aluco</i>	×	Germany
				カワウ <i>Phalacrocorax carbo</i>	×	Mongolia
				ウズラクイナ <i>Crex crex</i>	×	Russia
				オオヨシキリ <i>Acrocephala arundinaceus</i>	×	Sweden
SW5 (28.6%)	-	カンムリカイツブリ <i>Podiceps cristatus</i>	W	オナガガモ <i>Anas acuta</i>	W	US
		オオバン <i>Fulica atra</i>	W	ウズラクイナ <i>Crex crex</i>	×	Russia
		オオミズナギドリ <i>Calonectris leucomelas</i>	R	ダンチョウ <i>Grus japonensis</i>	R	Japan (Hokkaido)
		キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	R	ヤツガシラ <i>Upupa epops</i>	×	Portugal
YWT4 (3.6%)	-	ムクドリ <i>Spodiopsar cineraceus</i>	R	ハクセキレイ <i>Motacilla flava</i>	×	Bulgaria
				オオキンランチョウ <i>Euplectes orix</i>	×	South Africa

\* 初めて検出された系統. Lineages detected for the first time.

<sup>a</sup> GenBankアクセッション番号は初めて検出された系統のみ記載している. GenBank accession numbers are shown for only novel lineages.

<sup>b</sup> 関東における渡り区分: R=留鳥、W=冬鳥、S=夏鳥、×=関東に分布していない.

Migratory status in the Kanto region: R=resident breeder, W=wintering visitor, S=migrant (summer) breeder, ×=not distributed in the Kanto region,

表 2.4. 検出された *Haemoproteus* 属系統および宿主情報. Table 2.4. Detected *Haemoproteus* lineages and host information.

系統名 (陽性率) Lineage name (prevalence)	GenBank accession number <sup>a</sup>	本章 This chapter		既報 (MalAviから抜粋) Previous reports (excerpt from MalAvi)		
		鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	国 (地域) Country (region)
COCOR14* (4.9%)	LC230128	ハシボソガラス <i>Corvus corone</i>	R			
COCOR15* (7.3%)	LC230130	ハシボソガラス <i>Corvus corone</i>	R			
		ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R			
CORMAC04* (4.9%)	LC230129	ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R			
CXPIP19 (7.3%)	-	ハシボソガラス <i>Corvus corone</i>	R			
		ハシブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R			
FICNAR01* (2.4%)	LC230125	キビタキ <i>Ficedula narcissina</i>	S			
HYPHI07 (7.3%)	-	ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R	チャムネヒヨドリ <i>Ixos philippinus</i>	×	Philippines
		エゾムシクイ <i>Phylloscopus borealoides</i>	S			
LARCRA01 (9.8%)	-	ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	R			
		カモメ <i>Larus canus</i>	W			
		チョウゲンボウ <i>Falco tinnunculus</i>	R	キアシセグロカモメ <i>Larus cachinnans</i>	×	Spain
LARCRA02* (2.4%)	LC230123	ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	R			
NINOX06* (2.4%)	LC230131	アオバズク <i>Ninox japonica</i>	S			
NINOX07* (2.4%)	LC230132	アオバズク <i>Ninox japonica</i>	S			
NUMPHA01* (2.4%)	LC230122	チュウシャクシギ <i>Numenius phaeopus</i>	S			
OTULEM01* (7.3%)	LC230124	オオコノハズク <i>Otus semitorques</i>	R			
		アオサギ <i>Ardea cinerea</i>	R			
		ヤマシギ <i>Scolopax rusticola</i>	W			
OTULEM02* (2.4%)	LC230133	オオコノハズク <i>Otus semitorques</i>	R			
PLAMIN01* (19.5%)	LC230126	クロツラヘラサギ <i>Platalea minor</i>	P			
		フクロウ <i>Strix uralensis</i>	R			
		モズ <i>Lanius bucephalus</i>	R			
		スズメ <i>Passer montanus</i>	R			
STRORI01 (4.9%)	-	キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	R	キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	R	Japan (Hokkaido)
STRURA01* (2.4%)	LC230127	フクロウ <i>Strix uralensis</i>	R			
STRURA02* (7.3%)	LC230134	フクロウ <i>Strix uralensis</i>	R			
		ツバメ <i>Hirundo rustica</i>	S			
TUCHR01 (2.4%)	-	クロツグミ <i>Turdus cardis</i>	S	ウタツグミ <i>Turdus philomelos</i>	×	Russia
				ワキアカツグミ <i>Turdus iliacus</i>	×	Sweden

\* 初めて検出された系統. Lineages detected for the first time.

<sup>a</sup> GenBankアクセッション番号は初めて検出された系統のみ記載している. GenBank accession numbers are shown for only novel lineages.

<sup>b</sup> 関東における渡り区分: R=留鳥, W=冬鳥, S=夏鳥, ×=関東に分布していない.

Migratory status in the Kanto region: R=resident breeder, W=wintering visitor, S=migrant (summer) breeder, ×=not distributed in the Kanto region.

表 2.5. 検出された *Leucocytozoon* 属系統および宿主情報. Table 2.5. Detected *Leucocytozoon* lineages and host information.

系統名 (陽性率) Lineage name (prevalence)	GenBank accession number <sup>a</sup>	本章 This chapter		既報 (MalAviから抜粋) Previous reports (excerpt from MalAvi)		
		鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	国 (地域) Country (region)
AIXGAL01* (4.9%)	LC230144	オシドリ <i>Aix galericulata</i>	W			
ANACRE02 (2.4%)	-	ヨシガモ <i>Anas falcata</i>	W	コガモ <i>Anas crecca</i>	W	Japan (Hokkaido)
ANACU04 (4.9%)		オナガガモ <i>Anas acuta</i>	W	オナガガモ <i>Anas acuta</i>	W	United States
ASIFLA01* (2.4%)	LC230137	コムミズク <i>Asio flammeus</i>	W			
CIAE02 (4.9%)	-	カンムリカイツブリ <i>Podiceps cristatus</i>	W	トビ <i>Milvus migrans</i>	×	Spain
		アオバズク <i>Ninox japonica</i>	S	ウズラクイナ <i>Crex crex</i>	×	Russia
COCOR10 (4.9%)	-	カケス <i>Garrulus glandarius</i>	R	シメ <i>Coccothraustes coccothraustes</i>	W	Japan (Hokkaido)
		ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R			
		ハンボソガラス <i>Corvus corone</i>	R			
COCOR16* (2.4%)	LC230140	ハンボソガラス <i>Corvus corone</i>	R			
CORMAC05* (2.4%)	LC230139	ハンブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R			
CORMAC06* (2.4%)	LC230141	ハンブトガラス <i>Corvus macrorhynchos</i>	R			
FICNAR02* (2.4%)	LC230145	キビタキ <i>Ficedula narcissina</i>	S			
GORGOI03* (2.4%)	LC230143	ミゾゴイ <i>Gorsachius goisagi</i>	S			
HIRUS16* (2.4%)	LC230147	ツバメ <i>Hirundo rustica</i>	S			
HYPAM03* (2.4%)	LC230142	ヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>	R			
NINOX08* (2.4%)	LC230151	アオバズク <i>Ninox japonica</i>	S			
OTULEM03* (4.9%)	LC230135	オオコノハズク <i>Otus semitorques</i>	R			
OTULEM04* (2.4%)	LC230136	オオコノハズク <i>Otus semitorques</i>	R			
OTULEM05* (2.4%)	LC230138	オオコノハズク <i>Otus semitorques</i>	R			
PARMIN01* (2.4%)	LC230146	シジュウカラ <i>Parus minor</i>	R			
SCORUS01* (2.4%)	LC230149	ヤマシギ <i>Scolopax rusticola</i>	W			
SPOCIN01* (2.4%)	LC230150	ムクドリ <i>Spodiopsar cineraceus</i>	R			
STRORI04* (9.8%)	LC230148	キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	R			
		アオバト <i>Treron sieboldii</i>	R			
		スズメ <i>Passer montanus</i>	R			
STRORI05* (4.9%)	LC230152	キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	R			
		アオバト <i>Treron sieboldii</i>	R			
TUCAR02* (2.4%)	LC230154	クロツグミ <i>Turdus cardis</i>	S			
TURNAU01* (2.4%)	LC230153	ツグミ <i>Turdus naumanni</i>	W			

表 2.5. 検出された *Leucocytozoon* 属系統および宿主情報 (続き) .

Table 2.5. Detected *Leucocytozoon* lineages and host information (continued).

系統名 (陽性率) Lineage name (prevalence)	GenBank accession number <sup>a</sup>	本章 This chapter		既報 (MalAviから抜粋) Previous reports (excerpt from MalAvi)		
		鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	鳥種 Bird species	渡り区分 <sup>b</sup> Migration status	国 (地域) Country (region)
TUSW03 (2.4%)	-	コガモ <i>Anas crecca</i>	W	コガモ <i>Anas crecca</i>	×	United States
TUSW04 (17.1%)	-	オナガガモ <i>Anas acuta</i>	W	インドガン <i>Anser indicus</i>	×	Mongolia
		コガモ <i>Anas crecca</i>	W	カワウ <i>Phalacrocorax carbo</i>	×	Mongolia
		キンクロハジロ <i>Aythya fuligula</i>	W	コハクチョウ <i>Cygnus columbianus</i>	×	United States
		スズガモ <i>Aythya marila</i>	W			

\* 初めて検出された系統. Lineages detected for the first time.

<sup>a</sup> GenBankアクセッション番号は初めて検出された系統のみ記載している. GenBank accession numbers are shown for only novel lineages.

<sup>b</sup> 関東における渡り区分: R=留鳥、W=冬鳥、S=夏鳥、×=関東に分布していない.

Migratory status in the Kanto region: R=resident breeder, W=wintering visitor, S=migrant (summer) breeder, ×=not distributed in the Kanto region,

## 2.4 考察

### 2.4.1 保護鳥類における原虫保有状況

本章では、鳥類住血原虫の全体的な保有率は 21.1%であったが、これまで国内で報告された保有率（10.6～14.9%）より高かった (Imura et al., 2012; Murata, 2002; Nagata, 2006; Yoshimura et al., 2014)。しかし、検出方法、対象種、地域など様々な条件が異なるため、直接の比較は困難である。例えば、永田 (2006) は *Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属のみを検出対象とし、*Leucocytozoon* 属の検出は行っていない。沖縄県南大東島では保有率が 59.6%と非常に高かったが、島内における鳥類および蚊の生息密度が高いためと考えられた (Murata et al., 2008)。また、免疫や生息環境など様々な要因により、鳥種ごとの原虫保有率が大きく異なることも知られている (Imura et al., 2012; Quillfeldt et al., 2011; Valkiūnas, 2005; Yoshimura et al., 2014)。加えて、重要な要因として、今回は傷病保護鳥類を対象としたことが挙げられる。これらの個体は、窓への衝突、不動、怪我など様々な理由により保護され、多くの場合、脳震盪、骨折、貧血などの症状が見られていた。本章では体調や免疫反応に関する項目について検証を行っていないが、先行研究では、鳥種によって差はあるものの、健康な個体より体調不良の個体は住血原虫の感染率が高いと報告されている (Dawson and Bortolotti, 2000; Fleskes et al., 2017; Meixell et al., 2016)。ただし、体調不良時に感染する可能性が高いのか、逆に感染していることにより体調不良となるのかを判別することは困難である。また、一部の個体は怪我や身体状態の程度によって長期間保護・収容される。すなわち、そのような個体は施設内で感染する可能性が高くなると考えられる。国内における鳥類住血原虫の遺伝子系統やその多様性に関するデータは不足しており、保護前後のどちらで感染したのか区別は難しいため、可能な限り搬入直後にサンプルを採取することが重

要であると考えられる。

#### 2.4.2 渡り区分による解析

渡り鳥（冬鳥、夏鳥、旅鳥）の全体的な原虫保有率（31.6%）は留鳥（17.0%）よりも高かった。*Plasmodium* 属および *Leucocytozoon* 属では冬鳥の保有率が他の区分の鳥類より有意に高かったが（表 2.2）、オオバン（図 2.1a）およびカモ目（図 2.1b）をそれぞれ解析から除いた場合、どちらの原虫属においても有意差が認められなくなった。さらに、両者を解析から除いた場合、全体の保有率に有意差が認められなくなった（表 2.2）。そのため、原虫保有率が高いオオバンおよびカモ目によるバイアスが生じたと考えられる。オオバンの原虫保有状況に関する先行研究は少ないが、カモ目では *Leucocytozoon* 属原虫の保有率が高いことが知られている（Fleskes et al., 2017; Meixell et al., 2016; Ramey et al., 2015; Reeves et al., 2015）。その理由は十分に明らかになっていないが、免疫反応、生息環境、宿主特異性、ベクターの生息密度などの要因が考えられている（Imura et al., 2012; Quillfeldt et al., 2011; Valkiūnas, 2005; Yoshimura et al., 2014）（3.4.2 参照）。本章ではフクロウ（*Strix uralensis*、図 2.1c）の原虫保有率も高く、カモ目と同様に上述の要因が関係していると考えられる。様々な鳥種を対象としている調査では、多くの場合鳥種あたりのサンプル数が少なく、種ごとの比較解析は困難である。渡り区分による保有率に特定の傾向が確認された場合、ベクターの生息密度などが関係している可能性は否定できないが、本章のような様々な鳥種を対象とした地域サーベイランス調査では、宿主特異性を含む他の関連要因についても考慮する必要がある。

#### 2.4.3 *Plasmodium* 属原虫系統の解析

今回、合計 12 系統の *Plasmodium* 属原虫が検出された (表 2.3)。8 系統が留鳥から検出され、pSW5 を除く 7 系統は関東地方の留鳥と蚊の間に伝播されていることが示唆される。なお、後述するが、pSW5 については関東地方ではなく他地域で伝播されていると考えられる。

留鳥から検出された系統の内、4 系統 (pPADOM02、pSGS1、pUPUPA02、pYWT4) はいずれも過去に海外の鳥類から検出されている。*Plasmodium relictum* SGS1 は日本のヤマトクシヒゲカ (*Culex sasai*)、アカイエカ群 (*Cx. pipiens* group)、トラフカクイカ (*Lutzia vorax*) を含む世界各地の蚊から検出されており、ベクターとなる蚊の種数が多く、宿主域および地理的分布も広いことが知られている (Tsuda, 2017)。他の 3 系統のベクターは国内ではまだ明らかになっていないが、同様に広い分布域を持つ可能性がある。夏鳥であるヨシゴイ (*Ixobrychus sinensis*) から検出された pCXPIP10 は初めて鳥類から検出された。この系統は過去にスペインおよび日本のイエカ属 (*Culex* sp.) の蚊から検出されている (Tsuda, 2017)。現時点では宿主情報が限られるため本系統の分布域は不明だが、国内のベクターおよび宿主鳥類の間に伝播されている可能性が考えられる。

今回留鳥から検出された 2 系統 (pCXPIP09 および pCXPIP12) は、過去に国内の蚊からも検出されている (Ejiri et al., 2011a, 2009; Kim and Tsuda, 2010)。また、pCXPIP09 が検出された蚊からハシブトガラスおよびスズメ (*Passer montanus*) の DNA が検出されていることから (Kim and Tsuda, 2010)、この 2 系統は国内のベクターおよび様々な留鳥の間に維持されている可能性が高いと考えられる。なお、両系統とも国内からのみ検出されており、日本に特有に分布する系統である可能性もある。ただし、アカイエカなど一部のベクターの分布は非常に広く (Medvedev,

2009)、日本と周辺の国の間で様々な鳥種や個体群が行き来しているため、今後他の地域から検出される可能性もある。

新規系統として登録された pNYCNYC02 はゴイサギ (*Nycticorax nycticorax*) から検出された。本鳥種のほとんどは渡りを行わず留鳥性であるが、一部の個体はフィリピンなどに渡ることが知られている (Yamashina Institute for Ornithology, 2002; 日本鳥学会, 2012)。東南アジアにおける鳥類住血原虫の調査は他の地域と比較して限られており、本系統の分布域は不明であるが、今後未調査の地域から検出される可能性も考えられる。

4 系統 (pFULATR01、pSTVAR04、pSW2、pSW5) は主に冬鳥から検出された。関東地方における蚊の個体密度は冬季に減少し、吸血活動も制限される (Kim and Tsuda, 2010)。そのため、冬鳥が飛来中に吸血される可能性は低く、感染する可能性も低いと考えられる。ただし、春季の関東地方でツグミ (*Turdus eunomus*、図 2.2d) などの冬鳥を吸血したアカイエカも確認されており (Kim and Tsuda, 2010)、国内で冬鳥に原虫が伝播される可能性も否定できない。 *Plasmodium circumflexum* に分類されている pSW5 は世界各地で検出されており、ハボシカ属 (*Culiseta* spp.) の蚊が媒介すると考えられている (Meyer and Bennett, 1976; Santiago-Alarcon et al., 2012; Valkiūnas, 2005)。ハボシカ属は全北区に分布しているが (Medvedev, 2009)、日本では北海道および青森県に生息するミスジハボシカ (*Cs. kanayamensis*) およびヤマトハボシカ (*Cs. nipponica*) のみが知られている (Ejiri et al., 2011b; Maekawa et al., 2016; Ono, 1969)。国内のハボシカ属から鳥マラリア原虫の検出例はないが、吸血源解析の結果、オオワシ (*Haliaeetus pelagicus*) などの鳥類を吸血していることが明らかになっている (Ejiri et al., 2011b)。また、pSW5 は北海道の留鳥であるタンチョウ (*Grus japonensis*) から検出されており

(Yoshimura et al., 2014)、本系統は北日本もしくはさらに北方の地域で伝播されていると考えられる。なお、pSW5 が検出されたオオバンは北日本で繁殖し、関東で越冬する個体が多いが、関東で繁殖する小規模な個体群も報告されている (Hashimoto and Sugawa, 2013)。関東地方では鳥マラリア原虫が検出された蚊から鳥類の血液も検出されており、この地域で宿主-ベクター-鳥マラリア原虫の感染環が維持されていると考えられる (Ejiri et al., 2009; Kim et al., 2009)。本章で調べたオオバンは北日本に渡って繁殖する個体群なのか、渡らずに関東で繁殖する個体群なのか区別できなかったが、pSW5 のベクター分布状況を鑑みると、北日本で感染し、関東に渡ってきた個体群である可能性が高いと考えられる。しかし、ハボシカ属以外の蚊が本系統のベクターである可能性もあるため、さらなる調査が必要である。なお、本章で検出された pSW5 の多くはオオバンからであった (8羽中 5羽)。本系統は宿主特異性が低く様々な鳥種から検出されているが、そのような系統でも今回のように特定の宿主において保有率が極めて高い例が知られている (Hellgren et al., 2009)。

#### 2.4.4 *Haemoproteus* 属原虫系統の解析

*Haemoproteus* 属原虫は合計 18 系統が検出された (表 2.4)。3 系統は過去に海外の鳥類から検出されており、広域分布系統であると考えられる。これらのうち、クログミから検出された hTUCHR01 は海外の同じツグミ属 (*Turdus* sp.) 鳥類から検出されている。*Leucocytozoon* 属原虫ほどではないが、*Haemoproteus* 属原虫にはある程度の宿主特異性があることが知られている (Huang et al., 2015; Valkiūnas, 2005)。また、hTUCHR01 は形態種 *H. minutus* に分類されているが、本種はツグミ属に対する特異性が非常に高いことが報告されており (Palinauskas et al., 2013)、

今回の結果はこの宿主特異性を裏付けている。

今回、13 系統が初めて検出された他、hSTORIO1 は過去に国内の留鳥から 1 例報告されているのみであり、これらの系統の分布および伝播状況の把握には引き続き調査が必要である。これまで国内では分子生物学的手法による *Haemoproteus* 属原虫の検出はほとんど報告されておらず、近年まで形態学的検出が主流であったことなども関係している可能性がある (Murata, 2007; Nagata, 2006)。

*Haemoproteus* 属原虫のベクターは *Culicoides* 属を主とするヌカカ科 (Ceratopogonidae) およびシラミバエ科 (Hippoboscidae) である (Valkiūnas, 2005)。国内には *Culicoides* 属が少なくとも 82 種、シラミバエ科が 26 種記録されているが (Mogi et al., 2002; Yanase et al., 2014)、いずれの分類群においても *Haemoproteus* 属原虫の検出事例はなく、国内におけるベクターは不明である。今回検出された hCXPIP19 は過去に関東地方のアカイエカから検出されているが (Ejiri et al., 2011a; Shirotani et al., 2009)、蚊は *Haemoproteus* 属原虫の媒介能力がなく、体内に入った *Haemoproteus* 属原虫は消化されることが確認されている (Valkiūnas, 2005; Žiegytė, 2014)。一方、11 系統は留鳥から検出されており、国内で伝播されている可能性が高いと考えられる。夏鳥からのみ検出された 4 系統については伝播地域を特定するために更なる調査が必要である。

興味深いことに、*Plasmodium* 属および *Leucocytozoon* 属と異なり、冬鳥からのみ検出された *Haemoproteus* 属原虫系統は確認されなかった。*Haemoproteus* 属原虫が検出された冬鳥 4 羽の内、2 羽では混合感染により原虫系統は特定できなかった。残りの 2 羽から検出された系統 (hLARCRA01 および hOTULEM01) はいずれも留鳥からも検出されており、国内で伝播されている可能性がある。*Haemoproteus* sp. LARCRA01 はスペインのキアシセグロカモメ (*Larus cachinnans*) からも過去に検

出されおり、広域分布系統である可能性がある。なお、冬季における *Haemoproteus* 属原虫の伝播の可能性については不明である。海外では 11 月から翌年 4 月にかけて *Culicoides* 属のヌカカは活動しないことが報告されているが (Ander et al., 2012; Santiago-Alarcon et al., 2013)、2 月に卵を持ったヌカカが確認されており、冬季に吸血活動を行っていたことが示唆されている (Mayo et al., 2014)。日本における *Culicoides* 属を含むヌカカの季節性は十分に調査されておらず、冬季における吸血活動およびそれに伴う *Haemoproteus* 属原虫の伝播は否定できない。よって、国内における *Haemoproteus* 属の伝播動態を把握するためには、ベクター種の特定および活動時期を含むさらなる調査が必要となる。

#### 2.4.5 *Leucocytozoon* 属原虫系統の解析

*Leucocytozoon* 属原虫は合計 26 系統が検出された (表 2.5)。*Leucocytozoon* 属原虫は 3 属の中で最も宿主特異性が高いと考えられているが (Hellgren et al., 2009; Valkiūnas, 2005)、今回初めて検出された系統が多かったこともあり、宿主域に関する検討は困難であるが、ITUSW04 はカモ目で多い傾向があると示唆された。

12 系統は留鳥から検出され、国内で伝播されている可能性がある。今回夏鳥からは 5 系統が検出されたが、*Leucocytozoon lovati* の検出報告 1 報 (Sato et al., 2009) を除き、国内におけるブユの *Leucocytozoon* 属原虫保有状況は不明である。また、近隣の地域のブユにおける *Leucocytozoon* 属原虫の保有状況も明らかになっておらず、ベクター種および伝播地域の特定には日本および近隣地域における調査が重要である。

*Leucocytozoon* 属 8 系統は冬鳥からのみ検出された。これらのうち、5 系統はヨーロッパから極東ロシアにかけて広い繁殖域を持つカモ目からのみ検出された (Brazil,

2009; 日本鳥学会, 2012)。ベクターが吸血活動を行っている限り、繁殖地および越冬地のどちらでも原虫の伝播が行われる可能性がある (Valkiūnas, 2005; Waldenström et al., 2002)。関東地方におけるブユの季節消長は十分に調査されていないが、外気温 10°C以下ではブユの吸血活動は低下することが報告されている (Crosskey, 1990)。1981年から2010年までの12月から2月の関東地方における平均気温は7.6°Cで、最高気温は11.9°Cであった (気象庁: <http://www.data.jma.go.jp>)。そのため、関東地方ではブユは冬季に活動できないと考えられる。しかし、冬季における吸血活動を示唆する報告もある (Rubtsov, 1990; Saito et al., 1986)。斉藤ら (1986)は11月から5月の間の連続した5日間に東京都内で調査した結果、吸血状況の確認は行わなかったが、1,000頭以上のブユを捕集した。また、Rubtsov (1990)は北方地方では低温下で成虫の羽化および吸血活動が抑制されるが、低い緯度の地域に生息するブユは種によって秋から冬にかけて吸血活動が可能であると述べている。しかし現時点では関東では冬季におけるブユの吸血活動の有無を判断することは難しい。一方で、ITUSW04は日本では迷鳥とされており東アジア大陸で繁殖するインドガン (*Anser indicus*) およびカワウ (*Phalacrocorax carbo*) の1亜種から検出されており、本系統はアジア大陸で伝播されている可能性が高いと考えられる。*Leucocytozoon* sp. ANACU04は北アメリカのオナガガモ (*Anas acuta*) から検出されているが、オナガガモは年によって越冬地を日本と北アメリカの間で変えることが知られている (Nicolai et al., 2005; Yamashina Institute for Ornithology, 2002)。これは日本と北アメリカのカモ目の間で同じ原虫系統が検出されていることを裏付けており、カモ目は大陸間における原虫の運搬に重要な役割を持つと考えられる (Ramey et al., 2015)。

#### 2.4.6 結論

本章では、関東地方の保護鳥類における住血原虫の保有状況を初めて明らかにした。保護鳥類は必ずしも自然な状態ではないが、特に野鳥の調査が進んでいない地域では、地域内の鳥類における住血原虫の保有状況を明らかにするためには貴重な調査対象である。今回、新規系統が多数検出されたことから、保護鳥類における原虫系統を明らかにすることで、国内における原虫の遺伝的多様性を把握することにも繋がると示唆された。また、国内の留鳥から多数の原虫系統が検出され、コアサイクルが成立していることが示唆された。さらに、渡り鳥は渡った先で様々な住血原虫に暴露される可能性があり、そのため住血原虫の分布および拡散において重要な運搬者となっていると考えられた（越境運搬サイクル）。一方、原虫種ごとに適合したベクター種が異なるため、原虫が伝播されるためには鳥類の生息地における適合したベクター種の分布が鍵となる。気候変動などによりベクターおよび鳥類の両方で分布の変化が確認されており、感染症の生態把握および対策のためにはベクターや鳥類の生態も調査する必要がある。

## 2.5 小括

これまでに国内各地の野鳥から住血原虫が検出されており、原虫保有率は 10.6～14.9%であると報告されている。しかし一般に野鳥の捕獲および採血は困難であり、国内の野鳥における原虫保有状況は十分に明らかになっていない。国内各地には野生の傷病鳥類を保護し、治療や野生復帰を行う施設がある。このような施設では通常捕獲困難な渡り鳥を含む多様な鳥種が保護されるため、住血原虫の保有状況や分布を把握することができる。本章では、関東地方で保護された傷病鳥類における住血原虫の保有状況および分子系統関係を調べ、留鳥および渡り鳥における感染傾向を検討した。

東京都・千葉県・神奈川県にある 4 つの傷病鳥獣保護施設または動物病院で 2013 年 8 月から 2016 年 3 月の間に保護・治療されていた野鳥 80 種 475 羽から血液または臓器の一部を採取した。DNA を抽出し、鳥類住血原虫 3 属のミトコンドリア DNA *cytb* 遺伝子領域を標的とした nested-PCR を行い、増幅が見られた場合、塩基配列を決定して分子系統関係を解析した。また、渡り区分による原虫保有率を比較した。血液塗抹標本が得られた場合には顕微鏡下で原虫の有無を確認した。

475 羽中 100 羽から 3 属いずれかの原虫 DNA が検出され、全体の保有率は 21.1% であった。冬鳥の保有率は他の渡り区分より有意に高かったが、カモ目やオオバンなど保有率が高い鳥種によるバイアスであると示唆され、宿主特異性などの要因も考慮する必要がある。留鳥からは多数の原虫系統が検出され、過去に国内の蚊からも検出されている系統も確認されたことから、国内ではコアサイクルが成立し、留鳥とベクターの間で伝播・維持されている原虫系統があることが示唆された。一方、主に冬鳥から検出された一部の系統は大陸地方や北方地方などの留鳥からも検出されており、青森以北にのみ生息するハボシカ属 (*Culiseta* spp.) の蚊が媒介する原

虫系統も検出されたため、保護された冬鳥は繁殖地である大陸や北方地方で感染し、国内に原虫を運搬している可能性が示唆された（越境運搬サイクル）。

## 第3章

タシギ属鳥類における住血原虫保有状況および伝播動態の推定  
(越境運搬サイクル)

### 3.1 はじめに

「渡り鳥」にはその地域で越冬してさらに北の地域で繁殖する「冬鳥」、その地域で繁殖してさらに南で越冬する「夏鳥」、そしてその地域より北で繁殖してより南で越冬する「旅鳥」などが含まれ、通年同じ地域に滞在する「留鳥」とは区別される。日本は東アジア-オーストラリア渡り経路 (East Asian-Australian Flyway) の中に位置しており、渡り鳥にとって繁殖地、越冬地および中継地として重要な地域である (Higuchi et al., 2009)。渡りなどの動物の季節移動では、新たな地域に感染症を広げるリスクを伴うことが指摘されている (Altizer et al., 2011; Rappole et al., 2000; Satterfield et al., 2018)。また、渡り鳥は新たな原虫を他の地域に運搬し、住血原虫の伝播においても重要な役割を持つことが示唆されてきた (Atkinson and Lapointe, 2009; de Angeli Dutra et al., 2021; Garamszegi, 2011; Ishtiaq, 2017; Ishtiaq and Renner, 2020; Murata, 2007; Ramey et al., 2015; Waldenström et al., 2002)。日本の野鳥の約 3 割は渡り鳥であり、他の地域から国内に新たな病原体を持ち込む可能性や、国内の病原体を逆に他の地域へ持ち出す可能性がある (Murata, 2007)。一方、一部の研究では、ベクター種、宿主特異性、渡りの時期などによる制限から、渡り鳥により新たな病原体が導入される機会はこれまでの想定よりも少ない可能性があるとは指摘されている (Hellgren et al., 2013, 2007; Pulgarín-R et al., 2019; Ricklefs et al., 2017; Soares et al., 2020)。ただし、同種内でも異なる渡り経路を持つ鳥類の個体群は、異なる寄生虫に暴露される可能性があり、渡り行動は寄生虫感染の多様性と密接に関係している (Cumming et al., 2013; Ramey et al., 2015; Shurulinkov et al., 2012)。また、宿主鳥類と病原体の関係では、感染のリスクと渡りのリスクによるトレード・オフがあり、それによって最終的に渡り経路の変更に繋がる可能性がある (Clark et al.,

2016; Mendes et al., 2005; Sorensen et al., 2019; Waldenström et al., 2002)。住血原虫の世界的な分布傾向は、宿主鳥類の分布や渡り行動と強く関連しているため、原虫伝播が起こる地域の推定に応用できる (Ishtiaq, 2017; Ishtiaq et al., 2007; Valkiūnas, 2005; Waldenström et al., 2002)。しかし、住血原虫はこれまでに日本の様々な野鳥から検出されているが (Imura et al., 2012; Murata, 2007, 2002; Murata et al., 2007; Sato et al., 2007; Tanigawa et al., 2013; Yoshimura et al., 2014)、国内の渡り鳥における感染状況は散発的にしか報告されておらず (Murata, 2002; Tanigawa et al., 2013; Yoshimura et al., 2014)、国内における越境運搬サイクルの特徴についても不明である。

「ジシギ」とも呼ばれるタシギ属 (*Gallinago* spp.) 鳥類はチドリ目シギ科に属し、世界各地に分布しており、長距離の渡りを行う種も含まれるが (Gill et al., 2021)、ほとんどの種では住血原虫の調査が行われていない。タシギ属には 17 種が含まれているが、住血原虫の保有状況および遺伝的多様性はポルトガルのタシギ (*G. gallinago*) およびノルウェーのヨーロッパジシギ (*G. media*) の 2 種でのみ報告されている (Halvarsson, 2016; Höglund et al., 2017; Pardal et al., 2014)。

日本には 5 種のタシギ属鳥類が飛来または通過する (日本鳥学会, 2012)。タシギおよびアオシギ (*G. solitaria*) は国内の一部地域で越冬することが知られている。オオジシギ (*G. hardwickii*) は主に北海道など北日本で繁殖し、オーストラリアの一部地域で越冬する。一方、チュウジシギ (*G. megala*) およびハリオシギ (*G. stenura*) は日本より北の地域で繁殖し、東南アジアやオーストラリアなどで越冬する通過鳥である (Brazil, 2009; Hayman et al., 1986; Message and Taylor, 2005)。したがって、日本はこれらの種にとって、それぞれ異なる形で利用する重要な生息環境を提供している。近年、生息地の消失や狩猟などによってタシギおよびオオジシギの個体数は減

少している (IUCN, 2020; Kitajima and Fujimaki, 2003; Ura, 2007)。特に、オオジシギは日本およびオーストラリアの一部地域で準絶滅危惧種に指定されており (Department of the Environment, 2020; Ministry of the Environment, 2019)、保全・保護活動が行われている (CeRDI, 2020; Wild Bird Society of Japan, 2020)。なお、チュウジシギおよびハリオシギについては情報が限られており、個体数の動向は不明である。また、ノルウェーのヨーロッパジシギでは住血原虫感染による繁殖成功率の低下が報告されており (Halvarsson, 2016; Höglund et al., 2017; Pardal et al., 2014)、原虫感染による個体および個体群への影響が危惧されている。

そこで本章では、国内に飛来するタシギ属鳥類 4 種における住血原虫の保有状況を調査し、種間における保有率や原虫系統解析による推定伝播地域および遺伝的多様性を検討することで、越境運搬サイクルの特徴について考察した。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 サンプルの採取

2012年から2020年まで、2,000キロ近く離れた関東地方および南西諸島（沖縄県）で（図 3.1）、チュウジシギ（図 3.2a）、オオジシギ（図 3.2b）、ハリオシギ（図 3.2c）およびタシギ（図 3.2d）の4種のタシギ属鳥類の捕獲を行った。関東地方では、千葉県（35°36'N 140°07'E）および茨城県（36°33'N 139°53'E）で、主に春（4月から5月まで）および秋（8月から10月）の渡りの時期に捕獲を行った。南西諸島では、秋に石垣島（24°20'N 124°09'E）および与那国島（24°27'N 122°55'E）で捕獲を行った。捕獲にはたも網とライト、またはかすみ網を用い、羽衣に基づき捕獲個体の鳥種および年齢を決定し（Hayman et al., 1986）、固有識別番号が表記された環境省の金属足輪を個別に装着した。その後、各部位の計測を行い、翼下静脈から少量の血液を採取した。得られた血液は70-99.5%エタノール入りのマイクロチューブに入れ、日本大学生物資源科学部獣医学科実験動物学研究室に搬送後、次の工程まで-20°Cで保存した。なお、今回は血液塗抹標本の作製は行わなかった。捕獲された個体はデータ収集および血液の採取後に放鳥された。

タシギ属鳥類からのサンプル採取に関するすべての手順は、「動物の愛護および管理に関する法律（Act on Welfare and Management of Animals 1973）」の倫理基準に準拠して行われた。また、環境省標識調査の金属足輪は山階鳥類研究所の許可の下で装着した。捕獲およびサンプル採取中に鳥類を傷つけることはなかった。

### 3.2.2 DNA 抽出および分子学的雌雄別

PCI法を用いて血液からDNAを抽出し、tris-EDTA緩衝液に溶解した。DNA濃度はNanoDrop One超微量紫外可視分光光度計（Thermo Fisher Scientific）で測定

し、最終濃度 50 ng/μl (±10 ng/μl) になるように調製した。チュウジシギとオオジシギでは、chromo-helicase DNA (*CHD*) 1 遺伝子を標的とした PCR により雌雄判別を行った (Fridolfsson and Ellegren, 1999; Ura et al., 2005)。PCR にはプライマーセット 2550F/2718R を用い、反応液にはそれぞれ最終濃度 2 mM の MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM の dNTP、10×ExTaq Buffer (Mg<sup>2+</sup> free: Takara)、0.625 units の ExTaq® (Takara)、各プライマー 0.6 μM、50 ng のサンプル DNA を加え、各サンプル全量 25 μl とした。PCR 反応条件は既報に従って設定した (Fridolfsson and Ellegren, 1999)。解剖学的に雌雄が確認されているタシギ属鳥類のサンプルを入手できなかったため、PCR の陽性コントロールに第 2 章の研究で得られたセグロカモメ (*Larus vegae*) のオス 1 羽およびメス 1 羽の血液由来 DNA を、陰性コントロールには DNA の代わりに純水を加えた反応液を用いた。PCR 増幅産物の確認にはエチジウムブロマイド (nacalai tesque) を加えた 1.5%アガロースゲル (AgaroseS: Nippon Gene) を用いた。TAE 緩衝液が入った泳動槽にゲルを入れ、100V で約 20 分間泳動した。その後、紫外線照射下で目的遺伝子の増幅の有無を確認した。なお、陰性コントロールでは DNA の増幅は確認されず、コンタミネーションがなかったことを確認した。

### 3.2.3 鳥類住血原虫 DNA の検出

第 2 章と同様の方法で、住血原虫のミトコンドリア DNA *cytb* 遺伝子領域を標的とした nested-PCR、電気泳動およびゲルからの DNA 抽出を行った (2.2.2 参照)。ただし、*Leucocytozoon* 属原虫の陽性コントロールには、第 2 章で得られた *Leucocytozoon* sp. OTULEM04 陽性オオコノハズク (*Otus semitorques*) 由来の DNA を用いた。

### 3.2.4 検出された住血原虫の分子系統解析

抽出された DNA、BigDye® terminator cycle sequencing kit (Ver 3.1: Applied Biosystems) およびサイクルシーケンサー (ABI 3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) を用いて両方向からダイレクトシーケンスを行い、得られた波形を SeqMan Pro (DNASTAR) にてコンティグ結合した。得られた塩基配列は GenBank データベース (Madden, 2013) および MalAvi データベース (Bensch et al., 2009) の配列と比較した。低品質な波形のサンプルおよび既知の系統と 100%一致しないサンプルでは偽陽性の可能性を排除するために PCR を繰り返し行った。さらに、既知の系統と一致しない配列が得られた場合、MEGA X を用いてアミノ酸配列に変換し (Kumar et al., 2018)、配列エラーの可能性を調べた。

