

## Abstract of Doctoral Thesis

Name BAYANZUL Argamjav

Title: Phylogenetic study on eimerian and capillariid parasites of farmed ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus* L.)

(飼養コウライキジ(*Phasianus colchicus* L.) のアイメリア科ならびに毛細線虫科寄生虫の分子系統学的研究)

**Introduction:** My study consisted of two chapters. The first chapter, titled “Eimerian and capillariid infection in farmed ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*) in Ehime, Japan, with special reference to their phylogenetic relationships with congeners, focused on the ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus* Linnaeus 1758, a bird species originally endemic to Asia and the eastern regions of Europe, including Caucasus and Balkans. It has been widely naturalized throughout Europe and North America as game birds. In certain places within Japan, this pheasant species is farmed for exotic meat markets, as is the case of the green pheasant, *Phasianus versicolor* Vieillot 1825, which is exclusively endemic to the Japanese archipelago. Owing to their importance as game birds in the northern hemisphere, ring-necked pheasants have been the subject of various parasitological surveys, and their infection by various nematodes, such as capillariids, heterakids, and *Syngamus trachea*, as well as intestinal coccidians has been recorded. The second chapter, titled “New coccidian *Eimeria iyoensis* n. sp. (Apicomplexa: Eucoccidiorida: Eimeriidae) in farmed ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus* L.) in Ehime, Japan,” focused on the identification of a new coccidian species.

**Methods:** We employed integrated taxonomic approaches to eimerian and capillariid species from farmed ring-necked pheasants in Japan. During this study, we performed a parasitological examination of the gastrointestinal tract of farmed ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*) on two farms in Ehime, Japan.

**Results and Discussion:** Fecal examination through flotation and sedimentation methods (43, 103, and 50 samples in three consecutive years from 2020, respectively) detected coccidian oocysts (5–58%), or capillariid (40–56%) and heterakid eggs (45–72%). Following artificial sporology, most sporulated coccidian oocysts were ellipsoidal without micropyle nor residuum, but with 1–3 polar refractile granules, morphologically reminiscent of *Eimeria phasiani* (Apicomplexa: Eucoccidiorida: Eimeriidae). Intensive sequencing of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene (*cox-1*) using pan-eimerian primers and multiple oocyst samples from different pheasants indicated a single species. We characterized, for the first time, the complete *cox-1* sequence of *E. phasiani*, known to be prevalent in wild and captive ring-necked pheasants worldwide.

Worm recovery under a dissection microscope revealed two capillariid and one heterakid nematode species: *Eucoleus perforans* (Nematoda: Trichocephalida: Capillariidae) in the esophageal epithelium

(Appended form No. 3)

(prevalence, 8–73%), *Capillaria phasianina* (Capillariidae) in the cecal mucosa (10–87%), and *Heterakis gallinarum* (Nematoda: Ascaridida: Heterakidae) in the cecal lumen (69–88%). The small subunit ribosomal RNA gene (SSU rDNA) of *E. perforans* was perfectly identical to that in a previous isolate from farmed Japanese green pheasants (*Phasianus colchicus versicolor*) at a distant locality in Japan. The SSU rDNA of *C. phasianina* was characterized, for the first time, demonstrating a sister relationship with *Capillaria anatis*, parasites found in the ceca of domestic ducks, geese, and various wild anatid birds.

In a subsequent study, 35 fecal samples were collected from two- to three-month-old ring-necked pheasants from four pheasant-rearing farms in Ehime Prefecture, Japan. Microscopic examination using a saturated sugar solution technique detected numerous subspherical oocysts from the samples of one farm and ellipsoidal *E. phasiani* oocysts from the three other farms. The subspherical oocysts were artificially sporulated and measured 18.6  $\mu\text{m}$  by 15.7  $\mu\text{m}$  with a 1.18 shape index ( $n = 150$ ). Each oocyst contained four 10.7  $\mu\text{m} \times 5.8 \mu\text{m}$  sporocysts ( $n = 30$ ) and one coarse refractile polar granule; no micropyle or residua were detected. Each sporocyst contained two sporozoites with one large and one small refractile body and sparsely distributed residua. The complete, 1,443-bp *cox-1* sequence of this isolate exhibited low sequence identity with published *Eimeria* spp. sequences including *E. phasiani* that was previously recorded in the same area. Meanwhile, the oocyst morphology most closely resembled that of *Eimeria tetartooimia*, but distinct in morphology of refractile polar granules and sporocyst residua. The available GenBank *cox-1* sequence of *E. tetartooimia* exhibited a sequence identity of  $< 94.5\%$  with the study isolate. Here, the coccidian isolate identified in this study represents a new *Eimeria iyoensis* n. sp. capable of infecting ring-necked pheasant.

