

猛禽類寄生コクシジウムの研究：

Eumonospora 属の形態学および分子系統学的特徴

(**Coccidia of raptors: morphological and molecular
phylogenetic studies of genus *Eumonospora*)**

周 洵

猛禽類寄生コクシジウムの研究：

Eumonospora 属の形態学および分子系統学的特徴

(Coccidia of raptors: morphological and molecular
phylogenetic studies of genus *Eumonospora*)

周 洵

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 30 年入学

(指導教授：池 和憲)

令和 4 年 3 月

目次

序論	1
第1章 猛禽類由来寄生虫の感染状況の調査	5
1 緒言	5
2 材料および方法	5
3 結果	7
4 考察	8
5 小括	10
6 図表	11
第2章 猛禽類由来コクシジウムの形態学および分子系統学的解析	
1 緒言	16
2 材料および方法	17
3 結果	18
4 考察	21
5 小括	27
6 図表	28
第3章 猛禽類由来 <i>Eumonospora</i> 属コクシジウムの分子系統解析による分類	
1 緒言	41
2 材料および方法	42
3 結果	43
4 考察	45
5 小括	49
6 図表	51
総括	63
謝辞	67
参考文献	68

序 論

猛禽類はタカ目 (Accipitriformes)、フクロウ目 (Strigiformes)、およびハヤブサ目 (Falconiformes) の総称であり、日本国内にはタカ目 26 種、フクロウ目 11 種、ハヤブサ目 8 種の生息が確認されている [78]。日本における人と猛禽類の関係は古く、鳥類を獲物として鷹に狩りをさせる鷹狩りは古墳時代から確認され [77]、奈良・平安時代には天皇や貴族層が娯楽として鷹狩りを好んだことから、権威の象徴的な貴族分化として定着した [75]。中世以降では武家の間で鷹狩りが行われ、戦国時代には朝倉宗滴が世界最古の鷹の人工飼育に成功している [74]。しかし、明治以降になると鷹狩りは衰退し、また 1992 年 6 月に制定され、翌 1993 年に施行された絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律 (種の保存法) および 2002 年に改正された鳥獣の保護と管理並びに狩猟の適正化に関する法律 (鳥獣保護管理法) に基づき国内の野生猛禽類の全種の捕獲・飼育は原則禁止され、今日では伝統文化の継承としての鷹飼育や放鷹が細々と行われているに過ぎない。

このように日本の文化としての猛禽類の飼育は衰退の一途にあるが、海外で繁殖された猛禽類が日本に輸入され、ペットとして一般家庭で飼育される機会が増加傾向にある。日本国内において、猛禽類は特定動物に指定されている一部のタカ目を除き、一般家庭での飼育に関して許可は必要なく、そのほとんどを海外より輸入している。感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づく動物の輸入届出制度によると、2006 年には合計 609 羽の猛禽類が輸入され、2016 年の 1,741 羽と比較して 2.8 倍に増数している (<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000069864.html>)。輸入個体数の内訳について、タカ目 (法律上、ハヤブサ目も含める) は 2006 年以降、200 羽から 400 羽前後で推移しているが、フクロウ目は 2006 年に 609 羽で、2012 年以降は 1,000 羽前後と増加は著しく、2016 年には 1,741 羽となっている (図 0-1)。この背景には、小説や映画の影響によるフクロウ目認知度の高まりや [46]、動

物を展示する小規模施設（いわゆる鳥カフェや動物カフェ）の増加が背景にあるとされる [42]。海外で繁殖された猛禽類を日本に輸入する際、輸入者により届出書（動物種、輸送方法、輸出者および輸入者の情報等）と衛生証明書が日本の検疫所に提出される。衛生証明書では鳥インフルエンザの発生のない国・地域であることや輸出の際にウエストナイルウイルス感染症および鳥インフルエンザの臨床症状を示していないことが輸出国政府機関により証明されている。一方、細菌、真菌、寄生虫などの病原体を保有していても、輸出時に臨床症状が確認されなければ届出の義務はない。実際に、愛玩用として輸入された鳥類において、オウム病や西部ウマ脳炎などの人獣共通感染症を引き起こす病原体の検出報告もある [61]。以上のように、日本では社会情勢により猛禽類の輸入が増加し、飼育動物診療施設等に訪れる機会が増数していると想定されるが、それらが保有する病原体の分類学的知見、流行状況、病原性については不明のものが多く、また病原体の中でサイズの比較的大きい、いわゆるコクシジウム類でさえ体系的な調査報告が行われていない。

コクシジウム類はアピコンプレックス門（Phylum Apicomplexa）に属する原生生物（原虫）の一群で、幅広い分類群の後生動物に寄生する。広義では Conoidasida 綱コクシジウム亜綱（Subclass Coccidia）に分類される原虫類を指すが、獣医学・医学領域ではコクシジウム亜綱の真コクシジウム目（Order Eucoccidiorida）アイメリア亜目（Suborder Eimeriorina）に分類される原虫のうち、アイメリア科（Family Eimeriidae）およびサルコシステイス科（Family Sarcocystidae）を指すことが一般的である [50]。鳥類では *Eimeria* 属に加え、*Isospora* 属（*Atoxoplasma* 属）、*Caryospora* 属、*Avispora* 属、*Sarcocystis* 属（*Frenkelia* 属）、および *Toxoplasma* 属が寄生することが知られているが、猛禽類では *Eimeria* 属、*Avispora* 属、および *Sarcocystis* 属（*Frenkelia* 属）の報告があるにすぎない [50]。このうち *Avispora* 属は、主に猛禽類に特異的に寄生するコクシジウムの一群体で、国外においては下痢、血便や突然死など引き起こすことが知られており [10, 21, 49]、臨床獣医学