本章で検出された系統、近縁な既知の系統、および形態学的に種同定されている系統を用いて住血原虫 3 属のベイズ式系統樹を作成した。系統間の遺伝的距離 (pairwise distance) は MEGA X の Kimura-2-パラメーターを用いて計算した (Kumar et al., 2018)。アウトグループとして *Theileria annulata* を加えた。モデル選択には IQ-TREE 1.6.12 の ModelFinder を用いた (Kalyaanamoorthy et al., 2017)。Mr. Bayes version 3.2 にて作成したベイズ式系統樹にはベイズ情報量規準 (Bayesian Information Criterion, BIC) 下のモデル選択で得られた、ガンマ分布および不変座位率に基づいた一般時間反転可能モデル (GTR+ $\Gamma$ +I) を用いた。マルコフ連鎖モンテカルロ (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 法を用い、マルコフ連鎖 2 組それぞれ独立に 300 万世代走らせ、1,000 世代ごとにサンプリングをさせた (Ronquist et al., 2012)。なお、burn-in として、初めの 25% の系統樹を切り捨てた。最終的に得られた系統樹は FigTree 1.4 を用いて確認した (Rambaut, 2012)。

### 3.2.5 統計解析

フィッシャーの正確確率検定により、鳥種間における住血原虫保有率を比較した。その後、ボンフェローニ調整を用いた多重比較検定（post-hoc multiple comparison test）を行った。さらに、二項分布およびロジット変換を当てはめた一般化線形モデル（General Linear Model、GLM）を用いて種、雌雄、年齢、捕獲地域および季節が感染状況に影響を与えるかどうか、原虫属ごとに個別に検証した。個体の年齢は幼鳥（幼羽から第1回冬羽まで）および成鳥（第1回夏羽から成鳥羽まで）に分類した。モデルに交互作用の項を説明変数に含めた場合、いずれのモデルでも交互作用はなかったため、最終的に用いたモデルからは交互作用の項を除外した。また、サンプル数が少なかったためハリオシギおよびタシギは全ての解析から除外し、GLM解析はチュウジシギおよびオオジシギのみで行った。統計解析は全てR ver. 3.6.3で行い（R Core Team, 2020）、多重比較検定には‘fmsb’パッケージを用いた（Nakazawa, 2019）。統計値は小数点3位まで四捨五入し、有意水準は5%とした。

### 3.3 成績

2 地域でチュウジシギ、オオジシギ、ハリオシギおよびタシギ計 4 種 383 羽のタシギ属鳥類が捕獲された (表 3.1、図 3.2)。関東地方では全 4 種が捕獲され、沖縄県ではチュウジシギおよびハリオシギの 2 種のみが捕獲された。68 羽から 3 属いずれかの住血原虫 DNA が検出され (全体の保有率=17.8%) (表 3.1)、タシギは全て PCR 陰性であった。チュウジシギ(18.6%)、オオジシギ(19.4%)およびハリオシギ(11.1%)の間では全体の保有率に有意差は認められなかった (フィッシャーの正確確率検定:  $p=0.327$ ; 図 3.3)。しかし、各原虫属を個別に比較した場合、鳥種間で *Plasmodium* 属原虫および *Haemoproteus* 属原虫の保有率に有意差が確認された (フィッシャーの正確確率検定: *Plasmodium* 属  $p=0.003$ 、*Haemoproteus* 属  $p<0.001$ )。具体的には、*Plasmodium* 属原虫の保有率はオオジシギよりもチュウジシギで高く、*Haemoproteus* 属原虫の保有率はチュウジシギよりもオオジシギで高かった (ボンフェローニ調整を用いた多重比較検定: *Plasmodium* 属  $p=0.009$ 、*Haemoproteus* 属  $p<0.001$ ; 図 3.3)。*Leucocytozoon* 属の保有率については、種間で有意な差は認められなかった (フィッシャーの正確確率検定:  $p=0.110$ ; 図 3.3)。

*Plasmodium* 属原虫および *Haemoproteus* 属原虫のすべての GLM モデルでは、鳥種が有意な要因だった (表 3.2)。*Leucocytozoon* 属原虫については、標準誤差が大きく正確な結果は得られなかった。雌雄、年齢および季節はどの原虫属においても感染との関係は認められなかった。ただし、季節を含む *Plasmodium* 属原虫のモデルでは標準誤差が大きかった。秋に捕獲されたチュウジシギの *Haemoproteus* 属原虫保有率には捕獲地域間で有意な差があり、沖縄県の捕獲個体の保有率 (12.73%) は関東地方の保有率 (0.57%) よりも高かった (表 3.1 および表 3.2)。

住血原虫は計 7 系統が検出され、内訳は *Plasmodium* 属 4 系統、*Haemoproteus*

属 2 系統および *Leucocytozoon* 属 1 系統であった (図 3.4、表 3.3)。これらのうち、*Plasmodium* 属 3 系統は既知であり、他の 4 系統は今回初めて検出された。新しい系統には MalAvi に従って系統名を付し (Bensch et al., 2009)、GenBank データベース (NCBI website: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) にアクセッション番号 LC621903~LC21906 で登録した (表 3.3)。チュウジシギからは 7 系統すべてが検出され、オオジシギおよびハリオシギからはそれぞれ 3 系統が検出された。また、関東地方から 5 系統、沖縄県から 6 系統が検出され、うち 4 系統は両方の地域から検出された (図 3.1、表 3.3)。6 系統が幼鳥から検出され、うち *P. homonucleophilum* SW2 および *Plasmodium* sp. SYBOR02 は幼鳥からのみ検出された。*Plasmodium* sp. GALMEG01 および *Leucocytozoon* sp. GALMEG03 はそれぞれクレード A および D に含まれ、これらのクレードにはこれまでに主にスズメ目の鳥類から検出された系統が含まれていた (図 3.4)。一方、pSW5、pSYBOR02、hGALMEG02 および hGALHAR01 が含まれたクレード B および C はチドリ目を含む様々な目の鳥類から検出された系統を含んでいた。形態学的に同定されている住血原虫種との遺伝的距離を計算したところ、各原虫属の新しい系統はそれぞれ *P. rouxi* (pPADOM16、HM146901)、*H. laevis* (hSPMAG12、AB604510)、*L. majori* (ICB1、AY393804) に最も近縁であった。

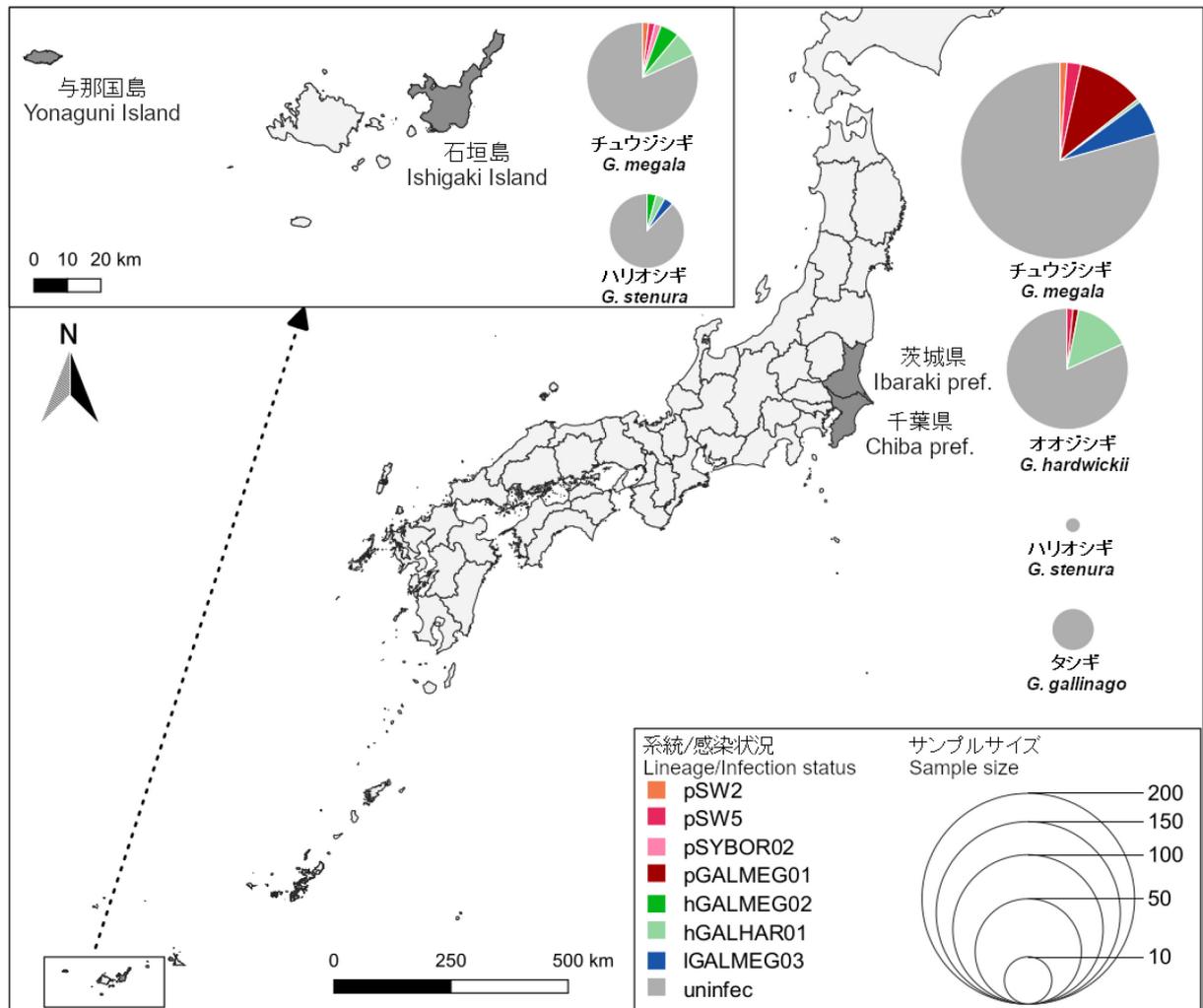


図 3.1. サンプル採取地および各地域の宿主ごとの原虫保有率および系統構成. 原虫系統名 1 文字目は、p が *Plasmodium*、h が *Haemoproteus*、l が *Leucocytozoon* を示す。Unifec は検出なし。

Fig. 3.1. Map of sampling areas, including the prevalence and lineage composition of each area by host species.

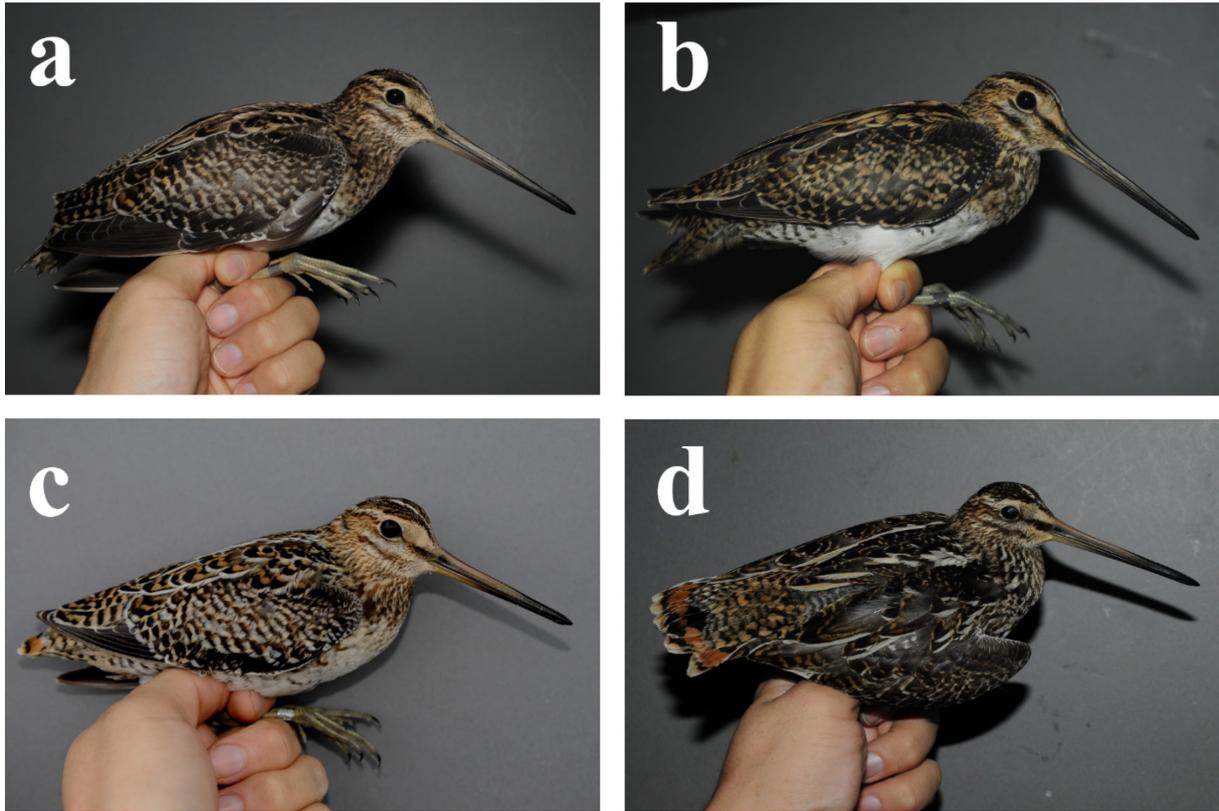


図 3.2. タシギ属鳥類 4 種. (a)チュウジシギ (*Gallinago megala*)、(b)オオジシギ (*Gallinago hardwickii*)、(c)ハリオシギ (*Gallinago stenura*)、(d)タシギ (*Gallinago gallinago*). 写真提供 : 小田谷嘉弥氏.

Fig. 3.2. The 4 snipe species. (a) *Gallinago megala*, (b) *Gallinago hardwickii*, (c) *Gallinago stenura*, (d) *Gallinago gallinago*. Photo courtesy of Mr. Y. Odaya.

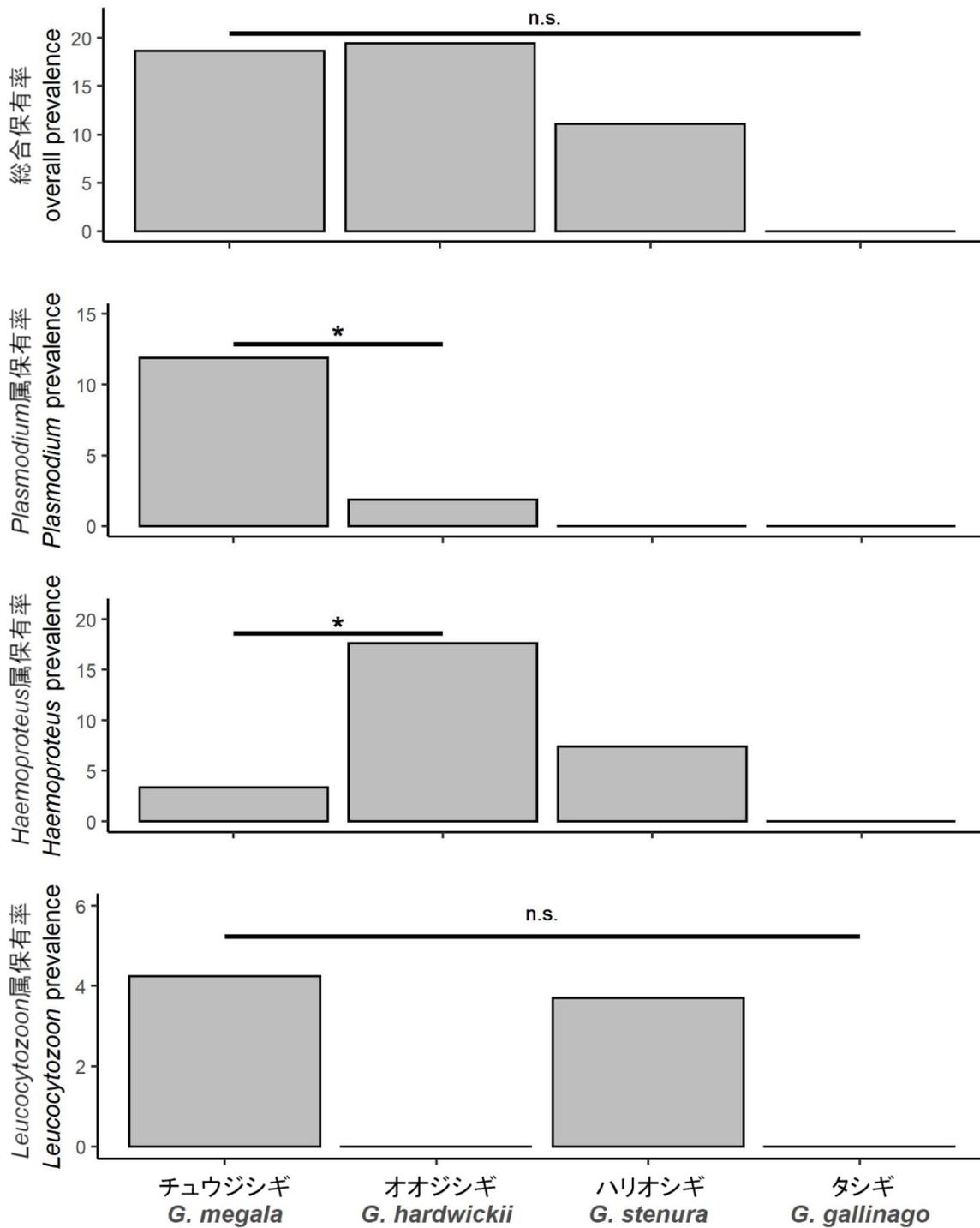


図 3.3. タシギ属における住血原虫保有率. 星印 (\*) は有意差あり ( $p < 0.05$ )、n.s. は有意差なし ( $p \geq 0.05$ ) を示す.

Fig. 3.3. Haemosporidian parasite prevalence among snipe species. Asterisk (\*) indicates significant differences ( $p < 0.05$ ), and n.s. indicates no significant differences ( $p \geq 0.05$ ).

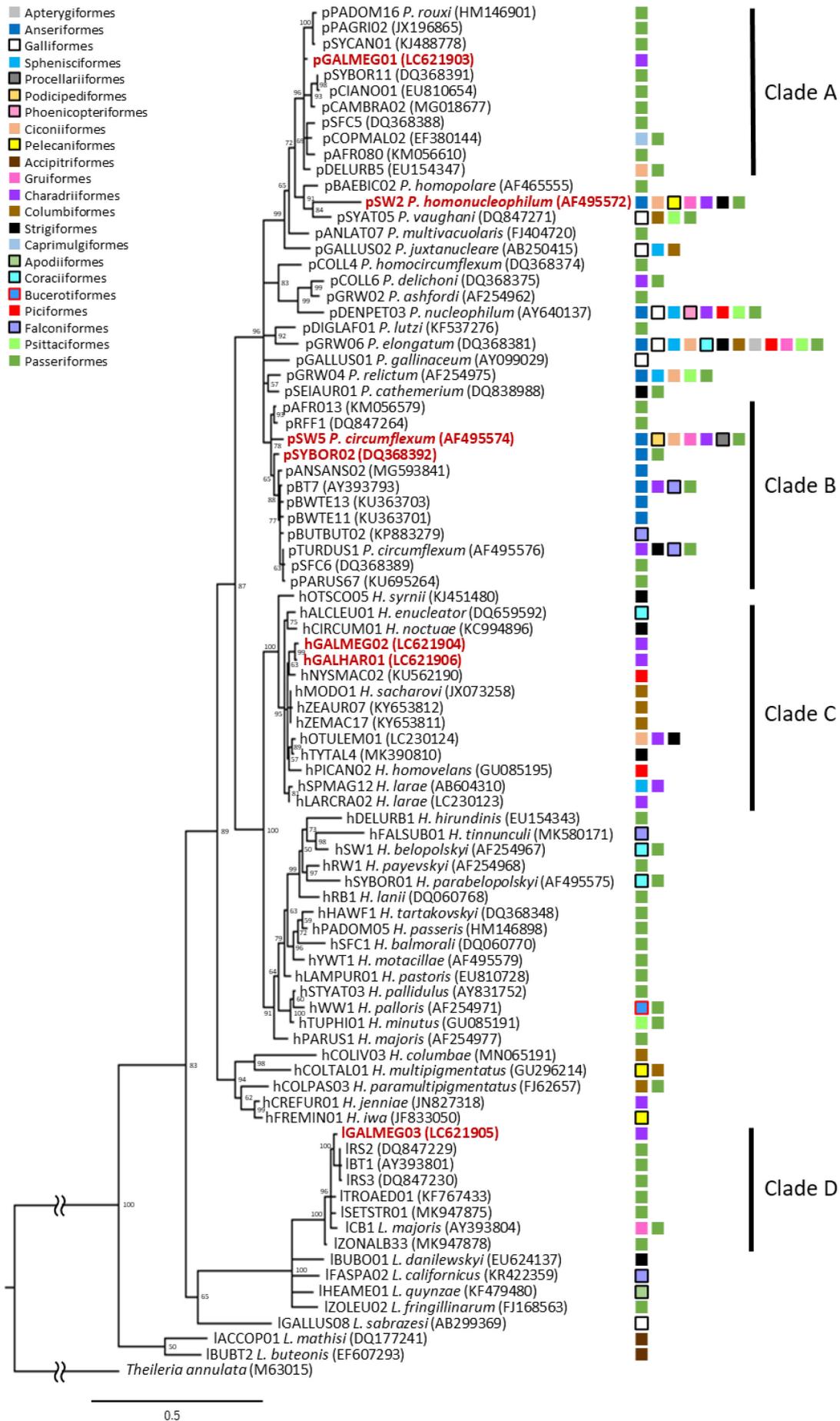


図 3.4. 鳥類住血原虫の *cytb* 遺伝子系統のベイズ系統解析 (470bp). 原虫系統名 1 文字目は、p が *Plasmodium*、h が *Haemoproteus*、l が *Leucocytozoon* を示す。系統樹上の数値は >0.60 の事後確率を示す。枝の長さは適用置換モデルに応じた変化量に比例して示した。本研究で得られた系統は赤字で示す。得られた系統が含まれる主なクレード (A-C) を示す。凡例に従い、系統樹の右側に宿主鳥類の目が示されている。

Fig. 3.4. Bayesian phylogenetic analysis of *cytb* gene lineages (470 bp) of avian haemosporidian parasites, rooted with *Theileria annulata*. Posterior clade probabilities of >0.60 were indicated. The branch lengths are drawn proportionally to the amount of change according to the substitution model applied. Lineages derived in this study are shown in red letters. Major clades (A–C) containing derived lineages are shown. The host order is shown to the right of the lineage name, according to the provided legend.

表 3.1. 国内のタシギ属における捕獲場所および季節ごとの住血原虫 DNA 検出結果.

Table 3.1. PCR results of haemosporidian detection per sampling location and season in snipes of Japan.

地域 Area	鳥種 Bird species	秋 Autumn						春 Spring						合計 Total					
		個体数 Number sampled	PCR陽性数 PCR positive (%)	P <sup>a</sup>	H <sup>a</sup>	L <sup>a</sup>	P/L <sup>a</sup>	個体数 Number sampled	PCR陽性数 PCR positive (%)	P <sup>a</sup>	H <sup>a</sup>	L <sup>a</sup>	P/L <sup>a</sup>	個体数 Number sampled	PCR陽性数 PCR positive (%)	P <sup>a</sup>	H <sup>a</sup>	L <sup>a</sup>	P/L <sup>a</sup>
関東地方 Kanto region	チュウジシギ <i>Gallinago megala</i>	175	34 (19.4)	25	1	10	2	6	0	0	0	0	0	181	34 (18.8)	25	1	10	2
	オオジシギ <i>Gallinago hardwickii</i>	66	12 (18.2)	2	10	0	0	42	9 (21.4)	0	9	0	0	108	21 (19.4)	2	19	0	0
	ハリオシギ <i>Gallinago stenura</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	タシギ <i>Gallinago gallinago</i>	8 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	小計 Sub-total	250	46 (18.4)	27	11	10	2	53	9 (17.0)	0	9	0	0	303	55 (18.2)	27	20	10	2
沖縄県 Okinawa pref.	チュウジシギ <i>Gallinago megala</i>	55	10 (18.2)	3	7	0	0	0	-	-	-	-	-	55	10 (18.2)	3	7	0	0
	ハリオシギ <i>Gallinago stenura</i>	25	3 (12.0)	0	2	1	0	0	-	-	-	-	-	25	3 (12.0)	0	2	1	0
	小計 Sub-total	80	13 (16.3)	3	9	1	0	0	-	-	-	-	-	80	13 (16.3)	3	9	1	0
	合計 Total	330	59 (17.9)	30	20	11	2	53	9 (17.0)	0	9	0	0	383	68 (17.8)	30	29	11	2

<sup>a</sup> P: *Plasmodium* sp.; H: *Haemoproteus* sp.; L: *Leucocytozoon* sp.;

P/L: *Plasmodium* sp.および*Leucocytozoon* sp.の混合感染. Co-infection between *Plasmodium* sp. and *Leucocytozoon* sp.

<sup>b</sup> 2個体は冬（11月と2月）に捕獲された. Two individuals were captured in the winter (November and February).

表 3.2. タシギ属における住血原虫保有率に関連する宿主因子を検定する一般化線形モデル (GLM) のモデルと係数.

Table 3.2. Models and their coefficients for the General Linear Models (GLMs) to test host factors associated with haemosporidian prevalence in snipes.

モデル Model	係数 Coefficients	<i>Plasmodium</i> sp				<i>Haemoproteus</i> sp.				<i>Leucocytozoon</i> sp.			
		推定値 Estimate	標準誤差 SE	z値 z value	p値 Pr (> z )	推定値 Estimate	標準誤差 SE	z値 z value	p値 Pr (> z )	推定値 Estimate	標準誤差 SE	z値 z value	p値 Pr (> z )
種 Species	(切片 intercept)	-3.970	0.714	-5.563	<0.001	-1.544	0.253	-6.110	<0.001	-20.570	1706.110	-0.012	0.990
	チュウジシギ <i>G. megala</i>	1.965	0.742	2.650	<b>0.008</b>	-1.806	0.440	-4.108	<b>&lt;0.001</b>	17.450	1706.110	0.010	0.992
種×雌雄 Species × Sex <sup>a</sup>	(切片 intercept)	-3.841	0.744	-5.165	<0.001	-1.483	0.346	-4.281	<0.001	-3.045	0.418	-7.286	<0.001
	チュウジシギ <i>G. megala</i> オス Male	1.933	0.743	2.600	<b>0.009</b>	-1.821	0.444	-4.101	<b>&lt;0.001</b>	-0.174	0.659	-0.264	0.791
種×年齢 Species × Age <sup>a</sup>	(切片 intercept)	-4.276	0.779	-5.489	<0.001	-1.335	0.347	-3.851	<0.01	-3.701	0.716	-5.171	<0.001
	チュウジシギ <i>G. megala</i> 成鳥 Adult	1.957	0.742	2.638	<b>0.008</b>	-1.800	0.440	-4.090	<b>&lt;0.001</b>	0.804	0.803	1.002	0.316
地域 Area <sup>b</sup>	(切片 intercept)	-1.792	0.216	-8.294	<0.001	-5.159	1.003	-5.144	<0.001	-2.803	0.326	-8.608	<0.001
	沖縄県 Okinawa pref.	-1.061	0.632	-1.679	0.093	3.234	1.081	2.990	<b>0.003</b>	-16.763	1450.071	-0.012	0.991
季節 Season <sup>c</sup>	(切片 intercept)	-3.466	0.718	-4.826	<0.001	-1.723	0.344	-5.018	<0.001				
	春 Spring	-17.100	2735.856	-0.006	0.995	0.424	0.510	0.832	0.406				

<sup>a</sup> *Leucocytozoon* sp.はチュウジシギでのみ解析した。 *Leucocytozoon* sp. was tested only among *G. megala*.

<sup>b</sup> 秋に捕獲されたチュウジシギのみを対象とした。 Only *G. megala* caught in autumn were included.

<sup>c</sup> 関東地方で捕獲されたオオジシギのみを対象とした。 *Leucocytozoon* sp.は検出されなかったため、解析を行わなかった。

Only *G. hardwickii* caught in the Kanto region were included. *Leucocytozoon* sp. was not detected and was not tested.

表 3.3. 比較地域および鳥種ごとに検出された原虫属、系統、GenBank アccession 番号および成鳥・幼鳥の感染個体数.

Table 3.3. Genus, parasite lineages, GenBank accession numbers and numbers of infected adult and juvenile snipes detected per sampling location and bird species.

原虫属 Parasite genus	系統 Lineage	Accession number	チュウジシギ <i>Gallinago megala</i>				オオジシギ <i>G. hardwickii</i>		ハリオシギ <i>G. stenura</i>
			関東地方 Kanto region		沖縄県 Okinawa pref.		関東地方 Kanto region		沖縄県 Okinawa pref.
			成鳥 Adult	幼鳥 Juvenile	成鳥 Adult	幼鳥 Juvenile	成鳥 Adult	幼鳥 Juvenile	幼鳥 Juvenile
			Adult	Juvenile	Adult	Juvenile	Adult	Juvenile	Juvenile
<i>Plasmodium</i>	pSW2	AF495572		2		1			
	pSW5	AF495574	1	3	1		1		
	pSYBOR02	DQ368392				1			
	pGALMEG01 <sup>a</sup>	LC621903	19 <sup>b</sup>				1		
<i>Haemoproteus</i>	hGALMEG02 <sup>a</sup>	LC621904			2	1		1	
	hGALHAR01 <sup>a</sup>	LC621906	1		1	3	11 <sup>c</sup>	8	
<i>Leucocytozoon</i>	lGALMEG03 <sup>a</sup>	LC621905	8 <sup>b</sup>	2				1	

<sup>a</sup> 新規系統. Novel lineages.

<sup>b</sup> 2個体はpGALMEG01およびlGALMEG03の両方に感染していた.

2 individuals were infected by both pGALMEG01 and lGALMEG03.

<sup>c</sup> 9個体は春に捕獲された. 他全ての個体は秋に捕獲された.

9 individuals were caught in the spring. All others were caught in the autumn.

### 3.4 考察

#### 3.4.1 シギ・チドリ類における原虫保有率の比較

これまで国内では、タシギ 1 羽およびオオジシギ 1 羽から *Plasmodium* 属原虫のみが報告されていたが (Murata, 2007, 2002)、本章で初めて日本のタシギ属鳥類における住血原虫の保有状況および遺伝的多様性を明らかにした。全体の住血原虫保有率は 17.8% であり (表 3.1)、ヨーロッパジシギでの保有率 (16.5~30%) と類似している (Halvarsson, 2016; Höglund et al., 2017)。しかし、他のシギ・チドリ類 (チドリ科 Charadriidae、シギ科 Scolopacidae、ミヤコドリ科 Haematopodidae など) の保有率は低く (Clark et al., 2016; Martínez-De La Puente et al., 2017; Mendes et al., 2005; Pardal et al., 2014)、例えば、世界的データベースから得られた 5 大陸におけるシギ・チドリ類 46 種の平均保有率は 6.2% であった (Clark et al., 2016)。これらの鳥類における低原虫保有率は、利用する生息環境や渡り戦略などの生態的要因に関係していると考えられている (Clark et al., 2016; Mendes et al., 2005)。海水環境は多くのベクター昆虫にとって生息に適しておらず、海洋性の鳥種は一般に原虫保有率が低いことが知られている (Clark et al., 2016; Martínez-De La Puente et al., 2017; Mendes et al., 2005)。反対に、本章で対象としたタシギ属のような鳥類は、開けた平野部の森林や田圃および草原などの淡水湿地に生息しており、このような環境は蚊などの鳥類住血原虫のベクターの生息に適している (Dale and Knight, 2008; Ferraguti et al., 2016; Gimonneau et al., 2012; Richards et al., 2010)。したがって、タシギ属鳥類では他のシギ・チドリ類よりベクター昆虫との接触機会が多いため原虫保有率が高いと考えられる。ただし、宿主鳥類の分類学的な違いや進化学的背景などに関連した免疫力の違いなど、他の要因も示唆されている (Martínez-Abraín et al., 2004)。

### 3.4.2 タシギ属鳥種間における原虫保有率の比較

チュウジシギおよびオオジシギの間では原虫の総合保有率に有意差は認められなかった。しかし、チュウジシギでは *Plasmodium* 属原虫の保有率がオオジシギよりも高く、オオジシギでは *Haemoproteus* 属原虫の保有率がチュウジシギよりも高かった (図 3.2、表 3.2)。同様に、近縁な鳥種間で保有する原虫属の構成が異なることが他の鳥種でも報告されている (Dubiec et al., 2016; Scordato and Kardish, 2014; Smith et al., 2018)。住血原虫保有状況の違いについては、以下のいくつかの可能性が考えられる。

まず、渡り経路、渡りの時期、生息環境を含む宿主鳥類の生態は、ベクターとの接触機会に関係し、さらには原虫保有率に関連している可能性がある。例えば、タシギ属鳥種間では、分布地域や渡り経路が異なっている。オオジシギは主に北海道およびロシアの一部で繁殖し、一部の個体は本州および九州の高地でも繁殖する (Frith et al., 1977; Hayman et al., 1986; Ura, 2007)。その後、オーストラリア東部の越冬地に渡る (CeRDI, 2020; Frith et al., 1977; Ura, 2007)。一方、チュウジシギはロシアやモンゴルの広い範囲で繁殖し、モンゴル東部、中国や日本を經由して南下する。主な越冬地は東南アジアで (Leader and Carey, 2003; Morozov, 2004)、オーストラリア北部やメラネシアの一部地域でも小規模な個体群が定期的に記録されている (Frith et al., 1977; Hayman et al., 1986)。タシギ属鳥類ではないが、異なる渡り経路を持つ個体群または鳥種の間では原虫保有率に差があることが知られている (Pedro et al., 2019; Valkiūnas and Iezhova, 2001)。また、タシギ属の種によって渡りの時期が異なっており、オオジシギは 7 月中旬から 8 月に繁殖地を出発して渡りを開始するが、チュウジシギはより遅い 8 月初旬から 9 月に渡りを開始する (Frith et al., 1977; Golovina, 1998; Hayman et al., 1986; Leader and

Carey, 2003)。さらに、両種とも渡り途中では田圃や淡水生の湿地など、類似した環境を好んで利用する (Brazil, 2009; Hayman et al., 1986; Message and Taylor, 2005; Ura, 2007)。一方で、繁殖期における生息環境は異なり、チュウジシギは川の流域や湿地に近い開けた森林地帯からタイガや森林帯まで幅広い環境を好むが、オオジシギは標高が高い場所を含む乾燥した草原や荒地を好む (Brazil, 2009; Frith et al., 1977; Golovina, 1998; Hayman et al., 1986; Leader and Carey, 2003; Message and Taylor, 2005)。また、ベクター種によっては吸血嗜好性や利用可能な宿主に応じ、特定の宿主を選択的に吸血することが報告されている (Kim and Tsuda, 2010; Medeiros et al., 2015; Santiago-Alarcon et al., 2013)。これらの生態的要因はいずれも宿主鳥類におけるベクターとの接触率に強く関係し (Elbers et al., 2015; Richards et al., 2010; Satterfield et al., 2018)、住血原虫への暴露率にも影響する (Ágh et al., 2019; Chahad-Ehlers et al., 2018; Kim and Tsuda, 2010; Lalubin et al., 2013; Sol et al., 2000)。しかし、本章で調べた各タシギ属鳥種が生息している地域のベクター密度およびベクターの原虫保有状況は不明であり、各種生態的要因の違いをさらに詳しく調査するためには、まず原虫の伝播地域を特定することが重要である。

一方、鳥種間における原虫保有率の違いは、宿主鳥類の免疫反応の差による可能性も考えられる。免疫反応は様々な方法で病原体に対して機能するが、宿主によっては感染に耐えつつ、健康への影響を最小限に抑えることが可能である。また、宿主が体内で感染を軽減または完全に排除することも可能である (Delhaye et al., 2018; Krams et al., 2012; Møller and Erritzée, 1998; Sorci, 2013; Sorensen et al., 2016)。このような免疫反応の違いは、病原体への暴露状況に関連した環境選択圧や進化的背景などの生活史形質の違いに由来すると考えられる (Atkinson et al., 2013; Boyd et al., 2018; Grilo et al., 2016; Lee, 2006; Mendes et al., 2006)。しかし、この反応は必

ずしも一貫しているわけではなく、鳥種もしくは個体によっては安定した感染レベルを維持することで感染に対処する場合もあれば、体内から病原体を完全に排除する場合もある (Atkinson et al., 2013; Møller and Erritzée, 1998)。すなわち、チュウジシギおよびオオジシギにおける原虫保有率の違いには、環境や分布などの生態学的要因だけでなく、免疫学的要因などの生理学的側面も関係している可能性がある (Martínez-Abraín et al., 2004)。しかし、*Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属における免疫反応の差は不明であり、今後の検討が必要である。また、分子生物学的手法のみではこの 2 属の混合感染を検出することは難しく (5.4.2 参照)、本章では血液塗抹標本は得られなかったため、形態学的にも検出できなかった。すなわち、*Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属原虫の混合感染が見落とされた可能性があり、その結果偶発的に鳥種間における差が検出されたことも考えられる。

なお、チュウジシギおよびオオジシギよりもサンプル数が少なく、今回はハリオシギおよびタシギについて統計学的に分析できなかったが、タシギ属鳥類における住血原虫の保有状況をより正確に把握するためにも、これら 2 種を加えたさらなる調査が必要である。

### 3.4.3 原虫保有率に関連する他の要因

雌雄および年齢は、いずれも各原虫属における保有率のばらつきの説明要因とはならなかった。多くの先行研究でも同様に、雌雄が原虫感染状況において重要な説明要因ではないと報告されているが (Ágh et al., 2019; Granthon and Williams, 2017; Halvarsson, 2016; Pedro et al., 2019; Podmokła et al., 2014)、雌雄で原虫保有率に差が見られた例も確認されている (Baillie et al., 2012; Jones, 2019)。今

回年齢による差は認められず、いくつかの先行研究と同様であった (Granthon and Williams, 2017; Pedro et al., 2019)。しかし、成鳥における感染個体の蓄積および幼鳥における高い致死率により、幼鳥より成鳥で原虫保有率が高くなることも報告されている (Mendes et al., 2005; Podmokła et al., 2014; Sol et al., 2003, 2000)。興味深いことに、ヨーロッパジシギでは幼鳥より成鳥の保有率が低く (Halvarsson, 2016)、免疫機能の発達度やベクターに対する防御行動などの違いが示唆されている (Mendes et al., 2005)。本章では年齢による差は認められなかったため、今回調べたタシギ属鳥類の幼鳥および成鳥はベクターに同程度暴露されていたと考えられ、幼鳥は初の渡りから成鳥と同様に地域間の原虫の分散および伝播に貢献していることも示唆される (Pulgarín-R et al., 2019)。

