

Abstract of Doctoral Thesis

Name: Imron Rosyadi

Title: Phylogenetic study of hemoparasites in domestic and wildlife animals with special reference to avian and chiropteran hemosporidians and ruminant trypanosomes

(家畜および野生動物に寄生する住血原虫類の分子系統学的研究
—特に家禽とコウモリに寄生する住血胞子虫類および反芻動物トリパノソーマに
注目して—)

Abstract of thesis:

Hemoparasites live in the bloodstreams of mammals, including humans, and depending on the species or strains of the pathogen, they can cause an acute illness with a wide range of symptoms. Several hemoparasitic illnesses and associated vectors continue to pose the greatest risks to the health of domestic and wild animals, which result in significant population and financial losses. The accurate identification of a disease-causing pathogen is crucial for comprehending disease transmission in the nature. Hemoparasite identification of intra-erythrocytic protozoa (Apicomplexa: Haemosporidia) in avian and chiropteran and flagellate protozoa (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in ruminants is still solely based on morphological characterization. Recently, molecular techniques have identified more precisely or finely the species, cryptic species, and additional genotypes or lineages for hemoparasites transmission in nature. In the present study, I have endeavored to understand the diversity of avian and chiropteran hemosporidians and ruminant trypanosomes in animals with natural infection.

In Chapter I, I studied an avian hemosporidian of the genus *Haemoproteus* (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae). Members of the genus are found worldwide in domestic and wild birds from various families with almost identical features. It is also generally suggested that this genus have limited pathogenicity and no veterinary relevance. To investigate this problem, I characterized morphologically and genetically pigeon haemoproteosis in farmed domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica* Gmelin, 1789) from Indonesia, with special references to hemogram analysis. In this study, we demonstrated for the first time a high prevalence of *Haemoproteus* infection with high degrees of coexistence of immature and mature gametocytes, indicating a chronic infection phase with repeated relapse and/or reinfection, in farmed domestic pigeons from Yogyakarta, Central Java. The morphology and measurements of parasite were identical to *Haemoproteus columbae* Kruse, 1890, distributed worldwide. The cytochrome *b* gene (*cytb*) of our isolates

exhibited four lineages that are prevalent in *H. columbae* lineages recorded worldwide. Our findings also demonstrated negative impact of subclinical *H. columbae* infection on the hemogram health of pigeons.

In Chapter II, I studied morphology and genetic diversity of bat hemosporidian parasites of the genus *Polychromophilus* Dionisi, 1899 (Haemosporidia: Haemoproteidae) in four bat species from Yamaguchi Prefecture, Japan. This study is the first to report the isolation and molecular characterization of two hemosporidian species of the genus *Polychromophilus* in bats distributed in Asian temperate region. *Polychromophilus melanipherus* from Japan is restricted to bats of the family Miniopteridae family in which gametocytes were dominant, and *Polychromophilus murinus* is limited to the family Vespertilionidae in which trophozoites were dominant. Host specificities of these two species correspond to previous studies on bats from Gabon, Madagascar, Europe, and Australia. The 15 *Polychromophilus cytb* sequences from 11 miniopterid and 4 vespertilionid bats were categorized into six haplotypes (three for each species), with no region-specific variation in the Old World. Multiple haplotypes (seven for cytochrome *c* oxidase subunit I (*cox-1*) and nine for apicoplast caseinolytic protease *c* (*clpc*)) and genotypes (three for nuclear elongation factor 2 (EF2)) were defined for Japanese *Polychromophilus* isolates, and the findings were compatible with hemosporidian *cytb* analyses. Our finding also identified bat flies of the genus *Nycteribia* as a potential invertebrate vector of *P. melanipherus*.