的にも重要である。

本研究では日本に輸入される猛禽類の寄生虫について調査を行い、その過程において見出され、不明な点が多い *Avispora* 属コクシジウム類について形態学的ならびに分子系統学的特徴について調べ、系統分類学的位置については再検討を行い、更には既知のコクシジウム類との比較を行った。

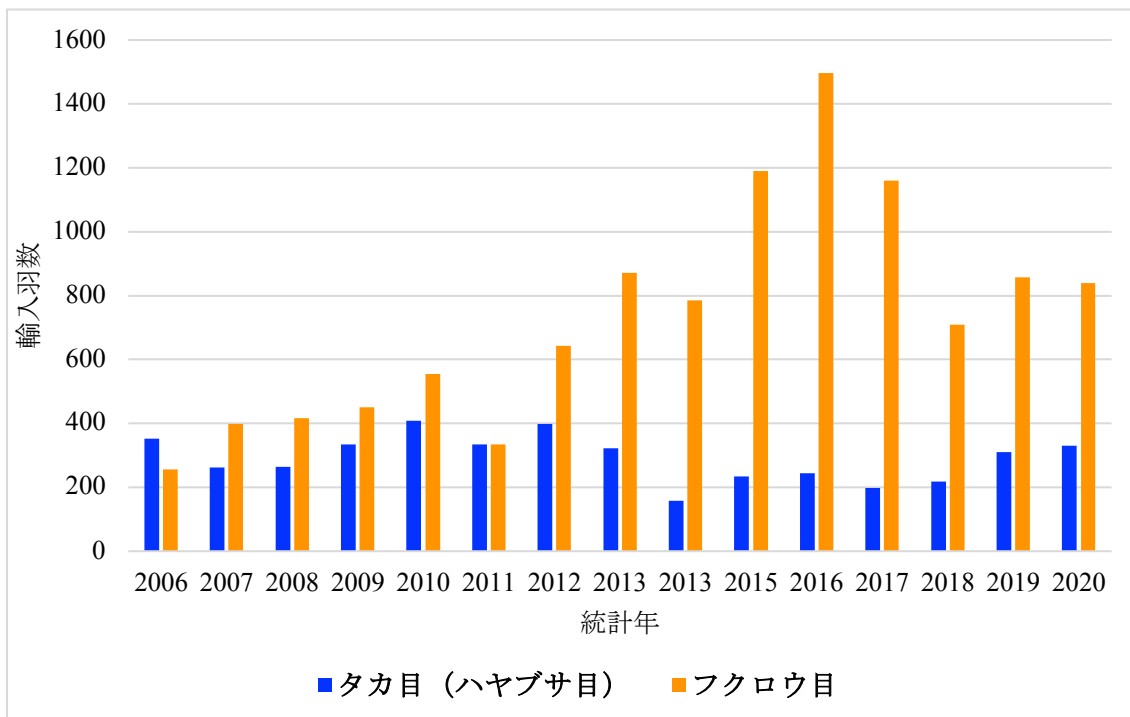


図 0-1 猛禽類海外輸入羽数の推移（厚生労働省より抜粋）

横軸は統計年、縦軸は輸入羽数左の青色グラフはタカ目（ハヤブサ目）、右のオレンジ色グラフはフクロウ目を示している。

第1章 猛禽類由来寄生虫の感染状況の調査

1 緒言

近年、日本においては海外で繁殖された猛禽類（タカ目、ハヤブサ目およびフクロウ目）を輸入し、ペットとして一般家庭で飼育される機会が増えており、特にフクロウ目の輸入羽数は増加傾向にある。海外で繁殖された猛禽類を日本に輸入する際、輸入者は届け出書および衛生証明書を日本の検疫所に提出する必要がある。衛生証明書では特定の伝染病の発生のない国や地域であることや伝染病等の臨床症状を示していないことで輸入は可能となる。しかし細菌、真菌、寄生虫などの病原体を保有していても臨床症状が確認されなければ届出の義務はない。実際には愛玩用に輸入された鳥類でオウム病や西部ウマ脳炎等の人獣共通感染症を引き起こす病原体を検出する例もある。日本では猛禽類が輸入される機会が増しているにもかかわらず、それらが保有する病原体の保有状況が不明な事が多く、また体系的な調査もなされていない。そこで今回、寄生虫、特に伝播力の強いコクシジウムを中心に、輸入猛禽類から寄生虫の保有状況を調べる目的で、東京都内の飼育販売施設で飼育される猛禽類の糞便試料を収集し、糞便内寄生虫検査を実施し、さらに光学顕微鏡によりコクシジウム類の有無を調査した。また、国内の飼育動物診療施設を受診した猛禽類においてコクシジウム症と診断された糞便を収集し、また個体情報、臨床症状、および経過について比較した。