チュウジシギでは、地域間で *Haemoproteus* 属原虫の保有率が異なり、関東地方の個体より沖縄県の個体の保有率が有意に高かった。さらに、統計学的な有意差は認められなかったが、関東地方のチュウジシギは沖縄県の個体よりも *Plasmodium* 属原虫の保有率が高かった。これまでに、この2地域で捕獲されたチュウジシギには形態学的な違いが認められ、これらの地域のチュウジシギは異なる個体群であることが示唆されている (Odaya et al. unpublished)。これらの個体群は異なる渡り経路を持つ可能性があり、上述したようなベクターおよび原虫への暴露機会が個体群間で異なるため、原虫保有率にも差が生じたことが考えられる (3.4.2 参照)。

なお、オオジシギでは、*Haemoproteus* 属原虫の保有率と季節の間に関係は認められなかったが、長距離型の渡り鳥において春と秋の原虫保有率が同程度であった先行研究の結果と一致していた (Hellgren et al., 2013; Pulgarín-R et al., 2019)。

### 3.4.4 住血原虫の分子系統構成

一般に、住血原虫は近縁な別の鳥種にも感染し、近縁な鳥種間で頻繁に宿主転換することが知られている (Clark and Clegg, 2017; Ellis and Bensch, 2018; Hellgren et al., 2007; Pulgarín-R et al., 2018; Ricklefs et al., 2014; Ricklefs and Fallon, 2002; Santiago-Alarcon et al., 2014)。ただし、異なる目の鳥種を含め、遺伝的に離れた鳥種間での宿主転換も報告されている (Clark and Clegg, 2017; Ricklefs et al., 2014; Santiago-Alarcon et al., 2014)。今回検出された 7 系統中、4 系統は初めて検出された。興味深いことに、pGALMEG01 および lGALMEG03 は、これまでに主にスズメ目の鳥類から検出された系統のクレードに分類された (図 3.4)。この 2 系統はそれぞれ複数の個体から検出されたため、スズメ目からの偶発的な流出 (spillover) による可能性は低く、スズメ目の鳥類からタシギ属へと宿主転換した可能性が高いと考えられる。しかし、スズメ目は他の目と比べて比較的捕獲しやすく、そのためより多くの個体が調査されてきた背景から、サンプリング・バイアスの可能性にも留意する必要がある (Clark et al., 2014)。一方、*Plasmodium* 属原虫のクレード B および *Haemoproteus* 属原虫のクレード C には、様々な目の鳥類から検出された系統が含まれており、チドリ目由来の系統も含まれていた。*Plasmodium* sp. SYBOR02 は主にスズメ目から検出されているが、*P. circumflexum* SW5 を含む近縁な系統は様々な鳥種から検出されている。今回検出された *Haemoproteus* 属系統に最も遺伝的距離に近い形態種は *H. laevis* であった。本種は様々なチドリ目鳥類の血液塗抹から検出されており (Peirce, 1981; Valkiūnas, 2005; Yakunin, 1972)、保護されたチドリ目からは原虫 DNA も検出されている (第 5 章参照)。本章では血液塗抹標本は得られず形態学的な検出および種同定はできなかったが、宿主および分子系統情報の組み合わせから、検出された

*Haemoproteus* 属系統は *H. laevis* に分類される別系統（種内変異系統）である可能性がある。一方、これまでチュウジシギおよびハリオシギを含むタシギ属鳥類からは、*H. scolopaci*、*H. contortus* および *H. rotator* が検出されている (Valkiūnas, 2005)。これら *Haemoproteus* 属原虫 3 種はいずれも形態学的に検出されているものの分子系統の記載がなく、本章で検出された系統と比較ができていないが、今後、血液塗抹標本を用いた形態学的比較研究が進めば、新たな知見が得られることが期待される。

鳥種間で検出された原虫の系統数にも違いが認められ、チュウジシギが最も原虫の多様性が高く（7 系統）、オオジシギおよびハリオシギではそれぞれ 3 系統であった（表 3.3）。*Plasmodium relictum* や *P. elongatum* など、いくつかの既知の原虫種の分布域は広いが (Garcia-Longoria et al., 2015; Hellgren et al., 2015; Santiago-Alarcon et al., 2012; Valkiūnas, 2005)、他の多くの原虫種は宿主特異性や地理的バリアーにより分布域が限られている (Clark and Clegg, 2017; Ellis and Bensch, 2018; Gupta et al., 2019; Hellgren et al., 2009)。渡り鳥は様々な生息地や環境を通過するため、留鳥と比べて多種多様のベクターや寄生虫に暴露される (Pulgarín-R et al., 2019; Ramey et al., 2015; Soares et al., 2020; Waldenström et al., 2002)。渡り鳥が接触するベクターおよび住血原虫相は、渡り経路や渡り戦略によって異なる。上述のように（3.4.2 参照）、チュウジシギはオオジシギより分布域が広く (Frith et al., 1977; Hayman et al., 1986; Leader and Carey, 2003; Morozov, 2004; Ura, 2007)、様々な原虫系統に暴露されるため、集団としては原虫系統の多様性が高い可能性がある。さらに、関東地方と沖縄県の個体間で検出された原虫系統が異なっていたことから、今回捕獲されたチュウジシギには異なる地域に生息する個体群が含まれていたと考えられる（表 3.3）。すなわち、渡り経路が異なるため、個体群間で原虫保有率のみならず原虫相にも違いが見られる可能性が示唆される。

### 3.4.5 伝播地域および時期

今回検出された原虫 7 系統中、6 系統が幼鳥から検出された。これらの幼鳥は渡り直前の繁殖期に生まれ、越冬地に向かった初の渡り途中で捕獲されたため、越冬地はまだ利用したことがない。すなわち、幼鳥から検出された原虫系統は、繁殖地または繁殖地から捕獲地までの渡り経路の途中で伝播された可能性が示唆される。

また、今回検出された *P. circumflexum* SW5 は世界各地から検出されているが、現在知られているベクターは国内では青森以北にのみ生息するハボシカ属の蚊のみである (2.4.3 参照)。このことから、本原虫系統は日本の多くの地域では伝播されず、ハボシカ属が生息する北方地方でのみ伝播されると考えられる。そのため、本原虫種は北方地域やロシアからモンゴルの大陸地方でタシギ属に伝播された可能性が示唆される。

### 3.4.6 結論

本章では初めて日本に生息するタシギ属の住血原虫保有状況および原虫の遺伝的多様性を明らかにした。また、第 2 章に続き、改めて原虫が鳥類の渡りに伴い国境を越えて運搬されていることが示唆された (越境運搬サイクル)。同属内の近縁な鳥種間や、同種の異なる個体群間でも原虫保有率や原虫相などの感染状況が異なり、生息環境、渡り経路や生理学的要因などが、原虫保有状況に影響する可能性が示され、国内における越境運搬サイクルの特徴に関する知見が初めて得られたと考える。一部の原虫系統については、これまでの検出例や宿主の生態から伝播地域を推定することができたが、初めて検出された系統についてはさらなる調査が必要となる。準絶滅危惧種であるオオジシギの保全プロジェクトが進む中、渡りを含むタシギ属の生態や病原体保有に関する情報は不足している。希少種の保全活動に貢献

するためにも、引き続き調査を行い、生息環境や渡り経路などの生態学的研究と寄生虫学的研究の連携が期待される。

### 3.5 小括

日本は鳥類の東アジア-オーストラリア渡り経路の中に位置し、渡り鳥にとって重要な地域である。渡り鳥は病原体の重要な運搬者となるが、国内における越境運搬サイクルの特徴はほとんど調べられていない。タシギ属 (*Gallinago* spp.) の一部の鳥種は長距離型の渡り鳥である。日本には 5 種が飛来するが、タシギ属鳥類における住血原虫の保有状況は海外の 2 種でのみ報告されている。本章では日本に飛来するタシギ属鳥類における原虫保有状況を明らかにし、種間における保有率や原虫系統解析による推定伝播地域などを検討し、越境運搬サイクルの特徴について考察した。

2012 年から 2020 年の渡りの時期に捕獲されたタシギ属 4 種 383 羽を対象とし、捕獲後、標識および採血を行い放鳥した。血液からは DNA を抽出し、住血原虫のミトコンドリア DNA *cytb* 遺伝子領域を標的とした nested-PCR を行い、増幅が見られた場合には塩基配列を決定し、分子系統を解析した。また、統計解析によりタシギ属の生態と原虫感染との関連を検討した。

383 羽中 68 羽 (17.8%) から 3 属いずれかの原虫 DNA が検出された。タシギ属を除くシギ科鳥類の住血原虫保有率は 0.0-6.2% と低いことが知られているが、タシギ属はベクターと接触する機会が多い淡水環境を利用するため原虫保有率が高いと考えられる。関東地方のチュウジシギでは *Plasmodium* 属、オオジシギでは *Haemoproteus* 属原虫の保有率が他の種より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、チュウジシギでは地域間で *Haemoproteus* 属原虫の保有率に有意差が見られた。このことから、近縁な鳥種や個体群間でも、生息環境、分布、渡り経路などの生態的要因と関連したベクターとの接触機会の違いにより、原虫相の違いが見られると考えられる。また、7 系統中 6 系統は幼鳥から検出され、いずれも繁殖地と捕獲

地の間で幼鳥に伝播されたことが示唆された。本章では国内における越境運搬サイクルの特徴に関する知見を初めて得ることができた。

## 第4章

小笠原諸島における鳥類住血原虫の分布状況および伝播経路の推定

(コアおよび越境運搬サイクル)

#### 4.1 はじめに

海洋島とは、海洋底から誕生して以降、大陸と繋がったことがない島である。島の生物相の構成は、受動的または能動的な方法で、空路もしくは海路で島に到着することができた生物種に限られる。そのため、海洋島では他の地理的環境よりも固有種が進化することによって特有の生態系が生じやすい (Carlquist, 1974; Kawakami and Okochi, 2010; Kueffer et al., 2014)。このような生態系に生息している種は、外来種の侵入に対する抵抗性は非常に脆弱であり、直接的な捕食、種間競争、新たな病原体の侵入や人為的導入などの要因が個体群の存続に影響する可能性がある (Carlquist, 1974; Kawakami, 2019; Kawakami and Okochi, 2010; Van Riper et al., 1986)。鳥マラリアの原因となる *Plasmodium* 属原虫 (鳥マラリア原虫) および鳥ポックスの原因となるアビポックスウイルス (Avipoxvirus; APV) は、海洋島であるハワイ諸島やニュージーランドの鳥類相に個体群の絶滅に関わる影響を及ぼしたことが知られている (Aruch et al., 2007; Atkinson and Lapointe, 2009; Howe et al., 2012; Samuel et al., 2018; Sijbranda et al., 2016; Van Riper et al., 2002, 1986; Van Riper III, 1991; Warner, 1968)。これまでに、鳥マラリア原虫および APV に感染した外来鳥種の人為的導入によって、ハワイ諸島固有の多数のハワイミツスイ族 (Drepanidini) 鳥類が絶滅または大幅に個体数が減少した (Van Riper et al., 2002, 1986; Warner, 1968)。これは、ハワイ諸島およびニュージーランドの固有鳥種はこれらの病原体への暴露経験がなかったため、病原体に対する免疫を獲得できず高い病原性を示したことが要因とされている (Atkinson et al., 2013, 2000; Sorci, 2013; Van Riper et al., 1986)。このように、病原体に感染した外来性の鳥類の侵入は、固有種の個体数減少や絶滅に繋がる重要な要因であると考えられている (Ewen et al., 2012; Van Riper et al., 2002; Van Riper III, 1991; Warner, 1968)。また、鳥マラリア原虫および APV はいずれも

蚊によって伝播される (Aruch et al., 2007; Valkiūnas, 2005; Yeo et al., 2019)。ただし、APV は直接接触などによっても伝播される (Huong et al., 2014; Lee et al., 2017; Yeo et al., 2019)。地学的成立以来、蚊が生息していなかったハワイ諸島では、人為的に持ち込まれた蚊によって偶発的に諸島内で蚊媒介性の病原体の伝播が可能となった (Van Riper et al., 2002, 1986; Warner, 1968)。すなわち、移入種を介して持ち込まれた新たな病原体は、海洋島の生態系に壊滅的な影響を与える可能性がある。

小笠原諸島は東京の約 1,000 キロ南に位置する海洋島である。本諸島には隔離された環境で独自に進化した様々な固有種を含む多種多様な生物が生息しており、固有の生態系を形成している (Kawakami, 2008; Kawakami and Okochi, 2010; Momiyama, 1930; Shimizu, 2003)。また、諸島内の島々は海鳥にとっても重要な繁殖地である (Chiba et al., 2007; Kawakami and Okochi, 2010)。この特有な生態系や多様性が評価され、小笠原諸島は 2011 年に世界自然遺産に登録された (UNESCO, 2011)。一方、ウズムシ、トカゲ、ネコ、各種植物、などの移入動植物種の直接的または間接的な影響により、在来種の個体数が激減している。加えて、他の人為的活動により同諸島の多くの生物の個体数が減少している (Kawakami, 2008; Kawakami and Okochi, 2010; Shimizu, 2003; Sugiura, 2016; Tomiyama, 1998)。そのため、メグロ (*Apalopteron familiare*) やセグロミズナギドリ (*Puffinus bannermani*) などの固有種や固有亜種が国内希少種に指定されており (Ministry of the Environment, 2019)、この脆弱な生態系を保全するため、外来生物の捕獲・駆除、外来生物および在来生物両方の分布域・個体密度・食性などのモニタリング調査など、様々な保全計画および調査が実行されている (Chiba et al., 2007; Chiba and Suzuki, 2011; Kawakami and Higuchi, 2003; Kawakami and Okochi, 2010; Saitoh et al., 2020; Shimizu, 2003; Sugita et al., 2016; Takahashi, 1973; Takaoka and Saito, 2006;

Toma and Miyagi, 2005; Yabe et al., 2009)。

一方、小笠原諸島における野生動植物の感染症とその影響を調べた研究は少なく、移入されたげっ歯類における広東住血線虫 (*Angiostrongylus cantonensis*)、魚類における二生吸虫類 (*Digenia*)、植物における南根腐病菌 (*Phellinus noxius*)、グリーンアノール (*Anolis carolinensis*) におけるサルモネラ菌 (*Salmonella* spp.) などに限られる (Kuramochi, 2018; Sahashi et al., 2015; Sumiyama et al., 2020; Tokiwa et al., 2013)。小笠原諸島にはウグイス (*Horornis diphone*) やヒヨドリ (*Hypsipetes amaurotis*) など、日本本土で住血原虫が検出されている鳥種 (Imura et al., 2012; Sato et al., 2007) も生息している。また、小笠原諸島では蚊、ヌカカおよびブユなどの吸血性節足動物の生息が確認されている (Takahashi, 1973; Takaoka et al., 1999; Tanaka et al., 1979; Toma and Miyagi, 2005; Wada, 1986)。固有鳥種と移入鳥種双方の存在に加え、ベクター候補の吸血性昆虫が生息していることから、小笠原諸島の状況は鳥マラリア原虫および APV が甚大な影響を与えたハワイ諸島などの他の海洋島と状況が類似していると考えられる。そこで本章では、外的要因の影響に鋭敏な生態系を持つ小笠原諸島における鳥類住血原虫の保有状況について、原虫伝播経路を推定し、感染サイクルの特徴について考察を試みた。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 調査地および環境

鳥類および蚊のサンプリングは小笠原諸島 (図 4.1a) の父島列島 (図 4.1b) : 父島 (27°0'N, 142°13'E)、姉島 (27°07'N, 142°12'E)、南島 (27°02'N, 142°10'E)、東島 (27°06'N, 142°15'E) ; および母島列島 (図 4.1c) : 母島 (26°40'N, 142°09'E)、向島 (26°36'N, 142°07'E)、姪島 (26°34'N, 142°13'E)、妹島 (26°33'N, 142°12'E)、姉島 (26°33'N, 142°09'E) で行われた。これらの島はいずれも亜熱帯気候帯に属し、主に採材した父島の年平均気温は 23°C、最低最高気温はそれぞれ 18°C および 28°C と気温差は比較的小さい。年間降水量は約 1,300 mm で、5 月に最も多く (174 mm)、2 月に最も少ない (61 mm) (Japan Meteorological Agency, 2020; Ministry of the Environment, 2010)。諸島は全体に標高が低い低地からなり、父島と母島の最高標高はそれぞれ 326 m と 462 m である (Government of Japan, 2010)。現在、諸島内のほとんどの地域は厳重に保護されており、父島と母島の一部地域のみ人が居住している (Ministry of the Environment, 2010)。

父島のサンプルは採集した町丁により 3 つの地域に区分した (図 4.1b)。Quantum GIS ver.3.14 を用いて植生図から算出した植被率は採集地域間で異なっていた (図 4.1d) (Biodiversity Center of Japan, 2016; National Statistics Center, 2018; QGIS Developmental Team, 2020)。北部地域には父島の主要な住宅地があり、主にトクサバモクマオウ (*Casuarina equisetifolia*) やギンネム (*Leucaena leucocephala*) の群集など移入種からなる二次林に囲まれていた。南部地域にはより小規模な住宅地があり、周囲には農業用の草原の他、人工林や自然林がある。北部および南部地域では人間の居住や移入種による影響が大きく、東部地域の植生はほとんどが自然のままの状態と保存されていた。この地域はほとんどが在来のムニンヒメツバキ・コブガシ群集

(*Machilus kobu-Schimetum mertensiana*) に覆われており、現在保護対策のために厳しく管理されている。なお、本章で扱う多くの鳥類の正確な回収場所の情報は得られなかったため、採集時の詳細な生息環境は不明である。

#### 4.2.2 保護および死亡鳥類のサンプリング

2011年から2019年にかけて、保護中に死亡した鳥類および死体回収された鳥類を対象とした。父島、兄島、東島、南島および母島で、それぞれ378羽、2羽、1羽、7羽および5羽が発見・保護された。加えて1羽は東京と父島の間を運行している貨客船「おがさわら丸」に不時着した。これらのうち6羽については、冷凍保存前に肝臓および心臓の一部を採取し、心臓の切断面からスタンプ標本を作製した。他すべての個体は剖検前に一度冷凍され、解凍後に肝臓、肺、心臓、筋肉の組織を採取し、剖検直後に70%エタノールを含んだマイクロチューブに入れて保存した。

さらに、父島で保護され、小笠原自然文化研究所で飼育されていた3羽から2015年8月に血液を採取した。血液は翼下静脈から採取し、血液塗抹標本を作製後、残りの血液は70%エタノール入りマイクロチューブに保存した。

スタンプ標本および血液塗抹標本はメタノールで固定し、Hemacolor® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で染色した。乾燥後、封入剤 EUKITT® (O. Kindler GmbH, Freiburg, Germany) を用いて封入した。

保護および死亡鳥類からのサンプル採取に関するすべての手順は、「動物の愛護および管理に関する法律 (Act on Welfare and Management of Animals 1973)」の倫理基準に準拠して行われた。捕獲およびサンプル採取中に鳥類を傷つけることはなかった。

#### 4.2.3 かすみ網を用いた鳥類のサンプリング

2016年2月および2020年9月に、かすみ網を用いて諸島内でスズメ目の留鳥を捕獲した。父島では38羽、母島列島（向島、姪島、妹島、姉島）では35羽が捕獲された。捕獲鳥類には環境省の金属足輪を装着し、翼下静脈から採血し、得られた血液を70-99%エタノール入りマイクロチューブ内に保存した。2016年に捕獲された個体については、血液塗抹標本も保護個体と同様の方法で作製した（4.2.2参照）。捕獲個体は、標識および採血終了後すぐに放鳥した。

かすみ網を用いて捕獲された鳥類からのサンプル採取に関するすべての手順は、保護鳥類と同様の倫理基準に準拠して行われた（4.2.2参照）。なお、かすみ網による鳥類の捕獲およびサンプル採取は環境省および小笠原総合事務所の許可の下で行われ、環境省標識調査の金属足輪は山階鳥類研究所の許可の下で装着した。

#### 4.2.4 鳥類血液からの DNA 抽出および住血原虫 DNA の検出

組織および血液サンプルから PCI 法により DNA を抽出し、最終緩衝液として tris-EDTA バッファーを使用して溶解した。超微量紫外可視分光光度計 (NanoDrop One: Thermo Fisher Scientific) で DNA 濃度を計測し、最終濃度が 50 ng/μl (±10 ng/μl) になるように調整した。鳥類住血原虫 3 属を検出するため、第 2 章と同様の方法で nested-PCR および電気泳動を行った (2.2.2 参照)。ただし、*Leucocytozoon* 属原虫の陽性コントロールには、第 2 章で得られた *Leucocytozoon* sp. OTULEM04 感染オオコノハズク由来の DNA を用いた。

加えて、上述のプライマーを用いて *Plasmodium* 属または *Haemoproteus* 属原虫 DNA 陽性となった全サンプルについては、異なる原虫属の混合感染を検出するために nested multiplex PCR を実施した (Pacheco et al., 2018)。まず、プライマーセッ

ト AE298/AE299 を用いてミトコンドリアの cytochrome *cox1* 遺伝子の一部および *cytb* 遺伝子全体を標的とした 1st PCR を行った。次に *Plasmodium* 属原虫を特異的に検出するプライマーセット AE983/AE985 および *Haemoproteus* 属原虫を特異的に検出するプライマーセット AE980/AE982 を用いて 2nd PCR を行った。陽性コントロールには、実験的に感染させたニワトリ由来の *P. gallinaceum* GALLUS01 および後述する第 5 章の *H. larae* SPMAG12 が検出された飼育下ケープペンギン (*Spheniscus demersus*) 血液の抽出 DNA を用いた。*Plasmodium* 属陽性の場合、上述と同様に Thermostable  $\beta$ -Agarase (Nippon Gene) を用いて DNA を抽出した。*Haemoproteus* 属陽性の場合、プライマーセット HaemF/AE982 を用いた PCR を追加で実施し (Hellgren et al., 2004; Pacheco et al., 2018)、陽性シグナル部分をゲルから切り出して DNA を抽出した。PCR 反応液の組成および電気泳動は第 2 章と同様の方法で行った (2.2.2 参照)。PCR 反応条件は既報に従って設定した (Pacheco et al., 2018)。

#### 4.2.5 蚊の捕集

蚊は父島のみで捕虫網によるスワイピング (2015 年 3 月および 8 月に実施) または二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 誘引 CDC 型トラップ (2015 年 3 月に実施) を用いて捕集した。誘引用の CO<sub>2</sub> は、ドライアイスの入手が困難であったため既報に従い酵母菌、砂糖および水を用いて発生させた (Tsuda et al., 2009)。スワイピングによる捕集は、朝または夕方に北部 5 ヶ所、東部 2 ヶ所および南部 3 ヶ所で行った。CDC 型トラップは北部と南部それぞれの地域に 2 台を夕方に設置し、翌朝に回収した。捕集された蚊は形態学的に種を同定し、DNA 抽出まで -20°C で保存した。

#### 4.2.6 蚊からの DNA 抽出および住血原虫の分子学的検出

捕集された蚊は実体顕微鏡 (Olympus SZ61TR: Olympus) 観察下で頭胸部および腹部に切断し、REDExtract-N-Amp Tissue PCR kit (SIGMA, St. Louis, MO, USA) を用いて各個体から個別に DNA を抽出した。*Plasmodium* 属または *Haemoproteus* 属原虫を検出するため、原虫の *cytb* 遺伝子の部分配列を標的とした nested-PCR を行った。1st PCR にはプライマーセット DW2/DW4、2nd PCR にはプライマーセット HaemNF/HaemNR2 を用いた (Waldenström et al., 2004)。PCR 反応液には最終濃度 4 mM の  $MgCl_2$ 、0.4 mM の dNTP、10×ExTaq Buffer ( $Mg^{2+}$ free: Takara)、1 unit の ExTaq® (Takara)、各プライマー0.4  $\mu$ M、1  $\mu$ l のサンプル DNA を加え、各サンプル全量 25  $\mu$ l となった。PCR の反応条件は既報に従って設定した (Perkins and Schall, 2002; Waldenström et al., 2004)。実験的に感染させたニワトリ血液由来の *P. gallinaceum* GALLUS01 および純水をそれぞれ陽性および陰性コントロールとして用いた。電気泳動は鳥類のサンプルと同様、第 2 章の方法に従って行った (2.2.2 参照)。

#### 4.2.7 鳥類住血原虫の分子系統解析

ゲルから抽出した DNA は BigDye® terminator cycle sequencing kit (Ver 3.1: Applied Biosystems) およびサイクルシーケンサー (ABI 3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) を用いて両方向からシーケンスした。二重波形が確認された場合、別日に新しく血液から抽出した DNA を用いて再度検出を試み、両方の検出で二重波形が確認された場合にのみ混合感染とした。得られた塩基配列は GenBank データベース (Madden, 2013) および MalAvi データベース (Bensch et al., 2009) の配列と比較した。陽性コントロールと一致する系統が得られた場合、コンタミネーション

の可能性を除くため、1st PCR から再度検出を試みた。

ベイズ式系統樹を第 3 章と同様の方法で作成した (3.2.4 参照)。また、検出された系統間の遺伝的関係を可視化するため、PopART 1.7 を用いて最小全域木 (minimum spanning network) を作成した (Leigh and Bryant, 2015)。

#### 4.2.8 顕微鏡による原虫検査

血液塗抹標本およびスタンプスメアの観察は、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX43: Olympus) を用いて行った。いずれも 400 倍および 1000 倍視野で観察し、確認された住血原虫は形態学的特徴に基づき種を識別した (Valkiūnas, 2005)。写真撮影には光学顕微鏡 (OLYMPUS IX71: Olympus) および cellSens Standard 1.6 (Olympus) を用いた。

#### 4.2.9 統計解析

フィッシャーの正確確率検定を用い、留鳥および渡り鳥の住血原虫保有率を比較した。渡り区分は日本鳥類目録改訂第 7 版 (日本鳥学会, 2012) および小笠原諸島の鳥類相に関するフィールド調査 (Chiba et al., 2007; Emura, 2011; Kawakami et al., 2018) に基づいて分類した。小笠原諸島内における *Plasmodium* 属原虫保有率に影響を与える要因を調べるため、二項分布とロジット関数を当てはめた GLM を使用した。鳥種 [メジロ (*Zosterops japonicus*, 図 4.2a)、イソヒヨドリ (*Monticola solitarius*, 図 4.2b)、トラツグミ (*Zoothera aurea*, 図 4.2c)]、年齢 (幼鳥または成鳥)、採集地域 (北部、東部、南部) および採集季節 (春、夏、秋、冬) の 4 項目を検討した。GLM 解析には父島のサンプルのみを用いた。また、上述 3 種以外の留鳥はサンプル数が少なかったため、解析から除いた。さらに、原虫系統によるバイアスを排除するため、

解析には pGRW06 のみを用いた。データが不均等であったため、分散分析 (ANOVA) の計算にはタイプ II の平方和を用いた。その後、テューキーの多重比較検定 (Tukey's multiple comparison test) を行った。また、オガサワライエカ (*Cx. boninensis*) における pGRW06 保有率および捕集地域の関係をフィッシャーの正確確率検定によって調べた。すべての統計解析には R version 3.6.3 を用い、'prevalence'、'car'、'multcomp'パッケージを使用した (Devleesschauwer et al., 2014; Fox and Weisberg, 2011; Hothorn et al., 2008)。有意水準は 5%とした。

### 4.3 成績

#### 4.3.1 鳥類における住血原虫保有状況

鳥類 470 羽中 168 羽から 3 属いずれかの住血原虫 DNA が検出された (表 4.1)。留鳥では、陽性個体は父島、母島、向島、姪島および姉島で認められた (付録 1 表 A1.1)。渡り鳥では、父島の 5 個体が原虫 DNA 陽性であった。他の 4 島 (兄島、東島、南島、妹島) からは陽性個体は認められなかった。総合陽性率は留鳥 (50.00% ; 95% CI=44.00-54.79%) および渡り鳥 (3.47% ; 95% CI=1.49-7.87%) の間で有意に異なっていた (フィッシャーの正確確率検定 :  $p < 0.001$ )。

*Plasmodium* 属 6 系統、*Haemoproteus* 属 2 系統および *Leucocytozoon* 属 4 系統が検出され、うち 5 系統は今回初めて検出された (表 4.1、図 4.3、付録 1 図 A1.1)。検出された全系統は標的とした遺伝子領域内で互いに 10 塩基以上異なっていた (図 4.3a)。検出された *Haemoproteus* 属系統は *Parahaemoproteus* 亜属のクレードに分類された (付録 1 図 A1.1)。3 個体は同じ原虫属の複数系統に混合感染していたと考えられ、系統は特定できなかった。メジロ 15 羽では、プライマーセット HaemF/HaemR2 で *Plasmodium* 属のみが検出されたが、*Plasmodium* 属と *Haemoproteus* 属原虫を判別可能な multiplex PCR では両原虫属 DNA の増幅が認められた (表 4.1)。プライマーセット HaemF/HaemR2 および *Plasmodium* 属に特異的なプライマーセット AE983/AE985 両方で同じ原虫系統が検出された (14 個体から pGRW06、1 個体から pMONTRI01)。*Haemoproteus* 属に特異的なプライマーセットでは 15 個体すべてから同一の系統 (hZOSJAP02) が検出された。留鳥からは *Plasmodium* 属 4 系統、*Haemoproteus* 属 2 系統、*Leucocytozoon* 属 3 系統が検出された。一方、渡り鳥からは *Plasmodium* 属 3 系統および *Leucocytozoon* 属 1 系統が検出され、留鳥および渡り鳥の間で共通して検出された系統は *P. elongatum* GRW06

のみであった。

父島、母島、向島、姪島、姉島の留鳥から、それぞれ 8、1、3、2、1 系統が検出された (図 4.3b)。4 系統 (pGRW06、pCXPIP12、hZOJAP02、IZOOAUR01) は複数の島の留鳥から検出され、いずれも父島列島と母島列島両方の留鳥から検出された。

留鳥 8 種中 6 種から住血原虫が検出された (表 4.1)。3 属すべての原虫のうち、*Plasmodium elongatum*(pGRW06) が最も多く (図 4.3b)、次に *P. relictum*(pGRW04) が多かったが、pGRW06 より検出頻度は低かった。これら原虫 2 種は父島の複数の鳥種から検出されたが、鳥種によって保有率は大きく異なっていた (図 4.3c)。また、*Haemoproteus* 属および *Leucocytozoon* 属はそれぞれ 19 羽および 6 羽の留鳥から検出された。

解析した父島の留鳥における pGRW06 の保有率について、宿主年齢は有意な要因ではなく (GLM : LR $\chi^2$ =1.372、df=1、 $p$ =0.242)、交互作用も認められなかった。一方、種 (GLM : LR $\chi^2$ =35.153、df=2、 $p$ <0.001) は有意な要因であり、季節との交互作用が認められた (GLM : LR $\chi^2$ =18.431、df=6、 $p$ =0.005)。トラツグミ (GLM : LR $\chi^2$ =5.003、df=3、 $p$ =0.172 ; GLM (北部のみ) : LR $\chi^2$ =3.455、df=3、 $p$ =0.327) およびイソヒヨドリ (GLM : LR $\chi^2$ =0.552、df=3、 $p$ =0.907 ; GLM (北部のみ) : LR $\chi^2$ =0.833、df=3、 $p$ =0.841) では北部地域の個体のみで比較した場合を含め、保有率に季節性は認められなかった。これら 2 種については、東部および南部地域で回収・捕獲された個体数が少なく地域間の保有率は比較できなかった。メジロでは、すべての地域を含めた場合、保有率が季節間で有意に異なっていた (GLM : LR $\chi^2$ =22.22、df=3、 $p$ <0.001)。しかし、地域ごとに解析した結果、季節間で有意差は認められなかった (表 4.3)。さらに、保有率は夏および冬において北部より南部で有意に高かった (デューキーの多重比較検定 (冬) : estimate=2.749、s.e.=1.168、z value=2.353、 $p$ <0.037)。

秋季においても南部の原虫保有率は比較的高かったが、有意差は認められなかった（表 4.3）。冬季における保有率は北部より東部で高かったが、サンプル数が少なく比較できなかった（デューキーの多重比較検定：estimate=-19.096、s.e.=3584.671、z value=-0.005、 $p=1.000$ ）。

血液塗抹標本およびスタンプスメアが得られた 51 羽中、41 羽で原虫虫体が認められた（付録 1 表 A1.2；図 A1.2）。なお、塗抹が得られた PCR 陽性個体はすべて虫体が確認された。一部の原虫は種まで同定できなかったが、*P. elongatum* および *P. relictum* は多数確認された。また、9 羽で *P. elongatum* および *H. killangoi* の混合感染が確認された。これらの鏡検結果は multiplex PCR の結果と一致したため、hZOSJAP02 は形態種 *H. killangoi* の遺伝子系統であることが明らかになった（付録 1 参照）。一方、2 羽で *P. elongatum* および *P. relictum* の混合感染が確認されたが、今回行った 2 種類の PCR 検出法では、2 羽とも *P. elongatum* GRW06 のみが検出された。

#### 4.3.2 蚊における住血原虫保有状況

合計 5 種 262 頭の蚊が捕集された（表 4.2）。スーピングで捕集したオガサワライエカ 12 頭およびネッタイエカ 1 頭から、pGRW06 が検出された。検出部位は、未吸血のオガサワライエカ 5 頭の頭胸部および腹部両方、1 頭の頭胸部、および 6 頭の腹部であった。オガサワライエカの原虫保有率は 27.27% (95% CI=16.35-41.85%) であり、感染個体は 3 月および 8 月の両方で捕集された。東部の保有率が最も高く (31.43% ; 95% CI=18.55-47.98%)、次いで北部が高かった (20.00% ; 95% CI=3.62-62.45%)。南部では原虫陽性蚊は捕集されなかった。なお、地域間の保有率に有意差は認められなかった（フィッシャーの正確確率検定： $p=0.592$ ）。ネッタイエカの原

虫保有率は 1.28% (95% CI=0.23-6.91%) であり、北部で捕集された未吸血個体の腹部から pGRW06 が検出された。さらに、未吸血のオガサライエカの腹部から *Haemoproteus* 属原虫 DNA が検出されたが、混合感染であったため種や系統は特定できなかった。

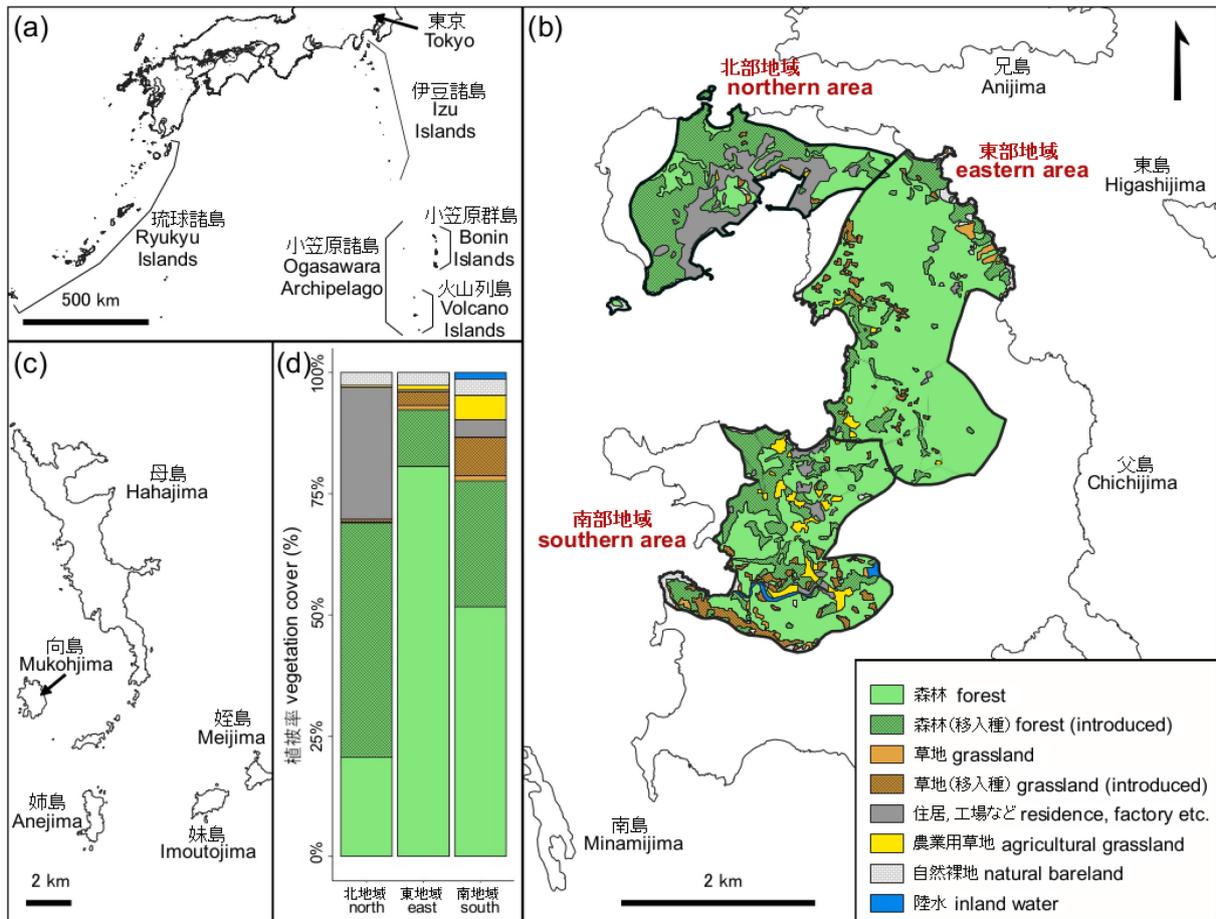


図 4.1. 調査地の位置および植生. (a) 小笠原諸島の位置. (b) 父島列島の島々および父島における 3 調査地域の植生. (c) 母島列島の島々. (d) 父島における 3 調査地域の植被率.

Fig. 4.1. Map of the study area. Location of the Bonin Islands in relation to other areas of Japan (a). Islands of the Chichijima group, with vegetation cover of the three sampling areas in Chichijima (b). Islands of the Hahajima group (c). Vegetation cover proportions of the three sampling areas of Chichijima (d).

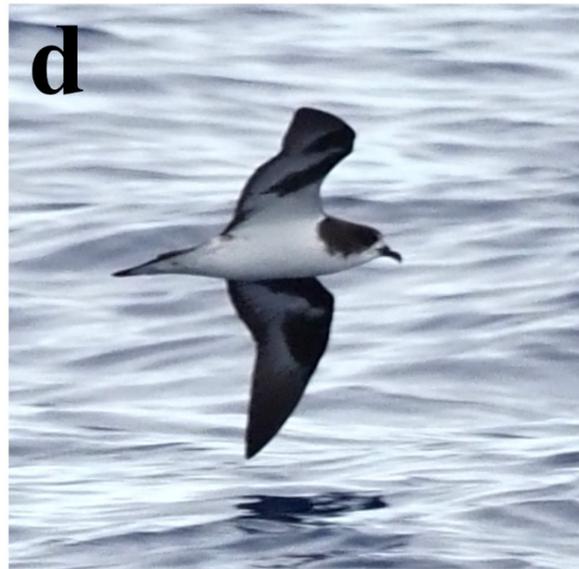


図 4.2. 本章で調べた一部の鳥種. (a) ”オガサワラ”メジロ (*Zosterops japonicus stejnegeri* × *Z. j. alani*), (b) イソヒヨドリ (*Monticola solitarius*), (c) トラツグミ (*Zoothera aurea*), (d) シロハラミズナギドリ (*Pterodroma hypoleuca*).