**Conclusion:** These methods allowed the researchers to gain a comprehensive understanding of the eimerian and capillariid infections recorded in the ring-necked pheasants and their phylogenetic relationships with congeners. The findings from this study contribute to the broader understanding of these parasites and their impact on the health of farmed pheasants. The study also opens up avenues for further research into the molecular characterization of these parasites, which can contribute to the development of more accurate diagnostic tools.

(About 800 words in English)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	BAYANZUL ARGAMJAV
審査委員	主査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副査：山口大学 教授 佐藤 晃一
	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 on eimerian and capillariid parasites of farmed ring-necked pheasants ( <i>Phasianus colchicus</i> L.) (飼養コウライキジ ( <i>Phasianus colchicus</i> L.) のアイメリア科ならびに毛細線虫科寄生虫の分子系統学的研究)

## 審査結果の要旨：

本研究では国内で飼養されるコウライキジ(*Phasianus colchicus karpowi*) 材料を寄生虫学的に精査し、分類学的位置づけや種同定で不確定な点が残る当該宿主のアイメリア科ならびに毛細線虫科寄生虫について形態学的観察と分子系統学的解析を行った。その研究成果は本研究で対象とした寄生虫種に限らず、広く寄生虫の分類あるいは種同定を考えるうえで示唆に富むところが大きいと考えられる。

第一章では、2020年～2022年の初冬(11月～12月)に食鳥処理されたコウライキジを愛媛県南予家畜保健衛生所宇和島支所の協力の下で研究材料として収集し、その消化管(計 219羽分)と盲腸便(計 196羽分)を用いて寄生虫学的に精査した。盲腸便については虫卵浮游法ならびに沈澱法により、アイメリア科オーシスト(検出頻度 5-58%)、毛細線虫卵(同 40-56%)、鶏盲腸虫卵(同 45-72%)を確認し、更に消化管の寄生虫学的検索から、食道粘膜内寄生の *Eucoleus perforans* (検出頻度 8-73%)、盲腸寄生の *Capillaria phasianina* (同 10-87%) と *Heterakis gallinarum* (同 69-88%)を回収した。アイメリア科オーシストは 2.5%重クロム酸カリ液中で人為的に孢子形成させ、短楕円形のオーシストについて内部構造を形態学的に精査し *Eimeria phasiani* と種同定した。本種についてはミトコンドリア cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子(*cox-1*) 全長を含む 1,554-bp をキジ寄生コクシジウム種として初めてシーケンスし、同じキジ科の鶏や七面鳥を固有宿主とする *Eimeria* spp. との分子系統学的関係を明らかにした。また、分離した 3種の線虫についてはリボソーム RNA 遺伝子配列を基に、他種との分子系統学的関係を論じた。キジ寄生コクシジウム種として 8種が知

られているが、オーシスト計測値には種内変異と種間での重複があり、また、内部構造の観察には専門的知識が必要となることから明確な種同定は難しい。本研究は、その種鑑別を容易とする分子生物学的種同定を進める契機となることが期待される。

第二章では、キジに寄生する *Eimeria* 属 8 種の分子遺伝学的特徴づけを進めるべく、コクシジウムによる集団下痢症が頻発する夏季(7月)に愛媛県南予家畜保健衛生所管内の 4 軒のキジ農家から糞便材料を収集し、3 軒の農家からは短楕円形の *E. phasiani* オーシストを、1 軒の農家からは類円形のオーシスト材料を得た。これらは 2.5%重クロム酸カリ液中で人為的に孢子形成を進め、類円形オーシストは *E. tetartooimia* に形態学的特徴が酷似するものの、精査によりオーシストやスポロシスト内の極体や残体、スティダ体の特徴が異なることを確認した。本種についても *cox-1* 全長 1,443-bp を含む 1,554-bp の塩基配列を明らかにし、*E. tetartooimia* で報告のある 420-bp 長の *cox-1* 配列とは 94.3%の低い同一性にとどまることを確認し、オーシストの形態学的特徴の違いも考慮し *Eimeria iyoensis* として新種記載した。本研究は、キジを固有宿主とする *Eimeria* spp. が従来把握できていた以上に多様性をもつ可能性を実際に示すこととなった。

キジに寄生する *Eimeria* spp. は従来、形態学的に区別される 8 種が知られ、孵化後の 2～7 週齢(季節繁殖することから 5 月～7 月)に激しい下痢症を引き起こすことが知られている。特に、*E. phasiani*、*E. duodenalis*、*E. colchici* が重要とされるが、今回新種として確認した *E. iyoensis* も過去にオーシスト形状が同一の種が国内キジ農家で集団下痢症を引き起こしていたこともあり、その病原性は改めて検討する余地がある。本研究で実践した手法による分子遺伝学的な種同定は、世界各地で問題とされるキジのコクシジウム症の原因特定と疫学調査において大いに有用性が期待される。

以上により、本論文は博士(獣医学)の論文として、妥当なものであると判断された。