2 材料および方法

2-1. 材料の収集

2018年4月に東京都内の飼育販売施設で飼養される猛禽類3目18種20個体

より糞便を採取した。鳥種は、フクロウ目の7種（トラフズク *Asio otus*、アナホリフクロウ *Athene cunicularia*、シロフクロウ *Bubo scandiacus*、マレーワシミミズク *Bubo sumatranus*、アフリカワシミミズク *Bubo africanus*、ワシミミズク *Bubo bubo sibiricus*、メンフクロウ *Tyto alba*）、タカ目の7種（オオタカ *Accipiter gentilis*、ヒメコンドル *Cathartes aura*、セアカノスリ *Geranoaetus polyosoma*、アカトビ *Milvus milvus*、ウタオオタカ *Melierax metabates*、カオグロクマタカ *Nisaetus alboniger*、ミミヒダハゲワシ *Torgos tracheliotos*）、およびハヤブサ目の4種（セーカーハヤブサ *Falco cherrug* (n=2)、バーバリアハヤブサ *Falco peregrinus pelegrinoides*、ハヤブサ *Falco peregrinus peregrinus* (n=2)、フォークランドカラカラ *Phalcoboenus australis*) である。また2018年4月から同年11月に東京都および大阪府の飼育動物診療施設においてコクシジウム症と診断された4種4羽のフクロウ目（コキンメフクロウ *Athene noctua*、アフリカオオコノハズク *Ptilopsis leucotis*、メガネフクロウ *Pulsatrix perspicillata*、カラフトフクロウ *Strix nebulosa*）および2019年11月に東京都内の飼育動物診療施設にて同症と診断されたハヤブサ目コチョウゲンボウ (*Falco columbarius*) より糞便試料を採取した。

採取した糞便は遠心チューブで密栓した状態で、冷蔵または冷凍で日本獣医生命科学大学へ輸送し、検査に供した。コクシジウム症と診断された個体情報、臨床症状、および経過などの情報は飼育動物診療施設より問診をし、収集した。

2-2. 糞便内寄生虫検査

糞便は直接薄層塗抹法および飽和食塩水（比重 1.2）を用いた浮遊法に供し、BX41 光学顕微鏡（オリンパス、日本）で寄生虫の有無を調べた。コクシジウムのオーシストが確認できたサンプルは 2.0%ないし 2.5%ニクロム酸カリウム溶液にて室温保存し、成熟後 4°Cで保管した。

3 結果

糞便検査陽性個体の詳細を表 1-1 に示した。10 種の猛禽類より腸管寄生虫を検出した。フクロウ目 5 種（アフリカオオコノハズク、カラフトフクロウ、コキンメフクロウ、シロフクロウ、メガネフクロウ）とハヤブサ目 1 種（コチョウゲンボウ）から大きさの異なる 2 種類のコクシジウムのオーシスト（oocyst）を検出した。ハヤブサ、セーカーハヤブサ（ハヤブサ目）、およびアカトビとミミヒダハゲワシ（タカ目）からは蠕虫卵を検出した。コクシジウムのオーシストは二クロム酸カリウム溶液にて成熟後、形態観察をした。

蠕虫卵は形態学的に異なる 2 種類を検出した。ハヤブサ目とアカトビより検出した蠕虫卵は卵円形から円形で、卵殻は厚くタンパク膜様な構造に覆われており、胚細胞様な内容物が観察できることから、猛禽類を含む鳥類に広く寄生する回虫類 *Ascaridia* 属の未成熟卵と同定した（図 1-1）。一方、ミミヒダハゲワシより検出した蠕虫卵は、褐色、楕円形で、その一端に小蓋を備え、内容としてミランシジウム様構造物が観察されたことから、二生亜綱の吸虫類（*Digenea* fam., gen. et sp. indet.）の成熟卵と同定した（図 1-2）。

大型のオーシストはアフリカオオコノハズク、カラフトフクロウ、コキンメフクロウ、シロフクロウ、メガネフクロウ、コチョウゲンボウから検出された。カラフトフクロウ由来を除くすべてのオーシストは二クロム酸カリウム液内で成熟オーシストまで発育した。成熟オーシストは円形から類円形で、オーシスト内に 1 つのスポロシスト（sporocyst）を備え、そのスポロシスト内には 8 つのスポロゾイト（sporozoite）が観察された。成熟スポロシストにスチーダボディ（Stieda body）およびパラスチーダボディ（parastieda body）は確認されなかった（図 1-3）。これらの形態学的特徴より、この大型のオーシストは *Avispora* 属のオーシストと同定した。

小型のオーシストはカラフトフクロウより検出された。成熟オーシストは円

形で、オーシスト内にスチーダボディを備える 4 つのスポロシストと、各スポロシスト内には 2 つのスポロゾイトが観察された (図 1-4)。これらの形態学的特徴より、この小型のオーシストは *Eimeria* 属のオーシストと同定した。

4 考 察

鳥類を終宿主とするコクシジウム類には *Eimeria* 属、*Caryospora* 属、*Isospora* 属、*Sarcocystis* 属 (*Frenkelia* 属含む)、および *Avispora* 属が知られている [17, 58]。日本ではこれまでに動物園飼育のシロフクロウより *Eimeria* 属および属名不明のコクシジウムの検出事例があるにすぎない [76]。

今回の調査でフクロウ目 5 種およびハヤブサ目 1 種で *Avispora* 属の感染を認めた。このコクシジウムは、主にタカ目、ハヤブサ目、およびフクロウ目等鳥類に寄生し、ユーラシア地域 (ポルトガル、チェコ、イギリス、ドイツ、ロシア、サウジアラビア、アラブ首長国連邦)、アメリカ地域 (アメリカ、メキシコ、ベネズエラ)、およびオーストラリアで報告されている [11, 14, 21, 37, 52, 62, 63, 71, 73]。本属コクシジウムの検出はいずれも国内で初めてのことで、またメガネフクロウ、アフリカオオコノハズク、およびコチョウゲンボウは初宿主報告となった。