Fig. 4.2. Some of the birds investigated in this chapter. (a) *Zosterops japonicus stejnegeri* × *Z. j. alani*, (b) *Monticola solitarius*, (c) *Zoothera aurea*, (d) *Pterodroma hypoleuca*.

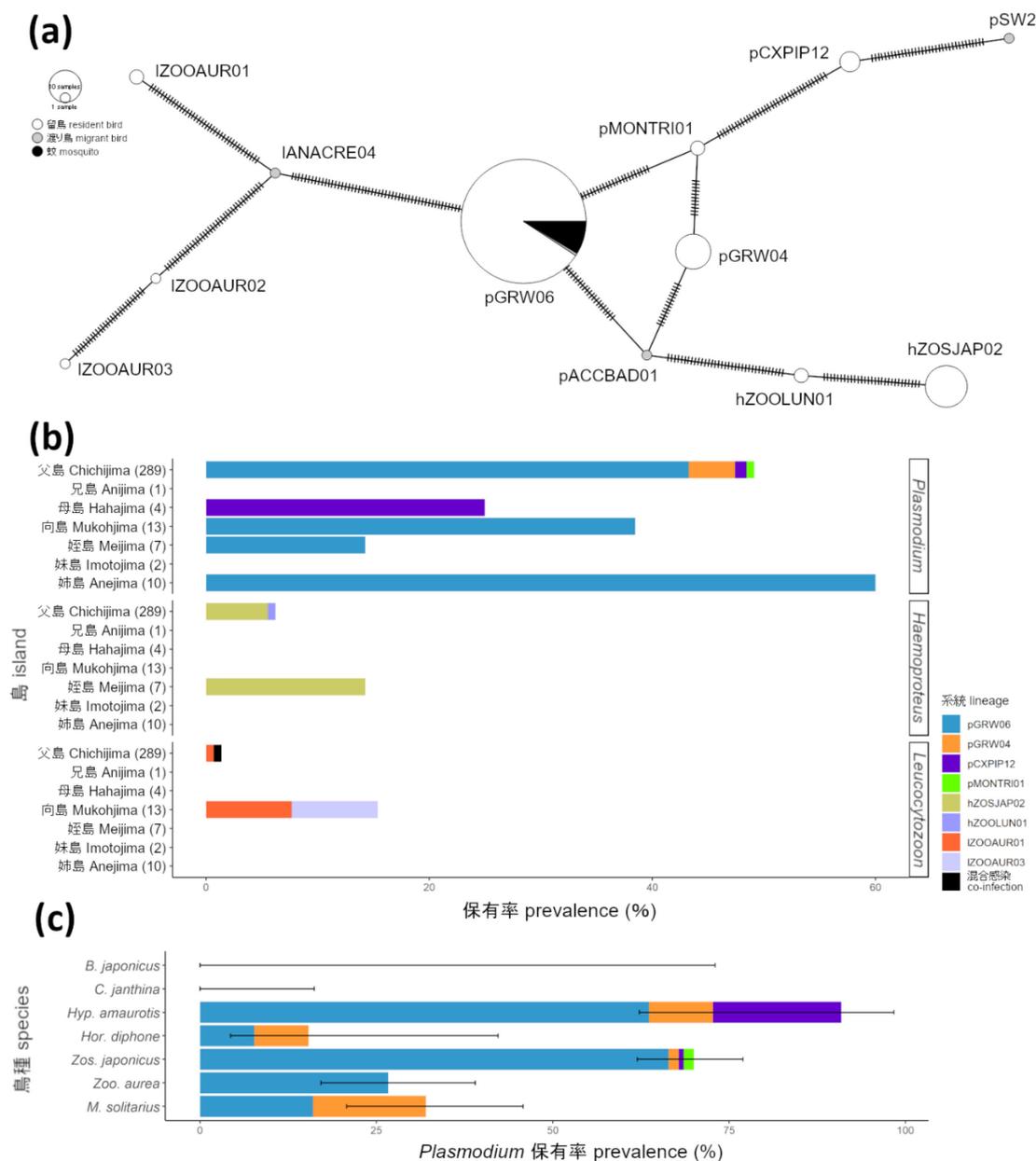


図 4.3. 本研究で検出された住血原虫系統の構成 (ミトコンドリア DNA *cyt b*). (a) 最小全域木、各ハッシュマークは塩基の変異を示す. (b) 島ごとの留鳥における原虫保有率. (c) 父島の留鳥における *Plasmodium* 属原虫保有率、鳥種は次の通りである: オガサワラノスリ (*Buteo japonicus toyoshimai*)、アカガシラカラスバト (*Columba janthina nitens*)、オガサワラヒヨドリ (*Hypsipetes amaurotis squamiceps*)、ハシナガウグイス (*Horornis diphone diphone*)、”オガサワラ”メジロ (*Zosterops japonicus stejnegeri* x *Z. j. alani*)、トラツグミ (*Zoothera aurea*)、イソヒヨドリ (*Monticola solitarius*)、エラーバーは信頼区間±95%を示す. 色は凡例で示されている通り、宿主/ベクターの区分 (a) または系統 (b,c) を示す.

Fig. 4.3. Composition of haemosporidian mitochondrial DNA cytochrome *b* lineages detected in this study. Minimum spanning network (a), prevalence among resident species by island (b), and *Plasmodium* prevalence among resident species of Chichijima (c). The colors represent host/vector status (a) or lineages (b,c), as shown in the legends. Each hash mark indicates a base mutation (a). Scientific names are abbreviated; refer to fig. 4.1 for the full scientific name (c). Error bars represent ±95% of confidence interval (c).

表 4.1. 小笠原諸島の鳥類における住血原虫検出 PCR 結果.

Table 4.1. Birds sampled in this study, with PCR results of haemosporidian detection.

区分 Status	鳥種 Bird species	父島群島 Chichijima group			母島列島 Hahajima group			合計 Total			系統(数) Lineages (number) <sup>e</sup>
		個体数 Sampled	陽性数 Positive	保有率 Prevalence	個体数 Sampled	陽性数 Positive	保有率 Prevalence	個体数 Sampled	陽性数 Positive	保有率 Prevalence	
留鳥 Resident	オガサワラノスリ <i>Buteo japonicus toyoshimai</i> <sup>a</sup>	1	0	0				1	0	0	
	アカガシラカラスバト <i>Columba janthina nitens</i> <sup>a</sup>	14	0	0	1	0	0	15	0	0	
	オガサワラヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis squamiceps</i> <sup>a</sup>	11	10	90.91	5	2	40.00	16	12	75.00	pGRW04 (1), pGRW06 (8), pCXPIP12 (3)
	ハンナガウグイス <i>Horornis diphone diphone</i> <sup>a</sup>	14	2	14.29	1	0	0	15	2	13.33	pGRW04 (1), pGRW06 (1)
	"オガサワラ"メジロ <i>Zosterops japonicus stejnegeri</i> × <i>Z. j. alani</i> <sup>b</sup>	140	99 <sup>d</sup>	70.71	17	8	47.06	157	107	68.15	pGRW04 (2), pGRW06 (100), pCXPIP12 (1), pMONTRI01 (2), hZOSJAP02 <sup>f</sup> (17)
	トラツグミ <i>Zoothera aurea</i>	60	22	36.67	2	2 <sup>d</sup>	100	62	24	38.71	pGRW06 (18), hZOOAUR01 <sup>f</sup> (2), hZOOAUR02 <sup>f</sup> (1), hZOOAUR03 <sup>f</sup> (1), <i>Leucocytozoon</i> sp.
	イツヒヨドリ <i>Monticola solitarius</i>	50	16	32.00				50	16	32.00	pGRW04 (8), pGRW06 (8)
	オガサワラカワラヒワ <i>Chloris kittlitzii</i> <sup>a</sup>				10	2	20.00	10	2	20.00	pGRW06 (2)
小計 Sub-total	290	149	51.38	36	14	38.89	326	163	50.00		
渡り鳥 Migrant											
夏鳥 Migrant breeder											
	クロアジサシ <i>Anous stolidus</i>	1	0	0				1	0	0	
	セグロアジサシ <i>Onychoprion fuscatus</i>	3	0	0				3	0	0	
	オーstonウミツバメ <i>Oceanodroma tristrami</i>	1	0	0				1	0	0	
	シロハラミズナギドリ <i>Pterodroma hypoleuca</i>	30 <sup>c</sup>	0	0	1	0	0	31	0	0	
	オナガミズナギドリ <i>Ardenna pacifica</i>	38	0	0				38	0	0	
	オガサワラミズナギドリ <i>Puffinus bannermani</i>	5	0	0				5	0	0	
	アナドリ <i>Bulweria bulwerii</i>	9	0	0				9	0	0	
	カツオドリ <i>Sula leucogaster</i>	1	0	0	1	0	0	2	0	0	
冬鳥 Winter visitor											
	オナガガモ <i>Anas acuta</i>	1	0	0				1	0	0	
	バン <i>Gallinula chloropus</i>	3	1	33.33				3	1	33.33	<i>Plasmodium</i> sp. [混合感染 co-infected] (1)
	オオバン <i>Fulica atra</i>	1	1	100				1	1	100	pSW2 (1)
	ムナグロ <i>Pluvialis fulva</i>	23	0	0				23	0	0	
	キョウジヨシギ <i>Arenaria interpres</i>	4	0	0				4	0	0	
	クロウミツバメ <i>Oceanodroma matsudairae</i>				1	0	0	1	0	0	
	チュウサギ <i>Ardea intermedia</i>	2	0	0				2	0	0	

表 4.1. 小笠原諸島の鳥類における住血原虫検出 PCR 結果 (続き).

Table 4.1. Birds sampled in this study, with PCR results of haemosporidian detection (continued).

区分 Status	鳥種 Bird species	父島群島 Chichijima group			母島列島 Hahajima group			合計 Total			系統(数) Lineages (number) <sup>e</sup>
		個体数 Sampled	陽性数 Positive	保有率 Prevalence	個体数 Sampled	陽性数 Positive	保有率 Prevalence	個体数 Sampled	陽性数 Positive	保有率 Prevalence	
旅鳥 Passage visitor	ハシボソミズナギドリ <i>Ardenna tenuirostris</i>	2	0	0				2	0	0	
	ゴイサギ <i>Nycticorax nycticorax</i>	1	0	0				1	0	0	
	ツバメ <i>Hirundo rustica</i>	1	0	0				1	0	0	
稀な旅鳥または迷鳥 Irregular or accidental visitor	コガモ <i>Anas crecca</i>	1	1	100				1	1	100	IANACRE04 <sup>f</sup> (1)
	キジバト <i>Streptopelia orientalis</i>	1	0	0				1	0	0	
	セイタカシギ <i>Himantopus himantopus</i>	2	1	50.00				2	1	50.00	pACCBAD01 (1)
	コチドリ <i>Charadrius dubius</i>	1	0	0				1	0	0	
	タシギ <i>Gallinago gallinago</i>	1	0	0				1	0	0	
	ツバメチドリ <i>Glareola maldivarum</i>	2	0	0				2	0	0	
稀な旅鳥または迷鳥 Irregular or accidental visitor	クロハラアジサシ <i>Chlidonias hybrida</i>	1	0	0				1	0	0	
	ハジロクロハラアジサシ <i>Chlidonias leucopterus</i>	1	0	0				1	0	0	
	コンジロウミツバメ <i>Oceanodroma leucorhoa</i>	1	0	0				1	0	0	
	オオグンカンドリ <i>Fregata minor</i>				1	0	0	1	0	0	
	ダイサギ <i>Ardea alba</i>	1	0	0				1	0	0	
	シメ <i>Coccythraustes coccythraustes</i>	1	1	100				1	1	100	pGRW06 (1)
	イスカ <i>Loxia curvirostra</i>	1	0	0				1	0	0	
	小計 Sub-total	140	5	3.57	4	0	0	144	5	3.47	
合計 Total	430	154	35.81	40	14	35.00	470	168	35.74		

<sup>a</sup> 固有種/固有亜種. Endemic species/subspecies.

<sup>b</sup> 移入種. Introduced species.

<sup>c</sup> シロハラミズナギドリ1羽は貨客船おがさわら丸で保護された. One *Pterodroma hypoleuca* was rescued on the passenger ship Ogasawara-maru

<sup>d</sup> 混合感染個体が確認された. メジロ14羽: pGRW06 x hZOSJAP02; メジロ1羽: pMONTRI01 x hZOSJAP02; トラツグミ1羽: pGRW06 x IZOOAUR01; トラツグミ1羽: pGRW06 x IZOOAUR03.  
Co-infected individuals were detected. 14 *Zosterops japonicus*: pGRW06 x hZOSJAP02; 1 *Zosterops japonicus*: pMONTRI01 x hZOSJAP02; 1 *Zoothera aurea*: pGRW06 x IZOOAUR01;  
1 *Zoothera aurea*: pGRW06 x IZOOAUR03.

<sup>e</sup> 系統名はMalAviデータベースに基づいて付けられている. Lineage names are given according to MalAvi database.

<sup>f</sup> 初めて検出された系統. Lineages detected for the first time.

表 4.2. 父島で捕集された蚊および住血原虫 DNA 検出結果.

Table 4.2. Mosquito samples collected and tested, including PCR results of haemosporidian detection.

捕集方法 sampling method	蚊種 mosquito species	北部地域 northern area		東部地域 eastern area		南部地域 southern area		合計 total	
		頭数	陽性数	頭数	陽性数	頭数	陽性数	頭数	陽性数
		no.	positive	no.	positive	no.	positive	no.	positive
スイーピング sweep netting <sup>a</sup>	セボリヤブカ <i>Aedes savoryi</i> <sup>b</sup>	4/0	0	1/0	0	52/0	0	57/0	0
	ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	5/41	0	1/28	0	1/1	0	7/70	0
	オガサワライエカ <i>Culex boninensis</i> <sup>b</sup>	1/1	1/0	0/35	0/11	3/0	0	4/36	1/11
	ネッタイエカ <i>Culex quinquefasciat</i>	1/1	0	0/1	0			1/2	0
	イエカ属 <i>Culex</i> sp.	1/0	0					1/0	0
	シノナガカクイカ <i>Lutzia shinonagai</i> <sup>b</sup>			0/1	0			0/1	0
	カクイカ属 <i>Lutzia</i> sp.	1/0	0					1/0	0
小計 sub-total	13/43	1/0	2/65	0/11	56/1	0	71/109	1/11	
CO <sub>2</sub> トラップ CO <sub>2</sub> trap	ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	2	0			1	0	3	0
	オガサワライエカ <i>Culex boninensis</i> <sup>b</sup>	3	0			1	0	4	0
	ネッタイエカ <i>Culex quinquefasciat</i>	10	1			65	0	75	1
	小計 sub-total	15	1			67	0	82	1
合計 total	71	2	67	11	124	0	262	13	

<sup>a</sup> 3月に捕集/8月に捕集. Collected in March/Collected in August.

<sup>b</sup> 固有種. Endemic species.

表 4.3. 父島の各調査地域におけるメジロ (*Zosterops japonicus*) の *Plasmodium elongatum* GRW06 保有率. 有意な  $p$  値は太字で示している.

Table 4.3. Prevalence of *Plasmodium elongatum* GRW06 in Japanese white-eyes (*Zosterops japonicus*) at each sampling area of Chichijima. Significant  $p$  values are shown in bold.

季節 season	北部地域 northern area	東部地域 eastern area	南部地域 southern area	尤度比統計量 LR chisq	$p$
春 (3月から5月) spring (March to May)	7/21 (33.33) <sup>a</sup>	0	0	-	-
夏 (6月から8月) summer (June to August)	25/43 (58.14)	0	10/11 (90.91)	4.879	<b>0.027</b>
秋 (9月から11月) autumn (September to November)	7/15 (46.67)	0	2/2 (100)	2.781	0.095
冬 (12月から2月) winter (December to February)	8/13 (61.54)	9/9 (100)	25/26 (96.15)	10.370	<b>0.006</b>
尤度比統計量 LR chisq	4.245		0.598		
$p$	0.236		0.742		

<sup>a</sup> 陽性数/個体数 (パーセントによる保有率). Positive/sampled (prevalence by percent).

## 4.4 考察

### 4.4.1 渡り鳥による諸島内への住血原虫侵入の可能性

今回、留鳥の住血原虫保有率は渡り鳥よりも有意に高かった（表 4.1）。最近、同様の状況が海外の海洋島でも報告されており、宿主特異性、原虫の生存率や宿主の生存率などが要因となっていると考えられている（Soares et al., 2020）。本調査地では、一般に原虫保有率が低い海鳥（図 4.2d：海鳥の 1 種、シロハラミズナギドリ）やシギ・チドリ類が対象となっていることが主要な要因の一つとして挙げられる（3.4.1 参照）。海水環境は多くのベクターの生息に適さないため、このような環境を利用する海鳥やシギ・チドリ類などはベクターとの接触が最小限になると考えられる（Clark et al., 2016）。セボリヤブカ（*Aedes savoryi*）など一部の蚊種は海水環境に耐性があることが知られている（Dale and Knight, 2008; Katano et al., 2010; Tsuda, 2019）。しかし、今回唯一鳥マラリア原虫 DNA が検出されたオガサワライエカは淡水環境でのみ繁殖し（Dale and Knight, 2008; Toma and Miyagi, 2005; Tsuda, 2019）、海鳥との接触機会は限られていると考えられる。また、海鳥の原虫保有率が低い他の要因として、免疫力や宿主-寄生虫間の関係なども挙げられている（Martínez-Abraín et al., 2004）。さらに、海洋島である小笠原諸島における渡り鳥の種類は、主に海鳥およびシギ・チドリ類で構成されているため、同諸島の渡り鳥では原虫保有率が低いと考えられる。

加えて、留鳥と渡り鳥の間で共通して検出された原虫系統は *P. elongatum* GRW06 のみであった（図 4.3a）。さらに、検出された系統は互いに 10 塩基以上異なっていた。留鳥と渡り鳥の間で頻繁に原虫が伝播されている場合、共通する原虫系統がより多く検出されることが予想される。今回唯一共通していた *P. elongatum* GRW06 は、鳥マラリア原虫の中で最も広域に分布する系統の一つであり（Bensch et al., 2009）、

日本本土の鳥類からも検出されている (Imura et al., 2012)。一方、本系統は父島で最も保有率が高かった。そのため、本系統が検出された渡り鳥は、小笠原諸島もしくは他地域のどちらで感染したのか不明である。留鳥と渡り鳥の間で共通する原虫系統が少ない原因として、宿主特異性、適切なベクター種の欠如および生息環境の隔離などが挙げられる (Beadell et al., 2004; Chahad-Ehlers et al., 2018; Clark and Clegg, 2017; Fecchio et al., 2019; Hellgren et al., 2009; Valkiūnas, 2005)。今回調査した範囲では、小笠原諸島では留鳥-渡り鳥間の伝播および諸島内における新たな原虫系統の定着は比較的稀であると考えられる。しかし、感染した渡り鳥および感染していない留鳥の両方に接触することが可能な蚊やヌカカなどのベクターが分布している場合、新たな原虫が移入・定着する可能性があるため、鳥類およびベクターとなりうる吸血昆虫の生態および住血原虫保有状況などのモニタリングを行う必要がある。

#### 4.4.2 小笠原諸島における鳥類住血原虫の伝播状況

住血原虫 9 系統が留鳥から検出され、これらの系統は小笠原諸島内で伝播されていると考えられた。鳥類で最も保有率が高かった pGRW06 は父島のオガサライエカおよびネッタイエカからも検出された。オガサライエカでは pGRW06 は未吸血個体の頭胸部および胸部のそれぞれから検出された。未吸血蚊には、過去に一度も吸血経験がない個体と、過去に吸血経験があるが現在血液の貯留が認められない個体が含まれ、血液を介して伝播される原虫が検出された場合は後者であると考えられる。また、鳥マラリア原虫の生活環を考慮すると、頭胸部からの検出は唾液腺のスポロゾイト由来、腹部からの検出は中腸のオーシスト由来であることを示す (Valkiūnas, 2005)。そのため、オガサライエカは pGRW06 のベクター種である可能性が示唆される。ただし、一部の *Plasmodium* 属原虫種は、媒介能力がない吸血昆虫 (incompetent

vector) の体内に侵入しても、オーシスト期まで発育して、以降は中断されることが知られているため (Žiegytė, 2014; Žiegytė and Valkiūnas, 2014)、媒介能力を証明するためには、蚊体内における原虫の各発育ステージの形態学的検出などのさらなる検討が必要である。ネッタイエカは *P. elongatum* ERIRUB01 のベクターであるため、同じ原虫種の別系統である pGRW06 の媒介能力も有する可能性がある (Palinauskas et al., 2016)。しかし、アカイエカおよびネッタイエカにおける *P. elongatum* の発育状況を調べた先行研究では、スポロゾイトの形成が全く見られない結果や、全個体でスポロゾイトが得られた結果まで様々であり、住血原虫の感染強度、環境条件、原虫系統などが媒介能力に影響を与える可能性があることに注意する必要がある (Palinauskas et al., 2016)。なお、ネッタイエカは、*P. relictum* GRW04 のベクターであることが実験感染により確認されている (Lapointe et al., 2005; Valkiūnas et al., 2015)。また、*Plasmodium* sp. CXPIP12 の原虫 DNA がネッタイエカの近縁種であるアカイエカ (*Cx. pipiens pallens*) の未吸血個体から検出されている (Kim and Tsuda, 2010)。媒介能力を証明するためには、蚊の体内におけるオーシストおよびスポロゾイトの確認が不可欠だが、今回の結果からオガサワライエカおよびネッタイエカは父島における鳥マラリアのベクターであることが示唆された。原虫陽性蚊は 3 月および 8 月に捕獲されており、これらの蚊に媒介能力があると仮定して、同島内では早くて 3 月に原虫の伝播が起こりうると考えられる。

原虫に感染した留鳥は父島列島および母島列島両方から検出され、どちらの列島でも原虫が伝播・維持されていることが示唆された。オガサワライエカおよびネッタイエカはどちらも母島列島でも生息が確認されており (Maekawa, 2021)、母島列島でも鳥マラリア原虫の伝播が可能と考えられる。

一般に *Haemoproteus* 属原虫 (*Parahaemoproteus* 亜属) はヌカカ、*Leucocytozoon*

属はブユがベクターであることが知られている（第 1 章既出）。今回検出された *Haemoproteus* 属原虫系統はどちらも *Parahaemoproteus* 亜属に分類され（付録 1 図 A1-1）、ヌカカによって媒介されていると考えられる。ヌカカおよびブユは共に父島と母島で分布が確認されており（Takaoka et al., 1999; Wada, 1986）、諸島内の原虫伝播に関与している可能性がある。また、オガサワライエカから *Haemoproteus* 属原虫の混合感染が検出された。アカイエカ体内では *Haemoproteus* 属原虫は途中までしか発育せず、中断されることが確認されているが、実験条件下で、感染後 17 日目までアカイエカ体内から *Haemoproteus* 属原虫 DNA が PCR で検出された例がある（Valkiūnas et al., 2013; Žiegytė, 2014）。そのため、オガサワライエカから検出された *Haemoproteus* 属原虫は過去の吸血時に体内に入り、発育しないまま残留していた原虫の DNA が PCR で検出された可能性がある。

#### 4.4.3 小笠原諸島における鳥類住血原虫の起源の推定

メジロ（図 4.2a）およびトラツグミ（図 4.2b）からそれぞれ原虫が 2 系統および 4 系統が検出された。小笠原諸島のメジロ（通称”オガサワラ”メジロ）は伊豆諸島の亜種シチトウメジロ（*Zosterops japonicus stejnegeri*）と火山列島の亜種イオウトウメジロ（*Z. japonicus alani*）の交雑個体群であると考えられている（Momiya, 1930）。ただし、近年琉球列島の個体群も関係している可能性が指摘されている（Sugita et al., 2016）。亜種シチトウメジロおよび亜種イオウトウメジロは 1900 年代初頭に小笠原諸島に持ち込め（Momiya, 1930）、その結果生じた交雑個体群である”オガサワラ”メジロは、現在小笠原諸島の優占鳥種の一つとなっている（Kawakami and Okochi, 2010; Sugita et al., 2016）。一方、トラツグミは人為的な導入ではないが、メジロと同様に小笠原諸島において比較的新しい鳥種である。トラツグミは、同

諸島がアメリカ占領下であった 1900 年代半ばに、ミミズ類の人為的導入により自然に繁殖個体群を形成し、定着したと考えられている (Kawakami, 2019, 2008)。よって、今回メジロおよびトラツグミからのみ検出された原虫系統は宿主鳥類と共に諸島内に持ち込まれたと考えられる。オーストラリア、中国、日本本土など小笠原諸島の周辺地域における鳥類住血原虫の疫学的調査は行われているが (Beadell et al., 2004; Cannell et al., 2013; Eastwood et al., 2019; Huang et al., 2015; Murata, 2007; Tsuda, 2017; Zhang et al., 2014)、伊豆諸島および火山列島は未調査である。また、琉球列島における原虫保有状況を調査した研究も少なく (Hagihara et al., 2005; Murata, 2007; Murata et al., 2008; Nagata, 2006)、特に分子疫学的情報は限られている (Ejiri et al., 2008; Tanaka et al., 2019)。周辺の島群における住血原虫相の調査および分子系統の比較により、小笠原諸島における住血原虫相についてさらなる知見が得られると期待される。

*Plasmodium* sp. CXPIP12 がメジロおよび亜種オガサワラヒヨドリ (*Hypsipetes amaurotis squamiceps*) から検出された。本系統は、上述したメジロおよびトラツグミから検出された原虫系統と同様にメジロと共に持ち込まれた可能性がある。一方、本系統はこれまで日本本土および対馬のヒヨドリや日本本土のアカイエカから検出されている (Kim and Tsuda, 2010; Tanigawa et al., 2013)。オガサワラヒヨドリは琉球列島の個体群が起源であると考えられており (Sugita et al., 2016)、pCXPIP12 は自然宿主であるヒヨドリと共に持ち込まれた可能性がある。

今回の調査で優占原虫系統だった pGRW06 および pGRW04 の 2 系統は、鳥マラリア原虫の中で最も分布域が広い系統として知られている (Bensch et al., 2009; Ellis et al., 2018)。宿主域および分布域が広い原虫系統は、一般に新たな地域でも定着しやすい傾向がある。ニュージーランドでは、これら 2 系統が移入種および在来種

の両方から検出されたが、隣に位置するオーストラリアからは検出されていないことに加え、移入種の原産地では頻繁に検出されていることから、これらの系統は移入種によってニュージーランドに持ち込まれた可能性が高いことが示唆された (Ewen et al., 2012)。このような解析は、移入種が離れた地域から持ち込まれたため可能であった。一方、小笠原諸島に移入された”オガサワラ”メジロは近隣の島群が起源であり、これらの島群は小笠原諸島に生息するいくつもの鳥類の固有亜種の起源でもある (Emura et al., 2013; Sugita et al., 2016)。そのため、これらの原虫系統の起源の推定は難しく、原虫系統の侵入経路を明らかにするためには、変異速度がより速い Merozoite surface protein 1 (*MSP1*) などの他の遺伝子領域を用いた解析などが必要である (Garcia-Longoria et al., 2015; Hellgren et al., 2015; Huang et al., 2019)。また、小笠原諸島には、pGRW06 が検出されたオガサワライエカを含む固有の蚊、ブユおよびヌカカなど、原虫のベクターとなりうる吸血昆虫が生息している (Takahashi, 1973; Takaoka et al., 1999; Tanaka et al., 1979; Toma and Miyagi, 2005; Wada, 1986)。このことは、移入種の導入以前から諸島内に鳥類の住血原虫が分布していた可能性を示唆している。これらの固有の吸血昆虫が近縁種から分岐した年代を推定することで、諸島内でいつ頃から住血原虫が伝播可能な状態になっていたのか推定できる可能性が考えられる。

#### 4.4.4 留鳥における住血原虫保有状況

留鳥 8 種中 6 種から住血原虫が検出され、合計保有率および系統ごとの保有率は鳥種間で大きく異なっていた。興味深いことに、顕微鏡検査によりメジロ 2 羽が *P. elongatum* および *P. relictum* に混合感染していたことが明らかになったが、2 種類の PCR 法でいずれも *P. elongatum* のみが検出された。先行研究においても住血原虫

の混合感染の検出の難しさが指摘されており、特に同じ原虫属の混合感染を検出することは困難である (Bernotiene et al., 2016; Pacheco et al., 2018)。今回、すべての個体で血液塗抹標本が得られていないため、*P. relictum* の保有率は PCR による結果よりも高い可能性がある。

父島の留鳥間では、*P. elongatum* GRW06 の保有率に有意差が見られた (図 4.3c)。解析を行った 3 鳥種 (メジロ、イソヒヨドリおよびトラツグミ ; 図 4.2a-c) では年齢および季節に有意差は見られなかった。メジロでは季節変動があると考えられたが、北部および南部を個別に分析した結果、季節変動は認められず、地域による違いがあることが明らかになった (表 4.3)。メジロの pGRW06 保有率は北部より南部で有意に高かった。加えて、冬季における地域間の pGRW06 保有率に有意差は確認されなかったが、東部の全個体が pGRW06 陽性であった。一方、捕集数が少なく有意差は認められなかったが、pGRW06 陽性の蚊は東部で多く捕集された。この地理的な差は宿主やベクターの個体密度に関連する生息環境の違いによるものであると考えられる。北部地域の大部分は住宅地となっているが (図 4.1b,d)、東部はほとんどが自然の植生に覆われている。また、南部地域には小規模な住宅地があるが、草地 (牧草地含む) や様々な植生が混在している。オガサワライエカは様々な環境に生息しているが、住宅地よりも植生がある場所を好み、特に多様な植生がある地域を好む。すなわち、このような環境ではオガサワライエカの個体密度が高いと考えられる (Maekawa, 2021)。小笠原諸島のメジロは、二次林、森林や開けた環境など、様々な環境に生息しており、特に開けた環境を好む傾向にある (Kawakami and Higuchi, 2003)。自然環境下では、高い宿主およびベクター個体密度に関連して原虫保有率が高くなることが報告されている (Bonneaud et al., 2009; Fecchio et al., 2017; Ferraguti et al., 2016; Huang et al., 2015; Lalubin et al., 2013)。東部および南部で

はメジロおよびオガサライエカ両方の個体密度が高いと考えられ、接触機会および伝播機会が多いことが示唆される。ただし、他の研究では宿主の個体密度と原虫保有率の間で関係は見られなかったり、逆に負の関係が見られた例もあり、この関係は宿主鳥種や原虫系統に依存する可能性もある (Fecchio et al., 2017; Van Hoesel et al., 2019)。異なる環境や地域間における原虫保有状況をより理解するためには、サンプル数が少なかった東部および南部地域でのさらなるサンプリングが必要である。なお、他の鳥種では地域差を解析できなかったため、鳥種間で見られた原虫保有率の有意差についての要因は明らかにできなかった。

#### 4.4.5 結論

今回、初めて小笠原諸島の鳥類や蚊における住血原虫保有状況および原虫の分子系統関係が明らかになった。同諸島には、固有の留鳥、移入種、渡り鳥および固有の蚊が分布していることから、移入種と共に住血原虫が侵入したニュージーランドの状況に近いと考えられる。固有亜種を含む留鳥および蚊から住血原虫が検出され、諸島内でコアサイクルが成立していることが示唆された。また、渡り鳥による新たな原虫系統の侵入は限られている一方で、人為的または自然な分布変化により新たな宿主鳥類が小笠原諸島に定着した場合、新たな原虫系統が持ち込まれ伝播される可能性があることが示唆された (越境運搬サイクル)。しかし、今回得られた情報からは原虫の起源を明らかにできず、多くの島ではまだ調査が不十分である。保全疫学の観点から、鳥類住血原虫の分布および伝播状況を各島単位で把握することで、保全活動の規模 (特定の島のみ、列島全体、諸島全体など) が明確になると期待される。さらに、住血原虫の病原性や小笠原諸島の生態系への影響はまだ不明であるため、引き続きモニタリングを行う必要があると考える。

#### 4.5 小括

海洋島である小笠原諸島には、隔離された環境で独自に進化した多種多様の生物が生息している。一方、人為的に持ち込まれた外来動植物も分布しており、外来種とともに侵入した鳥マラリア原虫により多数の固有鳥種が絶滅したハワイ諸島の状況に類似することから、移入種による生態系への影響が危惧される。そこで本章では、小笠原諸島における鳥類住血原虫の保有状況の解明および伝播経路の推定を試みた。

2011年から2020年まで、小笠原諸島内で死体回収、保護または捕獲された鳥類から、血液または組織を採取した。また、2015年に父島でスリーピングまたは二酸化炭素誘引 CDC 型トラップを用いた蚊の捕集を行った。すべてのサンプルから DNA を抽出し、住血原虫のミトコンドリア DNA *cytb* 遺伝子を標的とした PCR を行った。加えて、血液塗抹標本を鏡顕して原虫を検索した。また、鳥類の生態と原虫感染の関係を検討するため、統計解析を行った。

留鳥 8 種 326 羽中、6 種 163 羽 (50%) から全 3 属の原虫 DNA が検出され、いずれも諸島内で伝播されていることが示唆された (コアサイクル)。留鳥の原虫保有率は渡り鳥よりも有意に高く、共通する原虫系統は少なかった。そのため、諸島内で両区分の鳥類の間で原虫が伝播されている可能性は低いと考えられた。保有率が高かった *Plasmodium elongatum* GRW06 および *P. relictum* GRW04 は、どちらも一部の鳥種に高い病原性を示し、特に *P. relictum* GRW04 はハワイ諸島の固有種を絶滅させた鳥マラリア原虫系統である。また、*P. elongatum* GRW06 が検出された父島のイエカ属の蚊 2 種は、島内における鳥マラリア原虫のベクターであると考えられる。留鳥から検出された系統の多くは国内外の他地域からも検出されているため、比較的最近諸島内に持ち込まれた可能性がある。さらに、新規原虫系統が検出されたメジロおよびトラツグミは、1900 年代に人為的または自然に諸島に移動・定着したため、宿

主鳥類と共に新たな原虫系統が持ち込まれた可能性がある（越境運搬サイクル）。

## 第5章

飼育下ペンギンにおける *Haemoproteus* 属原虫感染経路の推定  
(飛び火サイクル)

## 5.1 はじめに

ペンギン目 (Sphenisciformes、以下ペンギン類) は飛べない鳥類で、その独特な直立姿勢および優れた泳力で知られている。多くの種は絶滅の危機に瀕していると言われている (IUCN, 2020)。ペンギン類の保護・保全のためには、感染症を含む様々な側面から現状を把握し、必要な対応を考慮する必要がある (Ropert-Coudert et al., 2019; Trathan et al., 2015)。大多数のペンギン類は、住血原虫が分布していない地域または少ない地域に分布しているため、通常は原虫に暴露される経験がないまま生息してきた。飼育下ペンギン類では、1926年にロンドン動物園で飼育されていたキングペンギン (*Aptenodytes patagonicus*) で初めて鳥マラリア感染が報告された (Scott, 1927)。以来、鳥マラリア感染による死亡例が世界各地の飼育下ペンギン類で報告されており、いずれもベクターである蚊が侵入可能な開放型屋外展示スペースで飼育されていた個体であった (Grilo et al., 2016; Vanstreels et al., 2016)。鳥マラリアの原因である *Plasmodium* 属原虫は、展示スペースの周辺に生息している野鳥からベクターの蚊を介して飼育下ペンギン類へと伝播されると考えられる (Ejiri et al., 2009; Valkiūnas, 2005)。日本は世界の中でも域外保全対象となるペンギン類の個体数が多い国の一つであり、500羽近くのケープペンギン (*Spheniscus demersus*) を含む3,000羽以上のペンギン類が動物園・水族館で飼育されている (Murata and Murakami, 2014; Takami, 2012)。鳥マラリアは日本のペンギン類でも散発的に発生している (Tamura et al., 2018; 佐藤, 2009)。さらに、国内の動物園内に生息するアカイエカから鳥マラリア原虫 DNA が検出され、ケープペンギンの血液由来 DNA も検出されたことから、飼育下ペンギン類がアカイエカに吸血されて原虫に感染していることが示唆された (Ejiri et al., 2011)。

*Haemoproteus* 属および *Leucocytozoon* 属原虫もペンギン類から検出されている

が、検出頻度は *Plasmodium* 属原虫よりも低い (Vanstreels et al., 2016)。1975 年に初めてペンギン類における *Leucocytozoon* 属原虫感染がニュージーランドの野生キマユペンギン (*Eudyptes pachyrhynchus*) で報告された (Allison et al., 1978; Fallis et al., 1976)。その後、*Leucocytozoon* 属原虫はニュージーランドおよび南アフリカに生息するケープペンギンおよびキンメペンギンの野生個体から検出され、周辺に生息するブユからも検出されたため、この地域で伝播されていることが確認された (Allison et al., 1978; Argilla et al., 2013; Earlé et al., 1992)。飼育下ペンギン類では、イギリスで飼育されていたマカロニペンギン (*Eudyptes chrysolophus*) の 1 例のみが報告されている (Peirce et al., 2005)。感染した雛や幼鳥を含むペンギン類の死亡例から、*Leucocytozoon* 属原虫はペンギン類に対して高い病原性を示す可能性が示唆されている (Argilla et al., 2013)。なお、キマユペンギンおよびケープペンギンから *Leucocytozoon* 属原虫のガメトサイトが検出されており (Earlé et al., 1992; Fallis et al., 1976)、本属原虫はペンギン類の体内で完全に発育し、ベクターを介したペンギン間の伝播が可能であると考えられている (Valkiūnas, 2005)。

一方、ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫感染は、ほとんどが PCR による DNA の検出結果のみに基づいて報告されている (Levin et al., 2009; Sallaberry-Pincheira et al., 2015; Vanstreels et al., 2016)。また、形態学的観察により *Haemoproteus* 属原虫と疑われる組織ステージが 2 例報告されているが (Cannell et al., 2013; Ishikawa and Hasegawa, 1989)、鳥マラリア原虫や *Leucocytozoon* 属原虫のようにガメトサイトの検出はこれまで報告されていない (Vanstreels et al., 2016)。そのため、*Haemoproteus* 属原虫がペンギン体内で感染ステージであるガメトサイトまで発育可能なのか、スポロゾイトや組織ステージで発育が中断されペンギン類は終末宿主となるのか不明であった。すなわち、ペンギン類は *Haemoproteus* 属原虫が発

