科学研究費助成事業(科学研究費補助金)研究成果報告書

平成24年 5月9日現在

機関番号:32665 研究種目:基盤研究(C) 研究期間:2009~2011 課題番号:21580406

研究課題名(和文)吸血昆虫媒介性病原体の分布を指標とした環境モニタリングシステムの構築

研究課題名 (英文) Establishment of ecological monitoring system based on the prevalence of vector borne pathogens

研究代表者

佐藤 雪太 (SATO YUKITA)

日本大学・生物資源科学部・准教授 研究者番号:40271762

研究成果の概要(和文):

本研究では、鳥マラリアなどの鳥類のベクター媒介性感染症の病原体の分布様式を指標に、環境変化を生物学的に検出することを目的とした。その結果、国内各地で野鳥や飼育鳥類、ベクターとなる吸血昆虫における病原体保有状況を明らかにし、地域特異的な遺伝子型を持つ病原体を検出することができた。今後は指標となる病原体の分布状況を経時的に調査することにより、環境変化のモニタリングが可能になると考えられる。

研究成果の概要 (英文):

Biological detection of environmental effect by climate change was attempted by referring the prevalence of avian vector borne disease as biomarkers. Prevalence of pathogens was revealed among wild and captive birds and vector arthropods in Japan in detail and area specific genotypes of the pathogens were also found. Those specific genotypes can be markers and continued monitoring of the prevalence in those monitoring sites could contribute to detect some changes of environmental status.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1, 800, 000	540,000	2, 340, 000
2010年度	1, 300, 000	390, 000	1, 690, 000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3, 800, 000	1, 140, 000	4, 940, 000

研究分野:環境農学

科研費の分科・細目:境界農学・環境農学

キーワード:ベクター媒介性感染症、鳥マラリア、蚊、環境、血液寄生原虫

1. 研究開始当初の背景

昨今の地球規模の環境変化により、感染症の分布域にも変動が見られ、温暖化現象により、節足動物媒介性感染症の分布がかつて流行の見られなかった地域まで拡大しつつある。典型的な例として、アフリカ・ケニアにおいて、非流行地であった高原地域でヒトマ

ラリアの発生が報告されている (IPCC report, 2007)。マラリアは蚊によって媒介されるが、温暖化現象によって媒介蚊が生息可能な環境が標高の高い地域に拡大したことが原因とされている。このように、吸血性節足動物がベクターとなる感染症は、環境変化の影響を受けやすく流行地域が拡大する可能性が

あるため、現在の発生地周辺における宿主およびベクター動物の病原体保有状況の把握は非常に重要である。

動植物に対する地球温暖化の影響は日本に おいてもすでに散見されており、高山植物 (ハイマツ) の伸長速度上昇による植物群相 の撹乱の可能性(Wada et al., 2005)、さらには 蚊(ヒトスジシマカ)の分布限界の北上が観 測されている (Kobayashi et al., 2002 他)。特 にヒトスジシマカの分布限界の変化は、ケニ アにおけるマラリア流行地域の拡大を想起 させ、過去 50 年間で北関東から東北地方ま で生息限界が北上した蚊により、病原体の分 布が変化していった可能性は否定できない。 蚊は様々な病原体を伝播するが、日本では 日本脳炎ウイルス、鳥マラリア原虫、糸状虫 (フィラリア) などのベクターとして、コガ タアカイエカ、アカイエカ、ヒトスジシマカ などが知られている。国内ではヒトおよび動 物の存続に関わるベクター媒介性感染症の 影響は報告されていない。しかし近年、鳥類 およびヒトで致死的な経過をたどるウエス トナイル熱ウイルスによる感染被害が欧米 を中心に発生し、温暖化による媒介蚊の分布 の変化に伴い、このベクター媒介性ウイルス 感染症の拡大が世界的な驚異となった。ウエ ストナイル熱は現時点で北米アラスカ地方 や極東ロシアの鳥類に感染が認められ、国内 にはウイルスを媒介できる蚊が生息してい る。そのため、両地方から長距離移動するシ ギ・チドリなどの渡り鳥による日本への伝播 が危惧されており、国立感染症研究所や国立 環境研究所などが鳥類およびベクターにお けるウイルス保有状況のモニタリングに力 を注いでいる。