Avispora 属はフクロウ目およびハヤブサ目、特にそれらの幼鳥に対して下痢、血便、食欲不振、突然死などの症状を引き起こし、猛禽類を飼育する文化が現存する中東や欧州では獣医療上重要な病原体としても知られている [21, 33, 37]。例えば、*Avispora kutzeri* と *Avispora neofalconis* はハヤブサに感染すると、激しい下痢、血便、元気消失、脱水、拒食症などを引き起こす [11]。また、欧州で飼育されていたシロフクロウの症例では、下痢や拒食がみられ、剖検で小腸と十二指腸粘膜における腸炎と *Avispora* 属の未成熟オーシストが認められている [49]。このほかハヤブサ類では *Avispora* 属により腸管粘膜が損傷したことにより、腸

管に寄生する微胞子虫の1種 *Enterocytozoon bieneusi* が病変より侵入し全身感染を起こした事例がある [45]。今回、診療施設より *Avispora* 属コクシジウム陽性と診断された猛禽類の症状を表 1-2 にまとめた。シロフクロウは健康診断にてオーシストが検出され無症状だったが、アフリカオオコノハズク、コキンメフクロウ、カラフトフクロウ、メガネフクロウ、およびコチョウゲンボウは食欲低下、嘔吐、下痢などの症状が共通してみられた。このうち、シロフクロウとメガネフクロウは同じ飼育者により飼育されている個体で、先住するメガネフクロウは、シロフクロウが導入されて以降に感染していることから、感染したシロフクロウにより水平伝播した可能性が疑われた。このメガネフクロウは感染後、食欲低下と血便の症状を呈しており、この結果はこれまでの研究とほぼ一致していた [49]。

Avispora 属コクシジウム感染症の治療にはオーシストの排出を減少させる他に、コクシジウムに対しての免疫賦与にも有効であることから、少量感染でも治療するのが好ましいとされる [17]。様々な抗原虫薬 (clazuril、amprolium、sulphonamides) が推奨されているが、現在はトルトラズリル (toltrazuril) 製剤が副作用も少なく、効果も優れているとされている [17]。実際に、今回、*Avispora* 属コクシジウム感染を認めたフクロウ類およびハヤブサ類ではトルトラズリルが投与され、メガネフクロウ、シロフクロウ、コチョウゲンボウは快復しており、一定の治療効果はあると思われる。しかし環境に存在するオーシストも排除しなければ、再感染も有り得るので、環境消毒も重要である [17]。

今回、カラフトフクロウから *Eimeria* 属のコクシジウムオーシストを認めたが、成熟オーシストの量が少なく、種レベルの同定は困難であった。これまでにカラフトフクロウからは *Eimeria bemricki* の1種が記載されている [6] が、未記載種の可能性も含めて、形態学的ならびに分子系統学的特徴の解析が期待される。

以上のように、国内で飼育されるフクロウおよびハヤブサ類において、これま

で国内で報告のない *Avispora* 属のコクシジウム感染が明らかとなった。フクロウ目では *Bubo* 属（シロフクロウ）と *Pulsatrix* 属（メガネフクロウ）の異なる属間における水平伝播が示唆され、宿主特異性の広さが想定された。

Avispora 属コクシジウムの病原性や病態解析および治療法については、終宿主が主に猛禽類であり、1 個体が高額で SPF 個体が入手できないことから感染実験による証明が困難である。今後も、宿主情報、臨床症状、および死亡個体の病理組織検査に関する情報を継続して収集していくことが期待される。

5 小 括

輸入猛禽類の糞便内寄生虫検査の結果、10 種の猛禽類が陽性であった。ハヤブサ、セーカーハヤブサ、およびアカトビから回虫卵が、ミミヒダハゲワシより吸虫卵が検出された。一方、フクロウ目 5 種とハヤブサ目 1 種から大きさの異なる 2 種類のコクシジウムのオーシストを検出した。メガネフクロウから検出された小型の成熟オーシストは形態学的特徴より *Eimeria* 属と同定した。一方、大型の成熟オーシストは 1 つのスपोロシスト、スपोロシスト内に 8 つのスポロゾイトを備え、スपोロシストにスチーダボディは確認できなかった。この形態学的特徴よりこのコクシジウムは *Avispora* 属と同定した。*Avispora* 属コクシジウムの検出は日本国内で初めてのことで、またメガネフクロウ、アフリカオオコノハズク、およびコチョウゲンボウについては初宿主報告となった。