育可能な宿主として、次の宿主への感染源となるかどうか不明であった。血中でガメトサイトが発育しない限り、ベクターは次の宿主へ原虫を伝播することはできない。これまで *Haemoproteus* 属原虫は比較的病原性が低いとされてきたが (Bennett et al., 1993)、非適合宿主である飼育下鳥類では重篤な症状を呈し、死に至ることもあることが報告されており、ペンギン類に対しても致死的可能性がある (Donovan et al., 2008; Himmel et al., 2019; Lee et al., 2018; Ortiz-Catedral et al., 2019)。そこで本章では、ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の発育ステージおよび感染経路について検討し、動物展示施設における本属原虫の伝播動態を明らかにすることを目的とした。

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 サンプルについて

当研究室が実施しているペンギン類における住血原虫の全国調査の過程で、A 水族館で飼育されていたケーブペンギン (図 5.1a) 2 羽および B 水族館で飼育されていたマゼランペンギン (*S. magellanicus*, 図 5.1b) 2 羽が住血原虫に感染していることが判明した (表 5.1)。水族館はそれぞれ近畿および中部地方に位置し、ペンギン類は屋外で飼育・展示されていた。調査中、すべての個体の健康状態は良好であった。また、調査前から感染予防のためにすべての個体に抗マalaria薬を投与していた。ただし、詳細な投薬プロトコルは施設から提供されていないため不明である。血液は翼下静脈から採取し、70%エタノール入りのチューブに入れ、次の工程まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保管した。採血直後に各個体につき 2 枚の血液塗抹標本作製し、すぐに風乾した。その後、メタノールで固定し、Hemacolor<sup>®</sup> (Merck KGaA) で染色し、乾燥後、封入剤 EUKITT<sup>®</sup> (O. Kindler GmbH) を用いて封入した。

加えて、第 2 章の継続調査の際に調べたウミネコ (*Larus crassirostris*, 図 5.1c) を、*Haemoproteus* 属原虫の感染源鳥種候補として検査した (第 2 章参照)。本個体は 2016 年 9 月に保護され、その後 2016 年 10 月および 2017 年 1 月に合計 2 回採血を行った (表 5.1)。血液の採取およびその後の手順はすべてペンギン類のサンプルと同様の方法で行い、ペンギン類から検出された原虫との比較に用いた。

ペンギン類およびウミネコからのサンプル採取に関するすべての手順は、「動物の愛護および管理に関する法律 (Act on Welfare and Management of Animals 1973)」の倫理基準に準拠して行われ、捕獲およびサンプル採取中に鳥類を傷つけることはなかった。

### 5.2.2 原虫 DNA の検出および分子系統解析

DNA は PCI 法を用いて血液から抽出し、tris-EDTA バッファーに溶解した。DNA の濃度および質は NanoDrop One 超微量紫外可視分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で計測した。DNA の最終濃度はウミネコで 50 ng/μl (±10ng/μl)、ペンギン類で 50 ng/μl (±10 ng/μl) および 200 ng/μl (±10 ng/μl) と 2 つの異なる濃度に調整した。

鳥類住血原虫 3 属のミトコンドリア DNA *cytb* 遺伝子を標的とした nested-PCR を第 2 章と同様の方法で行った (2.2.2 参照)。ただし、*Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属原虫の検出を行うプライマーセットのみを用い、*Leucocytozoon* 属原虫を検出するプライマーセットは用いていない。PCR の感度および偽陰性の可能性を把握するため、ペンギン類のサンプルは DNA 量 50 ng および 200 ng の両方で PCR を行った。ウミネコでは DNA 量 50 ng のみを用いた。

電気泳動から増幅 DNA の抽出は前述の通りに行った (2.2.2 参照)。抽出した増幅 DNA は BigDye® terminator cycle sequencing kit (Ver 3.1: Applied Biosystems) およびサイクルシーケンサー (ABI 3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) を用いて両方向からシーケンスした。コンティグ結合後、得られた 478 bp の塩基配列を GenBank データベース (Madden, 2013) および MalAvi データベースの配列を比較した (Bensch et al., 2009)。

Mr. Bayes version 3.2 を用いてベイズ式系統樹を作成した (Ronquist et al., 2012)。系統樹には以下の配列を加えた : (i) *Haemoproteus* 属および *Plasmodium* 属原虫の形態学的に種同定されている系統、(ii) ペンギン類から過去に検出された *Haemoproteus* 属系統 (表 5.2)、(iii) カモメ属 (*Larus* spp.) から過去に検出された *Haemoproteus* 属系統 (表 5.2) および(iv) 検出系統に遺伝的距離が近い系統。アウ

トグループには *Leucocytozoon* sp. SISKIN2 を用いた。系統間の遺伝的距離の算出には MEGA7 の Jukes-cantor モデルを用いた (Kumar et al., 2016)。また、系統間では、MEGA7 を用いて変換したアミノ酸配列の比較も行った (Kumar et al., 2016)。モデル選択を jModelTest2 (Darriba et al., 2012) で行い、BIC 下で GTR+ $\Gamma$ +I が選択された。MCMC 法を用い、マルコフ連鎖 2 組それぞれ独立に 300 万世代走らせ、サンプリングは 1,000 世代ごとに設定した (Ronquist et al., 2012)。初めの 25% の系統樹は burn-in として切り捨て、得られた系統樹は FigTree 1.4 を用いて確認した (Rambaut, 2012)。

コンタミネーションや実験的エラーの可能性を極力排除するために、DNA 抽出から分子系統解析まで、すべての原虫検出工程は 2 度行われ、それぞれ別の日に別の実験者 (研究協力者) が実施した。さらに、ペンギン類およびウミネコの検出工程は 1 ヶ月以上開けて行われた。

### 5.2.3 血液塗抹検査

血液塗抹標本は光学顕微鏡 OLYMPUS BX43 (Olympus) を用いて、各サンプル 2 枚の塗抹をそれぞれ確認した。ペンギン類およびウミネコの塗抹は 400 倍および 1,000 倍視野で塗抹面全体を観察し、ペンギン類の各塗抹はおよそ 10 時間ずつ観察した。住血原虫と疑われる像が見られた場合、光学顕微鏡 OLYMPUS IX71 (Olympus) で確認し、cellSens Standard 1.6 (Olympus) で撮影した。確認された原虫は形態学的特徴に基づき識別し、発育ステージの確認も行った (Valkiūnas, 2005)。

赤血球 1,000 個または感染強度が低い場合は 10,000 個あたりの原虫虫体数を 400 倍視野で数え、全血液塗抹の感染強度を計測した。なお、計測にあたってランダムな場所からカウントを開始した。

ペンギン類から *Haemoproteus* 属原虫ガメトサイトが認められた場合は、行徳野鳥病院の保護鳥類から検出された近縁な原虫系統のガメトサイトと比較した（第2章図 2-1 および表 2-4 参照）。本章で対象としたウミネコに加え、以下の *Haemoproteus* 属系統のガメトサイトを再度観察して比較した：チュウシャクシギ（*Numenius phaeopus*）から検出された hNUMPHA01、カモメ（*Larus canus*）とウミネコから検出された hLARCRA01、およびウミネコから検出された hLARCRA02。さらに、*Haemoproteus lae* のガメトサイトを含む証拠血液塗抹標本（アクセッション番号 1526.86-1527.86、Nature Research Centre、Vilnius）も比較に用いた。本標本は *H. lae* の模式地であるカザフスタン南部で捕獲された模式種ユリカモメ（*Chroicocephalus ridibundus*）から採取された血液で作製された（共同研究者提供画像）。

ガメトサイトを含むペンギン類（MPM コレクション番号 21620-21624）、カモメ（MPM コレクション番号 21625）、ウミネコ（MPM コレクション番号 21626-21629）およびチュウシャクシギ（MPM コレクション番号 21630）の代表的な血液塗抹標本は公益財団法人目黒寄生虫館に寄託した。

#### 5.2.4 混合感染の可能性に関する分子学的解析

*Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属原虫の混合感染の可能性を検討するため、DNA 量 200 ng で原虫 DNA 陽性となったすべてのペンギンサンプルに対して nested-multiplex PCR を既報に従って行った（Ciloglu et al., 2019; Pacheco et al., 2018）。まず、原虫ミトコンドリアゲノムの *cox1* 遺伝子の一部と *cytb* 遺伝子全体を標的としたプライマーセット AE298/AE299 を用いて 1st PCR を行った（Pacheco et al., 2018）。PCR 反応液にはそれぞれ最終濃度 4 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM の dNTP、10×ExTaq

Buffer (Mg<sup>2+</sup> free: Takara)、1 unit の ExTaq<sup>®</sup> (Takara)、各プライマー10 μM、200 ng のサンプル DNA を加え、各サンプル全量 25 μl とした。PCR の反応条件は既報に従って設定した (Pacheco et al., 2018)。次に、*cytb* の内側部分を標的とした 2nd PCR をプライマーセット PMF/PMR および HMF/HMR を用いて行った (Ciloglu et al., 2019)。反応液には、5 μl のマスターミックス (Qiagen Multiplex PCR Master Mix: QUIAGEN, Hilden, Germany)、各プライマー2 μM、2 μl の 1st PCR 増幅産物を加え、各サンプル全量 10 μl とした。陽性コントロールとして、*Haemoproteus* sp. SPMAG12 と *Plasmodium* 属 3 系統を混合したサンプルを準備した (①hSPMAG12 x pCXPIP09、②hSPMAG12 x pSGS1、③hSPMAG12 x pNYCNYC02)。本章のケーブペンギンから検出された hSPMAG12 を用いた (表 5.1、サンプル番号 1b)。3 つの *Plasmodium* 属系統のサンプルにはマゼランペンギン 2 羽およびフンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*) から検出されたものを使用した (付録 2 表 A2.1)。これらの血液は関東地方および南西諸島の動物展示施設で採取された。どちらか一方の原虫系統が選択的に増幅される可能性を最小限に抑えるため、ペンギン類から検出された *Haemoproteus* 属原虫と近い感染強度 (1/10,000 以下) であることを確認した。また、マゼランペンギンから検出された pCXPIP09 を *Plasmodium* 属原虫の単独感染の陽性コントロールとして加えた。なお、陽性コントロールに用いた *Plasmodium* 属系統はいずれも国内のペンギン類から頻繁に検出されている系統であり (未発表データ)、混合感染を検討する際に適している。

### 5.3 成績

ペンギン類全 4 羽およびウミネコから、PCR および顕微鏡検査両方で *Haemoproteus* 属原虫が検出された (表 5.1)。DNA 量 200 ng ではペンギン類の全 8 サンプルが原虫 DNA 陽性であったが、50 ng では 4 サンプルのみが陽性であった (表 5.1)。なお、DNA 量 50 ng を用いたウミネコのサンプルはどちらも原虫 DNA 陽性であった。加えて、陰性コントロールで DNA 増幅は見られず、コンタミネーションはなかったと判断された。

検出されたすべての配列は、*Haemoproteus* sp. SPMAG12 と同定され、2 回の独立した PCR で同じ結果が得られた。なお、本系統は過去に日本の飼育下マゼランペンギンから検出されているが (GenBank アクセッション番号 AB604310)、ガメトサイトは確認されていない。また、本系統は第 1 章で保護されたウミネコから検出された hLARCRA02 (遺伝的差 : 2 bp、0.2%) およびチュウシャクシギから検出された hNUMPHA01 (遺伝的差 : 4 bp、0.7%) に最も近縁であった (図 5.2)。

得られた塩基配列をアミノ酸に変換して比較したところ、hSPMAG12、hLARCRA02 および hNUMPHA01 はいずれも一致した。また、分子系統解析では pSPMAG12 は *Parahaemoproteus* 亜属のクレードに位置した (図 5.2)。

ペンギン類における multiplex PCR では、すべて *Haemoproteus* 属のみの増幅が確認された。陽性コントロール 3 検体中 2 検体では正しく *Plasmodium* 属および *Haemoproteus* 属両方の増幅が見られた。しかし、hSPMAG12 x pSGS1 の組み合わせでは *Plasmodium* 属の増幅のみが確認された。*Plasmodium* sp. CXPIP09 の単独感染では適切な原虫属のみの増幅が見られた。また、陰性コントロールでは増幅は確認されなかった。

顕微鏡検査ではペンギンサンプル 5 検体からそれぞれ原虫ガメトサイトが 1 個ず

つ検出され(表 5.1、図 5.3a-e)、同じ個体から 2 個検出された例もあった(図 5.3a,e)。ガメトサイトが確認された 4 サンプルは DNA 量 50 ng を用いた PCR と一致する結果が得られた。一方、ケープペンギンの 1 サンプル(サンプル番号 2b、表 5.1)は顕微鏡下でガメトサイトが確認されたが、DNA 量を 50 ng にした PCR では陰性であった。ウミネコではどちらのサンプルからも複数のガメトサイトが確認され、感染強度は赤血球 1,000 個中 10 および 12 虫体であった。

顕微鏡検査では各ペンギンサンプルで最大 1 個のガメトサイト、合計 5 個のガメトサイトしか検出できなかったため、形態のみによる種同定には至らなかった。一方、ウミネコの血液塗抹標本にはガメトサイトが多数含まれ(図 5.3f-1)、これらは形態的にカザフスタンのユリカモメから初めて検出・記載された *H. lae* と同定された(Peirce, 1981; Yakunin, 1972)。ペンギン類から検出されたガメトサイトは、ウミネコから検出されたものと形態学的に一致した。また、ペンギン類とウミネコの両方から分子系統学的に一致する hSPMAG12 が検出された。これまで *H. lae* は形態学的に分類・検出されてきたが、今回塩基配列情報およびガメトサイトの形態学的特徴の 2 つの情報を融合することで、初めて hSPMAG12 が形態種 *H. lae* の遺伝子系統であることを明らかにした。以下は今回検出された *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *lae* の形態学的記載である。

### 5.3 補足 ペンギン類およびウミネコから検出された *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *lae* ガメトサイトの記述

宿主: ケープペンギン (*Spheniscus demersus*)、マゼランペンギン (*S. magellanicus*)

およびウミネコ (*Larus crassirostris*) から pSPMAG12 が検出された

場所：日本

証拠材料：代表的な血液塗抹標本は、公益財団法人目黒寄生虫館（東京）に寄託した

（MPM コレクション番号 21620-21624、21628、21629）

代表的な DNA 配列：ミトコンドリア *cytb* 系統 hSPMAG12（478bp、GenBank アクセッション番号 AB604310）

説明：[5 標本基づく；図 5.3] 主な特徴：ガメトサイトは感染赤血球の核の周辺で成長し、赤血球の核は側方にずれない（図 5.3b-l）。成長中のガメトサイトは多くの場合、赤血球の核に接触しない（図 5.3a-d,e-h,i,k）。成長が進むにつれ、ガメトサイトは先端部で赤血球の核を囲み（図 5.3b,c,g,h）、最終的に核を完全に包み込み（図 5.3b,c,g,h）、赤血球の細胞質内全てを占領する（図 5.3j,l）。成長中のガメトサイトの輪郭は多くの場合不規則である（図 5.3a-c,g,h）。色素顆粒の数は多く（17 から 34 の間）、円形もしくは楕円形で、中程度の大きさである（長さ 1  $\mu\text{m}$  未満）。本章で確認されたマクロガメトサイトおよびミクロガメトサイト（図 5.3）の細かな特徴は模式地（カザフスタン南部）で捕獲された模式宿主であるユリカモメ（*Chroicocephalus ridibundus*）で確認されたガメトサイト（Yakunin, 1972）と一致しているため、ここでは省略する。

備考：Yakunin (1972)はユリカモメから検出された *H. lae* の記載をしたが、図解を提供しなかった。その後、Valkiunas (2005)が 1986 年に模式地であるカザフスタン南部のユリカモメから同原虫種を検出し、証拠材料に指定し（アクセッション番号 1526.86-1527.86、Nature Research Centre、Vilnius）、*H. lae* の再記述に用いられた。ガメトサイトの形態学的比較から、この証拠材料と pSPMAG12 のガメトサイトは同じ原虫種であることが確認できた。赤血球の核を包囲する様子と色素顆粒の数から、*H. lae* は他のチドリ目の原虫種と鑑別が可能である

(Valkiūnas, 2005)。なお、遺伝的に近縁であった *cytb* 配列の hNUMPHA01 (図 5.4q-t) と hLARCRA02 (図 5.4g-l) および hLARCRA01 (図 5.4a-f,m-p) のガメトサイトは *H. laevis* SPMAG12 と形態学的に一致していたことから (図 5.3 および図 5.4 を比較)、これらの遺伝子配列は同原虫種の別系統であると考えられる。



図 5.1. 本章で調べた鳥種. (a)ケープペンギン (*Spheniscus demersus*) (b)マゼランペンギン (*Spheniscus magellanicus*) (c)ウミネコ (*Larus crassirostris*).

Fig. 5.1. Bird species investigated in this chapter. (a) *Spheniscus demersus*, (b) *Spheniscus magellanicus*, (c) *Larus crassirostris*.

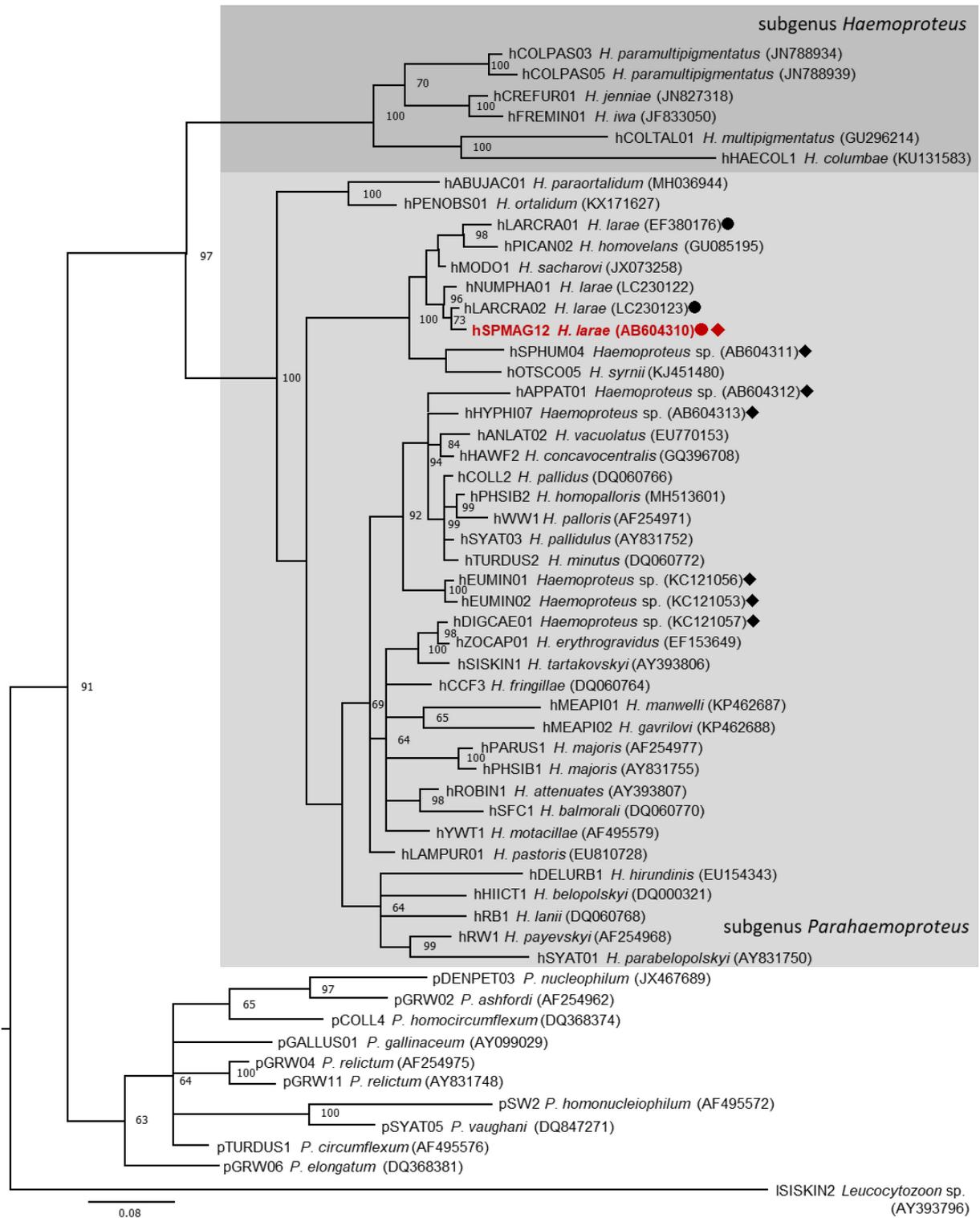


図 5.2. 鳥類住血原虫の *cytb* 遺伝子系統のベイズ系統解析 (470 bp). >0.60 の事後確率のみを表記した. 枝の長さは、適用置換モデルに応じた変化量に比例する. 記号解説: 濃いグレー、*Haemoproteus* 亜属の種; 薄いグレー、*Parahaemoproteus* 亜属の種; ダイヤ、先行研究でペンギン類から検出された *Haemoproteus* 属系統 (表 5.2 参照); 丸、先行研究でカモメ属 (*Larus* spp.) から検出された *Haemoproteus* 属系統 (表 5.2 参照); 赤字、本章で検出された系統.

Fig. 5.2. Bayesian phylogenetic analysis of *cytb* gene lineages (470 bp) of avian haemosporidian parasites, rooted with *Leucocytozoon* species lineage 1SISKIN2. Posterior clade probabilities of >0.60 were indicated. The branch lengths are drawn proportionally to the amount of change according to the substitution model applied. Key: dark grey area, species of subgenus *Haemoproteus*; light grey area, species of subgenus *Parahaemoproteus*; diamond, *Haemoproteus* spp. lineages derived from penguins in previous studies (see Table 5.2); circle, *Haemoproteus* spp. lineages derived from *Larus* sp. gulls in previous studies (see Table 5.2); red letters, lineage derived in this chapter.

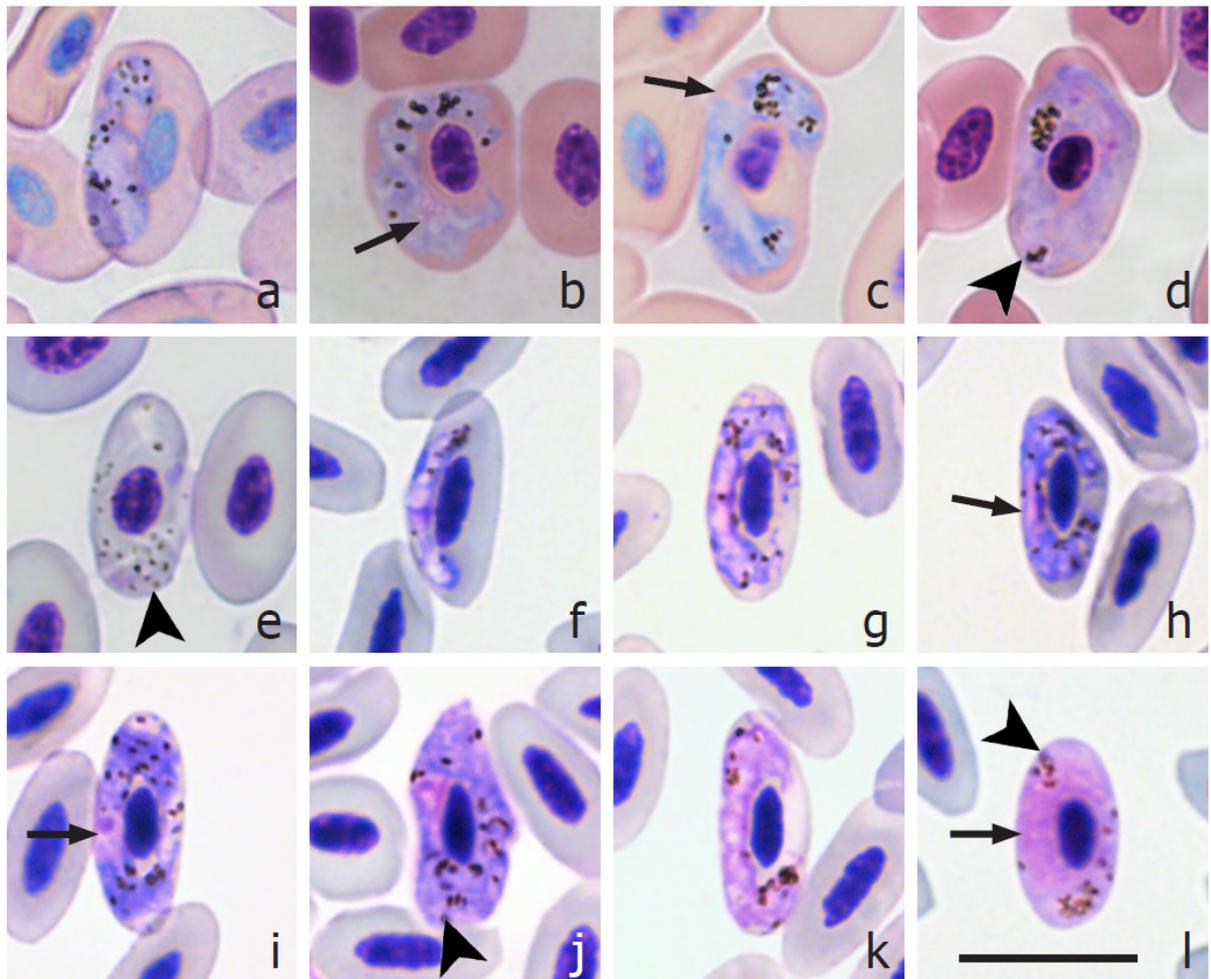


図 5.3. ケープペンギン (*Spheniscus demersus*) (a,c,e; a および e は同じ個体から検出)、マゼランペンギン (*S. magellanicus*) (b,d)、およびウミネコ (*Larus crassirostris*) (f-l)から検出された *Haemoproteus lae* SPMAG12 のガメトサイト。幼若ガメトサイト(a,f)、マクロガメトサイト(b,g,h,i,j)、およびマイクロガメトサイト(c,d,e,k,l)。記号解説：矢印、ガメトサイト核；矢頭、色素顆粒。Hemacolor®で染色。スケールバー：10  $\mu$ m.

Fig. 5.3. Gametocytes of the lineage hSPMAG12 of *Haemoproteus lae* from the blood of *Spheniscus demersus* (a,c,e; images a and e are from the same bird individual), *S. magellanicus* (b,d) and *Larus crassirostris* (f-l). Young gametocytes (a,f), macrogametocytes (b,g,h,i,j) and microgametocytes (c,d,e,k,l). Key: arrows, gametocyte nuclei; arrowheads, pigment granules. Stained with Hemacolor®. Scale-bar:10  $\mu$ m.

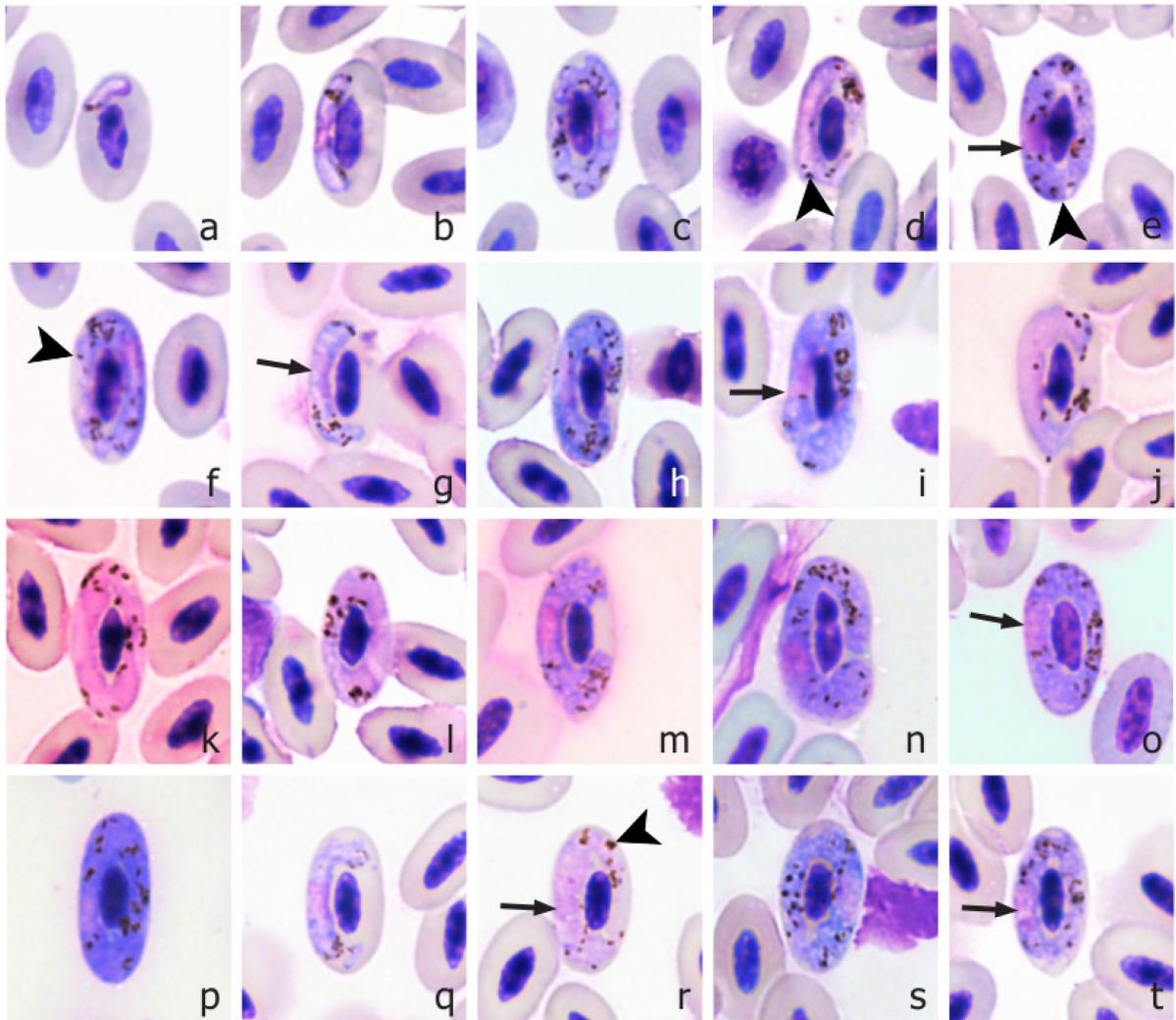


図 5.4. ウミネコ (*Larus crassirostris*) (a-l)、カモメ (*Larus canus*) (m-p)、およびチュウシャクシギ (*Numenius phaeopus*) (q-t) の血液から検出された *Haemoproteus larae* LARCRA01 (a-f,m-p)、LARCRA02 (g-l) および NUMPHA01 (q-t) のガメトサイト。幼若ガメトサイト(a,b,g,q)、マクロガメトサイト(c,e,f,h,i,m-p,s,t)、およびミクロガメトサイト(d,j-l,r)。記号解説：矢印、ガメトサイト核；矢頭、色素顆粒。Hemacolor®で染色。スケールバー：10 μm。

Fig. 5.4. Gametocytes of the lineages hLARCRA01 (a-f,m-p), hLARCRA02 (g-l) and hNUMPHA01(q-t) of *Haemoproteus larae* from the blood of *Larus crassirostris* (a-l), *Larus canus* (m-p) and *Numenius phaeopus* (q-t). Young gametocytes (a,b,g,q), macrogametocytes (c,e,f,h,i,m-p,s,t) and microgametocytes (d,j-l,r). Key: arrows, gametocyte nuclei; arrowheads, pigment granules. Stained with Hemacolor®. Scale-bar: 10 μm.

表 5.1. 本章で使用したサンプルに関する情報および検出結果.

Table 5.1. Information about samples used in this chapter and results of material examination.

施設 Facility	個体番号 Individual number	鳥種 Bird species	サンプル 番号 Sample number <sup>c</sup>	孵化日 Date of hatching	採取日 Sampling date	PCR結果 <sup>a</sup> PCR testing		顕微鏡検査 Microscopic examination	
						50ng	200ng	虫体 Parasitemia	感染強度 Intensity
						A水族館 aquarium A	1	ケープペンギン <i>Spheniscus demersus</i>	1a
			1b		2017-07-03	+	+	+	<1/10,000
			1c		2017-09-15	-	+	-	
			1d		2017-11-06	-	+	-	
	2	ケープペンギン <i>Spheniscus demersus</i>	2a	2008-11-14	2017-04-29	+	+	+	<1/10,000
			2b		2017-11-17	-	+	+	<1/10,000
B水族館 aquarium B	3	マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	3	2009-04-25	2018-08-15	+	+	+	<1/10,000
	4	マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	4	2012-05-20	2018-08-13	+	+	+	<1/10,000
行徳野鳥病院 Gyotoku wild bird hospital	5	ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	5a	2016-09-22 <sup>d</sup>	2016-10-09	+	nd	+	10/1,000
			5b		2017-01-08	+	nd	+	12/1,000

<sup>a</sup> 50ngおよび200ngはPCR反応時に加えたDNA量を示す。 50ng and 200ng refer to the amount of DNA template included in the PCR reactions.

<sup>b</sup> 結果:+, 陽性; -, 陰性; nd, データなし (検査していない) . Results: +, positive; -, negative; nd, no data (untested).

<sup>c</sup> 個体番号1, 2および5のサンプルは採取日順に示す。 Samples for individuals no. 1, no. 2 and no. 5 are given in order of sampling date.

<sup>d</sup> 保護および搬入日. 出生日不明. Date of rescue and admittance to the facility. Date of hatching is unknown.

表 5.2. 過去にペンギン類および *Larus* 属のカモメ類から検出された *Haemoproteus* 属系統.

Table 5.2. Lineages of *Haemoproteus* previously detected from penguins and *Larus* gulls.

	系統 <sup>a</sup> Lineage	Accession number	鳥種 Bird species	状況 Status	国(地域) Country (Locality)	参考 Reference
ペンギン類から検出された <i>Haemoproteus</i> 系統	APPAT01	AB604312	オウサマペンギン <i>Aptenodytes patagonicus</i>	飼育下 captive	Japan (Hokkaido)	Sasaki et al. (unpublished)
	DIGCAE01 <sup>c</sup>	KC121057	ガラパゴスペンギン <i>Spheniscus mendiculus</i>	野生 wild	Ecuador (Galapagos)	Cannell et al. 2013
	EUMIN01 <sup>c</sup>	KC121056	コビトペンギン <i>Eudyptula minor</i>	野生 wild	Australia (Penguin Island)	Cannell et al. 2013
			コビトペンギン <i>Eudyptula minor</i>	野生 wild	Australia (Penguin Island)	Cannell et al. 2013
	HYPHI07	AB604313	イワトビペンギン <i>Eudyptes chrysocome</i>	飼育下 captive	Japan (Hokkaido)	Sasaki et al. (unpublished)
	PE101 <sup>bd</sup>	KJ561806	フンボルトペンギン <i>Spheniscus humboldti</i>	野生 wild	Chile	Sallaberry-Pincheira et al. 2015
	PE112 <sup>bd</sup>	KJ561807	フンボルトペンギン <i>Spheniscus humboldti</i>	野生 wild	Chile	Sallaberry-Pincheira et al. 2015
	SPHUM04	AB604311	フンボルトペンギン <i>Spheniscus humboldti</i>	飼育下 captive	Japan (Kanagawa)	Sasaki et al. (unpublished)
	SPMAG12	AB604310	マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	飼育下 captive	Japan (Miyagi)	Sasaki et al. (unpublished)
			ケーブペンギン <i>Spheniscus demersus</i>	飼育下 captive	Japan	本章 this chapter
マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	SPMEN02 <sup>d</sup>	GQ395686	マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	飼育下 captive	Japan	本章 this chapter
			マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	野生 wild	Equador (Galapagos)	Levin et al. 2009
カモメ属から検出された <i>Haemoproteus</i> 系統	LARCAC01 <sup>d</sup>	AF465593	キアシセグロカモメ <i>Larus cachinnans</i>	野生 wild	Spain	Ricklefs and Fallon 2002
	LARCRA01	EF380176	ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	野生 wild	South Korea	Ishtiaq et al. 2007
			ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	飼育下 captive	Japan (Chiba)	第2章 Chapter 2
			カモメ <i>Larus canus</i>	飼育下 captive	Japan (Chiba)	第2章 Chapter 2
	LARCRA02	LC230123	ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	飼育下 captive	Japan (Chiba)	第2章 Chapter 2
	SPMAG12		ウミネコ <i>Larus crassirostris</i>	飼育下 captive	Japan (Chiba)	本章 this chapter

<sup>a</sup> 系統名は他の記載がない限り、MalAviデータベースに従って示す。 Codes of lineages are given according to MalAvi database, unless otherwise denoted.

<sup>b</sup> 系統名はGenBankデータベースのメタデータに従って示す。 Codes of lineages are given according to the GenBank database metadata.

<sup>c</sup> これらの記録の有効性については議論されている(本文参照)。 There is debate on the validity of these records (see text).

<sup>d</sup> 本研究で調べた標的領域で400bpより短い配列; これらは系統解析から除いた。

Lineages shorter than 400 bp in the partial cytb gene sequence investigated in this study; these were excluded from phylogenetic analysis.