In Chapter III, I studied morphologically and genetically the cervid *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Honshu sika deer (*Cervus nippon*) from Japan. Seven genotypes of ruminant Megatrypanum-type trypanosomes were characterized based on the putative secondary structure of the hair-pin loop of the 18S ribosomal RNA gene (rDNA) hypervariable region. Of *T. theileri* and ruminant Megatrypanum-type trypanosomes, internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences were grouped into 10 major groups. The phylogenetic relationships of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH), cathepsin L-like cysteine protease (CatL-like) and spliced leader RNA (SL) gene is almost similar to those observed based on the 18S rDNA. Our findings demonstrated the distribution of genetic lineages of cervid Megatrypanum-type trypanosomes in Japan, where deer trypanosomes in western part are genetically closer to European cervid trypanosomes and the bovine *T. theileri* TthII lineage, while deer trypanosomes in northern part are genetically closer to North American cervid trypanosomes and the bovine *T. theileri* TthI lineage.

Through morphological and molecular characterization using genetic markers, I have resolved some complex biodiversities of avian and chiropteran hemosporidians and ruminant trypanosomes. By appropriately selecting hemoparasite genetic markers, we may be able to predict the potential risk of epizootic disease to humans and domestic animals that may be in contact with wildlife animals.

学位論文審査の結果の要旨

| | |
|---|--|
| 氏 名 | Imron Rosyadi |
| 審 査 委 員 | 主 査：山口大学 教授 佐藤 宏 |
| | 副 査：山口大学 教授 度会 雅久 |
| | 副 査：山口大学 教授 西垣 一男 |
| | 副 査：鹿児島大学 准教授 松尾 智英 |
| | 副 査：山口大学 准教授 柳田 哲矢 |
| 題 目 | Phylogenetic study of hemoparasites in domestic and wildlife animals with special reference to avian and chiropteran hemosporidians and ruminant trypanosomes (家畜および野生動物に寄生する住血原虫類の分子系統学的研究—特に家禽とコウモリに寄生する住血胞子虫類および反芻動物トリパノソーマに注目して—) |
| <p>審査結果の要旨：</p> <p>家畜や家禽、あるいは野生動物には多様な住血原虫の寄生がみられ、潜在感染もしくは深刻な臨床症状を呈する感染症の原因となっている。病原体としての住血原虫の正確な種同定は、その感染症を理解する基盤であり、形態学的な視点や分子系統マーカーによる特徴づけにより実施されている。本研究では赤血球内寄生する原虫として <i>Haemoproteus</i> 属と <i>Polychromophilus</i> 属 (Apicomplexa: Haemosporidia)、さらに血球外寄生の住血原虫である反芻動物の <i>Trypanosoma theileri</i> (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) に注目し、形態学的種同定とともに複数の分子系統マーカーによる解析を行い、複数の住血原虫の種同定の現状理解と今後に向けた課題について考察を試みている。3章からなる本研究の概要は以下のとおりである。</p> <p>1. ジョグジャカルタ特別州で飼養されるハトでの <i>Haemoproteus columbae</i> 潜在感染</p> <p>家禽としてのハトあるいは野生のドバト (<i>Columba livia</i>) には <i>Haemoproteus columbae</i> (Haemoproteidae) の寄生が広く知られている。感染個体では、肺の細網内皮系細胞での赤外発育 (schizogony) を経て赤内発育 (gametogony) がみられ、吸血するハトシラミバエ体内で孢子形成 (sporogony) が行われる。インドネシアでは鳩肉消費を含めさまざまな用途でハトが飼養されているが、住血原虫の寄生状況やその意義についてはほとんど知見がない。ジョグジャカルタ特別州内4カ所の農場(農場当たり8-10羽)について血液検査を試みたところ、その62.5-100%に <i>H. columbae</i> 寄生が確認され、ガメトサイトの赤血球寄生率は3.0-5.6%であった。幼若および成熟ガメトサイトの寄生が混在しており、家禽として飼養されるハトで再発もしくは再感染による重度の潜在感染が持続していることが示唆された。ミトコンドリア cytochrome <i>b</i> gene (<i>cytb</i>)塩基配列解析により HAECOL1 を中心に</p> | |

COLIV03、COQUI05、CXNEA02 といった世界的に広く分布する遺伝系統の原虫寄生であった。ハトでの *H. columbae* 感染は病害性がないとされてきたが、ヘモグラム解析から感染個体では有意な大球性低色素性貧血と低蛋白血症が確認され、持続的潜在感染が感染個体に一定の健康障害を引き起こしていることが明確に指摘された。