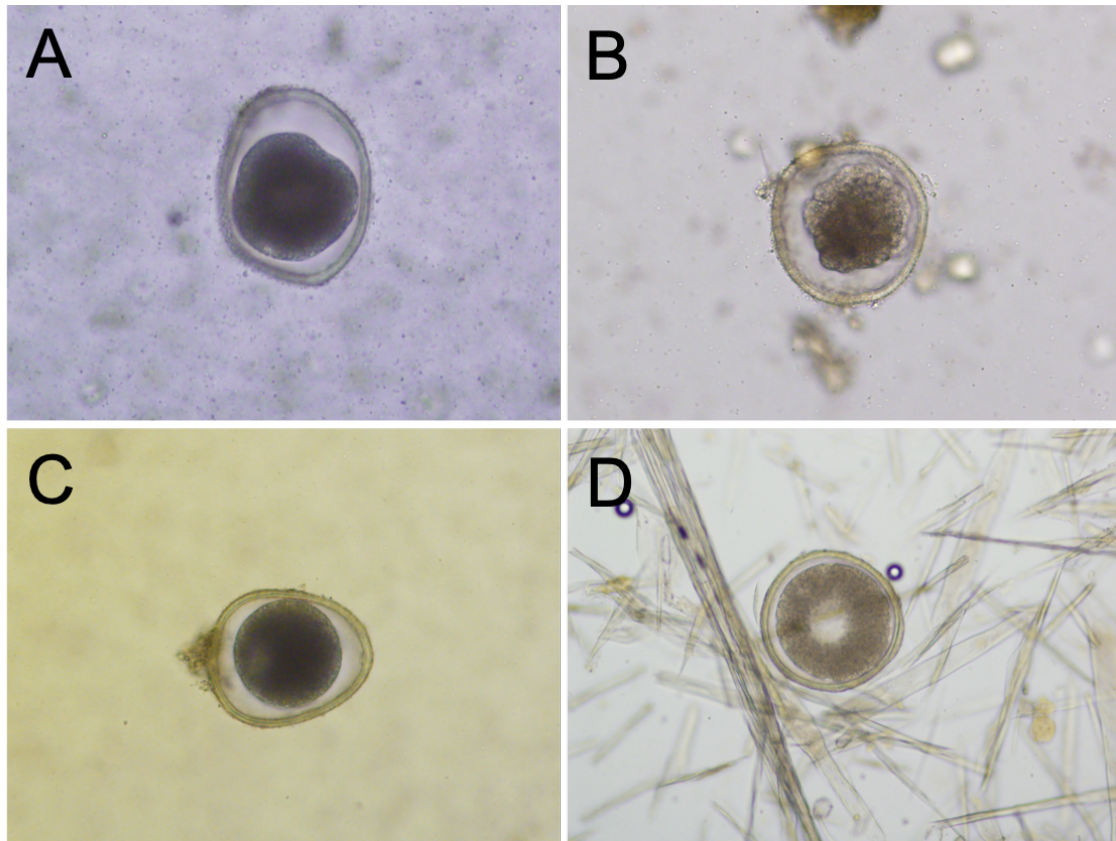


図 1-1 ハヤブサ目およびタカ目より検出された蠕虫卵

A-C: ハヤブサ目より検出された蠕虫卵。虫卵は卵円形から円形で、卵殻は厚くタンパク膜様な構造に覆われており、虫卵内には胚細胞様な内容物が観察できる。

D: タカ目より検出された蠕虫卵。ハヤブサ目より検出された蠕虫卵と類似した構造を有している。



図 1-2 タカ目より検出された蠕虫卵

卵殻の一端に小蓋を備え（矢印）、ミランシジウム様な内容物が観察できる。

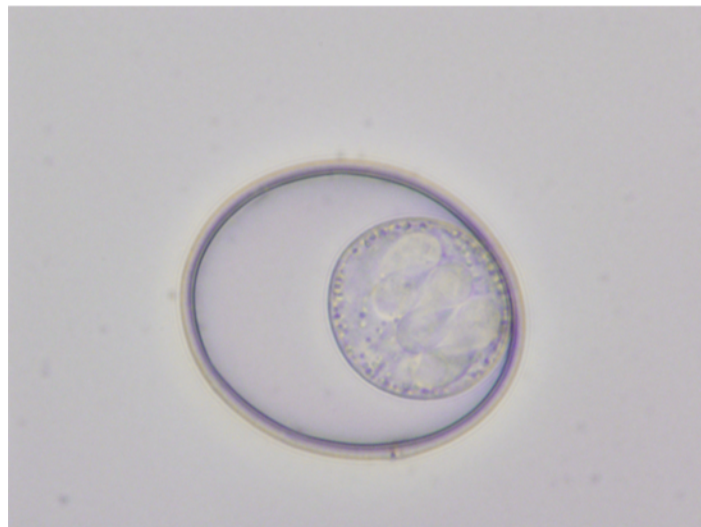


図 1-3 フクロウ目より検出された原虫の成熟オーシスト

円形から類円形で、オーシスト内に1つのスポロシストを備え、スポロシスト内に8つのスポロゾイトが観察された。



図 1-4 カラフトフクロウより検出された原虫の成熟オーシスト
円形で、オーシスト内に4つのスポロシストを備え、スポロシスト内に2つの
スポロゾイトが観察された。

表 1-1 猛禽類の糞便内寄生虫検査で検出された寄生虫

種類	採取場所	由来	年齢	寄生虫
ハヤブサ目				
ハヤブサ		CB (イギリス)	3	蠕虫卵
ハヤブサ	飼育販売施設	CB (イギリス)	5	蠕虫卵
セーカーハヤブサ		CB (イギリス)	1	蠕虫卵
コチョウゲンボウ	飼育動物診療施設	CB (ベルギー)	1	オーシスト
タカ目				
アカトビ	飼育販売施設	CB (ベルギー)	5	蠕虫卵
ミミヒダハゲワシ		WC (アフリカ)	25	蠕虫卵
フクロウ目				
シロフクロウ	飼育販売施設	CB (ベルギー)	1	オーシスト
シロフクロウ		不明 (ベルギー)	NA	オーシスト
アフリカオオコノハズク		CB (NA)	NA	オーシスト
コキンメフクロウ	飼育動物診療施設	CB (NA)	NA	オーシスト
カラフトフクロウ		CB (NA)	0.5	オーシスト
メガネフクロウ		不明 (イギリス)	NA	オーシスト