## 5.4 考察

### 5.4.1 ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の発育および検出

今回、ペンギン類において初めて *Haemoproteus* 属原虫ガメトサイトの発育が確認された。これまでに PCR を用いた血液や組織からの原虫 DNA 検出が報告されていたが (Levin et al., 2009; Sallaberry-Pincheira et al., 2015)、いずれもガメトサイトの発育は確認されていなかった。宿主鳥類からベクター昆虫に原虫が伝播されるためには、原虫はガメトサイトまで発育する必要がある。ベクターにとってガメトサイトは唯一感染力のある原虫の発育ステージであり、その他のステージで原虫の発育が停止した場合、宿主鳥類は原虫の感染力がない終末宿主となる。本章の最も重要な結果は、*Haemoproteus* 属原虫はペンギン体内でガメトサイトまで発育可能であり、ペンギン類が適合宿主であることを明らかにしたことである。すなわち、ペンギン類でも *Haemoproteus* 属原虫が発育し、他の個体への感染源となり得ることが示唆された。

ペンギン類は鳥マラリア (*Plasmodium* 属) 原虫感染に非常に高い感受性を示すため、野生および飼育下のペンギン類における *Plasmodium* 属原虫を対象とした調査・研究がこれまで数多く行われて来た。また、*Leucocytozoon* 属原虫もいくつかの研究報告があるが (Grilo et al., 2016; Vanstreels et al., 2016)、ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫感染は PCR を用いた検出で数例報告されているのみである (表 5.2)。これらの先行研究では、PCR 陽性個体でガメトサイトが検出されない理由として原虫の発育が中断されること (abortive infection) を挙げている (Cannell et al., 2013; Levin et al., 2013)。原虫は非適合宿主体内では赤外ステージの発育を完了できず、ガメトサイトステージまで到達できない (Cannell et al., 2013; Himmel et al., 2019)。原虫発育が中断する原因には 2 つの可能性が考えられる。1 つは、ベクター

が原虫に対して耐性を持つ宿主鳥類を吸血した場合で、宿主体内に侵入した原虫スポロゾイトはそれ以上発育できず感染は成立しない。*Haemoproteus* 属原虫のスポロゾイトが宿主鳥類の血中や臓器から検出された例があり (Khan et al., 1969; Schultz and Whittington, 2005; Valkiūnas, 2005)、実験感染では耐性を持つ宿主鳥類に侵入したスポロゾイトは数日から 1 週間程度宿主体内に残ることが確認されている (Khan et al., 1969)。PCR は非常に感度が高く、血中のわずか数個のスポロゾイトも検出可能なため (Valkiūnas et al., 2009)、原虫が発育できない宿主鳥類からも原虫 DNA が検出される可能性がある。2 つ目の可能性は、宿主体内に侵入したスポロゾイトが臓器まで到達し組織ステージの発育が始まっても完了できないか、増殖したメロゾイトが赤血球壁を貫通できずガメトサイトが形成されない場合である (Himmel et al., 2019; Ortiz-Catedral et al., 2019; Valkiūnas and Iezhova, 2017)。興味深いことに、先行研究で日本の飼育下ペンギン類から *Haemoproteus* 属原虫の赤外型メロントと思われる組織像が確認されているが (Ishikawa and Hasegawa, 1989)、ガメトサイトは検出されなかった。さらに、組織ステージも報告されたが、*Haemoproteus* 属原虫であることを証明するには情報が不十分であった。この報告のペンギン類 3 個体ではいずれもあらゆる臓器における重度の壊死や炎症などの急性症状を示し、最終的に死亡した。この報告の著者らは赤外型メロントを肝臓から検出したが、*Haemoproteus* 属原虫の組織ステージでは、肝臓での発育は一般的ではない (Valkiūnas, 2005; Vanstreels et al., 2016)。ただし、最近の研究で感染個体の肝臓から *H. majoris* のメガロメロントが検出された例もある (Ilgūnas et al., 2019)。組織学的観察および PCR を組み合わせた研究では、コビトペンギンから検出された赤外型メロントが *Haemoproteus* 属原虫であると報告されている (Cannell et al., 2013)。しかし、同じサンプルを PCR で再検査した結果、*Haemoproteus* 属原虫 DNA は検

出されず、代わりに *Toxoplasma gondii* DNA 陽性となった (Campbell, 2015)。一方、組織像は *Toxoplasma* 属原虫のシストやサイトメアよりも *Haemoproteus* 属原虫のサイトメアに形態学的に近いと考えられ (Sallaberry-Pincheira et al., 2015)、*Haemoproteus* 属原虫および *Toxoplasma* 属原虫の混合感染が疑われ、コビトペンギンの死因は解明できなかった。以上のように、組織学的所見および PCR を組み合わせて病理診断を行う場合でも、感染鳥類における原虫の病原性は注意深く評価する必要がある。同様に、石川と長谷川の報告 (Ishikawa and Hasegawa, 1989)にも注意が必要である。

これまで *Haemoproteus* 属原虫のガメトサイトがペンギン類から検出されてこなかった要因の一つとして、今回のような非常に低い血中感染強度が挙げられる。*Plasmodium* 属原虫感染で死亡したペンギン類では多くの場合感染強度が高い (Bueno et al., 2010; Fix et al., 1988; Silveira et al., 2013; Vanstreels et al., 2016)。しかし、一部の個体では非常に感染強度が低く (Vanstreels et al., 2014)、このような個体は PCR や顕鏡などで偽陰性となる可能性がある。本章ではペンギン類各サンプルにつき 2 枚の血液塗抹標本を確認し、ガメトサイトは最高で 1 つしか確認できなかった。このような低い感染強度の場合、顕微鏡検査だけでなく PCR でも原虫の検出は難しいと考えられる。先行研究の多くは原虫 DNA 検出 PCR における各サンプルの DNA 量を 50 ng としている (Chagas et al., 2018; Hellgren et al., 2004; Valkiūnas et al., 2008)。本章では、個体番号 1 のケーブペンギンから 4 回血液を採取したが、DNA 量 50 ng を用いた PCR で陽性反応が得られたのはガメトサイトが確認された 1 サンプルのみであった (表 5.1)。一方、残りの 3 サンプルは全て DNA 量 50 ng で陰性、200 ng で陽性となった。前述の通り、この広く用いられている PCR 法 (Hellgren et al., 2004)では、新しく宿主体内に侵入したスポロゾイトの DNA が

検出される可能性も指摘されている (Valkiūnas et al., 2009)。ガメトサイトが検出されなかったが、DNA 量 200 ng を用いた PCR で陽性となったサンプルはそれぞれ 8 月、9 月および 11 月に採取された。国内におけるヌカカの季節性は十分に調査されていないが、ヌカカは一般に 5 月から 10 月まで吸血活動を行うことが報告されており (Ander et al., 2012; Santiago-Alarcon et al., 2012)、DNA 量 50 ng で陰性であり 200 ng で陽性となったサンプルでは、ヌカカとの接触により新たに侵入したスポロゾイトが検出された可能性が考えられる。一方、新たな感染ではなく、ペンギン体内で原虫が持続感染しており、感染期間を通じて感染強度が変動していた可能性も考えられる。なお、個体番号 2 のケーブペンギンでは 2 回採血を行い、両方のサンプルからガメトサイトが検出された。しかし PCR では、一方のサンプルは DNA 量 50 ng で陰性、200 ng で陽性であり、DNA 量 50 ng を用いた場合、PCR の検出限界よりも低い感染強度であった可能性がある。よって、今後低い感染強度であっても原虫 DNA を検出するためには、より高い濃度の鋳型 DNA を用いる必要があることが示唆される。

今回見られたように、ペンギン類では *Haemoproteus* 属原虫の感染強度は非常に低かったが、抗マラリア薬投与の影響による可能性が考えられる。日本の多くの動物園や水族館では、低温環境での飼育が必要なキングペンギンなど一部の種を除き、ペンギン類は主に屋外で飼育されている (公益社団法人日本動物園水族館協会, 2020)。そして多くの場合、ペンギン類はベクターが自由に侵入可能な開放環境で飼育されているため、感染予防として抗マラリア薬 (ヒト用) の投与を行っている (Grilo et al., 2016; Schneider et al., 2014)。これまでのところ、抗マラリア薬の投薬だけでは鳥マラリア感染は完全に予防できないが、発症時に重症化を防ぐ効果があると報告されている (Grilo et al., 2016)。 *Haemoproteus* 属原虫感染個体に対しては、プリマキンお

よびアトバコン・プログアニル塩酸塩などの抗マラリア薬による治療で原虫の感染強度を低下させる効果もあることが確認されている (Lee et al., 2018; Merino et al., 2000)。今回対象とした個体に対する治療プロトコルの詳細な情報は得られなかったが、抗マラリア薬が原虫の感染強度に影響した可能性が考えられる。よって、飼育下鳥類における住血原虫の疫学的モニタリングを行う際には、感染予防策の有無や感染強度の影響も考慮しておく必要がある。

#### 5.4.2 混合感染の検証

*Haemoproteus* 属および *Plasmodium* 属原虫の混合感染は野鳥で頻繁に確認されており、個体群によっては混合感染個体が優勢である例も報告されている (Beadell et al., 2004; Dimitrov et al., 2014; Valkiūnas et al., 2006)。PCR は非常に感度が高く、信頼性も高い診断ツールであるが、住血原虫の混合感染の検出の際には感度または識別能力が不十分であり、見落とされる可能性があることが知られている。ペンギン類から検出される住血原虫は大多数が *Plasmodium* 属原虫であり、*Haemoproteus* 属原虫は非常に少ない (Grilo et al., 2016; Vanstreels et al., 2016)。また、原虫種によっては、*Plasmodium* 属と *Haemoproteus* 属原虫の形態学的鑑別が難しく、特に血中に幼若なガメトサイトのみが存在する場合はさらに困難である (Valkiūnas, 2005)。本章では、混合感染も念頭に、検出された原虫がペンギン類で多い *Plasmodium* 属原虫ではなく *Haemoproteus* 属原虫であることを確認するため、2 つの multiplex PCR 手技を組み合わせ、検出を試み、すべてのサンプルで *Plasmodium* 属原虫 DNA の増幅は見られず、*Haemoproteus* 属原虫 DNA の増幅が確認された。よって、今回調べたペンギン類 4 羽はすべて *Haemoproteus* 属原虫の単独感染だったと考えられた。ただし、今回用いた multiplex PCR 法は、従来よりも混合感染の検出感度が高いが

(Ciloglu et al., 2019; Pacheco et al., 2018)、原虫系統の組み合わせによっては他の組み合わせ以上に検出が困難な場合もある (Bernotiene et al., 2016)。すなわち、分子系統を特定の形態種に分類する際、PCR 結果は注意深く解釈する必要がある。今回、陽性コントロールの内 hSPMAG12 x pSGS1 の組み合わせでは *Plasmodium* 属原虫の増幅しか確認できなかった。これは 2 つの原虫系統の間で感染強度に差があったためであると考えられる。すべての陽性コントロールは感染強度が 1/10,000 以下であることを確認した上で選別したが、各サンプルの詳細な感染強度を調べることはできなかった。また、混合感染している一方の原虫属または原虫系統の方が PCR によって増幅されやすい可能性も考えられる (Ciloglu et al., 2019; Valkiūnas et al., 2006)。

#### 5.4.3 *Haemoproteus laevis* SPMAG12 の形態学および分子系統学的鑑別

本章では、ペンギン類全個体およびウミネコから hSPMAG12 のみが検出された。これまで hSPMAG12 は 2006 年に北日本の水族館で飼育されていたマゼランペンギンからのみ検出されていた (GenBank アクセッション番号 AB604310)。本章で *Haemoproteus* 属原虫が検出されたペンギン類はすべて国内で孵化しており、国内で感染したと考えられる。ペンギン類では各血液塗抹からガメトサイトが 1 つずつしか検出されなかったため、この情報のみから原虫種を特定できなかったが、ペンギン類から検出された原虫の遺伝子系統およびガメトサイトの形態はすべてウミネコから検出されたものと一致した。今回検出されたガメトサイト (図 5.3) の形態学的特徴は模式宿主であるユリカモメから検出されたガメトサイトとも一致した (Peirce, 1981; Valkiūnas, 2005; Yakunin, 1972)。以上の分子系統学および形態学的鑑別の組み合わせにより、ペンギン類は *H. laevis* に感染していたことが強く示唆された。なお、*Plasmodium* 属原虫では同じ原虫種が異なる目の鳥種に感染した場合、形態的特

徴が異なることがあるが (Nilsson et al., 2016; Valkiūnas, 2005)、*Haemoproteus* 属原虫では報告がなく、同様の変化が起こるか不明である。本章でペンギン類から検出された成熟ガメトサイトは、原虫種の鑑別に関わる主要な特徴を維持していた。しかし、検出されたガメトサイト数が極めて少なく、形態の維持またはバリエーションの有無について明らかにするためにはさらなる検討が必要である。一方、*H. lae* SPMAG12 に近縁な原虫系統である hNUMPHA01、hLARCRA02 および hLARCRA01 も *H. lae* と一致する形態学的特徴を示したことから、同じ形態種に含まれる種内変異系統と考えられる (図 5.4)。比較的よく調べられている *Haemoproteus majoris* (Nilsson et al., 2016)、*Plasmodium relictum* (Valkiūnas et al., 2018) および他の鳥類住血原虫でも、同様に同一原虫種内の遺伝的変異が報告されている。これまでにカモメ科鳥類から *H. lae* がいくつか報告されているが、いずれも形態学的な鑑別に基づいており (Quillfeldt et al., 2011)、分子系統学的手法を組み合わせるにより他の分子系統も検出される可能性がある。

#### 5.4.4 飼育下ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の感染経路および伝播状況

分子系統解析で *H. lae* SPMAG12 は *Parahaemoproteus* 亜属のクレードに分類された (図 5.2)。近年の感染実験では、*Culicoides* 属のヌカカが現在知られているすべての *Parahaemoproteus* 亜属を媒介可能であることが明らかになっており (Bukauskaitė et al., 2019; Žiegytė et al., 2017)、*H. lae* のベクターもヌカカであると考えられる。今回調査した水族館ではヌカカの生息は確認されておらず、調査が必要であるが、ヌカカは野生のカモメ科鳥類および飼育下ペンギン類を吸血して原虫を媒介している可能性がある。個体番号 1 および 2 のケーブペンギン (表 5.1) は複数回採血され、それぞれ最初と最後の採血日は 15 ヶ月および 7 ヶ月離れていた。前

述の通り、調査期間中、DNA 量 200 ng を用いた PCR ではすべてのサンプルから hSPMAG12 が検出され、どの個体も症状は確認されなかった。このことから、原虫は不顕性に宿主体内で 1 年以上持続感染していた可能性が考えられる。ただし、調査期間中に新たに感染した可能性もあり、現時点では持続感染と新たな感染を区別できない。

もしペンギン体内で原虫が感染維持されていた場合、不顕性の長期感染ペンギン類は、*H. lae* SPMAG12 のレゼルボアとなり、同居する他の個体などへの感染源となる可能性が示唆される。ただし、ペンギン類では感染強度が非常に低かったため、これらの個体からベクターへの伝播が可能かどうかは不明である。ヒトの熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) を用いた先行研究では、顕微鏡でガメトサイトが確認できない極めて低度の感染強度であっても、宿主を吸血した蚊の体内でオーシストが形成されたことが確認されている (Schneider et al., 2007)。また、*Plasmodium relictum* を用いた研究では、感染強度および伝播能力は蚊との接触や時間帯などによって変動する可能性が示唆されている (Cornet et al., 2014; Pigeault et al., 2018)。なお、*Haemoproteus* 属原虫でも同様の生態であるかは不明である。ペンギン類が *H. lae* SPMAG12 のレゼルボアとなり、ベクターを介して他の個体への感染源となる可能性については、マラリア原虫と同様にヌカカ体内における発育状況や、ペンギン類とヌカカとの接触に関するさらなる調査が必要である。

一方、ウミネコの感染強度は 1.0-1.2% であり、ヌカカが吸血してスポロゾイトを形成できる十分なガメトサイト数 (Ziętyć et al., 2017) であったことが示唆された。*H. lae* の自然宿主はカモメ科鳥類であることが報告されている (Valkiūnas, 2005)。そのため、日本ではウミネコ、そしておそらく他のカモメ科鳥類が *H. lae* の自然宿主であると考えられる。なお、カモメ科鳥類はペンギン類の飼育エリアに飛来すること

が多く、周辺に生息するベクターに吸血された場合はペンギン類への感染源になる可能性がある。また、*H. lae*の模式宿主であるユリカモメも日本で普通に見られる鳥種であり、飼育施設に飛来することが多い。さらに、日本のペンギン類（特に *Spheniscus* 属）の多くは今回の施設のように屋外で飼育されているため、ベクター昆虫は施設周辺の野生カモメ科鳥類および飼育下ペンギン類から自由に吸血可能である。すなわち、*H. lae*SPMAG12は、野生カモメ科鳥類および飼育下ペンギン類双方の間で維持されている可能性がある。

飼育下ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の感染環および伝播をより理解するためにはさらなる調査が必要である。特にペンギン類を飼育している施設周辺のチドリ目鳥類を含む野鳥における原虫保有状況や、ベクターとなるヌカカ類の生息状況と原虫保有状況の解明が必要である。さらに、原虫感染個体の健康状態を詳細に調べて非感染個体と比較するなど、病原性についても検討する余地がある。多くのペンギン類で今回同様に原虫感染強度が低かった場合、ペンギン類では *Haemoproteus* 属原虫病原性が低い可能性が示唆されるため、国内の他の地域で飼育されているペンギン類における保有状況も検討する必要がある。そして、適切なベクターが存在する環境下では、*H. lae*は野鳥を介さずペンギン間でも伝播される可能性も考慮すべきと考える。多くの動物飼育施設では、鳥マラリア感染対策として扇風機を使ったエアカーテンや捕虫トラップなどを設置している (Grilo et al., 2016)。しかし、このような対策のほとんどは蚊に対する効果が確認されている反面、ヌカカに対する効果は不明である。ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫感染を防ぐためには、ヌカカの防除対策も必要である。

#### 5.4.5 結論

本章では、ペンギン類から *Haemoproteus* 属原虫のガメトサイトを初めて検出し、ペンギン類が本属原虫の宿主となることを示唆し、水族館や動物園などの施設では、園館に飛来する野鳥だけではなくペンギン類が他の個体への *Haemoproteus* 属原虫の感染源になりうることを明らかにした。また、自然宿主であるカモメ科鳥類およびベクターであるヌカカも施設内の感染環に関与している可能性が高いと考えられた。一方、ペンギン類に対する *Haemoproteus* 属原虫感染の病原性についてはさらなる調査が必要である。野生下では多くのペンギン種が絶滅の危機に瀕しており、域外保全のため多くのペンギン類が日本を含む各国で飼育されている。域外保全の飼育環境をさらに改善するためには、鳥マラリア原虫に加えて *Haemoproteus* 属原虫もペンギン類の感染症として認識する必要がある。また、ペンギン類への *Haemoproteus* 属原虫感染源やベクターと考えられる野鳥およびヌカカの調査が期待される。

## 5.5 小括

ペンギン類を多数飼育している日本の動物園・水族館は、ペンギン類の域外保全の観点から重要な役割を担っている。多くのペンギン類は住血原虫に対して耐性を持たず、鳥マラリア (*Plasmodium* 属) 原虫による飼育下ペンギン類の死亡例が日本を含む世界各地で報告されている。一方、ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫感染の報告は、そのほとんどが原虫 DNA の検出のみである。そのため、ペンギン類ではベクターへの感染ステージである原虫のガメトサイトが形成されるのか、発育が中断されて終末宿主となるのか不明であった。すなわち、ペンギン類では *Haemoproteus* 属原虫が完全に発育し、ベクターを介して他の個体への感染源となり得るか不明であった。そこで、ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の発育ステージおよび感染経路について検討した。

*Haemoproteus* 属原虫感染が疑われた国内の飼育下ケーブペンギンおよびマゼランペンギン各 2 羽から血液を採取し、DNA 抽出後に mtDNA *cytb* 遺伝子領域を標的とした nested-PCR、multiplex-PCR および分子系統解析を行った。また、血液塗抹標本を用いて顕微鏡下で原虫の検索を行った。さらに、ペンギン類への感染源となる鳥種を検討するため、傷病保護施設で保護されていたウミネコ 1 羽を対象に同様の方法で原虫の検出を試みた。

ペンギン類およびウミネコから単一の *Haemoproteus* 属原虫系統 hSPMAG12 が検出され、さらに血中にはガメトサイトも確認され、本系統は形態種 *Haemoproteus laevis* と同定された。これまで *Haemoproteus* 属原虫はペンギン類の体内で発育が中断されると考えられていたが、今回初めてペンギン類が *Haemoproteus* 属原虫の感染源となりうることが示唆された。これまでペンギン類から *Haemoproteus* 属原のガメトサイトが検出されなかったが、感染強度が非常に低かったことが要因であるこ

とが考えられ、PCR でも通常より多くの DNA を用いる必要がある可能性が示唆された。*H. lae* は過去に海外のカモメ類から検出されていることから、カモメ類が自然宿主と考えられる。また、hSPMAG12 はヌカカが媒介する *Parahaemoproteus* 亜属に分類された。よって、*H. lae* は自然宿主のカモメ類からヌカカによって飼育下ペンギン類へ伝播され（飛び火サイクル）、感染ペンギン類からさらに他の個体に伝播される可能性が考えられた。

## 第6章

### 総括

鳥類の血液に寄生する原虫（以下住血原虫）は、それぞれ *Plasmodium* 属原虫（鳥マラリア原虫）はカ（蚊）科、*Haemoproteus* 属原虫はヌカカ科やシラミバエ科、*Leucocytozoon* 属原虫はブユ科の吸血昆虫によって宿主鳥類に伝播されるベクター媒介性感染症の病原体であり、日本を含む世界各地の野鳥や飼育下鳥類などで報告されている。これらの原虫は多くの鳥類では不顕性感染であると考えられているが、感染抵抗性を獲得していない非好適宿主であるペンギン類など一部の鳥種では致死性であり、ハワイ諸島では移入種と共に持ち込まれた住血原虫によって固有種が絶滅したことが知られている。また、致死的な病原性以外にも、繁殖成功率の低下など宿主への影響も報告されている。そのため、鳥類の住血原虫は獣医学および保全医学上重要な病原体である。

住血原虫は、ベクター昆虫・宿主鳥類・原虫それぞれの生態に強く依存して伝播が成立している。近年、気候変動などによりベクターの生息可能範囲や鳥類の分布および渡り行動の変化が報告されており、これに伴い病原体の分布も変化する可能性が高いことが指摘されている。そのため、感染症のリスク評価および生物多様性保全を行う上で、病原体の伝播動態を把握することが重要である。

住血原虫を含む鳥類の病原体の感染サイクルは、鳥類の生態と関連して、①在来の留鳥間で構成されるコアサイクル、②渡り鳥や移入種とともに移動する病原体の感染による越境運搬サイクル、③自然宿主ではない種に病原体が伝播される飛び火サイクルの三つに区分することができる。コアサイクルは在来の留鳥とベクター、越境感染サイクルは長距離を移動する渡り鳥、そして飛び火サイクルでは本来の生息地から離れた地域で飼育されている展示・飼育下鳥類が対象となる。鳥類の住血原虫の伝播動態を把握するためにはこれらの感染サイクルの特徴や宿主およびベクターにおける病原体保有状況を明らかにすることが重要である。

日本では 600 種以上の野鳥が記録されており、様々な固有種や固有亜種が生息している。また、その約 3 割が渡り鳥であり、日本は渡り鳥にとって繁殖地や中継地などとして重要な地域である。さらに、国内では、域外保全のため様々な鳥種が動物展示施設で飼育されている。これまでに国内の鳥類における住血原虫保有状況が明らかにされてきたが、留鳥・渡り鳥・飼育下鳥類など宿主鳥類の生態区分および感染サイクル区分に着目した報告は乏しく、鳥類住血原虫の分布および伝播などの生態における鳥類の役割は十分に解明されていなかった。そこで本研究では、国内の異なる生息環境および生態区分の鳥類における住血原虫の保有状況および伝播動態を明らかにすることを目的とした。

#### 6.1 関東地方の保護鳥類における住血原虫保有状況（コアおよび越境運搬サイクル）

国内各地には、野生の傷病鳥類を保護し、治療や野生復帰を行う施設（自治体に委託される動物病院を含む）がある。このような施設は年間を通じて様々な鳥種が保護され、住血原虫の感染状況や分布を把握することができる。本章では、関東地方で保護された傷病鳥類を対象に、住血原虫の保有状況および分子系統関係を調べ、留鳥および渡り鳥における感染傾向を検討した。

東京都、千葉県および神奈川県にある 4 つの保護施設において、2013 年 8 月から 2016 年 3 月までに保護された野鳥 80 種 475 羽から血液を採取した。DNA を抽出後、各種住血原虫のミトコンドリア DNA (mtDNA) シトクロム *b* (*cytb*) 遺伝子の部分配列を標的とした nested-PCR を行い、増幅が見られた場合は塩基配列を決定して分子系統を解析した。また、血液塗抹標本が得られた場合には顕微鏡下で原虫検出を行った。

保護鳥類における住血原虫の保有率は、鳥マラリア原虫を含む 3 属合計で 21.1%

であった。なかでも留鳥から数多くの系統が検出され、国内で住血原虫が感染および伝播されていることが示唆された（コアサイクル）。一方、冬鳥から検出された一部の系統は北方地方にのみ分布するハボシカ属（*Culiseta* spp.）の蚊が媒介し、北海道やアジア大陸の留鳥からも検出されている。そのため、当施設で保護された冬鳥は、繁殖地である北方地方やアジア大陸で感染し、国内に原虫を運搬している可能性が示唆された（越境運搬サイクル）。

## 6.2 タシギ属鳥類における住血原虫保有状況および伝播動態の推定（越境運搬サイクル）

タシギ属（*Gallinago* spp.）の鳥類には長距離型の渡りを行う種が知られており、日本には絶滅危惧種に指定されているオオジシギを含む 5 種が飛来する。渡り鳥は病原体の運搬者となるが、国内における越境運搬サイクルの特徴については調べられていなかった。また、これまでタシギ属鳥類における原虫保有状況は海外でもほとんど調べられておらず、渡りに伴う病原体伝播の有無も不明であった。本章では日本のタシギ属鳥類における原虫保有状況を明らかにし、種間における保有率や原虫系統解析による推定伝播地域などを検討し、越境運搬サイクルの特徴について考察した。

2012 年から 2018 年の春と秋に、渡りの中継地である関東地方および沖縄県で捕獲されたオオジシギ、チュウジシギ、ハリオシギおよびタシギ合計 383 羽を対象とした。捕獲個体には金属足環による標識を行い、血液を採取した後に放鳥した。得られた血液から DNA を抽出し、各種住血原虫の mtDNA *cyt b* 遺伝子の部分配列を標的とした nested-PCR を行い、増幅が見られた場合は塩基配列を決定して分子系統を解析した。さらにタシギ属の生態および原虫感染の関連を検討するため、鳥種、雌雄、年齢、季節、地域と原虫保有率について統計解析を行った。

383羽中68羽から3属いずれかの住血原虫DNAが検出され、保有率は17.8%であった。シギ科鳥類の住血原虫保有率は0.0-6.2%程度と低いことが知られているが、同じシギ科でもタシギ属はベクターと接触する機会が多い農耕地や湿地のような環境に生息しているため保有率が高いと考えられる。関東地方のチュウジシギでは *Plasmodium* 属、オオジシギでは *Haemoproteus* 属原虫の保有率が他の種より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。これは生息環境、分布、渡り経路などの生態的要因に関係し、ベクターとの接触機会が異なるためと考えられる。また、関東地方および沖縄県のチュウジシギの間では *Haemoproteus* 属原虫の保有率が有意に異なっていたが、この2地域の個体は形態的な違いから異なる個体群であると考えられる。そのため、今回捕獲された個体には複数の個体群が含まれており、渡り経路およびベクターとの接触機会が異なる可能性が考えられた。その年に産まれた幼鳥は初めて渡りを経験するため、幼鳥から検出された6系統は、いずれも繁殖地と捕獲地の間で伝播されたことを示している。

以上、今回初めて国内に飛来するタシギ属鳥類における住血原虫の保有状況を明らかにし、他地域で感染したと考えられる個体も確認されたことから、改めて原虫が鳥類の渡り行動に伴い運搬されていることが示唆された(越境運搬サイクル)。また、近縁な鳥種や個体群間でも生態などの違いから原虫相などの感染状況が異なることを明らかにした。

### 6.3 小笠原諸島における鳥類住血原虫の分布状況および伝播経路の推定(コアおよび越境運搬サイクル)

小笠原諸島は東京の約1,000km南に点在する海洋島からなり、隔離された環境の中で独特に進化した動植物が多数生息している特異的な生態系を持つことから、2011

年に世界遺産に登録された。一方、ヒトの移動に伴い外来性動植物も持ち込まれており、移入種とともに侵入した鳥マラリア原虫により多くの固有鳥種が絶滅したハワイ諸島と同様に、移入種による生態系への影響が危惧される。そこで本章では、小笠原諸島における鳥類住血原虫の分布状況および伝播経路の解明を試みた。

2011年から2019年まで、小笠原諸島内で死体回収、保護または捕獲された鳥類から、血液または組織を採取した。また、2015年にスーピングまたは二酸化炭素誘引 CDC 型トラップを用いて父島内で蚊を捕集した。得られた鳥類および蚊サンプルから DNA を抽出し、鳥類住血原虫の mtDNA *cytb* 遺伝子の部分配列を標的とした nested-PCR および multiplex-PCR を行った。加えて、血液塗抹中の原虫も顕微鏡下で検索した。また、鳥類の生態区分（留鳥および渡り鳥）別の原虫保有率を比較した。

留鳥 326 羽中 163 羽（50.0%）から 3 属いずれかの住血原虫 DNA が検出され、いずれの原虫属も諸島内で伝播されていることが示唆された。留鳥の原虫保有率は渡り鳥よりも有意に高く、諸島内で両者の間で原虫が伝播されている可能性は低いと考えられる。優占原虫系統である *Plasmodium elongatum* GRW06 および *P. relictum* GRW04 は、いずれも一部の鳥種で高い病原性を示し、特に *P. relictum* GRW04 はハワイ諸島の固有鳥種の絶滅の原因となった原虫種である。また、*P. elongatum* GRW06 は今回採取したオガサライエカおよびネッタイエカからも検出されており、これら 2 種の蚊が島内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る。

留鳥および渡り鳥の間では共通する原虫系統が少なく、渡り鳥が他地域で原虫に感染して飛来しても、諸島内の留鳥に伝播される可能性は低いと考えられる。留鳥から検出された多くの系統は他地域でも検出されており、比較的近年諸島内に持ち込まれた可能性がある。また、今回新規原虫系統が検出されたメジロおよびトラツグミは、いずれも 1900 年代に小笠原諸島に移動・定着した種であり、宿主鳥類とともに新た

な原虫系統が島内に持ち込まれた可能性が考えられる。

以上、小笠原諸島では鳥類住血原虫 3 属すべてが留鳥およびベクターの間で伝播・維持されていることが示唆された（コアサイクル）。他地域から渡り鳥により新たな原虫系統が運搬され、定着する可能性は低いと考えられる一方、宿主鳥類が定着した場合は持ち込まれた新たな原虫系統が伝播される可能性があることが示唆された（越境運搬サイクル）。

#### 6.4 飼育下ペンギンにおける *Haemoproteus* 属原虫感染経路の推定（飛び火サイクル）

現存するペンギン類 18 種中 15 種は、絶滅危惧種または準絶滅危惧種に指定されている。海外と比較して日本はペンギン類の飼育数が多く、国内の動物園・水族館はペンギン類の域外保全上重要な役割を持つ。ペンギン類は鳥マラリア原虫に感受性が高く死亡例も多い。一方、*Haemoproteus* 属原虫は散発的に感染が報告されているが、多くは原虫 DNA の検出のみで、ペンギン類の赤血球中に次の個体への伝播に関わる発育ステージであるガメトサイトは検出されていない。すなわち、ペンギン類では *Haemoproteus* 属原虫が完全に発育し、ベクターを介して他個体への感染源となり得るか不明である。そこで本章では、ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫の発育ステージおよび感染経路について検討した。

国内の水族館飼育下のケープペンギンおよびマゼランペンギン各 2 羽から血液を採取し DNA を抽出した。その後、mtDNA の *cytb* 遺伝子領域を標的とした nested-PCR および multiplex-PCR を行い、分子系統解析を行った。また、血液塗抹標本作製し、顕微鏡下で虫体の検索を行った。さらに、ペンギン類への原虫感染源と考えられる鳥種であるウミネコ 1 羽が傷病保護施設で保護されていたため、同様に原虫を

検索した。

ペンギン類およびウミネコから、原虫 DNA が検出され、*Haemoproteus laeae* SPMAG12 系統と分類された。さらに、ペンギン類の血液から *Haemoproteus* 属原虫のガメトサイトが初めて検出され、ペンギン類でも原虫が発育して感染源となりうることが示唆された。今回検出された *H. laeae* は、海外のカモメ類からも検出されており、カモメ類が自然宿主と考えられる。カモメ類はペンギンの展示エリアに侵入することが多く、ペンギン類への感染源となっている可能性がある。また、本原虫系統はヌカカが媒介する *Parahaemoproteus* 亜属に分類された。よって、国内では、自然宿主であるウミネコなどのカモメ類からヌカカを介して飼育下ペンギン類に *Haemoproteus* 属原虫が伝播されており（飛び火サイクル）、さらに感染したペンギン類から他の個体または鳥種に原虫を伝播する可能性が示唆された。

本研究では、国内各地の留鳥およびベクターの間で住血原虫が伝播・維持されており、コアサイクルが成立していることが示唆された。一方、一部の原虫は渡り鳥によって運搬される越境運搬サイクルにより伝播することが示唆された。また、人為的な宿主鳥類の移入や自然な分布変化によっても原虫が新たな地域に持ち込まれる可能性があることが明らかとなり、国内における越境運搬サイクルには複数の経路が存在することが示唆された。加えて、飛び火サイクルには、野鳥からベクター経由で飼育下鳥類へと原虫が伝播される経路の他、飼育下鳥類から同居する個体などへ伝播される経路もある可能性が示唆された。

以上のように、国内の鳥類の住血原虫感染におけるコアサイクル、越境運搬サイクルおよび飛び火サイクルが確認され、各サイクル内でも複数の伝播経路が示唆された。また、留鳥、渡り鳥および飼育下鳥類は、いずれも国内における住血原虫の伝播およ

び維持に関係しており、異なる役割を持つことが示唆された。本研究で明らかにした国内の異なる生態区分の鳥類における住血原虫の保有状況を継続的に調査していくことにより、鳥類の域内・域外保全における感染症のリスク評価に繋がる知見が得られると期待される。

謝辭

本研究の実施に際し、終始ご指導を賜りました日本大学大学院獣医学研究科 佐藤雪太 教授に深甚なる謝意を表します。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 松本 淳 教授、鯉江 洋 教授ならびに本学大学院生物資源科学研究科 村田浩一 教授に深く御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり、ご助言ならびに御指導を賜りました本学大学院獣医学研究科 越後谷裕介 専任講師、San Francisco State University Professor Ravinder N.M. Sehgal、University of Extremadura Professor Dr. Alfonso Marzal、Nature Research Center chief researcher Dr. Gediminas Valkiunas、国立感染症研究所 昆虫医科学部 前室長 津田良夫博士に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、長期に亘り貴重な検体を提供いただきました NPO 法人 人行徳自然ほごくらぶ 主任研究員 佐藤達夫氏および職員の皆様、いのかしら公園動物病院 院長 石橋 徹博士および職員の皆様、バードクリニック金坂動物病院 院長 金坂裕先生、神奈川県自然環境保全センター 職員の皆様、我孫子市鳥の博物館 学芸員 小田谷嘉弥氏、国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所 主任研究員 川上和人博士、国立科学博物館 動物研究部研究主幹 西海 功博士、NPO 法人小笠原自然文化研究所 理事長 堀越和夫氏、同研究所 副理事長 鈴木 創氏および職員の皆様、本学生物資源科学部獣医学科 実験動物学研究室 卒業生 木村 墨氏、水族館 2 施設の職員の皆様に篤く御礼申し上げます。

また、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本学生物資源科学部獣医学科 実験動物学研究室 室員諸氏および卒業生諸氏に対し、厚く感謝致します。

最後に、博士課程に進学することを応援してくださり、あらゆる場面で暖かく支え続けてくれた両親と兄 2 人に心から感謝いたします。

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 No. S1491007「グローバル化社会における動物由来感染症制御のための国際共同研究と若手研究者育成」(研究代表者：丸山総一 日本大学教授)、日本学術振興会 科学研究補助金 基盤研究 (C) No. 26450484、No.21K05961 (研究代表者：佐藤雪太 日本大学教授)および同補助金 特別研究員奨励費 No. 19J20367 (研究代表者：犬丸瑞枝 本論文執筆者) による助成を得て行われました。

## 引用文献

- Ágh, N., Piross, I. S., Majoros, G., Csörgő, T., & Szöllősi, E. (2019). Malaria infection status of European Robins seems to associate with timing of autumn migration but not with actual condition. *Parasitology*, *146*, 814–820.
- Allison, F. R., Desser, S. S., Whitte, L. K., & Whitten, L. K. (1978). Further observations on the life cycle and vectors of the haemosporidian *Leucocytozoon tawaki* and its transmission to the Fiordland crested penguin. *New Zealand Journal of Zoology*, *5*(2), 371–374.
- Altizer, S., Bartel, R., & Han, B. A. (2011). Animal migration and infectious disease risk. *Science*, *331*(6015), 296–302.
- Ander, M., Meiswinkel, R., & Chirico, J. (2012). Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), the potential vectors of bluetongue virus, in Sweden. *Veterinary Parasitology*, *184*(1), 59–67.
- Argilla, L., Howe, L., Gartrell, B. D., & Alley, M. R. (2013). High prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) in the sub-Antarctic regions of New Zealand. *Parasitology*, *140*, 672–682.
- Aruch, S., Atkinson, C. T., Savage, A. F., & Lapointe, D. A. (2007). Prevalence and distribution of pox-like lesions, avian malaria, and mosquito vectors in Kipahulu Valley, Haleakala National Park, Hawai'i, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, *43*(4), 567–575.
- Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L., & Iko, W. M. (2000). Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii amakihi. *Journal of Wildlife Diseases*, *36*(2), 197–204.
- Atkinson, C. T., & Lapointe, D. A. (2009). Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, *23*(1), 53–63.
- Atkinson, C. T., Saili, K. S., Utzurrum, R. B., & Jarvi, S. I. (2013). Experimental evidence for evolved tolerance to avian malaria in a wild population of low elevation Hawai'i 'Amakihi (*Hemignathus virens*). *EcoHealth*, *10*(4), 366–375.
- Baillie, S. M., Gudex-Cross, D., Barraclough, R. K., Blanchard, W., & Brunton, D. H. (2012). Patterns in avian malaria at founder and source populations of an endemic New Zealand passerine. *Parasitol Res*, *111*, 2077–2089.

