

学 位 論 文 要 旨

氏名 CHU THI THANH HUONG

題 目 : Genetic diversity of poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) in Japan and prevalence of their avian pathogens

(日本国内におけるワクモ (*Dermanyssus gallinae*) の遺伝的多様性と病原体保有状況)

論文要旨 :

Dermanyssus gallinae, poultry red mite (PRM), was first described by De Geer in 1778. It is a blood-feeding arthropod parasite belonging to the subclass Acari, superorder parasitiformes, order Mesostigmata (Gamasida), in the family Dermanyssidae. PRM is distributed throughout the world including Europe, Africa, North and South America, Australia and Asia including Japan. It is a significant pest to laying hens. It is less than 1.5mm in length and can rapidly propagate in poultry houses. It causes a decline in egg quality and egg production, anemia and even death. It is also a potential vector of infectious diseases. Phylogenetic analyses of European PRMs suggest that they are transmitted among different countries, raising the possibility that some pathogens may be spread with them. Similar phylogenetic studies, which are essential for epidemiological studies, have not been conducted in Asian countries. In addition, a comprehensive study of the distribution of avian pathogens in PRM has not been conducted. In the present study, the phylogenetic and genetic diversity of mites distributed in Japan and other countries were examined. Furthermore, detection of several avian pathogens from the mite was attempted to assess the risk of transmission of infectious diseases by the mites.

To define the genetic diversities of the mite in Japan, 239 mite samples were collected during 2005 to 2012 from 40 prefectures throughout Japan. The nucleotide sequences of a part of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) and 16S rRNA genes and nuclear internal transcribed spacers (ITS) region obtained from these samples were determined. The COI and 16S rRNA sequences were classified into 28 and 26 haplotypes, respectively. In phylogenetic trees, the haplotypes clustered into 2 haplogroups corresponding to haplogroups A and B, which were previously reported. Haplogroups A and B were further subdivided into sub-haplogroups AJ1 and AJ2, and BJ1 and BJ2, respectively. In both trees, the sequences of haplotypes in AJ1 and BJ2 were relatively distant from those reported in other countries, while some sequences in AJ2 and BJ1 were identical to those in Europe. The ITS sequences were classified into two sequences, and both sequences were closely related to sequences found in European countries. Although

the ITS sequences of some samples were different from each other, their haplotypes were the same. These results show that *D. gallinae* in Japan were genetically diverse, and raise the possibility of overseas transmission of *D. gallinae* between Europe and Japan. In addition, detection of different sequences of nuclear ITS region from the mites classified into same haplotype based on the mitochondrial genes suggests that a hybridization event occurred between different haplotypes of the mites in Japan.

To define the prevalence of avian infectious agents in the mite, 159 mite samples collected from 2004 to 2012 from 142 chicken farms in 38 prefectures were examined. Polymerase chain reactions (PCR) were conducted to check for the presence of seven pathogens (Avipox virus (APV), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (ER), *Salmonella enterica* (SE), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), Fowl Adenovirus (FAdV) and Marek's disease virus (MDV)). Because live vaccines against APV, MS and MG were used in Japan, additional PCR or sequence analyses were done to distinguish wild-type pathogens from the live vaccines. Of the 159 PRM samples, APV DNA was detected in 22 samples (13.8%), 19 of which were wild-type APV. Furthermore, MS DNA was detected in 15 samples (9.4%) and the MG DNA was detected in 2 samples (1.3%). Eight of 15 MS 16S rRNA sequences differed from the vaccine sequence, indicating they were wild-type strains, while both of the MG gene sequences detected were identical to the vaccine sequences. Of these avian pathogen-positive mite samples, six were positive for both APV and MS. Four of the 22 APV-positive mite samples and 2 of 15 MS-positive samples remained positive after being washed, indicating that the mites can harbor the pathogens internally. The DNAs of ER, SE, FAdV and MDV were not detected in any samples. These findings indicate that *D. gallinae* in Japan is contaminated with wild-type APV and MS and might play a role as a vector in spreading these diseases in farms.