WC：野外捕獲

CB：人工繁殖

NA：不明

表 1-2 飼育動物診療施設のコクシジウム陽性症例の由来、主訴、臨床症状および経過

種類	由来	主訴	臨床症状および経過
フクロウ目			
アフリカオオコノハズク	CB (NA)	眼の腫脹	眼房に白色浮遊物、貧血 TZ 投与、第 8 病日死亡
コキンメフクロウ	CB (NA)	食欲不振、元気 消失、体重減少	重度消瘦 TZ 投与、第 7 病日死亡 剖検にて腹水、腸ガス、腸 壁の菲薄化の所見
カラフトフクロウ	CB (NA)	嘔吐	下痢 TZ 投与、快復
シロフクロウ	不明 (ベルギー)	新導入後の健 康診断	症状無し TZ 投与、快復
メガネフクロウ	不明 (イギリス)	食欲低下	上記シロフクロウ導入後 血便を発症 TZ 投与、快復
ハヤブサ目			
コチョウゲンボウ	CB (ベルギー)	下痢	下痢 TZ 投与、快復

CB : 繁殖個体

NA : 不明

TZ : トルトラズリル

第2章 猛禽類由来コクシジウムの形態学および分子系統学的解析

1 緒言

本論文の第1章での猛禽類からの寄生虫検査において、回虫類の未成熟卵および吸虫類の成熟卵を検出し、さらにフクロウ目5種とハヤブサ目1種より小型および大型のコクシジウムのオーシストも検出した。小型のオーシストはメガフクロウからで *Eimeria* 属であった。一方、大型のオーシストは形態学的特徴より *Avispora* 属であると同定した。

Avispora 属は約20種の鳥類寄生種が分類されている [56] が、その命名手順には混乱がみられる。これまでオーシスト内に1つのスポロシストを備え、その内に8つのスポロゾイトが存在するコクシジウムは1904年に設けられた *Caryospora* 属とされていた [19, 34]。一方1933年にヒメコンドル (*Catharets aura septentrionalis*) より形態学的に *Caryospora* 属と類似したコクシジウムが発見され、*Caryospora* 属との相違点としてオーシスト内のスポロシストにスチーダボディが無いという形態学的根拠を基に、*Eumonospora* 属が提唱された [3]。しかし、翌1934年にスチーダボディの有無による新属設立は根拠が乏しいという指摘がなされ、*Eumonospora* 属は *Caryospora* 属のシノニムとなった [28]、という経緯がある。それから半世紀以上経ち、爬虫類と鳥類より様々な *Caryospora* 属コクシジウムが検出され、そのスポロシストの形態に関して幾度も疑問提起がなされてきた。2014年には鳥類より検出した *Caryospora* 属オーシストにスチーダボディが無いことが再注目され、*Caryospora* 属の分類については疑問視されている [10]。2016年にオーストラリアのワライカワセミ (*Dacelo novaeguineae*) に寄生する *Caryospora* 属コクシジウムの遺伝子解析が行われ、爬虫類寄生種の *Caryospora* 属がアイメリア科に位置するのに対し、鳥類寄生種の *Caryospora* 属はサルコシステイス科に近縁であることが明らかにされている [73]。2016年に

Schuster らは、ノガン目 (Otidiformes) の鳥類より得た *Caryospora* 属の系統解析結果と形態学的特徴から *Avispora* 属を提唱し、全ての鳥類寄生の *Caryospora* 属は *Avispora* 属に異動するべきとした [56] が、新属提唱には、全ての鳥類寄生種や属シノニムの文献調査がなされていないこと、また属模式種が誤っていること、から現在混乱を招いている [19]。

このように *Caryospora* 属、*Avispora* 属、および *Eumonospora* 属のкокシジウムの分類学的な混乱が生じており、本研究では猛禽類より得られた *Avispora* 属кокシジウムについて形態的学的および分子系統学的な解析によってその分類学的位置の妥当性を明らかにすることとした。

2 材料および方法

2-1. オーシストの形態観察

オーシストは BX41 光学顕微鏡 (オリンパス) の微分干渉観察を用いて、1,000 倍にて微細構造 [オーシストの長径 (L)、オーシストの幅 (W)、長径と幅の比率 (L/W)、マイクロパイル (MC)、オーシスト残体 (OR)、極小体 (PG)、スポロシスト (SP)、スチーダボディ (SB)、サブスチーダボディ (SSB)、パラスチーダボディ (PSB)、スポロシスト残体 (SR)、およびスポロゾイト (SZ)] を観察し、計測した。写真撮影は DP71 (オリンパス) で行い、計測は接眼マイクロメーターおよび ImageJ [54] で行った。

2-2. 分子生物学的および分子系統学的解析

オーシスト陽性試料は二クロム酸カリウム溶液を蒸留水で 3 回洗浄した後、DNA 抽出キット Power Soil DNA isolation kit (QIAGEN、ドイツ) を使用し、細胞破砕機 TissueLyser LT (QIAGEN) を用いてオーシストを破砕後、常法に従い DNA を抽出し、精製した。Polymerase Chain Reaction (PCR) は核ゲノムの 18S

rRNA 遺伝子 (18S)、28S rRNA 遺伝子 (28S)、およびミトコンドリアの cytochrome *c oxidase subunit 1* 遺伝子 (*cox1*) を標的とした。PCR に用いたプライマーの詳細については表 2-1 に示した。