- Beadell, J. S., Gering, E., Austin, J., Dumbacher, J. P., Peirce, M. A., Pratt, T. K., Atkinson, C. T., & Fleischer, R. C. (2004). Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. *Molecular Ecology*, *13*(1), 3829–3844.
- Beadell, J. S., Ishtiaq, F., Covas, R., Melo, M., Warren, B. H., Atkinson, C. T., Bensch, S., Graves, G. R., Jhala, Y. V., Peirce, M. A., Rahmani, A. R., Fonseca, D. M., & Fleischer, R. C. (2006). Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1604), 2935–2944.
- Bennett, G. F., Peirce, M. A., & Ashford, R. W. (1993). Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History*, *27*(5), 993–1001.
- Bensch, S., Hellgren, O., & Pérez-Tris, J. (2009). MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 1353–1358.
- Bernotiene, R., Palinauskas, V., Iezhova, T., Murauskaite, D., & Valkiūnas, G. (2016). Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Experimental Parasitology*, *163*, 31–37.
- Biodiversity Center of Japan. (2016). *The sixth and seventh national surveys on the natural environment*. [www.biodic.go.jp/trialSystem/EN/shpddl.html](http://www.biodic.go.jp/trialSystem/EN/shpddl.html)
- Bonneaud, C., Sepil, I., Mila, B., Buermann, W., Pollinger, J., Sehgal, R. N. M., Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Saatchi, S., & Smith, T. B. (2009). The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*, *25*, 439–447.
- Boyd, R. J., Kelly, T. R., Macdougall-Shackleton, S. A., & Macdougall-Shackleton, E. A. (2018). Alternative reproductive strategies in white-throated sparrows are associated with differences in parasite load following experimental infection. *Biology Letters*, *14*, 20180194.
- Brazil, M. A. (2009). *Birds of East Asia: China, Taiwan, Korea, Japan, and Russia*. Princeton University Press.
- Bueno, M. G., Lopez, R. P. G., Tironi de Menezes, R. M., Costa-Nascimento, M. de

- J., Lima, G. F. M. de C., Araujo, R. A. de S., Vaz Guida, F. J., & Kirchgatter, K. (2010). Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *173*(1), 123–127.
- Bukauskaitė, D., Iezhova, T. A., Ilgūnas, M., & Valkiūnas, G. (2019). High susceptibility of the laboratory-reared biting midges *Culicoides nubeculosus* to *Haemoproteus* infections, with review on *Culicoides* species that transmit avian haemoproteids. *Parasitology*, *146*(3), 333–341.
- Campbell, K. (2015). *An investigation of an infection with a protozoan parasite causing mortalities in little penguins (Eudyptula minor) on Penguin Island, Western Australia*. Murdoch University.
- Cannell, B. L., Krasnec, K. V, Campbell, K., Jones, H. I., Miller, R. D., & Stephens, N. (2013). The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. Infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). *Veterinary Parasitology*, *197*(1–2), 74–84.
- Carlquist, S. (1974). *Island biology*. Columbia University Press.
- CeRDI. (2020). *Tracking the migration of Latham's snipe*.  
[www.cerdi.edu.au/cb\\_pages/lathams\\_snipe.php](http://www.cerdi.edu.au/cb_pages/lathams_snipe.php)
- Chagas, C. R. F., Bukauskaitė, D., Ilgūnas, M., Iezhova, T. A., & Valkiūnas, G. (2018). A new blood parasite of leaf warblers: molecular characterization, phylogenetic relationships, description and identification of vectors. *Parasites & Vectors*, *11*, 538.
- Chahad-Ehlers, S., Fushita, A. T., Lacorte, G. A., De Assis, P. C. P., & Del Lama, S. N. (2018). Effects of habitat suitability for vectors, environmental factors and host characteristics on the spatial distribution of the diversity and prevalence of haemosporidians in waterbirds from three Brazilian wetlands. *Parasites & Vectors*, *11*, 276.
- Chiba, H., Kawakami, K., Suzuki, H., & Horikoshi, K. (2007). The distribution of seabirds in the Bonin Islands, southern Japan. *J Yamashina Inst Ornithol*, *39*(1), 1–17.
- Chiba, Y., & Suzuki, T. (2011). Breeding biology of the Ogasawara buzzard endemic to the Ogasawara (Bonin) Islands. *Orithol Sci*, *10*, 119–129.

- Ciloglu, A., Ellis, V. A., Bernotienė, R., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2019). A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites. *Parasitology Research*, *118*, 191–201.
- Clark, N. J., & Clegg, S. M. (2017). Integrating phylogenetic and ecological distances reveals new insights into parasite host specificity. *Molecular Ecology*, *26*, 3074–3086.
- Clark, N. J., Clegg, S. M., & Klaassen, M. (2016). Migration strategy and pathogen risk: Non-breeding distribution drives malaria prevalence in migratory waders. *OIKOS*, *125*(9), 1358–1368.
- Clark, N. J., Clegg, S. M., & Lima, M. R. (2014). A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): New insights from molecular data. *International Journal for Parasitology*, *44*(5), 329–338.
- Coon, C. A. C., Garcia-Longoria, L., Martin, L. B., Magallanes, S., de Lope, F., & Marzal, A. (2016). Malaria infection negatively affects feather growth rate in the house sparrow *Passer domesticus*. *Journal of Avian Biology*, *47*(6), 779–787.
- Cornet, S., Nicot, A., Rivero, A., & Gandon, S. (2014). Evolution of plastic transmission strategies in avian malaria. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004308.
- Crosskey, R. W. (1990). *The Natural History of Blackflies*. John Wiley & Sons.
- Cumming, G. S., Shepard, E., Okanga, S., Caron, A., Ndlovu, M., & Peters, J. L. (2013). Host associations, biogeography, and phylogenetics of avian malaria in southern African waterfowl. *Parasitology*, *140*, 193–201.
- Dale, P. E. R., & Knight, J. M. (2008). Wetlands and mosquitoes: A review. *Wetlands Ecology and Management*, *16*, 255–276.
- Danielová, V., Daniel, M., Schwarzová, L., Materna, J., Rudenko, N., Golovchenko, M., Holubová, J., Grubhoffer, L., & Kilián, P. (2010). Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonoše Mountains, Czech Republic). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *10*(3), 223–270.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more

- models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- Dawson, R. D., & Bortolotti, G. R. (2000). Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *The Auk*, 117(2), 373–380.
- de Angeli Dutra, D., Filion, A., Fecchio, A., Braga, É. M., & Poulin, R. (2021). Migrant birds disperse haemosporidian parasites and affect their transmission in avian communities. *Oikos*, 1–10.
- Deksne, G., Davidson, R. K., Buchmann, K., Kärssin, A., Kirjušina, M., Gavarāne, I., Miller, A. L., Rut Pálsdóttir, G., Robertson, L. J., Mørk, T., Oksanen, A., Palinauskas, V., & Jokelainen, P. (2020). Parasites in the changing world—Ten timely examples from the Nordic-Baltic region. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00150.
- Delhaye, J., Jenkins, T., Glaizot, O., & Christe, P. (2018). Avian malaria and bird humoral immune response. *Malaria Journal*, 17, 77.
- Department of the Environment. (2020). *Gallinago hardwickii in species profile and threats database*, Department of the Environment, Canberra. [www.environment.gov.au/sprat](http://www.environment.gov.au/sprat)
- Devleeschauwer, B., Torgerson, P., Charlier, J., Levecke, B., Praet, N., Roelandt, S., Smit, S., Dorny, P., Berkvens, D., & Speybroeck, N. (2014). *prevalence: Tools for prevalence assessment studies. R package version 0.4.0*.
- Dimitrov, D., Zehtindjiev, P., Bensch, S., Ilieva, M., Iezhova, T. A., & Valkiūnas, G. (2014). Two new species of *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporida, Haemoproteidae) from European birds, with emphasis on DNA barcoding for detection of haemosporidians in wildlife. *Systematic Parasitology*, 87, 135–151.
- Donovan, T. A., Schrenzel, M., Tucker, T. A., Pessier, A. P., & Stalis, I. H. (2008). Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 304–313.
- Dubiec, A., Podmokła, E., Zagalska-Neubauer, M., Drobniak, S. M., Arct, A., Gustafsson, L., & Cichoń, M. (2016). Differential prevalence and diversity of haemosporidian parasites in two sympatric closely related non-migratory passerines. *Parasitology*, 143, 1320–1329.
- Dunn, J. C., Goodman, S. J., Benton, T. G., & Hamer, K. C. (2013). Avian blood

- parasite infection during the non-breeding season: an overlooked issue in declining populations? *BMC Ecology*, *13*, 30.
- Earlé, R. A., Bennett, G. F., & Brossy, J. J. (1992). First African record of *Leucocytozoon tawaki* (Apicomplexa: Leucocytozoidae) from the Jackass Penguin *Spheniscus demersus*. *South African Journal of Zoology*, *27*(2), 89–90.
- Eastwood, J. R., Peacock, L., Hall, M. L., Roast, M., Murphy, S. A., Gonçalves da Silva, A., & Peters, A. (2019). Persistent low avian malaria in a tropical species despite high community prevalence. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *8*, 88–93.
- Ejiri, H., Sato, Y., Kim, K. S., Hara, T., Tsuda, Y., Imura, T., Murata, K., & Yukawa, M. (2011). 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. *Journal of Medical Entomology*, *48*(3), 600–607.
- Ejiri, H., Sato, Y., Kim, K. S., Tsuda, Y., Murata, K., Saito, K., Watanabe, Y., Shimura, Y., & Yukawa, M. (2011). Blood meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro Wetland, a subarctic zone of Japan. *Journal of Medical Entomology*, *48*(4), 904–908.
- Ejiri, H., Sato, Y., Sasaki, E., Sumiyama, D., Tsuda, Y., Sawabe, K., Matsui, S., Horie, S., Akatani, K., Takagi, M., Omori, S., Murata, K., & Yukawa, M. (2008). Detection of avian *Plasmodium* spp. DNA sequences from mosquitoes captured in Minami Daito Island of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *70*(11), 1205–1210.
- Ejiri, H., Sato, Y., Sawai, R., Sasaki, E., Matsumoto, R., Ueda, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Omori, S., Murata, K., & Yukawa, M. (2009). Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. *Parasitology Research*, *105*(3), 629–633.
- Elbers, A. R. W., Koenraadt, C. J. M., & Meiswinkel, R. (2015). Mosquitoes and *Culicoides* biting midges: vector range and the influence of climate change. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *34*(1), 123–137.
- Ellis, V. A., & Bensch, S. (2018). Host specificity of avian haemosporidian parasites

- is unrelated among sister lineages but shows phylogenetic signal across larger clades. *International Journal for Parasitology*, *48*(12), 897–902.
- Ellis, V. A., Sari, E. H. R., Rubenstein, D. R., Dickerson, R. C., Bensch, S., & Ricklefs, R. E. (2018). The global biogeography of avian haemosporidian parasites is characterized by local diversification and intercontinental dispersal. *Parasitology*, *146*(2), 213–219.
- Emura, N. (2011). The avifauna of Chichijima Island, the Bonin Islands - Comparison with the record fifteen years ago. *Strix*, *27*, 159–164.
- Emura, N., Ando, H., Kawakami, K., & Isagi, Y. (2013). Genetic and morphological differences among populations of the Japanese Bush-Warbler (Aves: Sylviidae) on the Ogasawara Islands, Northern Pacific. *Pacific Science*, *67*(2), 187–196.
- Ewen, J. G., Bensch, S., Blackburn, T. M., Bonneaud, C., Brown, R., Cassey, P., Clarke, R. H., & Pérez-Tris, J. (2012). Establishment of exotic parasites: The origins and characteristics of an avian malaria community in an isolated island avifauna. *Ecology Letters*, *15*(10), 1112–1119.
- Fallis, A. M., Bisset, S. A., & Allison, F. R. (1976). *Leucocytozoon tawaki* n.sp. (Eucoccida: Leucocytozoidae) from the penguin *Eudyptes pachyrhynchus*, and preliminary observations on its development in *Austrosimulium* spp. (Diptera: Simuliidae). *New Zealand Journal of Zoology*, *3*(1), 11–16.
- Fecchio, A., Ellis, V. A., Bell, J. A., Andretti, C. B., D'horta, F. M., Silva, A. M., Tkach, V. V., & Weckstein, J. D. (2017). Avian malaria, ecological host traits and mosquito abundance in southeastern Amazonia. *Parasitology*, *144*, 1117–1132.
- Fecchio, A., Wells, K., Bell, J. A., Tkach, V. V., Lutz, H. L., Weckstein, J. D., Clegg, S. M., & Clark, N. J. (2019). Climate variation influences host specificity in avian malaria parasites. *Ecology Letters*, *22*(3), 547–557.
- Ferraguti, M., Martínez-De La Puente, J., Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R. C., & Figue. (2016). Effects of landscape anthropization on mosquito community composition and abundance. *Scientific Reports*, *6*, 29002.
- Ferrell, S. T., Snowden, K., Marlar, A. B., Garner, M., & Lung, N. P. (2007). Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park.

- Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(2), 309–316.
- Fix, A. S., Waterhouse, C., Greiner, E. C., & Stoskopf, M. K. (1988). *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 24(4), 610–619.
- Fleskes, J. P., Ramey, A. M., Reeves, A. B., & Yee, J. L. (2017). Body mass, wing length, and condition of wintering ducks relative to hematozoa infection. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 8(1), 89–100.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2011). *An R Companion to Applied Regression, Third edition*. Sage.
- Fridolfsson, A.-K., & Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30, 116–121.
- Frith, H. J., Crome, F. H. J., & Brown, B. K. (1977). Aspects of the biology of the Japanese snipe *Gallinago hardwickii*. *Australian Journal of Ecology*, 2(3), 341–368.
- Fuller, T., Bensch, S., & Novembre, J. (2012). The ecology of emerging infectious diseases in migratory birds: An assessment of the role of climate change and priorities for future research. *EcoHealth*, 9, 80–88.
- Garamszegi, L. Z. (2011). Climate change increases the risk of malaria in birds. *Glob. Chang. Biol.*, 17(5), 1751–1759.
- Garcia-Longoria, L., Hellgren, O., Bensch, S., De Lope, F., & Marzal, A. (2015). Detecting transmission areas of malaria parasites in a migratory bird species. *Parasitology*, 142(9), 1215–1220. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000487>
- Gill, F., Donsker, D., & Rasmussen, P. (2021). *IOC World Bird List (v11.2)*.
- Gimonneau, G., Pombi, M., Choisy, M., Morand, S., Dabiré, R. K., & Simard, F. (2012). Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito, *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. *Med Vet Entomol*, 26(1), 9–17.
- Golovina, N. M. (1998). Status of snipe *Gallinago* spp. and Woodcock *Scolopax rusticola* in the south-east of Western Siberia. *International Wader Studies*, 10, 345–350.
- Government of Japan. (2010). *Nomination of the Ogasawara Islands for Inscription on the World Heritage List*.

- Granthon, C., & Williams, D. A. (2017). Avian malaria, body condition, and blood parameters in four species of songbirds. *The Wilson Journal of Ornithology*, *129*(3), 492–508.
- Grilo, M., Vanstreels, R. E. T., Wallace, R., García-Párraga, D., Braga, É. M., Chitty, J., Catão-Dias, J. L., & Madeira de Carvalho, L. M. (2016). Malaria in penguins – current perceptions. *Avian Pathology*, *45*(4), 393–407.
- Gupta, P., Vishnudas, C. K., Ramakrishnan, U., Robin, V. V., & Dharmarajan, G. (2019). Geographical and host species barriers differentially affect generalist and specialist parasite community structure in a tropical sky-island archipelago. *Proceedings of the Royal Society B*, *2865*, 20190439.
- Hagihara, M., Amano, Y., Nagamine, T., Kinjo, T., & Murata, K. (2005). Detection of *Haemoproteus* sp. and microfilaria from the Japanese black wood pigeon (*Columba janthina*) in Okinawa. *J Jpn Vet Med Assoc*, *58*, 613–616.
- Halvarsson, P. (2016). *Host-parasite interactions in natural populations*. Uppsala University.
- Hashimoto, H., & Sugawa, H. (2013). Population trends of wintering Eurasian Coot *Fulica atra* in East Asia. *Ornithological Science*, *12*, 91–105.
- Hayman, P., Marchant, J., & Prater, T. (1986). *Shorebirds*. A & C Black.
- Hellgren, O., Atkinson, C. T., Bensch, S., Albayrak, T., Dimitrov, D., Ewen, J. G., Kim, K. S., Lima, M. R., Martin, L., Palinauskas, V., Ricklefs, R. E., Sehgal, R. N. M., Valkiūnas, G., Tsuda, Y., & Marzal, A. (2015). Global phylogeography of the avian malaria pathogen *Plasmodium relictum* based on MSP1 allelic diversity. *Ecography*, *38*, 842–850.
- Hellgren, O., Pérez-Tris, J., & Bensch, S. (2009). A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology*, *90*(10), 2840–2849.
- Hellgren, O., Waldenström, J., & 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.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Pérez-Tris, J., Ösi, E. S., Hasselquist, D., Uskiene, A. K., Ottosson, U., & Bensch, S. (2007). Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites—a phylogenetic approach. *Molecular Ecology*, *16*,

1281–1290.

- Hellgren, O., Wood, M. J., Waldenström, J., Hasselquist, D., Ottosson, U., Stervander, M., & Bensch, S. (2013). Circannual variation in blood parasitism in a sub-Saharan migrant passerine bird, the garden warbler. *Journal of Evolutionary Biology*, *26*, 1047–1059.
- Higuchi, H., Koike, S., & Shigeta, M. (2009). Effects of climate change on the phenology, distribution, and population of organisms (Japanese). *Chikyu Kankyo*, *14*(2), 189–198.
- Himmel, T., Harl, J., Küber-Heiss, A., Konicek, C., Fernández, N., Juan-Sallés, C., Ilgūnas, M., Valkiūnas, G., & Weissenböck, H. (2019). Molecular probes for the identification of avian *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* parasites in tissue sections by chromogenic in situ hybridization. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 282.
- Höglund, J., Wang, B., Saether, S. A., Blom, M. P. K., Fiske, P., Halvarsson, P., Horsburgh, G. J., Burke, T., Kålås, J. A., & Ekblom, R. (2017). Blood transcriptomes and de novo identification of candidate loci for mating success in lekking great snipe (*Gallinago media*). *Molecular Ecology*, *26*, 3458–3471.
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, *50*(3), 346–363.
- Howe, L., Castro, I. C., Schoener, E. R., Hunter, S., Barraclough, R. K., & Alley, M. R. (2012). Malaria parasites (*Plasmodium* spp.) infecting introduced, native and endemic New Zealand birds. *Parasitol Res*, *110*, 913–923.
- Huang, X., Dong, L., Zhang, C., & Zhang, Y. (2015). Genetic diversity, temporal dynamics, and host specificity in blood parasites of passerines in north China. *Parasitology Research*, *114*, 4513–4520.
- Huang, X., Rapševičius, P., Chapa-Vargas, L., Hellgren, O., & Bensch, S. (2019). Within-lineage divergence of avian haemosporidians: A case study to reveal the origin of a widespread *Haemoproteus* parasite. *Journal of Parasitology*, *105*(3), 414–422.
- Huong, C. T. T., Murano, T., Uno, Y., Usui, T., & Yamaguchi, T. (2014). Molecular detection of avian pathogens in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) collected in chicken farms. *Journal of Veterinary Medical Science*, *76*(12),

1583–1587.

- Ilgūnas, M., Chagas, C. R. F., Bukauskaitė, D., Bernotienė, R., Iezhova, T. A., & Valkiūnas, G. (2019). The life-cycle of the avian haemosporidian parasite *Haemoproteus majoris*, with emphasis on the exoerythrocytic and sporogonic development. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 516.
- 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. *Veterinary Parasitology*, *183*(3–4), 244–248.
- Ishikawa, H., & Hasegawa, K. (1989). Protozoiasis suspected as *Haemoproteus* sp. in Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* in captivity (Japanese). *Toba Aquarium Annual Report*, *1*, 77–89.
- Ishtiaq, F. (2017). Exploring host and geographical shifts in transmission of haemosporidians in a Palaearctic passerine wintering in India. *Journal of Ornithology*, *158*, 869–874.
- Ishtiaq, F., Gering, E., Rappole, J. H., Rahmani, A. R., Jhala, Y. V., Dove, C. J., Milensky, C., Olson, S. L., Peirce, M. A., & Fleischer, R. C. (2007). Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: A regional study. *Journal of Wildlife Diseases*, *43*(3), 382–398.
- Ishtiaq, F., & Renner, S. C. (2020). Bird migration and vector-borne parasite transmission. In *Avian malaria and related parasites in the tropics* (pp. 513–526). Springer Nature Switzerland.
- IUCN. (2020). *The IUCN Red List of Threatened Species Version 2020-1*. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Japan Meteorological Agency. (2020). *Tables of Monthly Climate Statistics*. [www.data.jma.go.jp/obd/stats/data/en/smp/index.html](http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/data/en/smp/index.html)
- Jones, W. (2019). *Avian malaria and interspecific interactions in Ficedula flycatchers*. Uppsala University.
- Kakogawa, M., Ono, A., Inumaru, M., Sato, Y., & Asakawa, M. (2019). Detection of avian haemosporidia from captive musophagid birds at a zoological garden in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *81*(12), 1892–1895.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic

- estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587–589.
- Katano, R., Tsuda, Y., Saitoh, Y., & Kobayashi, M. (2010). Experimental studies on the ecology of *Culex inatomi* (Diptera: Culicidae): Effects of salinity and temperature on larval development and reproduction of populations during the cool season (Japanese). *Medical Entomology and Zoology*, *61*(4), 327–333.
- Kawakami, K. (2008). Threats to indigenous biota from introduced species on the Bonin Islands, Sothern Japan. *Journal of Disaster Research*, *3*(3), 174–186.
- Kawakami, K. (2019). The history of anthropogenic disturbance and invasive alien species impact on the indigenous avifauna of the Ogasawara Islands, southern Japan. *Japanese Journal of Ornithology*, *68*(2), 237–262.
- Kawakami, K., Eda, M., Izumi, H., Horikoshi, K., & Suzuki, H. (2018). Phylogenetic position of endangered *Puffinus lherminieri bannermani*. *Ornithological Science*, *17*(1), 11–18.
- Kawakami, K., & Higuchi, H. (2003). Interspecific interactions between the native and introduced white-eyes in the Bonin Islands. *Ibis*, *145*(4), 583–592.
- Kawakami, K., & Okochi, I. (Eds.). (2010). *Restoring the Oceanic Island ecosystem: Impact and management of invasive alien species in the Bonin Islands*. Springer Japan.
- Khan, R. A., Desser, S. S., & Fallis, A. M. (1969). Survival of sporozoites of *Leucocytozoon* in birds for 11 days. *Canadian Journal of Zoology*, *47*, 347–350.
- Kilpatrick, A. M., Chmura, A. A., Gibbons, D. W., Fleischer, R. C., Marra, P. P., & Daszak, P. (2006). Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *PNAS*, *103*(51), 19368–19373.
- Kim, K. S., & Tsuda, Y. (2010). 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. *Molecular Ecology*, *19*(24), 5545–5554.
- Kim, K. S., Tsuda, Y., Sasaki, T., Kobayashi, M., & Hirota, Y. (2009). 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. *Parasitology Research*, *105*(5), 1351–1357.
- Kitajima, S., & Fujimaki, Y. (2003). Latham's snipe *Gallinago hardwickii*

- population trends in the Tokachi Plain, Hokkaido. *J Yamashina Inst Ornithol*, *35*, 12–18.
- Kobayashi, M., Nihei, N., & Kurihara, T. (2002). Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by Geographical Information System. *Journal of Medical Entomology*, *39*(1), 4–11.
- Krams, I., Suraka, V., Rattiste, K., Aboliņš-Abols, M., Krama, T., Rantala, M. J., Mierauskas, P., Cirule, D., & Saks, L. (2012). Comparative analysis reveals a possible immunity-related absence of blood parasites in common gulls (*Larus canus*) and black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Journal of Ornithology*, *153*(4), 1245–1252.
- Kueffer, C., Drake, D. R., & Fernández-Palacios, J. M. (2014). Island biology: looking towards the future. *Biology Letters*, *10*(10), 20140719.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874.
- Kuramochi, T. (2018). Digenean trematode fauna parasitic in fishes from the Ogasawara Islands. *Mem Natl Mus Nat Sci Tokyo*, *52*, 95–103.
- Lalubin, F., Delédevant, A., Glaizot, O., & Christe, P. (2013). Temporal changes in mosquito abundance (*Culex pipiens*), avian malaria prevalence and lineage composition. *Parasites & Vectors*, *6*, 307.
- Lapointe, D. A., Goff, M. L., & Atkinson, C. T. (2005). Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *Journal of Parasitology*, *91*(4), 843–849.
- Leader, P. J., & Carey, G. J. (2003). Identification of pintail snipe and Swinhoe's snipe. *British Birds*, *96*, 178–198.
- Lee, H. R., Koo, B.-S., Kim, J.-T., Kim, H.-C., Kim, M.-S., Klein, T. A., Shin, M.-S., Lee, S., Jeon, E.-O., Min, K.-C., Lee, S. B., Bae, Y., & Mo, I.-P. (2017). Molecular epidemiology of avian poxvirus in the oriental turtle dove (*Streptopelia orientalis*) and the biting midge (*Culicoides arakawae*) in the

- Republic of Korea. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(4), 749–760.
- Lee, K. A. (2006). Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integrative & Comparative Biology*, 46(6), 1000–1015.
- Lee, S.-H., Kwak, D., & Kim, K.-T. (2018). The first clinical cases of *Haemoproteus* infection in a snowy owl (*Bubo scandiacus*) and a goshawk (*Accipiter gentilis*) at a zoo in the Republic of Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(8), 1255–1258.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full - feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Levin, I. I., Outlaw, D. C., Vargas, F. H., & Parker, P. G. (2009). *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Biological Conservation*, 142(12), 3191–3195.
- Levin, I. I., Zwiers, P., Deem, S. L., Geest, E. A., Higashiguchi, J. M., Iezhova, T. A., Jiménez-Uzcátegui, G., Kim, D. H., Morton, J. P., Perlut, N. G., Renfrew, R. B., Sari, E. H. R., Valkiūnas, G., & Parker, P. G. (2013). Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and evidence for arrival via migratory birds. *Conservation Biology*, 27(6), 1366–1377.
- Madden, T. (2013). *The BLAST sequence analysis tool*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information.
- Maekawa, Y., Tsuda, Y., & Sawabe, K. (2016). A nationwide survey on distribution of mosquitoes in Japan (Japanese). *Medical Entomology and Zoology*, 67(1), 1–12.
- Maekawa, Y., Kimura R., Kasai A., Takeuchi M., Inumaru M., Sato Y., Komagata O., Sawabe K., Tsuda Y. (2021). Faunal and genetic studies of mosquitoes on Chichi-jima and Haha-jima, the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan. *Med Entomol Zool*, 72(4), 237-253.
- Martínez-Abraín, A., Esparza, B., & Oro, D. (2004). Lack of blood parasites in bird species: Does absence of blood parasite vectors explain it all? *Ardeola*, 5(1), 225–232.
- Martínez-De La Puente, J., Eberhart-Phillips, L. J., Carmona-Isunza, C., Zefania,

- S., Navarro, M. J., Kruger, O., Hoffman, J. I., Székely, T., & Figuerola, J. (2017). Extremely low *Plasmodium* prevalence in wild plovers and coursers from Cape Verde and Madagascar. *Malaria Journal*, *16*, 243.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontín, J., & De Lope, F. (2008). Effects of malaria double infection in birds: One plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology*, *21*(4), 979–987.
- Marzal, A., Reviriego, M., Hermosell, I. G., Balbontín, J., Bensch, S., Relinque, C., Rodríguez, L., Garcia-Longoria, L., & de Lope, F. (2013). Malaria infection and feather growth rate predict reproductive success in house martins. *Oecologia*, *171*(4), 853–861.
- Mayo, C. E., Osborne, C. J., Mullens, B. A., Gerry, A. C., Gardner, I. A., Reisen, W. K., Barker, C. M., & MacLachlan, N. J. (2014). Seasonal variation and impact of waste-water lagoons as larval habitat on the population dynamics of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at two dairy farms in Northern California. *PLOS ONE*, *9*(2), 89633.
- Medeiros, M. C., Ricklefs, R. E., Brawn, J. D., & Hamer, G. L. (2015). *Plasmodium* prevalence across avian host species is positively associated with exposure to mosquito vectors. *Parasitology*, *142*, 1612–1620.
- Medvedev, S. (2009). The fauna of bloodsucking insects of Northwestern Russia. Characteristics of the ranges. *Entomological Review*, *89*(1), 56–68.
- Meixell, B. W., Arnold, T. W., Lindberg, M. S., Smith, M. M., Runstadler, J. A., & Ramey, A. M. (2016). Detection, prevalence, and transmission of avian hematozoa in waterfowl at the Arctic/sub-Arctic interface: co-infections, viral interactions, and sources of variation. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 390.
- Mendes, L., Piersma, T., Hasselquist, D., Matson, K. D., & Ricklefs, R. E. (2006). Variation in the innate and acquired arms of the immune system among five shorebird species. *Journal of Experimental Biology*, *209*, 284–291.
- Mendes, L., Piersma, T., Lecoq, M., Spaans, B., & Ricklefs, R. E. (2005). Disease-limited distributions? Contrasts in the prevalence of avian malaria in shorebird species using marine and freshwater habitats. *OIKOS*, *109*, 396–404.
- Merino, S., Moreno, J., Sanz, J. J., & Arriero, E. (2000). Are avian blood parasites

- pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 267, 2507–2510.
- Message, S., & Taylor, D. (2005). *Waders of Europe, Asia and North America*. Christopher Helm.
- Meyer, C. L., & Bennett, G. F. (1976). Observations on the sporogony of *Plasmodium circumflexum* Kikuth and *Plasmodium polare* Manwell in New Brunswick. *Canadian Journal of Zoology*, 54(1), 133–142.
- Ministry of the Environment. (2010). *Ogasawara Islands Mangement Plan*.
- Ministry of the Environment. (2019). *The Japanese Red List of Threatened Species, 2019 version*.
- Mogi, M., Mano, T., & Sawada, I. (2002). Records of Hippoboscidae, Nycteribiidae and Streblidae (Diptera) from Japan. *Med Entomol Zool*, 53(Suppl 2), 141–165.
- Møller, A. P., & Erritzée, J. (1998). Host immune defence and migration in birds. *Evolutionary Ecology*, 12, 945–953.
- Momiyama, T. (1930). On the birds of Bonin and Iwo-islands (Japanese). *Bull Biogeogr Soc Japan*, 1, 89–186.
- Morales, J., Moreno, J., Merino, S., Sanz, J. J., & Tomás, G. (2007). Early moult improves local survival and reduces reproductive output in female Pied Flycatchers. *Ecoscience*, 14(1), 31–39.
- Morii, T., Nakamura, K., Lee, Y., Iijima, T., & Hoji, K. (1986). Observations on the Taiwanese strain of *Leucocytozoon caulleryi* (Haemosporina) in chickens. *The Journal of Protozoology*, 33(2), 231–234.
- Morozov, V. V. (2004). Displaying Swinhoe's snipe in eastern European Russia: a new species for Europe. *British Birds*, 97, 134–138.
- Murata, K. (2002). Prevalence of blood parasites in Japanese wild birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(9), 785–790.
- Murata, K. (2007). Study on avian haemosporidian parasites in Japanese wild birds (Japanese). *Journal of Animal Protozooses*, 22(1), 1–8.
- Murata, K., Nii, R., Yui, S., Sasaki, E., Ishikawa, S., Sato, Y., Matsui, S., Horie, S., Akatani, K., Takagi, M., Sawabe, K., & 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.

- Murata, K., Tamada, A., Ichikawa, Y., Hagihara, M., Sato, Y., Nakamura, H., Nakamura, M., Sakanakura, T., & 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.
- Murata, M., & Murakami, M. (2014). Two distinct mtDNA lineages among captive african penguins in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(4), 559–563.
- Nagata, H. (2006). Reevaluation of the prevalence of blood parasites in Japanese Passerines by using PCR based molecular diagnosis. *Ornithological Science*, 5, 105–112.
- Nakazawa, M. (2019). *fmsb: Functions for medical statistics book with some demographic data*. R package version 0.7.0.
- National Statistics Center. (2018). *Portal Site of Official Statistics of Japan*. [www.e-stat.go.jp](http://www.e-stat.go.jp)
- Nicolai, C. A., Flint, P. L., & Wege, M. L. (2005). Annual survival and site fidelity of Northern pintails banded on the Yukon-Kuskokwim Delta, Alaska. *Journal of Wildlife Management*, 69(3), 1202–1210.
- Nilsson, E., Taubert, H., Hellgren, O., Huang, X., Palinauskas, V., Markovets, M. Y., Valkiūnas, G., & Bensch, S. (2016). Multiple cryptic species of sympatric generalists within the avian blood parasite *Haemoproteus majoris*. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(9), 1812–1826.
- Olias, P., Wegelin, M., Zenker, W., Freter, S., Gruber, A. D., Klopfleisch, R., & Klopflisch, R. (2011). Avian malaria deaths in parrots, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 950–952.
- Ono, H. (1969). On the mosquitoes at Tokachi Prefecture in Hokkaido (Japanese). *Research Bulletin of Obihiro University*, 6(1), 17–31.
- Ortiz-Catedral, L., Brunton, D., Stidworthy, M. F., Elsheikha, H. M., Pennycott, T., Schulze, C., Braun, M. J., Wink, M., Gerlach, H., Pendl, H., Gruber, A. D., Ewen, J. G., Pérez-Tris, J., Valkiūnas, G., & Olias, P. (2019). *Haemoproteus minutus* is highly virulent for Australasian and South American parrots.

- Pacheco, M. A., Cepeda, A. S., Bernotienė, R., Lotta, I. A., Matta, N. E., Valkiūnas, G., & Escalante, A. A. (2018). Primers targeting mitochondrial genes of avian haemosporidians: PCR detection and differential DNA amplification of parasites belonging to different genera. *International Journal for Parasitology*, 48(8), 657–670.
- Palinauskas, V., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Markovets, M. Y., Bensch, S., & Valkiūnas, G. (2013). Molecular characterization and distribution of *Haemoproteus minutus* (Haemosporida, Haemoproteidae): A pathogenic avian parasite. *Parasitol Int*, 62, 358–363.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C. V., & Bensch, S. (2008). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology*, 120(4), 372–380.
- Palinauskas, V., Žiegytė, R., Iezhova, T. A., Ilgūnas, M., Bernotienė, R., & Valkiūnas, G. (2016). Description, molecular characterisation, diagnostics and life cycle of *Plasmodium elongatum* (lineage pERIRUB01), the virulent avian malaria parasite. *International Journal for Parasitology*, 46, 697–707.
- Pardal, S., Alves, J. A., Zé-Zé, L., Osório, H., Rocha, A., Lopes, R. J., Potts, P., Amaro, F., Santiago-Quesada, F., Sanchez-Guzman, J. M., Masero, J., Alves, M. J., Pérez-Tris, J., Ramos, J. A., & Mendes, L. (2014). Shorebird low spillover risk of mosquito-borne pathogens on Iberian wetlands. *Journal of Ornithology*, 155(2), 549–554.
- Pedro, R., Claudio, N., Elena, C., & Claudio, V. (2019). Low occurrence of hemosporean parasites in the Neotropical cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*) in Chile. *Parasitology Research*, 118, 325–333.
- Peirce, M. A. (1981). Haematozoa of British birds. VI. Redescription of *Haemoproteus laevis* Yakunin from the lesser black-backed gull *Larus fuscus*. *Journal of Natural History*, 15(3), 459–462.
- Peirce, M. A., Greenwood, A. G., & Stidworthy, M. F. (2005). *Leucocytozoon* in captive penguins. *Veterinary Record*, 157(25), 519–520.
- Perkins, S. L., & Schall, J. J. (2002). A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology*, 88(5),

972–978.

