

令和 5 年 4 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04319

研究課題名(和文)ニホンライチョウ寄生原虫の寒冷地共生進化経路の解明と保全に向けた実践的病態解明

研究課題名(英文)Evolutional genetical analyses for consortism of protozoan parasites with Japanese rock ptarmigans at cold districts and evaluation of their pathogenicity toward conservation

研究代表者

松林 誠 (Matsubayashi, Makoto)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授

研究者番号：00321076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンライチョウは日本アルプスのみに生息する鳥類で、特別天然記念物である。しかし、その数は近年、激減している。生息域内のライチョウは高率にアイメリア原虫に感染している。本研究では、この原虫が寒冷地に適応していること、感染源は長期滞在する糞便汚染のある土壌である可能性を見出し、遺伝子学的に北欧のライチョウ亜種に寄生する種と同一または極めて近縁であることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絶滅危惧種であるニホンライチョウについて、各種保全活動が実施されている。しかし、未だレッドリストダウンには至っていない。野生下のライチョウはアイメリア原虫に高率に感染しているが、本研究ではその感染源や生態、そして遺伝子学的な進化経路等の一端を明らかにすることができた。これらの解析手法や知見を基に、保全に向けたさらなる解析が行えると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Japanese rock ptarmigans inhabit only at Japanese Alps and are specified as national special natural monument. Recently, the number of the birds is decreasing. Previously, it has been reported that the Japanese rock ptarmigans are frequently infected with Eimeria species as protozoan parasites. In the present study, we showed that these parasites could adapt to the environment of lower temperature, one of the origins for the infections might be soils contaminated with the parasites where the birds stayed for a long periods. Additionally, these parasites could be genetically identical or closely related to those of subspecies of rock ptarmigans inhabiting Northern Europe.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：ニホンライチョウ アイメリア 寒冷地 寄生 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニホンライチョウは我が国の特別天然記念物であり、日本アルプスのみに生息する草食性の高い鳥類である。その数は近年、激減しており、現在、絶滅危惧種に指定されている。生息域内および域外において保全活動が実施されているが、レッドリストダウンには至っていない。我々はこれまでの調査で、ニホンライチョウにはアイメリア原虫と呼ばれる寄生虫が、広範囲の生息地で高率に感染している可能性を報告した。一般には、このアイメリア原虫は主に消化管粘膜に寄生し、増殖することで知られている。そして、家畜等では比較的解析が進んでおり、アイメリア原虫に感染した動物は下痢や血便、増体不良等を呈するため、本原虫は畜産領域では重要な寄生虫として認識されている。感染した動物の糞便中には、消化管内で増殖した原虫が多量に含まれる。そして、外界のおおよそ 27 前後の適温下で成熟し、感染性を獲得する。その後、環境中で長期間、生存可能であり、これが新たな感染源となる。しかし、低温下では成熟せず、凍結すると死滅する。このアイメリア原虫は、一般には固有の動物に寄生する種がそれぞれ存在するとされる。これまでの我々の解析から、ライチョウに寄生する原虫は他種動物のものとは大きく異なり、寒冷地でも生存でき、環境およびライチョウ間でその生活環を維持していると推定される。また、本原虫がライチョウの減少の一因になっている可能性も想定される。しかし、ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫について、寒冷地での生存生態はもちろん、病原性や感染経路は不明である。

2. 研究の目的

保全活動を実施していく中で、アイメリア原虫の生息域内での感染経路を含む詳細な分布状況、さらに感染個体の健康状態を明らかにし、その対策を盛り込む必要がある。また、ライチョウと同じキジ目キジ科の鳥類には鶏や七面鳥等、家畜も数多く存在する。氷河期の遺存種であるライチョウのアイメリア原虫の分子系統解析により、その共生進化経路を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 北アルプスと中央アルプスでニホンライチョウの 4 家族を約 1 か月間、3 つのケージにて保護した。その間、親鳥および孵化した雛の糞便を採取し、経日的に原虫調査を実施すると共に健康状態を観察した。糞便検査は、まずは各 1g の便を蒸留水で懸濁し、金メッシュまたはガーゼで濾した。遠心後に上清を廃棄し、そこに比重約 1.2 のショ糖液を入れ、再度、遠心した。上層をループで回収して計測し、表層面のオーシスト数を定量した。また、ケージ内の原虫汚染状況を明らかにするため、ケージ内の 10 か所の土壌を採取し、検査に供した。土壌の検査は、3 ケージ内を格子状に 10 等分に区切り、そのうち 25cm² の面積の表層面、深さ 1-2cm の土壌を採取した。また、ケージ保護期間中には、おおよそ 2 時間程度、ライチョウの家族をケージから放鳥する。そのため、ケージの周辺の 7 か所の土壌を同様に採取した。検査は、10-80g の土壌を 0.05% Tween 水で懸濁し、金メッシュで濾過した。遠心沈殿後に上記と同じショ糖液を加えて遠心した後、上層の原虫を回収し、定量した。