PCR 反応は 95°C (18S および 28S) か 96°C (*cox1*) で 5 分の熱処理後、94°C で 30 秒の熱変性、アニーリングは 60°C (18S)、45°C (28S)、50°C (*cox1*) で 30 秒、そして 72°C で 1 分の伸長を 1 サイクルとして 30 (18S)、35 (28S)、40 (*cox1*) サイクル行ない、最終伸長反応は 72°C で 10 分 (18S) あるいは 5 分 (28S と *cox1*) とした。

PCR 反応組成は 10× Ex Taq buffer 2 μL、dNTPs (各 2.5 mM) 1.6 μL、各プライマー (50 μM) 0.2 μL、Ex Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Bio、日本) 0.2 μL、DNA テンプレート 1.0 μL、および UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific、アメリカ) 14.8 μl とした。DNA 染色は GRGreen (BioCraft、日本) を用い、1.5% アガロースゲルで電気泳動後、イルミネーターでバンドを確認した。増幅産物が得られたものはシーケンスサービスに依頼し (Macrogen、日本)、精製、シーケンス反応後、ABI 3730xl DNA analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いてダイレクトシーケンスにより遺伝子を解読した。

遺伝子データは系統解析ソフトウェア Geneious Prime 2020.2.2 (<https://www.geneious.com>) を用いて解析し、配列を決定した。決定した配列は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した。配列は National Center for Biotechnology Information database での BLASTN プログラム (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて既知データベースに登録されているゲノム配列との相同性比較を行なった。

3 結果

2018 年にフクロウ 5 種 (アフリカオオコノハズク、カラフトフクロウ、コキ

シメフクロウ、シロフクロウ、およびメガネフクロウ)より検出した *Avispora* 属のオーシストの形態学特徴を表 2-2 に示す。これらの形態学的特徴は概ね一致し (図 2-1)、同種であると判断した。オーシストは楕円形から卵円形で無色、オーシスト壁は 2 層でマイクロパイル、オーシスト残体、および極小体は認められなかった。成熟オーシストが得られた 4 種 (アフリカオオコノハズク、コキンメフクロウ、シロフクロウ、およびメガネフクロウ) では、スポロシストは 1 つで、スポロシスト壁にスチーダボディ、サブスチーダボディ、およびパラスチーダボディは認められなかった。スポロシスト内のスポロシスト残体は多型性を示し、スポロシスト内で散在するものや膜様な構造に包まれているものがみられた (図 2-2)。スポロゾイトは 8 つで、中間が太い楕円形であった。

現在までに、フクロウ目に寄生する *Avispora* 属としては、*A. bubonis*、*A. henryae*、*A. mochogalegoi*、および *A. strigis* の計 4 種が記載されている。このうち *A. strigis* のオーシストは、 $13.8 \times 10.9 \mu\text{m}$ とコクシジウム類の中でも極めて小さいが、それ以外は性状が不明な点が多く、再記載が期待される。また、今回採取されたオーシストは、*A. bubonis* とはスポロシストの、*A. mochogalegoi* とはオーシストの大きさからそれぞれ区別できた。一方、*A. henryae* とは各部位の特徴が概ね一致したため、今回フクロウ目 5 種より検出したコクシジウムを *A. henryae* と同定した。更に *Avispora* 属は *Eumonospora* 属の新参シノニムであることが判明し、*Eumonospora* 属の再提唱を行ない、これ以降、これまでの *Avispora* 属と代わり、*Eumonospora* 属の表記を用いることとする。

フクロウ目 5 種由来の *Eumonospora henryae* について、18S、28S、および *cox1* 遺伝子の増幅を試みたところ、アフリカオオコノハズク、シロフクロウ、およびコキンメフクロウ由来のオーシストから増幅遺伝子産物を認めた。ダイレクトシーケンス法により決定した配列長は 18S で 1,584 bp、28S で 1,431 bp、*cox1* で 698 または 885 bp であった。各遺伝子領域をマルチプルアライメントしたところ、18S と 28S はそれぞれ単一の配列であり、その代表配列を DDBJ に登録した

(Accession nos. LC595641、LC5956412)。 *cox1* では 595 番目の 1 塩基が多型を示し、アフリカオオコノハズクとシロフクロウ由来の配列では G、コキンメフクロウ由来の配列では T であった。これらについてもそれぞれ DDBJ に登録した (Accession nos. LC595643、LC521951、LC521952)。

今回得られたオーシスト由来の遺伝子配列の相同性について BLASTN で解析を行った結果、18S はワライカワセミ由来 *Eumonospora daceole* (Accession no. KJ634019) と最も高い相同性 99.5% を示し、次点で *Besnoitia besnoiti* (Accession nos. KJ746531、FJ797432) と 99.1% であった。28S では *Besnoitia besnoiti* (Accession no. AF076900) の 92.2% と次点で同種 (Accession no. DQ227420) の 92.1% であった。 *cox1* では *Cystoisospora felis* (Accession no. JN227478) の 82.2~82.5% で、次点で *Nephroisospora eptesici* (Accession no. KU215383) と 80.7~80.8% の相同性を示した。 *Eumonospora* 属の 28S および *cox1* については、利用できる配列がデータベースにないことから比較ができなかった。

2019 年にコチョウゲンボウの糞便より検出された *Eumonospora* 属オーシストの形態学特徴 (図 2-3) を表 2-3 にまとめた。オーシストは楕円形から卵円形で無色、オーシスト壁は 2 層で外層は円滑、マイクロパイル、オーシスト残体、および極小体は見られなかった。オーシスト内のスポロシストは 1 つで、スチーダボディ、サブスチーダボディ、およびパラスチーダボディは認められなかった。スポロシスト内にスポロシスト残体と 8 つのスポロゾイトを認めた (図 2-4)。