- Pigeault, R., Caudron, Q., Nicot, A., Rivero, A., & Gandon, S. (2018). Timing malaria transmission with mosquito fluctuations. *Evolution Letters*, *2*(4), 378–389.
- Podmokła, E., Dubiec, A., Drobniak, S. M., Arct, A., Gustafsson, L., & Cichoń, M. (2014). Determinants of prevalence and intensity of infection with malaria parasites in the Blue Tit. *Journal of Ornithology*, *155*(3), 721–727.
- Pulgarín-R, P. C., Gómez, C., Bayly, N. J., Bensch, S., FitzGerald, A. M., Starkloff, N., Kirchman, J. J., González-Prieto, A. M., Hobson, K. A., Ungvari-Martin, J., Skeen, H., Castaño, M. I., & Daniel Cadena, C. (2019). Migratory birds as vehicles for parasite dispersal? Infection by avian haemosporidians over the year and throughout the range of a long-distance migrant. *Journal of Biogeography*, *46*(1), 83–96.
- Pulgarín-R, P. C., Gómez, J. P., Robinson, S., Ricklefs, R. E., & Daniel Cadena, C. (2018). Host species, and not environment, predicts variation in blood parasite prevalence, distribution, and diversity along a humidity gradient in northern South America. *Ecology and Evolution*, *8*(8), 3000–3014.
- QGIS Developmental Team. (2020). *QGIS Geographic Information System* (3.14). Open Source Geospatial Foundation Project.
- Quillfeldt, P., Arriero, E., Martínez, J., Masello, J. F., & Merino, S. (2011). Prevalence of blood parasites in seabirds - a review. *Frontiers in Zoology*, *8*(1), 26.
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rambaut, A. (2012). *FigTree: Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0*
- Ramey, A. M., Schmutz, J. A., Reed, J. A., Fujita, G., Scotton, B. D., Casler, B., Fleskes, J. P., Konishi, K., Uchida, K., & Yabsley, M. J. (2015). Evidence for intercontinental parasite exchange through molecular detection and characterization of haematozoa in northern pintails (*Anas acuta*) sampled throughout the North Pacific Basin. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *4*(1), 11–21.
- Rappole, J. H., Derrickson, S. R., & Hubalek, Z. (2000). Migratory birds and spread

- of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Diseases*, *6*(4), 319–328.
- Reeves, A. B., Smith, M. M., Meixell, B. W., Fleskes, J. P., & Ramey, A. M. (2015). Genetic diversity and host specificity varies across three genera of blood parasites in ducks of the Pacific Americas Flyway. *PLOS ONE*, *10*(2), e0116661.
- Reperant, L. A., Fučkar, N. S., Osterhaus, A. D. M. E., Dobson, A. P., & Kuiken, T. (2010). Spatial and temporal association of outbreaks of H5N1 influenza virus infection in wild birds with the 0°C isotherm. *PLOS Pathogens*, *6*(4), e1000854.
- Richards, E. E., Masuoka, P., Brett-Major, D., Smith, M. M., Klein, T. A., Kim, H. C., Anyamba, A., & Grieco, J. (2010). The relationship between mosquito abundance and rice field density in the Republic of Korea. *International Journal of Health Geographics*, *9*, 32.
- Ricklefs, R. E., & Fallon, S. M. (2002). Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, *269*, 885–892.
- Ricklefs, R. E., Medeiros, M. C. I., Ellis, V. A., Svensson-Coelho, M., Blake, J. G., Loiselle, B. A., Soares, L., Fecchio, A., Outlaw, D. C., Marra, P. P., Latta, S. C., Valkiūnas, G., Hellgren, O., & Bensch, S. (2017). Avian migration and the distribution of malaria parasites in New World passerine birds. *Journal of Biogeography*, *44*(5), 1113–1123.
- Ricklefs, R. E., Outlaw, D. C., Svensson-Coelho, M., Medeiros, M. C. I., Ellis, V. A., & Latta, S. (2014). Species formation by host shifting in avian malaria parasites. *PNAS*, *111*(41), 14816–14821.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542.
- Ropert-Coudert, Y., Chiaradia, A., Ainley, D., Barbosa, A., Boersma, P. D., Brasso, R., Dewar, M., Ellenberg, U., García-Borboroglu, P., Emmerson, L., Hickcox, R., Jenouvrier, S., Kato, A., McIntosh, R. R., Lewis, P., Ramírez, F., Ruoppolo, V., Ryan, P. G., Seddon, P. J., ... Trathan, P. N. (2019). Happy feet in a hostile

- world? The future of penguins depends on proactive management of current and expected threats. *Frontiers in Marine Science*, 6(May), 248.
- Rubtsov, I. A. (1990). *Fauna of the USSR Diptera Volume 6, Part 6: Blackflies (Simuliidae)* (2nd ed.). E.J. Brill.
- Sahashi, N., Akiba, M., Ota, Y., Masuya, H., Hattori, T., Mukai, A., Shimada, R., Ono, T., & Sato, T. (2015). Brown root rot caused by *Phellinus noxius* in the Ogasawara (Bonin) islands, southern Japan - current status of the disease and its host plants. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1), 33.
- Saito, K., Kanayama, A., Sato, H., & Ogata, K. (1986). Studies on the ecology of blackflies (Diptera: Simuliidae). VIII. Fauna of the blackflies in Tokyo metropolis (Japanese). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 30(2), 144–146.
- Saitoh, T., Kawakami, K., Red'kin, Y. A., Nishiumi, I., Kim, C.-H., & Kryukov, A. P. (2020). Cryptic speciation of the oriental greenfinch *Chloris sinica* on oceanic islands. *Zoological Science*, 37(3), 1–15.
- Sallaberry-Pincheira, N., Gonzalez-Acuña, D., Herrera-Tello, Y., Dantas, G. P. M., Luna-Jorquera, G., Frere, E., Valdés-Velasquez, A., Simeone, A., & Vianna, J. A. (2015). Molecular Epidemiology of Avian Malaria in Wild Breeding Colonies of Humboldt and Magellanic Penguins in South America. *EcoHealth*, 12(2), 267–277.
- Samuel, M. D., Woodworth, B. L., Atkinson, C. T., Hart, P. J., & LaPointe, D. A. (2018). The epidemiology of avian pox and interaction with avian malaria in Hawaiian forest birds. *Ecological Monographs*, 88(4), 621–637.
- Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Pineda, E., Segelbacher, G., & Schaefer, H. M. (2013). Urban forests as hubs for novel zoonosis: blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians. *Parasitol*, 140(1), 1799–1810.
- Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H. M., & Segelbacher, G. (2012). Bloodmeal analysis reveals avian *Plasmodium* infections and broad host preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors. *PLoS ONE*, 7(2), e31098.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., & Schaefer, H. M. (2012). Diptera vectors

- of avian haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, *87*, 928–964.
- Santiago-Alarcon, D., Rodríguez-Ferraro, A., Parker, P. G., & Ricklefs, R. E. (2014). Different meal, same flavor: cospeciation and host switching of haemosporidian parasites in some non-passerine birds. *Parasites & Vectors*, *7*, 286.
- Sato, Y., Hagihara, M., Yamaguchi, T., Yukawa, M., & Murata, K. (2007). Phylogenetic comparison of *Leucocytozoon* spp. from wild birds of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *69*(1), 55–59.
- Sato, Y., Tamada, A., Mochizuki, Y., Nakamura, S., Okano, E., Yoshida, C., Ejiri, H., Omori, S., Yukawa, M., & Murata, K. (2009). Molecular detection of *Leucocytozoon lovati* from probable vectors, black flies (Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. *Parasitol Res*, *104*(1), 251–255.
- Satterfield, D. A., Marra, P. P., Sillett, T. S., & Altizer, S. (2018). Responses of migratory species and their pathogens to supplemental feeding. *Philosophical Transactions B*, *373*, 20170094.
- Schneider, P., Teun Bousema, J., Gouagna, L. C., Otieno, S., Van De Vegte-Bolmer, M., Omar, S. A., & Sauerwein, R. W. (2007). Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *76*(3), 470–474.
- Schneider, T., Olsen, D., Dykstra, C., Huettner, S., Branch, S., Sirpenski, G., Sarro, S., Waterfall, K., Henry, L., DuBois, L., Jozwiak, J., Diebold, E., Wallace, R., Waier, A., Slifka, K., McClements, R., & Urquhard, H. (2014). *Penguin (Spheniscidae) Care Manual*.
- Schultz, A., & Whittington, P. (2005). High prevalence of avian malaria infection to avifauna at Cape Recife. *Ostrich*, *76*(1&2), 56–60.
- Scordato, E. S., & Kardish, M. R. (2014). Prevalence and beta diversity in avian malaria communities: host species is a better predictor than geography. *Journal of Animal Ecology*, *83*(6), 1387–1397.
- Scott, H. H. (1927). Report on the deaths occurring in the society's gardens during the year 1926. *Proceedings of the Zoological Society of London*, *1*(1), 173–198.
- Shimizu, Y. (2003). The nature of Ogasawara and its conservation. *Glob Environ*

*Res*, 7(1), 3–14.

- Shirotani, A., Shibata, A., Ejiri, H., Sato, Y., Tsuda, Y., Hatakeyama, Y., Iwano, H., Murata, K., & Yukawa, M. (2009). Detection of avian malaria DNA from mosquitoes in Kanagawa in Japan (Japanese). *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 62(1), 73–79.
- Shurulinkov, P., Chakarov, N., & Daskalova, G. (2012). Blood parasites, body condition, and wing length in two subspecies of yellow wagtail (*Motacilla flava*) during migration. *Parasitology Research*, 110(5), 2043–2051.
- Sijbranda, D. C., Campbell, J., Gartrell, B. D., & Howe, L. (2016). Avian malaria in introduced, native and endemic New Zealand bird species in a mixed ecosystem. *New Zealand Journal of Ecology*, 40(1), 72–79.
- Silveira, P., Belo, N. O., Lacorte, G. A., Kolesnikovas, C. K. M., Vanstreels, R. E. T., Steindel, M., Catão-Dias, J. L., Valkiūnas, G., & Braga, É. M. (2013). Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South American penguins. *Parasitology International*, 62, 165–171.
- Smith, J. D., Gill, S. A., Baker, K. M., & Vonhof, M. J. (2018). Prevalence and diversity of avian haemosporida infecting songbirds in southwest Michigan. *Parasitology Research*, 117, 471–489.
- Soares, L., Young, E. I., & Ricklefs, R. E. (2020). Haemosporidian parasites of resident and wintering migratory birds in The Bahamas. *Parasitology Research*, 119, 1563–1572.
- Sol, D., Jovani, R., & Torres, J. (2003). Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia*, 135, 542–547.
- Sol, D., Jovani, R., Torres Sol, J., Sol, D., & Jo, R. (2000). Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *ECOGRAPHY*, 23, 307–314.
- Sorci, G. (2013). Immunity, resistance and tolerance in bird–parasite interactions. *Parasite Immunology*, 35, 350–361.
- Sorensen, M. C., Asghar, M., Bensch, S., Fairhurst, G. D., Jenni-Eiermann, S., & Spottiswoode, C. N. (2016). A rare study from the wintering grounds provides

- insight into the costs of malaria infection for migratory birds. *Journal of Avian Biology*, 47, 575–582.
- Sorensen, M. C., Dixit, T., Kardynal, K. J., Newton, J., Hobson, K. A., Bensch, S., Jenni-Eiermann, S., & Spottiswoode, C. N. (2019). Migration distance does not predict blood parasitism in a migratory songbird. *Ecology and Evolution*, 9(14), 8294–8304.
- Sugita, N., Kawakami, K., & Nishiumi, I. (2016). Origin of Japanese white-eyes and brown-eared bulbuls on the Volcano Islands. *Zoological Science*, 33(2), 146–153.
- Sugiura, S. (2016). Impacts of introduced species on the biota of an oceanic archipelago: the relative importance of competitive and trophic interactions. *Ecological Research*, 31, 155–164.
- Sumiyama, D., Hayashida, I., Kanazawa, T., Anzai, H., & Murata, K. (2020). Prevalence and antimicrobial-resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from green anoles (*Anolis carolinensis*) collected on the Haha-jima of the Ogasawara archipelago, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82(10), 1558–1561.
- Takahashi, S. (1973). Insects of medical importance in Ogasawara (Bonin) Islands (Japanese). *Eisei Dobutsu*, 24(2), 143–148.
- Takami, K. (2012). Consideration on the vaccination to captive rare and endangered species based on their conditions (Japanese). *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 17(2), 63–71.
- Takaoka, H., & Saito, K. (2006). A new species of *Simulium* (*Nevermannia*) from the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan (Diptera: Simuliidae). *Tropical Medicine and Health*, 34(4), 155–158.
- Takaoka, H., Saito, K., & Suzuki, H. (1999). *Simulium* (*Nevermannia*) *bonninense* from the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan (Diptera: Simuliidae): taxonomic assignment to the *Vernum*-group and descriptions of male, pupa and mature larva. *Jpn J Trop Med Hyg*, 27(2), 189–194.
- Tamura, J., Sumiyama, D., Kanazawa, T., Sato, Y., & Murata, K. (2018). A study on molecular phylogeny of the avian malaria parasite's MSP1 gene from the penguins in captivity (Japanese). *Journal of the Japanese Association of Zoos*

- and Aquariums*, 60(1), 103–111.
- Tanaka, Kazuo, Mizusawa, K., & Saugstad, E. S. (1979). A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). In *American Entomological Institute*.
- Tanaka, Kei, Sumiyama, D., Kanazawa, T., Sato, Y., & Murata, K. (2019). Prevalence and molecular phylogeny of avian malaria parasites in Columbiformes in Japan (Japanese). *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24(2), 65–71.
- Tanigawa, M., Sato, Y., Ejiri, H., Imura, T., Chiba, R., Yamamoto, H., Kawaguchi, M., Tsuda, Y., Murata, K., & Yukawa, M. (2013). Molecular identification of avian haemosporidia in wild birds and mosquitoes on Tsushima Island, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(3), 319–326.
- Tokiwa, T., Hashimoto, T., Yabe, T., Komatsu, N., Akao, N., & Ohta, N. (2013). First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) infections in invasive rodents from five islands of the Ogasawara Archipelago, Japan. *PLoS ONE*, 8(8), e70729.
- Toma, T., & Miyagi, I. (2005). Notes on mosquitoes in Chichi-jima, Ogasawara Archipelago, Japan and biology of *Culex (Sirivanakarnius) boninensis* (Diptera: Culicidae). *Med. Entomol, Zool*, 56(3), 237–241.
- Tomiya, K. (1998). Disturbance in island ecosystem by introduced species in Ogasawara Islands. *Japanese Journal of Ecology*, 48, 63–72.
- Trathan, P. N., García-Borboroglu, P., Boersma, D., Bost, C.-A., Crawford, R. J. M., Crossin, G. T., Cuthbert, R. J., Dann, P., Davis, L. S., De La Puente, S., Ellenberg, U., Lynch, H. J., Mattern, T., Pütz, K., Seddon, P. J., Trivelpiece, W., & Wienecke, B. (2015). Pollution, habitat loss, fishing, and climate change as critical threats to penguins. *Conservation Biology*, 29(1), 31–41.
- Tsuda, Y. (2017). Review of recent studies on avian malaria parasites and their vector mosquitoes (Japanese). *Medical and Veterinary Entomology*, 68(1), 1–10.
- Tsuda, Y. (2019). *An illustrated book of the mosquitoes of Japan: adult identification, geographic distribution and ecological note (Japanese)*.

Hokuryukan.

- Tsuda, Y., Matsui, S., Saito, A., Akatani, K., Sato, Y., Takagi, M., & Murata, K. (2009). Ecological study of avian malaria vectors on the island of Minami-Daito, Japan. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *25*(3), 279–284.
- UNESCO. (2011). *Decisions Adopted by the World Heritage Committee at its 35th Session*.
- Ura, T. (2007). Latham's snipe. *Bird Research News*, *4*(10), 4–5.
- Ura, T., Azuma, N., Hayama, S., & Higashi, S. (2005). Sexual dimorphism of Latham's Snipe (*Gallinago hardwickii*). *Emu*, *105*(1), 259–262.
- Valkiūnas, G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia* (Vol. 1). CRC Press.
- Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Hellgren, O., & Bolshakov, C. V. (2006). Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology*, *92*(2), 418–422.
- Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2001). A comparison of the blood parasites in three subspecies of the yellow wagtail *Motacilla flava*. *Journal of Parasitology*, *87*(4), 930–934.
- Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2017). Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. *Malaria Journal*, *16*, 101.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R. N. M., & Bensch, S. (2008). A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*, *94*(6), 1395–1401.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T. A., Loiseau, C., & Sehgal, R. N. M. (2009). Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporean parasites in peripheral blood of naturally infected birds. *Journal of Parasitology*, *95*(6), 1512–1515.
- Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Fragner, K., Weissenböck, H., Atkinson, C. T., & Iezhova, T. A. (2018). Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian malaria. *Malaria Journal*, *17*(1), 1–21.
- Valkiūnas, G., Kazlauskienė, R., Bernotienė, R., Palinauskas, V., & Iezhova, T. A.

- (2013). Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitol Res*, *112*, 2159–2169.
- Valkiūnas, G., Žiegytė, R., Palinauskas, V., Bernotienė, R., Bukauskaitė, D., Ilgūnas, M., Dimitrov, D., & Iezhova, T. A. (2015). Complete sporogony of *Plasmodium relictum* (lineage pGRW4) in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, with implications on avian malaria epidemiology. *Parasitology Research*, *114*(8), 3075–3085.
- Van Hoesel, W., Marzal, A., Magallanes, S., Santiago-Alarcon, D., Ibáñez-Bernal, S., & Renner, S. C. (2019). Management of ecosystems alters vector dynamics and haemosporidian infections. *Scientific Reports*, *9*, 8779.
- Van Riper, C. I., Van Riper, S. G., Goff, M. L., & Laird, M. (1986). The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs*, *56*(4), 327–344.
- Van Riper, C. I., Van Riper, S. G., & Hansen, W. R. (2002). Epizootiology and effect of avian pox on Hawaiian forest birds. *The Auk*, *119*(4), 929–942.
- Van Riper III, C. (1991). The impact of introduced vectors and avian malaria on insular passeriform bird populations in Hawaii. *Bull Soc Vector Ecol*, *16*(1), 59–83.
- Vanstreels, R. E. T., Braga, É. M., & Catão-Dias, J. L. (2016). Blood parasites of penguins: a critical review. *Parasitology*, *143*(8), 931–956.
- Vanstreels, R. E. T., Kolesnikovas, C. K. M., Sandri, S., Silveira, P. P. P., Belo, N. O., Ferreira, F. C. J., Epiphonio, S., Steindel, M., Braga, É. M., Catão-Dias, J. L., Ferreira-Junior, F. C., Epiphonio, S., Steindel, M., Braga, É. M., & Catão-Dias, J. L. (2014). Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil. *PLOS ONE*, *9*(4), 94994.
- Wada, Y. (1986). Revision of the *claggi* group of the genus *Culicoides* distributed in Japan, with description of a new species (Diptera: Ceratopogonidae). *Jpn J Sanit Zool*, *37*(2), 141–152.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., & Östman, Ö. (2004). A new nested

- polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology*, *90*(1), 191–194.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., & Ottosson, U. (2002). Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology*, *11*, 1545–1554.
- Warner, R. E. (1968). The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *The Condor*, *70*, 101–120.
- Wild Bird Society of Japan. (2020). *Latham's snipe Conservation Survey Project (Japanese)*. [www.wbsj.org/activity/conservation/endangered-species/oojishigi-project](http://www.wbsj.org/activity/conservation/endangered-species/oojishigi-project)
- Yabe, T., Hashimoto, T., Takiguchi, M., Aoki, M., & Kawakami, K. (2009). Seabirds in the stomach contents of black rats *Rattus rattus* on Higashijima, the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan. *Marine Ornithology*, *37*(3), 293–295.
- Yakunin, M. P. (1972). Blood parasites of wild birds of South-East Kazakhstan (Russian). *Trudy Instituta Zoologii Akademii Nauk Kazakhskoi SSR*, *33*, 69–79.
- Yamashina Institute for Ornithology. (2002). *Atlas of Japanese Migratory Birds from 1961 to 1995 (Japanese)*.
- Yanase, T., Hayama, Y., Shirafuji, H., Yamakawa, M., Kato, T., Horiwaki, H., Tsutsui, T., & Terada, Y. (2014). Development of a light trap with light-emitting diodes (LEDs) for the collection of *Culicoides* biting midges (Japanese). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, *58*(1), 127–132.
- Yeo, G., Wang, Y., Chong, S. M., Humaidi, M., Lim, X. F., Mailepessov, D., Chan, S., How, C. B., Lin, Y. N., Huangfu, T., Fernandez, C. J., Hapuarachchi, H. C., & Yap, G. (2019). Characterization of Fowlpox virus in chickens and bird-biting mosquitoes: a molecular approach to investigating Avipoxvirus transmission. *Journal of General Virology*, *100*, 838–850.
- Yoshimura, A., Koketsu, M., Bando, H., Saiki, E., Suzuki, M., Watanabe, Y., Kanuka, H., & Fukumoto, S. (2014). Phylogeny comparison of avian haemosporidian parasites from resident and migratory birds in northern

- Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(2), 235–242.
- Zhang, Y., Wu, Y., Zhang, Q., Su, D., & Zou, F. (2014). Prevalence patterns of avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* parasites and the influence of host relative abundance in Southern China. *PLoS ONE*, 9(6), e99501.
- Žiegytė, R. (2014). *The experimental study on development of avian malaria parasites (Plasmodium) and haemoproteids (Haemoproteus) in vectors*. Vilnius University.
- Žiegytė, R., Markovets, M. Y., Bernotienė, R., Mukhin, A., Iezhova, T. A., Valkiūnas, G., & Palinauskas, V. (2017). The widespread biting midge *Culicoides impunctatus* (Ceratopogonidae) is susceptible to infection with numerous *Haemoproteus* (Haemoproteidae) species. *Parasites & Vectors*, 10, 397.
- Žiegytė, R., & Valkiūnas, G. (2014). Recent advances in vector studies of avian haemosporidian parasites. *EKOLOGIJA*, 60(4), 73–83.
- 加藤六部・木村マリ. (1950). 鳥マラリアの研究 [4] 日本産野鳥の血液内寄生虫の自然感染状態. *日本細菌學雜誌*, 5(3), 103–106.
- 公益社団法人日本動物園水族館協会. (2020). *適正施設ガイドライン【ペンギン科 Spheniscidae】*.
- 佐藤雪太. (2009). ペンギンのマラリア. *獣医畜産新報*, 62(7), 569–574.
- 永井利承. (1954). 野鳥血液寄生虫の長期観察に就いて. *長崎医学会雑誌*, 12, 958–961.
- 日本鳥学会. (2012). *日本鳥類目録改訂第7版*. 日本鳥学会.

## 業績一覽

## 学位論文に関する主論文

1. Inumaru M., Murata K., & Sato Y. (2017). Prevalence of avian haemosporidia among injured wild birds in Tokyo and environs, Japan. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 6(1), 299-309.
2. Inumaru M., Aratani S., Yamamoto M., Sato Y., Murata K., & Valkiunas G. (2020). Penguins are competent hosts of *Haemoproteus* parasites: the first detection of gametocytes, with molecular characterization of *Haemoproteus* larvae. *Parasites Vectors*, 13(1), 307.
3. Inumaru M., Odaya Y., Sato Y., & Marzal A. (2021). First records of prevalence and diversity of avian haemosporidia in snipe species (genus *Gallinago*) of Japan. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 16(1), 5-17.

## 参考論文

1. Makino I., Inumaru M., Abe N., & Sato Y. (2018). A new avian *Cryptosporidium* genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (*Strix leptogrammica*) with severe dehydration and diarrhea. *Parasitology research*, 117(9), 3003-3008.
2. Kakogawa M., Ono A., Inumaru M., Sato Y., & Asakawa M. (2019). Detection of avian haemosporidia from captive musophagid birds at a zoological garden in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(12), 1892-1895.
3. Bensch S., Inumaru M., Sato Y., Lee Cruz L., Cunningham A., Goodman S.,

- Levin I., Parker P., Casanueva P., Hernández MA., Moreno-Rueda G., & Rojo MA. (2020). Contaminations contaminate common databases. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 355-362.
4. Inumaru M., Yamada A., Shimizu M., Ono A., Horinouchi M., Shimamoto T., Tsuda Y., Murata K., & Sato Y. (2021). Vector incrimination and transmission of avian malaria at an aquarium in Japan: mismatch in parasite composition between mosquitoes and penguins. *Malaria Journal*, 20(1), 136.
  5. Fecchio A., Clark N., Bell J., Skeen H., Lutz H., De La Torre G., Vaughan J., Tkach V., Schunck F., Ferreira F., Braga E., Lugarini C., Wamiti W., Dispoto J., Galen S., Kirchgatter K., Sagario M. C., Cueto V., González-Acuña D., Inumaru M., Sato Y., Schumm Y., Quillfeldt P., Pellegrino I., Dharmarajan G., Gupta P., Robin V., Ciloglu A., Yildirim A., Huang X., Chapa-Vargas L., Álvarez Mendizábal P., Santiago-Alarcon D., Drovetski S., Hellgren O., Voelker G., Ricklefs R., Hackett S., Collins M., Weckstein J., & Wells K. (2021). Global drivers of avian haemosporidian infections vary across zoogeographical regions. *Glob Evol Biogeogr*, 30(12), 2393-2406.
  6. Maekawa Y., Kimura R., Kasai A., Takeuchi M., Inumaru M., Sato Y., Komagata O., Sawabe K., & Tsuda Y. (2021). Faunal and genetic studies of mosquitoes on Chichi-jima and Haha-jima, the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan. *Med Entomol Zool*, 72(4), 237-253.

## 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 25 回日本野生動物医学会大会 優秀口頭発表賞

受賞研究課題 「タシギ属の 3 種における血液寄生原虫保有状況および伝播動態の推定」

受賞年月・会場 2019 年 9 月・山口大学吉田キャンパス

2. 令和元年度 日本学術振興会 特別研究員 (DC1 (農学・環境学) 採用

研究課題 「鳥類血液寄生原虫を指標とした越境性感染症の分布動態の解明」

採用期間 2019 年 4 月 ～ 2022 年 3 月 (3 年間)

3. East and Southeast Asia Travel Fund. Prevalence of avian haemosporidia among injured wild birds in Northern and Eastern Japan. *27th International Ornithological Congress*. Vancouver, Canada. 2018.

4. Student Grant. Difficulties of ex-situ conservation: avian haemosporidia among captive penguins in Japan. *4th International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites in Wildlife*. Beijing, China. 2018.

付録

付録 1 : 小笠原諸島における鳥類住血原虫に関する補足資料

メジロから検出された *Haemoproteus (Parahaemoproteus) killangoi* Bennett and Peirce, 1981 の記述

宿主 : メジロ (*Zosterops japonicus*) から hZOSJAP02 が検出された

場所 : 日本 東京都小笠原村父島

証拠材料 : 代表的な血液塗抹標本は日本大学生物資源科学部獣医学科実験動物学研究室に保管している

代表的な DNA 配列 : ミトコンドリア *cytb* 系統 hZOSJAP02 (478bp)

説明 : 幼若ガメトサイト (図 A1.2i) は赤血球の核に密着する。輪郭はわずかにアメーバ状である。マクロガメトサイト (図 A1.2j-1) は末端で赤血球の核を取り囲むように成長する。しかし、ガメトサイトは赤血球核を完全に包み込むことはない。成長中のガメトサイトは赤血球の核をずらすことはないが、成熟ガメトサイトは赤血球の核を側方にずらすことがある (図 A1.2l)。成長中のガメトサイトはダンベル状の形になる。完全に成熟したガメトサイトはアメーバ状の輪郭とダンベル状の形状を失い、赤血球の核と壁に密着した均一な輪郭を示す (図 A1.2j-1)。原虫の核は小型で、亜終端に位置する (図 A1.2j-1)。丸く、中程度の大きさ (0.5-1.0  $\mu\text{m}$ ) の色素顆粒 (図 A1.2j) と、大型で棒状の色素顆粒 (図 A1.2j-1) が 7-11 個 (平均  $9.2 \pm 1.3$  個) 存在する。

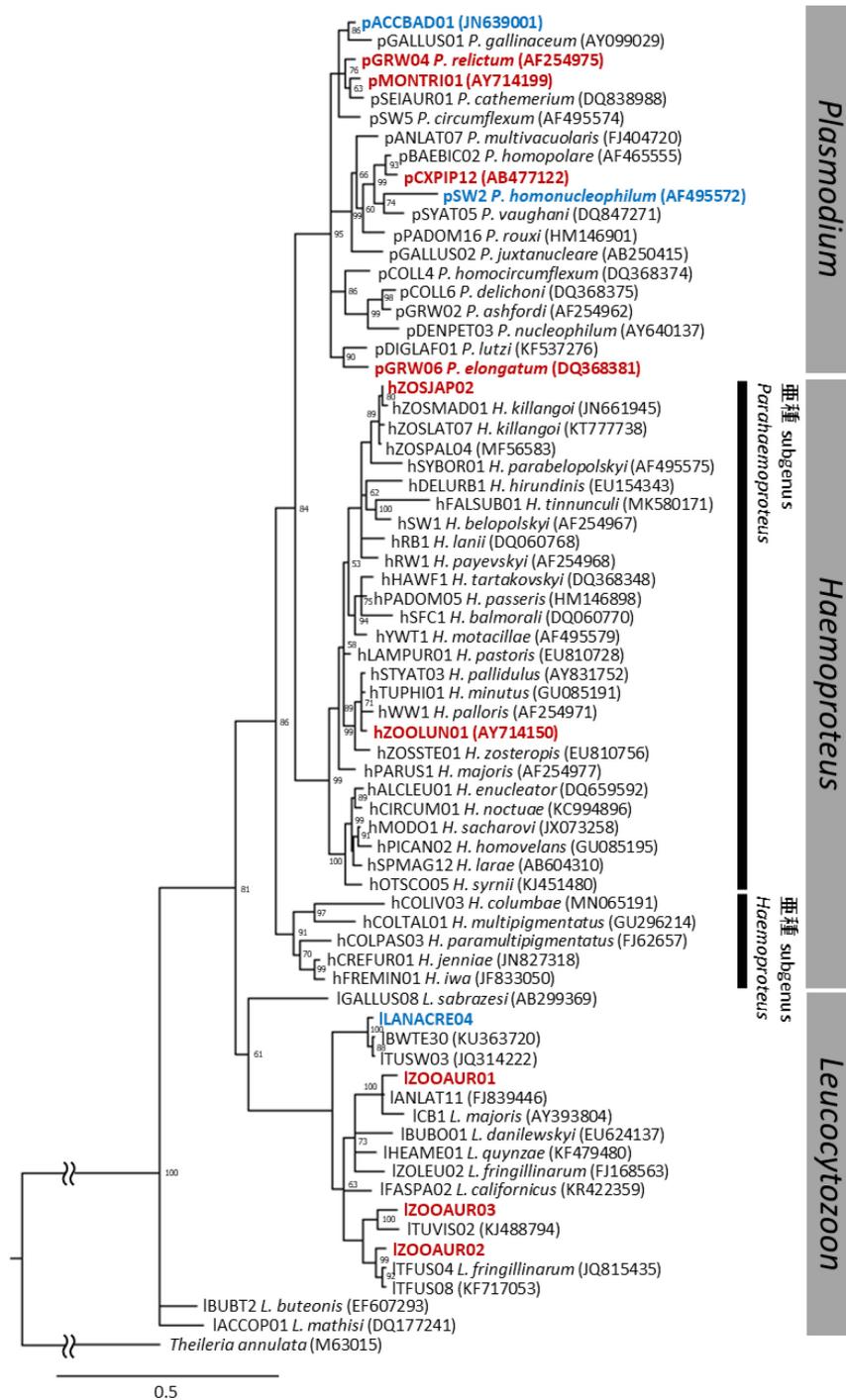


図 A1.1. 鳥類住血原虫の *cytb* 遺伝子系統のベイズ系統解析 (475 bp). >0.60 の事後確率のみを表記した. 枝の長さは、適用置換モデルに応じた変化量に比例する. 留鳥から検出された系統は赤字、渡り鳥から検出された系統は青字で示す.

Fig. A1.1. Bayesian phylogenetic analysis of *cytb* gene lineages (475 bp) of avian haemosporidian parasites, rooted with *Theileria annulata*. Only posterior clade probabilities of >0.60 were indicated. Branch lengths proportional to the amount of change according to the applied substitution model. Lineages from resident birds are shown in red letters, and lineages detected from only migratory birds are shown in blue letters.

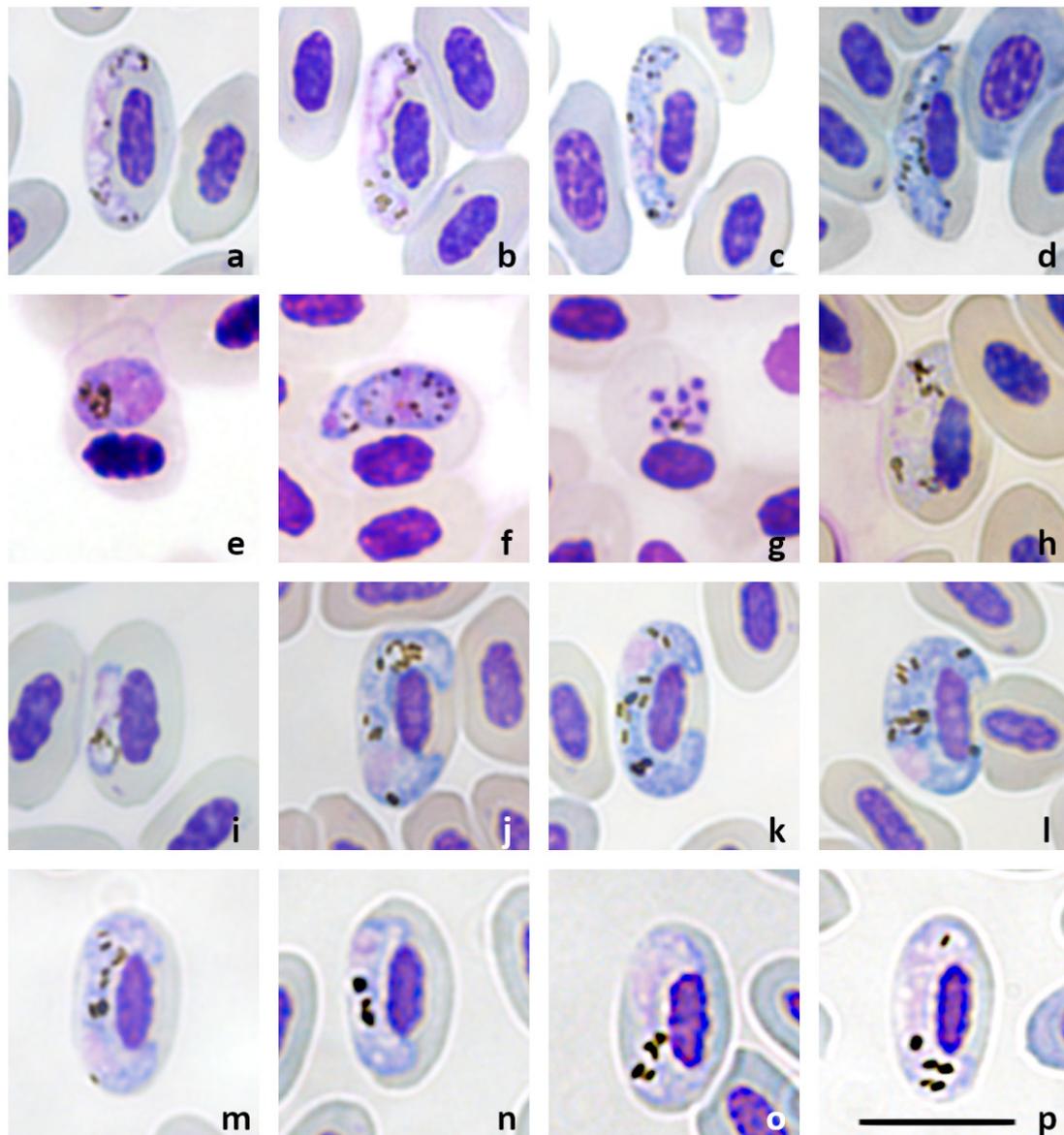


図 A1.2. 父島の留鳥の血液中に見られた住血原虫 (Hemacolor®染色 ; 以下鳥種・原虫種) : (a-d) メジロ (*Zosterops japonicus*)・*Plasmodium elongatum*、(i-p) メジロ・*Haemoproteus killangoi*、(e) ヒヨドリ (*Hypsipetes amaurotis*)・*Plasmodium relictum*; (f,g) イソヒヨドリ (*Monticola solitarius*)・*Plasmodium relictum*; (h) ヒヨドリ・*Plasmodium* 属原虫. かすみ網で捕獲 (a-d,h-p)、保護個体(e)、死体回収 (f,g). 幼若ガメトサイト (i)、マイクロガメトサイト (a,b,h,m-p)、マクロガメトサイト (c-f,j-l)および赤内型メロント (g). スケールバー : 10  $\mu$ m.

Fig. A1.2. Haemosporidian parasites from resident birds of Chichijima (Hemacolor®-stained). *Plasmodium elongatum* (a-d) and *Haemoproteus zosteropsis* (i-p) from mist-netted *Zosterops japonicus*; *Plasmodium relictum* from a rescued *Hypsipetes amaurotis* (e) and deceased *Monticola solitarius* (f,g); *Plasmodium* sp. from a mist-netted *Hypsipetes amaurotis* (h). Young gametocyte (i), microgametocytes (a,b,h,m-p), macrogametocytes (c-f,j-l) and erythrocytic meront (g). Scale-bar: 10  $\mu$ m.

表 A1.1. 小笠原諸島で採集した留鳥の詳細な PCR 結果.

Table A1.1. Detailed PCR results of resident birds sampled in Ogasawara archipelago.

島 Island	オガサワラ ノスリ <i>Buteo japonicus</i>	アカガシラ カラスバト <i>Columba janthina</i>	オガサワラヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis</i>		ハシナガウグイス <i>Horornis diphone</i>		”オガサワラ”メジロ <i>Zosterops japonicus</i>		トラツグミ <i>Zoothera aurea</i>		イソヒヨドリ <i>Monticola solitarius</i>		オガサワラカワラヒワ <i>Chloris kittlitzii</i>	
	陽性/個体 <sup>a</sup> pos/no.	陽性/個体 pos/no.	陽性/個体 pos/no.	系統 <sup>b</sup> lineages	陽性/個体 pos/no.	系統 lineages	陽性/個体 pos/no.	系統 lineages	陽性/個体 pos/no.	系統 lineages	陽性/個体 pos/no.	系統 lineages	陽性/個体 pos/no.	系統 lineages
父島 Chichijima	0/1	0/14	10/11	pGRW04 (1) pGRW06 (7) pCXPIP12 (2)	2/13	pGRW04 (1) pGRW06 (1)	99/140	pGRW04 (2) pGRW06 (93) pCXPIP12 (1) pMONTRI01 (2) hZOSJAP02 (16)	22/60	pGRW06 (16) IZOOLUN01 (2) IZOOAUR01 (1) IZOOAUR02 (1) 1 [co-infected] (2)	16/50	pGRW04 (8) pGRW06 (8)		
姉島 Anijima					0/1									
母島 Hahajima		0/1	1/3	pCXPIP12 (1)										
向島 Mukohjima			0/1				3/8	pGRW06 (3)	2/2	pGRW06 (2) IZOOAUR01 (1) IZOOAUR03 (1)			0/2	
姪島 Meijima					0/1		2/4	pGRW06 (1) hZOSJAP02 (1)					0/2	
妹島 Imotojima													0/2	
姉島 Anejima			1/1	pGRW06 (1)			3/5	pGRW06 (3)					2/4	pGRW06 (2)
合計 Total	0/1	0/15	12/16		2/15		107/157		24/62		16/50		2/10	

<sup>a</sup> 陽性/個体: 陽性数/個体数. pos/no.: positive samples/negative samples.

<sup>b</sup> 系統名はMalAviデータベースに従って示す. 括弧内は各系統の検出数を示す. Lineage names are given according to MalAvi database. Parentheses show the number per lineage.

表 A1.2. 父島および母島で保護または捕獲した鳥類から得られた塗抹標本の鏡検結果および PCR 結果との比較.

Table A1.2. Details on microscopy results of smears obtained from birds rescued or captured in Chichijima and Hahajima, with comparisons to PCR results.

鳥種 Bird species	塗抹 smears	陽性 positive	鏡検結果/PCR結果( 个体数) microscopy results / PCR results (number)
オガサワラヒヨドリ <i>Hypsipetes amaurotis squamiceps</i>	5	3	<i>P. elongatum</i> / pGRW06 (1) <i>P. relictum</i> / pGRW04 (1) unidentifiable / pCXPIP12 (1)
ハシナガウグイス <i>Horornis diphone diphone</i>	3	0	
”オガサワラ”メジロ <i>Zosterops japonicus</i>	37	35	<i>P. elongatum</i> / pGRW06 (19) <i>P. elongatum</i> x <i>H. killangoi</i> / pGRW06 x hZOSJAP02 (9) <i>P. relictum</i> / pGRW04 (1) unidentifiable / pGRW06 (6)
トラツグミ <i>Zoothera aurea</i>	1	1	<i>P. elongatum</i> / pGRW06 (1)
イソヒヨドリ <i>Monticola solitarius</i>	3	2	<i>P. relictum</i> / pGRW04 (2)
シロハラミズナギドリ <i>Pterodroma hypoleuca</i>	1	0	
カツオドリ <i>Sula leucogaster</i>	1	0	
合計 Total	51	41	

付録 2 : 飼育下ペンギン類における *Haemoproteus* 属原虫に関する補足資料

表 A2.1. 混合感染サンプルの作製に用いた *Plasmodium* 属原虫のサンプル情報.

Table A2.1. Information on *Plasmodium* spp. samples used to prepare mixed-infections.

系統 Lineage	鳥種 Bird species	施設 Facility	孵化日 Date of hatching	採取日 Sampling date	感染強度 Intensity of parasitemia
pCXPIP09	マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	C水族館 Aquarium C	1997-05-20	2017-10-19	<1/10,000
pSGS1	マゼランペンギン <i>Spheniscus magellanicus</i>	C水族館 Aquarium C	2003-05-24	2017-10-19	<1/10,000
pNYCNYC02	フンボルト ペンギン <i>Spheniscus humboldti</i>	D水族館 Aquarium D	2002-04-29	2016-02-04	<1/10,000