(2) ケージ保護期間中に死亡した雛について、各臓器を採取し、10%緩衝ホルマリン水にて固定し、定法にしたがって、病理組織解析を行った。

(3) 高地寒冷地での体外における、原虫の成熟条件を検討するため、ニホンライチョウから採取したアイメリア原虫を使用し、15~25 にインキュベートし、経時的に形態を観察し成熟率を測定した。

(4) 生息域内での原虫の分布状況を調査するため、ニホンライチョウが生息可能である地域を選定し、その土壌 43 検体を採取した。採材方法および検査法は、上述と同様に実施した。

(5) 国内の鶏以外の鳥類について、アイメリア原虫の調査を実施した。キジ目キジ科の鳥類を中心に 3 属 6 科 16 種の鳥類の糞便を検査した。検査は、上述の方法にて行った。陽性検体については、ショ糖浮遊法により精製し、28 で 1 週間インキュベートすることで成熟させ、形態学的な解析を行った。遺伝子解析には、原虫 1 個を顕微鏡下で採取し、18S rRNA 遺伝子領域および cytochrome c oxidase subunit I (COI) の遺伝子領域の部分配列を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。決定後は、GenBank に登録されている他種鳥類由来のアイメリア原虫の配列を取得し、分子系統樹を作成して遺伝学的な位置づけを解析した。

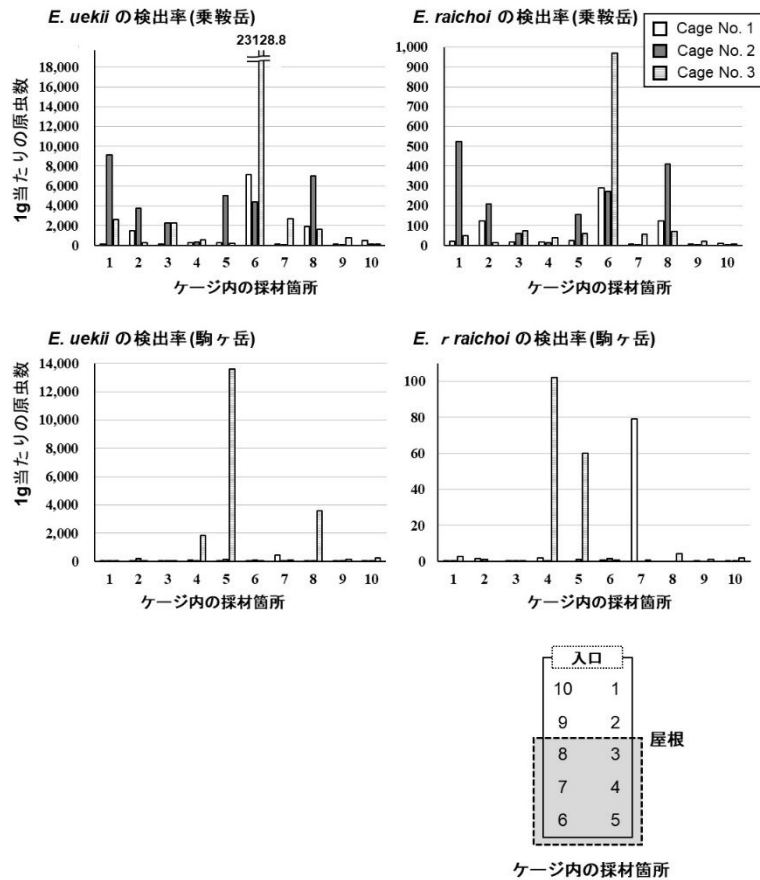
(6) 世界には 20 以上のライチョウ亜種が存在する。生息地域は、主に北欧やアメリカ北部等、北極圏を中心とする国々である。しかし、一部、日本アルプスのように高山帯に隔離された状態で生存し、進化した亜種も存在する。そこで、アイスランドとスバルバル諸島に生息するライ