The present results indicate the possibility of overseas transmission of *D. gallinae*. In addition, wild-type APV and MS DNAs were detected in the mite in Japan. Although the infectivities of these pathogens detected in the mites were not confirmed, these findings imply that PRM contributes to the spread of avian pathogens worldwide. For a comprehensive understanding about a role of *D. gallinae* in distributing infectious diseases around the world, further worldwide epidemiological studies will be needed.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	CHU THI THANH HUONG
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 教授 山口 剛士
	副 査：鳥取大学 教授 伊藤 壽啓
	副 査：鹿児島大学 准教授 田仲 哲也
	副 査：鳥取大学 准教授 伊藤 啓史
	副 査：鳥取大学 講師 笛吹 達史
題 目	Genetic diversity of poultry red mites (<i>Dermanyssus gallinae</i>) in Japan and prevalence of their avian pathogens (日本国内におけるワクモ (<i>Dermanyssus gallinae</i>) の遺伝的多様性と病原体保有状況)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ワクモ (<i>Dermanyssus gallinae</i>) は吸血性の外部寄生虫で、ダニ目、中気門亜目、ワクモ科、ワクモ属に分類される。ワクモは、日本を含む世界各地に分布し、特に採卵鶏での寄生が問題になっている。鶏はワクモ寄生により産卵率や卵質の低下、貧血を呈し、寄生による死亡例も報告されている。ワクモはまた、病原微生物のベクターとしても知られている。これまでに報告されているワクモの分子系統解析では、ヨーロッパ各国間でのワクモの広がりが見られ、ワクモが媒介する病原微生物の国際的拡散の可能性が危惧されている。一方、アジア地域ではワクモの分子系統解析はこれまで全く行われておらずワクモの遺伝的多様性や他の国や地域との遺伝的関連は明らかにされていない。また、ワクモの病原体保有状況についてもこれまで包括的な調査・研究は無く、その実態は不明である。そこで申請者は、日本全国で採取されたワクモについて複数遺伝子の配列を明らかにし分子系統解析を行った。またワクモから病原微生物の遺伝子検出を行い、その実態解明を試みた。</p> <p>日本国内に分布するワクモの遺伝的多様性解析には、2005 年から 2012 年に全国 40 道府県で採取したワクモ 239 検体を用いた。ミトコンドリア DNA のシトクロームオキシダーゼ I (COI) および 16S rRNA と核リボソーム DNA の内部転写スペーサー領域 (ITS) の一部をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅後、塩基配列を解読した。COI および 16S rRNA 配列は、塩基配列が同一の場合に同一ハプロタイプとした。その結果、国内のワクモは少なくとも COI 遺伝子で 28、16S rRNA</p>	

で 26 のハプロタイプがあることが示された。分子系統解析では、両遺伝子ともハプロタイプが 2 つの群 (ハプログループ) に分かれることが示され、それらは国外のワクモで報告されているハプログループ A および B に一致した。ハプログループ A および B に属する各ハプロタイプは、それぞれさらに 2 つのサブハプログループ (AJ1 および AJ2 と BJ1 および BJ2) に分かれ、日本国内に分布するワクモの遺伝的多様性が明らかにされた。また国内で検出された各ハプロタイプの配列と他国で検出された既報配列との比較で、サブハプログループ AJ1 および BJ2 に属するハプロタイプの配列が他国で検出されたいずれの配列とも異なること、また、AJ2 および BJ1 に属するハプロタイプの配列にはヨーロッパで採取されたワクモと同一の配列が認められることを明らかにし、これらがヨーロッパのワクモと遺伝的に関係のあることを示した。ITS 領域の配列解析では、解読した 33 配列が 2 種の配列から成り、いずれもヨーロッパで検出された配列と近縁であることが示された。また、ミトコンドリア DNA 由来の COI および 16S rRNA でハプロタイプが同一のワクモは、核リボソーム DNA の ITS 領域配列も同一であったが、ハプロタイプが同一で ITS 領域の配列が異なるワクモが 4 例に認められたことを示し、異なるハプロタイプ間で交雑があった可能性を示唆した。

次に申請者は、2004年から2012年に国内38道府県で採取した159検体を用い、PCR法により7種の病原体 (*Avipox virus* (APV), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (ER), *Salmonella enterica* (SE), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), Fowl Adenovirus (FAdV) および Marek's disease virus (MDV)) の遺伝子検索を行った。国内で生ワクチンが使用されている APV、MS および MG は、遺伝子が検出された場合、生ワクチンと野外株の型別を行った。検索した 159 検体のうち、APV 遺伝子が 22 検体 (13.8%) から検出され、21 検体が野外株であることが示された。また、MS 遺伝子が 15 検体 (9.4%)、MG 遺伝子が 2 検体 (1.3%) から検出され、MS 遺伝子 15 例のうち 8 例が野外株、MG 遺伝子 2 例はいずれも生ワクチンであることが示された。ER、SE、FAdV および MDV の配列は検出されなかった。病原体遺伝子が検出されたワクモ 6 検体は同一検体から APV および MS 遺伝子が検出され、ワクモが複数の病原微生物を伝播する可能性が明らかにされた。また、APV 遺伝子陽性 22 検体のうち 3 検体は、ワクモ虫体を洗浄後に調製した DNA から APV 遺伝子が検出され、APV がワクモ内部に存在する可能性を示した。ワクモからの MS および MG 遺伝子の検出はこれまで報告が無く、ワクモによる伝播の可能性を初めて明らかにした。

国内ワクモと海外に分布するワクモの遺伝的関連性や病原体の保有状況を明らかにした本研究は、ワクモの国際的な広がりの実態とワクモによる病原微生物の国際的な伝播の可能性を示唆し、ワクモの国際的制御の重要性を明らかにした。これらの成績は、ワクモ防除における疫学上極めて重要な情報を提供し、今後の国際的なワクモ防除の確立に寄与するものと考えられた。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を受けるにふさわしいものと判断された。