しかし、侵入の可能性のある病原体の検出 のみを行っていては、既存のベクターや病原 体の分布の変化を見落とすことになる。よっ て、すでに鳥類とベクターとの間で伝播が確 実に認められる病原体と調査地点を選定し て、定期的にモニタリングする体制を整えて おけば、同様の伝播様式を取るウエストナイ ル熱ウイルスのような外来性感染症の監視 も可能である。すなわち、病原体の保有状況 の変化を検出することにより間接的に環境 変化を検知し、外来の病原体も検出する極め て応用範囲の広い調査が可能であると考え た。

2. 研究の目的

環境要因、とりわけ気温の変動によって分布に影響を受ける蚊やブユなどの吸血昆虫

(ベクター)が媒介する鳥類の病原体(原虫:鳥マラリアおよびロイコチトゾーン、ウイルス:鶏痘ウイルス)について、国内の宿主鳥類およびベクターにおける保有状況を分子生物学的検出手法により定時監視するサイトを設定し、ベクター媒介性感染症の分布域の変化をモニタリングすることにより環境変化を生物学的に検出するシステムの構築を目的とする。

3. 研究の方法

鳥類のベクター媒介性原虫およびウイルス感染症の国内におけるモニタリングサイト選定のため、候補地における感染サイクルを解明する。すなわち、病原体保有鳥種および媒介昆虫種を特定するため、これまでに我々が確立した手法を用いて宿主鳥類およびベクターにおける病原体の検出を行う。次いで、病原体の遺伝子解析を行い、モニタリングサイトにおける病原体が、どのようなに伝子型から構成されているのかを明らかにして、今後の病原体分布状況の変化を検知できる体制を整える。

これまでの研究成果により、鳥類のベクター媒介性原虫またはウイルスが確認されているモニタリングサイト候補地において、研究協力者と共に野鳥の捕獲調査、吸血昆虫の採集、病原体の遺伝子検出および系統解析を行い、次年度以降定期的に調査可能なサイトを設定する。すなわち、北と南のラインと垂直分布(標高差)ラインを設定し、鳥類およびベクター昆虫における病原体分布状況を明らかにする。検出対象病原体は原虫3属

(Plasmodium、Haemoproteus および Leucocytozoon) と、ウイルス2種(鳥ポックスウイルスおよびウエストナイル熱ウイルス)とし、これまで確立した手法を応用して鳥類およびベクターからの病原体検出を試みる。

4. 研究成果

(1) 隔離された島嶼生態系に生息する鳥類および媒介昆虫における血液原虫の保有状況の解明

南のモニタリングサイトとして、隔離された島嶼生態系を持つ沖縄県南大東島を 選定し、鳥類および媒介昆虫における血液 原虫の保有状況を調査した。

野鳥を捕獲して採血し、蚊捕集トラップおよびスイーピングにより鳥マラリア原虫ベクター候補蚊の採取を行った。鳥類の血液は薄層塗沫染色標本作成または DNA抽出を行い、採取した蚊は種の同定後に採取時期および種類ごとに 1~5 匹程度をプ

ールして DNA 抽出を行った。次いで、鳥マラリア原虫 mtDNA cytb 遺伝子を標的に nested PCR を行った。増幅が見られた場合は塩基配列を決定し、既知の各種鳥マラリア原虫の配列と比較して類縁関係を推定した。

血液塗沫観察により、モズ、ダイトウメ ジロおよびスズメに鳥マラリア原虫を認 め、感染率はモズで 24.0% (100/416)、ダ イトウメジロで 47.1% (24/51) およびス ズメで 5% (1/20) であった。採集した蚊 1,264 個体からは、9種の蚊が同定され大 半はネッタイイエカ(84.5%)であった。 PCR により、ネッタイイエカ (11/978: 1.1%)、サキジロカクイカ(1/4; 25%)、ヒ トスジシマカ(1/47;2.1%) およびキンイ ロヌマカの一種(1/20:5%)から鳥マラリ ア原虫遺伝子の増幅が見られた。また、塩 基配列比較により、モズ、ヒトスジシマカ およびサキジロカクイカから検出された 鳥マラリア原虫は遺伝学的に同一である ことが示唆された。さらに、他のネッタイ イエカおよびキンイロヌマカの一種から、 各種鳥マラリア原虫に近縁な配列が増幅 された。