チョウ亜種について、糞便を採取し、検査を実施した。検査は上述の方法と同様に実施した。陽性検体については、精製後に原虫1個を採取し、上述と同様の方法で遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1) ケージ保護期間中、5羽の雛の死亡が確認された。この家族の雛の糞便を経時的に検査した結果、採取した全ての糞便でアイメリア原虫の感染が確認された。1gの糞便あたりの平均原虫数はおおよそ $10^3 \sim 10^4$ 個であった。また、ケージ内の土壌について、原虫の汚染状況を調査した。その結果、全てのケージでアイメリア原虫が検出された。1gの土壌中に含まれる原虫数は、最大で 10^4 個を超えていた。ケージ内での汚染の程度は、ケージの奥側が最も多量の原虫が検出された(図1)。このエリアは、ライチョウの家族が寝床として使用しており、比較的、長時間滞在していた箇所になる。また、検出された原虫は形態的に変形等はなく、多くは既に成熟しており、感染性を保持していると考えられた。そのため、ケージ内の特に奥側は重度に汚染されていることが分かり、これが感染源となっている可能性が考えられた。また、日中の放鳥後に家族が散策するケージ周辺エリアの土壌からは、原虫は検出されなかった。したがって、野生下では、寝床等、比較的長時間、または繰り返し滞在する箇所において、直接または間接的な糞口経路により原虫が伝播している可能性があると考えられた。

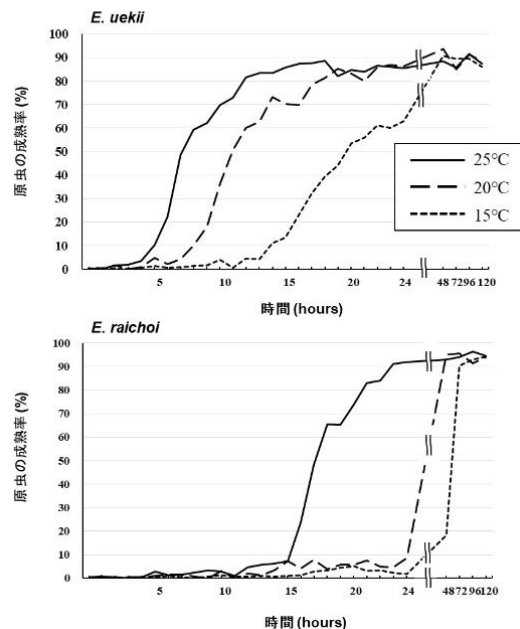
図1 ケージ内の土壌の原虫検査結果



(2) ケージ保護期間中に死亡した雛5羽中の4羽について、病理組織解析を実施した。生息域内で死亡したため、十分な固定ができず、凍結保存により死後融解が顕著であったが、うち2羽で多数の発育中の原虫が確認された。寄生部位は十二指腸から結腸と、消化管の全域に及んでいることが分かった。直接的な死因の同定には至らなかったが、原虫感染が死亡に関与した可能性は否定できなかった。

図2 ケージ内の土壌の原虫検査結果

(3) ニホンライチョウから採取したアイメリア原虫を使用し、15~25℃にインキュベートし、経時的に成熟率を測定した。その結果、15℃では20時間、20℃では11時間、25℃では8時間で50%以上の原虫が成熟できることが分かった(図2)。これらの結果は、ライチョウに寄生するアイメリア原虫は低温環境に適応し、糞便と共に排出された後、温度が低くても早期に成熟が可能であることが分かった。



(4) 餌となる高山植物が豊富に存在する地域を含め、ニホンライチョウが生息可能である地域を選定し、その土壌43検体を調査した。その結果、いずれの検体からもアイメリア原虫は検出されなかった。

(5) 国内の鶏以外の各種鳥類について、アイメリア原虫の調査を実施した。その結果、ニホンキジからのみアイメリア原虫が検出された。過去、

キジから報告されている原虫の形態と比較したところ、全9種のうち *E. tetartooimia* と類似することが分かった。18S rRNA および COI 遺伝子領域で部分塩基配列を決定し、系統樹を作製した。その結果、鶏に寄生する比較的病原性の低いアイメリア種と遺伝子学的に近縁であることが分かった。今回、検出されたキジは下痢等の臨床症状を呈していなかったため、病原性は低い可能性があると考えられた。