2. 日本のユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) およびモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*) からの初めての *Polychromophilus* spp. の分離とその分子系統学的特徴づけ

コウモリは世界各地に広く分布し種多様性に富んでいる。*Polychromophilus* 属を含め Plasmodiidae のほとんどの属が専らコウモリから記録されていることから、コウモリの住血原虫の種多様性と地理的分布の把握はマラリア原虫をはじめとした本科の進化を考える上で重要である。しかし、アジア温帯地域に分布するコウモリでの住血原虫の研究はほとんど行われていない。山口県内 3 か所で収集したユビナガコウモリ、モモジロコウモリ、キクガシラコウモリ (*Rhinolophus nippon*)、コキクガシラコウモリ (*Rhinolophus cornutus*)、計 75 匹の住血原虫寄生状況を検討し、ユビナガコウモリから *Polychromophilus melanipherus* (寄生率 40.5% [15 匹])、モモジロコウモリから *Polychromophilus murinus* (46.2% [6 匹]) の赤血球内ガメトサイト寄生を確認した。この種同定はミトコンドリアの *cytb*、*cytochrome c oxidase subunit I gene*、*apicoplast caseinolytic protease C gene*、核 DNA *elongation factor 2 gene* の塩基配列解析に基づいて行われ、分離された 2 種それぞれに複数のハプロタイプあるいは遺伝子型が確認されたが、熱帯や欧州などの *Miniopteridae* 科コウモリからの *P. melanipherus* あるいは *Vespertilionidae* 科コウモリから記録されている *P. murinus* とよく一致し、日本固有の分子遺伝学的系統は確認されなかった。東南アジアおよびアフリカの熱帯地域の *Vespertilionidae* 科コウモリから少なくとも 3 種の未知 *Polychromophilus* spp. が分離されているが、その分布は限局的である可能性が支持された。なお、ユビナガコウモリ体表に寄生するクモバエ (*Nycterbia* spp.) 中腸の外表面に *P. melanipherus* オーシストを検出し、ベクターとしての重要性を証明した。

3. 日本列島のホンシュウジカに寄生する *Trypanosoma theileri*-like の分子系統学的位置づけ

家畜としての牛の血流に寄生する *Trypanosoma theileri* は持続的に潜在感染する大型のトリパノソーマである。また、世界各地の野生偶蹄類にも同様のトリパノソーマの寄生が確認され、その分類学的不定性から *T. theileri*-like として扱われている。牛に寄生する *T. theileri* には 2 つの明確に区別される遺伝型 (TthI と TthII) が知られているが、野生動物寄生の *T. theileri*-like の分類学的位置は整理されていない。山口県内のシカから新たに分離した *T. theileri*-like (YMG 株) について *ribosomal RNA gene*、*gGAPDH gene*、*CatL-like gene*、*SL gene* を指標に分子系統学な位置づけを検討したところ、本種を独立種とした場合、牛寄生の *T. theileri* の TthI 型と TthII 型を別種として扱うことになり、更に、世界各地の野生偶蹄類から記録のある多数の *T. theileri*-like を独立種と考えることになる。このことで、*T. theileri* クレードの種分類は大きく混乱する。実際、国内のシカに寄生する *T. theileri*-like の遺伝型も典型的には 2 つに区別できるが (エゾシカから分離された TSD1 株と山口県からの YMG 株)、その中間的な遺伝型を示す分離株も国内のホンシュウジカから確認でき、種として集約できない。このような分類学的な混乱を回避するためには、牛寄生 *T. theileri* および野生偶蹄類寄生の *T. theileri*-like は「*T. theileri*」単一種の下で、宿主特異性と分子系統学的特徴で分類することが妥当と結論された。

以上、住血原虫の分子系統学的特徴づけがその種同定と感染症理解のうえでもつ意義と限界について具体的に検討と考察を行い、今後の課題の一端を明らかにした。このことから、審査委員一同は、本研究を博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。