以上から、南大東島では宿主動物である モズが鳥マラリア原虫に比較的高率に感 染しており、ヒトスジシマカ、サキジロカ クイカ、ネッタイイエカおよびキンイロヌ マカの一種が病原体のベクターである可 能性が示唆された。

(2) 日本アルプスに生息するライチョウにおける Leucocytozoon 属原虫およびベクター 昆虫種における原虫保有状況および感染サイクルの解明

標高差を考慮したモニタリングサイトとして、日本アルプス山系に生息する特別天然記念物であるライチョウのロイコチトゾーン(Leucocytozoon)属原虫について、宿主鳥類およびベクター昆虫種の同定および原虫保有状況を検討した。

ライチョウの血液は常法により薄層塗 沫染色標本作成または DNA 抽出を行い、 採取したブユは種の同定後に個別に解剖 して DNA 抽出を行った。次いで、ロイコ チトゾーン属原虫 mtDNA cytb 遺伝子を標 的に、ライチョウおよびブユから抽出した DNA を用いて nested PCR を行った。 さら に、ブユが吸血していた動物種も、同様に 抽出 DNA から鳥類の mtDNA cytb 遺伝子 増幅を試みた。 増幅が見られた場合は塩基 配列を決定し、既知の各種鳥類血液原虫の 配列や日本アルプスに生息する野生鳥類 の配列と比較して類縁関係を推定した。

ライチョウの血液塗沫中にロイコチト ゾーン原虫が認められ、感染率は 78.1%で あった。PCR により増幅された配列はい ずれも同一で、形態学的に Leucocytozoon lovati と推定された。系統樹解析では、L. lovati は鳥マラリア原虫グループ

(Plasmodium や Hemoproteus)とは異なり、既報のロイコチトゾーン原虫グループに含まれた。ブユは6種に分類され、うちアシマダラブユ、ウチダツノマユブユおよびオオブユから、ライチョウが保有するロイコチトゾーン原虫 (L. lovati) と同一の塩基配列が検出された (1.6%)また、複数のブユから鳥類の遺伝子が増幅され、ライチョウと同一の配列も認められた。以上から、ライチョウはロイコチトゾーン属原虫に比較的高率に感染していること、各種ブユが病原体を保有し、さらにライチョウを吸血していることが示唆され、病原体 (L. lovati)、宿主鳥類(ライチョウ)およびベクター(ブユ類)の種類が明らかになった。

ライチョウの生息域は地球温暖化の影響により年々縮小していると考えられるため、今後ベクター分布域の変化が起こった場合、新たな病原体の侵入や、原虫感染濃度の上昇が宿主動物に影響を及ぼすことが想定される。よって、今後も感染サイクル全体のモニタリングが重要であると考えられた。

(3) 高標高地の森林地帯に生息する野生鳥類 における原虫感染状況の解明

日本アルプス以外の標高差のモニタリングサイトとして、埼玉県内で定期的に生態調査が行われている高標高地において、野島の血液寄生原虫感染状況を検討した。

埼玉県秩父市の東京大学付属秩父演習林(標高 1650m付近)において、霞網で捕獲したスズメ目鳥類 14 種 134 羽から採血した。血液塗沫による形態学的検索および nested-PCR 法による鳥類血液原虫 DNAの検出により、原虫の有無および分子系統を解析した。

鳥類の原虫感染率は18.7%で、内訳は Plasmodium 属原虫が3.7%、Leucocytozoon 属原虫が14.9%であった。鳥種別の感染率は、コガラが50%(2/4羽)、ヒガラが83.3%(5/6羽)、マミジロが100%(2/2羽)と 比較的高率であった。これまで南西諸島の 鳥類などで40%を越える原虫感染が認められているが、関東圏の森林でも高い感染率を維持する何らかの生態的メカニズムがあると推察される。また、ベクターとなるブユ類の生息が認められたが原虫保有状況は不明である。今後も調査を継続し、森林環境における鳥類と血液寄生原虫の相互関係について明らかにしていくことにより、病原体による宿主動物の行動制御についての考察が可能になると期待される。