(6) アイスランドおよびスバルバル諸島のライチョウ亜種の便を採取し、検査した。その結果、いずれの地域からも楕円型および丸型の2種のアイメリア原虫が検出された。ニホンライチョウからも2種のタイプが検出されており、一つは楕円型である *E. uekii*、もう一つは丸型の *E. raichoi* である。これら3地域の原虫について、形態的に比較したところ、楕円型、丸型共に大きさ等、特徴がほぼ一致した。また、18S rRNA および COI 遺伝子領域で部分塩基配列を決定し、系統樹を作成した。その結果、アイスランドおよびスバルバル諸島の楕円型の原虫は *E. uekii* と遺伝子学的に同種であると考えられ、鶏に寄生するアイメリア種と近縁であることが分かった。また丸型の原虫に関しては、北欧間では同種と考えられたが、*E. raichoi* とは別のクラスターを形成し、七面鳥に寄生するアイメリア種と近縁であることが初めて分かった。今後、さらにキジ科鳥類のアイメリア原虫の配列データを蓄積する必要があるが、ライチョウが氷河期の遺存種であり、日本アルプスと北欧での原虫伝播が困難であること、鶏等の家畜はそれ以後に進化したことを考えると、極めて以前よりアイメリア原虫はライチョウに感染していた、または寄生適応した可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsubayashi M, Kobayashi A, Kaneko M, Kinoshita M, Tsuchida S, Shibahara T, Hasegawa M, Nakamura H, Sasai K, Ushida K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Distribution of <i>Eimeria uekii</i> and <i>Eimeria raichoi</i> in cage protection environments for the conservation of Japanese rock ptarmigans (<i>Lagopus muta japonica</i>) in the Japanese Alps.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Parasitol Parasites Wildl.	6. 最初と最後の頁 225-230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijppaw.2021.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsubayashi M, Takami K, Kinoshita M, Tsuchida S, Ushida K, Shibahara T, Sasai K.	4. 巻 120(8)
2. 論文標題 Morphological and molecular identification of <i>Eimeria tetartooimia</i> oocysts from a Japanese green pheasant (<i>Galliformes; Phasianidae; Phasianus versicolor</i>) at a zoo in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Res.	6. 最初と最後の頁 2973-2979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-021-07197-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsubayashi M, Kinoshita M, Kobayashi A, Tsuchida S, Shibahara T, Hasegawa M, Nakamura H, Sasai K, Ushida K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Parasitic development in intestines and oocyst shedding patterns for infection by <i>Eimeria uekii</i> and <i>Eimeria raichoi</i> in Japanese rock ptarmigans, <i>Lagopus muta japonica</i> , protected by cages in the Southern Japanese Alps.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Parasitol Parasites Wildl.	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijppaw.2020.04.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松林 誠、土田さやか、小林 篤、芝原友幸、中村浩志、村田浩一、牛田一成
2. 発表標題 ニホンライチョウに寄生するコクシジウムの寒冷地における生態および分子系統樹解析.
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松林 誠, 芝原 友幸
2. 発表標題 家禽や野生鳥類のアイメリア原虫とその病原性
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松林 誠
2. 発表標題 ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫の生態と病原性
3. 学会等名 第20回ライチョウ会議 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 楠田 哲士 (分担執筆; 松林誠, 牛田一成, 土田さやか, 小林篤他)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 288
3. 書名 神の鳥ライチョウの生態と保全	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	牛田 一成 (Ushida Kazunari) (50183017)	中部大学・応用生物学部・教授 (33910)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土田 さやか (Tsuchida Sayaka) (40734687)	中部大学・応用生物学部・講師 (33910)	
研究分担者	笹井 和美 (Sasai Kazumi) (70211935)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	
研究分担者	芝原 友幸 (Shibahara Tomoyuki) (00355207)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	小林 篤 (Kobayashi Atsushi) (30838917)	東邦大学・理学部・訪問研究員 (32661)	削除：2021年6月16日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アイスランド	University of Iceland	Icelandic Institute of Natural History	