(4) 国内に生息する媒介蚊における鳥マラ リア原虫保有状況および吸血行動の解明

これまで国内各地の鳥類およびベクター 昆虫から、鳥マラリア原虫などの血液寄生 原虫類の保有状況および伝播サイクルを解 明してきたが、特に媒介生物である蚊に注 目し、国内における鳥マラリア原虫保有状 況および吸血行動を総合的に検討した。

北海道、秋田県、東京都、神奈川県および沖縄県で野外または公園、動物園等で蚊を捕集して DNA を抽出し、nested-PCR により原虫保有状況を明らかにし、原虫系統、原虫保有蚊の種類および捕集地域との相関を検討した。さらに、吸血していた蚊から脊椎動物の DNA 増幅を試み、吸血源動物種を同定した。

(5)総括

本研究課題では、国内各地のモニタリングサイトで、野鳥とベクター昆虫類におけると病原体保有状況を検討し、鳥マラリア原虫の多くの系統が伝播・維持されていることが明らかになった。今後の環境変化により、ベクターとなる吸血性節足動物の分布域や発生個体数も変化した場合、媒介される感染症の

発生地域や、感染個体数が変化する可能性がある。さらに、蚊は鳥マラリア以外にもウエストナイル熱やデング熱など、国内でまだだ、生が見られていない感染症を媒介するため、モニタリングを継続することにより、地球になどで影響を受けるこれら節足動物媒介性感染症の侵入監視に役立つ重要な知見が得られると期待される。よって、今後も病原体の遺伝情報(DNA)を目印として、野生動物とヒトを含む生態系全体の健康を考に、国内各地における鳥マラリアなどの節足動物媒介性感染症のモニタリングを継続していくことが重要であると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

〔雜誌論文〕(計 18件) *Corresponding author

- ① Imura T, Suzuki Y, Ejiri H, <u>Sato Y*</u>, Ishida K, Sumiyama D, <u>Murata K</u>, Yukawa M. Prevalence of avian haematozoa in wild birds in a high-altitude forest in Japan. Vet Parasitol. 183(3-4):244-8, 2012. 查読有
- ② Ejiri H, Sato Y*, Kim KS, Tamashiro M, Tsuda Y, Toma T, Miyagi I, Murata K, Yukawa M. First record of avian Plasmodium DNA from mosquitoes collected in the Yaeyama Archipelago, southwestern border of Japan. J Vet Med Sci. 73(11): 1521-1525, 2011. 查読有
- 佐藤雪太* 保全医学におけるモデル生物 一鳥マラリアを例に一. アニテックス 23(3):35-39. 2011. 査読無 (invited review)
- ④ Yamauchi T*, Tsuda Y, <u>Sato Y</u>, <u>Murata</u>
 <u>K</u>. Pigeon louse fly, Pseudolynchia canariensis (Diptera:Hippoboscidae) collected by dry ice trap. J Am Mosquito Control Assoc. 27(4):441-3, 2011. 查読有
- ⑤ Ejiri H, Sato Y*, Kim KS, Hara T, Tsuda Y, Murata K, Saito K, Watanabe Y, Shimura Y, Yukawa M. Blood-meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro Wetland, a subarctic zone of Japan. J Med Entomol. 48(4):904-908, 2011. 查読有

- ⑥ Ejiri H, Sato Y*, Kim KS, Hara T, Tsuda Y, Imura T, Murata K, Yukawa M.
 Entomological study on transmission of avian malaria parasites in a zoological garden in Japan:
 Blood-meal identification and detection of avian malaria parasite DNA from blood-fed mosquitoes. J Med Entomol. 48(3):600-607, 2011. 查読有
- で 佐藤雪太* 環境および生態系の保全指標としての鳥類原虫感染症. 獣医畜産新報. 64:15-20, 2011. 査読無(invited review)
- ® Omori S, <u>Sato Y*</u>, Toda H, Sasaki K, Isobe T, Nakanishi T, <u>Murata K</u>, Yukawa M. Use of flow cytometry to separate Leucocytozoon caulleryi from avian blood. Parasitol. 137:1899-1903, 2010. 查読有
- (9) 大森澄枝、佐藤雪太*、戸田秀明、佐々木一枝、磯部尚、中西照幸、村田浩一、湯川眞嘉. フローサイトメトリー法による Leucocytozoon caulleryi ガメトサイト分離の試み. Jap J Vet Parasitol. 9(1):65, 2010. 査読無
- ⑩ 寺内宏光、平野文哉、石川智史、<u>佐藤雪</u> <u>太*</u>、加藤千晴、福富 潤、炭山大輔、<u>村</u> 田浩一、湯川眞嘉. 神奈川県内で保護さ れた野鳥における住血原虫保有状況お よび分子系統. Jap J Vet Parasitol. 9(1):62, 2010. 査読無
- ① 平野文哉、<u>佐藤雪太*</u>、寺内宏光、進藤順治、<u>村田浩一</u>、湯川眞嘉. 青森県の野島における *Leucocytozoon* 属原虫の保有状況および分子系統解析. Jap J Vet Parasitol. 9(1):54, 2010. 査読無
- ① 飯川理永、**佐藤雪太***、原田紗希、松本 淳、 野上貞雄、肴倉孝明、<u>村田浩一</u>、高岡宏 行、湯川眞嘉. 白馬乗鞍岳および御嶽山 のブユにおけるフィラリア保有状況と 分子系統. Jap J Vet Parasitol. 9(1):64, 2010. 査読無
- ① 江尻寛子、**佐藤雪太***、津田良夫、<u>村田</u> <u>浩一</u>、原 樹子、湯川眞嘉. 動物園の特 性を活かした鳥マラリアの感染生態調 査. Jap J Vet Parasitol. 9(1):59, 2010. 査読無
- 佐藤雪太*、吉田千紘、原田紗希、松本 淳、野上貞雄、村田浩一、高岡宏行、湯川眞嘉. 日本アルプスに生息するブユにおけるフィラリア保有状況. Jap J Vet Parasitol. 8(2):110, 2010. 査読無
- 15 Imura T, Sato Y*, Ejiri H, Tamada A,

- Isawa H, Sawabe K, Omori S, <u>Murata K</u>, Yukawa M. Molecular identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. Parasitol Res. 106(2):543-7, 2010. 查読有
- Tsuda Y*, Matsui S, Saito A, Akatani K, <u>Sato Y</u>, Takagi M, <u>Murata K</u>. Ecological study of avian malaria vectors on the island of Minami-Daito, Japan. J Am Mosquito Control Assoc. 25(3):279-84, 2009. 查読有
- ① Ejiri H, <u>Sato Y*</u>, Sawai R, Sasaki E, Matsumoto R, Ueda M, Higa Y, Tsuda Y, Omori S, <u>Murata K</u>, Yukawa M. Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. Parasitol Res. 105(3):629-33, 2009. 查読有
- (18) 佐藤雪太* ペンギンのマラリア 獣医 畜産新報 62(7):563-568, 2009. 査読無 (invited review)

[学会発表] (計 28 件) (主なものに限定)

- 江尻寛子、佐藤雪太、津田良夫、村田浩一、湯川眞嘉国内における鳥マラリアの感染サイクルに関する研究。第153回日本獣医学会学術集会プレナリーセッション(大会長賞・獣医学奨励賞受賞)。2012年3月27日大宮ソニックシティ
- ② 谷川ももこ、江尻寛子、千葉 礼、佐藤 雪太、山本英恵、川口 誠、村田浩一、 湯川眞嘉. 長崎県対馬におけるベクタ 一媒介性感染症に関する調査. 第153回 日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月 28 日 大宮ソニックシティ
- ③ 高須愛子、**佐藤雪太**、井村貴之、炭山大輔、<u>村田浩一</u>、湯川眞嘉. 国内の飼育下ペンギンにおける鳥マラリア感染について. 第153回 日本獣医学会学術集会. 2012年3月28日 大宮ソニックシティ
- ④ <u>Sato Y</u> (招待講演). Prevalence of avian Plasmodium and other bird haemosporidia in Japan. Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011(II). 2011 年 11 月 17 日 長崎大学熱帯医学研究所
- 事村貴之、鈴木優佳、佐藤雪太、江尻寛子、石田健、炭山大輔、村田浩一、湯川眞嘉.野鳥における血液寄生原虫感染の経年モニタリング第152回日本獣医学会学術集会2011年9月20日大阪府立大学
- ⑥ <u>Sato Y</u> (招 待 講 演). Avian

haemoprotozoa: application of the genomics to the filed surveillance. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress. 2011年9月8日 札幌コンベンションセンター

- ② Ejiri H, <u>Sato Y</u>, Kim K, Tsuda Y, <u>Murata K</u>, Yukawa M. Prevalence of avian *Plasmodium* in vector mosquitoes of Japan. International Meeting on Malaria and related Haemosporidian parasites of Wildlife. National Conservation Training Center, West Virginia, USA. 2011年8月6日
- 图 Ejiri H, <u>Sato Y</u>., Kim KS, Hara T, Tsuda Y, Imura T, <u>Murata K</u>, Yukawa M. Analysis of blood-fed mosquitoes can reveal the prevalence of avian malaria not only in vectors but also in host birds. XIIth International Congress of Parasitology (ICOPA), Melbourne, Australia. 2010 年 8 月 17 日
- 9 佐藤雪太(招待講演).環境および生態系保全指標としての鳥類住血原虫感染症.第149回日本獣医学会学術集会 日本野生動物医学会シンポジウム 日本獣医生命科学大学.2010年3月27日
- ⑩ 寺内宏光、平野文哉、石川智史、<u>佐藤雪</u>太、加藤千晴、福富 潤、炭山大輔、<u>村</u>田浩一、湯川眞嘉. 神奈川県内で保護された野鳥における住血原虫保有状況および分子系統. 第149回日本獣医学会学術集会(ベストプレゼンテーション賞受賞). 日本獣医生命科学大学. 2010年3月27日
- ① **佐藤雪太**、吉田千紘、原田紗希、松本 淳、野上貞雄、<u>村田浩一</u>、高岡宏行、湯川眞嘉. 日本アルプスに生息するブユにおけるフィラリア保有状況. 第148回日本獣医学会学術集会. 鳥取大学. 2009 年 9月26日
- ① 井村貴之、<u>佐藤雪太</u>、沢辺京子、津田良夫、<u>村田浩一</u>、湯川眞嘉. 鳥類血液原虫のベクター昆虫における吸血源動物の探索. 第 147 回日本獣医学会学術集会. JRA 総合研究所. 2009 年 4 月 3 日
- 6. 研究組織
- (1)研究代表者

佐藤 雪太 (SATO YUKITA) 日本大学・生物資源科学部・准教授 研究者番号: 40271762

(2)研究分担者

村田 浩一 (MURATA KOICHI) 日本大学・生物資源科学部・教授 研究者番号: 00339285 (3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

津田 良夫(TSUDA YOSHIO) 国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長 沢辺 京子(SAWABE KYOKO) 国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長 齊藤 慶輔(SAITO KEISUKE) 猛禽類医学研究所・代表 志村 良治 (SHIMURA RYOUJI) 釧路市動物園・副園長・獣医師 肴倉 孝明(SAKANAKURA TAKAAKI) 山岳環境研究所·理事 松井 晋 (MATSUI SHIN) 大阪市立大学・理学研究科・大学院生 大森 澄枝(OMORI SUMIE) 日本大学・生物資源科学部・大学院生・JSPS 特別研究員 DC1 江尻 寛子 (EJIRI HIROKO) 日本大学·生物資源科学部·大学院生·JSPS 特別研究員 DC2 井村 貴之(IMURA TAKAYUKI) 日本大学·生物資源科学部·大学院生·JSPS 特別研究員 DC1