現在ハヤブサ目からは 8 種の *Eumonospora* 属 (*E. biarmicusis*、*E. boeri*、*E. cherrughi*、*E. falconis*、*E. kutzeri*、*E. megafalconis*、*E. neofalconis*、*E. penerireiroi*) の報告がある。ハヤブサ目から得られた成熟オーシストの長径が類似するのは *E. biarmicusis* と *E. kutzeri* であった。このうち *E. biarmicusis* は、今回検出した種とスポロシストの大きさから区別できた。一方、*E. kutzeri* はスポロシストの大きさも同等の値であったことから、今回の検出種は *E. kutzeri* の成熟オーシストと形態学的に同定した。

コチョウゲンボウより検出した *Eumonospora* 属コクシジウムの 18S、28S、および *cox1* の部分配列を決定し DDBJ に登録した (Accession nos. LC595644–LC595646)。BLASTN で相同性を調べたところ、18S は *E. henryae* (Accession no. LC595642) と、28S でも *E. henryae* (Accession no. LC595641) と 100%一致した。*cox1* はコキンメフクロウ由来の *E. henryae* (Accession no. LC521950) と 100%一致、アフリカオオコノハズク由来とシロフクロウ由来 *E. henryae* (Accession nos. LC521951、LC5219512) とは 99.9%であった。以上の結果より、コチョウゲンボウ由来コクシジウムを *E. henryae* と同定した。この結果は形態学的に同定した *E. kutzeri* と一致しないが、分子系統学的に複数の遺伝子領域で 100%一致していることから、*E. henryae* の同定を優先し、最終同定とした。

4 考 察

Avispora 属は Schuster らが提唱した属で、約 20 種の鳥類寄生種が分類されている [56] が、その命名手順には混乱がみられている。これまで、*Avispora* 属と同様にオーシスト内に 1 つのスポロシストを備え、その内に 8 つのスポロゾイトが存在するコクシジウムは *Caryospora* 属とされていた [19]。*Caryospora* (Léger, 1904) 属の歴史は古く、1904 年にキスジクサリヘビ (*Vipera kaznakovi*) より記載されたコクシジウムに対して、*Caryospora simplex* (Léger, 1904) という模式種として設けられた属である [34]。一方、1933 年に Allen はヒメコンドル (*Catharets aura septentrionalis*) より形態学的に *Caryospora* 属と類似したコクシジウムを発見した。彼女はヘビ寄生 *Caryospora* 属との相違点としてオーシスト内のスポロシストにスチーダボディが無いという形態学的根拠を基に、*Eumonospora tremula* Allen, 1933 を模式種として新たに *Eumonospora* (Allen, 1933) 属を提唱した [3]。しかし、翌 1934 年、Hoare はスチーダボディの有無による新属設立は根拠が乏しいという指摘を行った [28]。この指摘を受け、同年に Allen

によって *Eumonospora* 属は *Caryospora* 属のシノニムになった [4]。以降、1つのスポロシスト内に 8 つのスポロゾイトを備えるコクシジウム類は全て *Caryospora* 属に分類されるようになった。それから半世紀以上経ち、爬虫類と鳥類より様々な *Caryospora* 属が検出され、そのスポロシストの形態に関して幾度と疑問提起がなされてきた。例えば 2014 年には Berto らが鳥類より検出した *Caryospora* 属オーシストにスチーダボディが無いことを再提起し、*Caryospora* 属の分類について疑問視している [9]。また、同年、Yang らはオーストラリアのワライカワセミ (*Dacelo novaeguineae*) に寄生する *Caryospora daceloe* Yang et al., 2014 の遺伝子解析を行い、爬虫類寄生種の *Caryospora* 属がアイメリア科に位置するのに対し、鳥類寄生種の *Caryospora* 属はサルコシステイス科の *Toxoplasma gondii* や *Besnoitia* 属と系統学的に近縁であることを明らかにしている [73]。これに対し、2016 年に Schuster らは、ノガン目 (Otidiformes) の鳥類 (サバクフサエリショウノガン *Chlamydotis macqueenii* およびフサエリショウノガン *Chlamydotis undulata*) より得た *Caryospora megafalconis* の系統解析結果と形態学的特徴を基に新属 *Avispora* Schuster et al., 2016 を提唱し、全ての鳥類寄生の *Caryospora* 属は *Avispora* 属に異動するべきとした [56]。しかし、Schuster らによる新属提唱は、全ての鳥類寄生種や属シノニムの文献調査がなされていないこと、また属模式種が誤っていることから現在混乱を招いている [19]。

Avispora 属コクシジウムのうち、*Avispora henryae* (あるいは *Caryospora henryae*) の分類は特に混乱を極めている。本種は 1932 年に Yakimoff らにより、ロシアの動物園飼育下ワシミミズク (*Bubo bubo*) より検出され、*Isospora henryi* Yakimoff & Matikaschwili 1932 として記載された [71]。その後、1936 年に同動物園の飼育下ハヤブサ目 (チゴハヤブサ *Falco subbuteo* およびチョウゲンボウ *Falco tinnunculus*)、タカ目のトビ *Milvus migrans*、およびフクロウ目のワシミミズクより形態学的に類似性の高いコクシジウムを検出し、その全てを *I. henryi* と同定し、同時に *Caryospora henryi* と改属した。更に形態学的に相同することから、

1933年にAllenがコンドルより記載した *Caryospora tremula* (Allen, 1933) も *C. henryi* のシノニムとした [72]。1974年に、本種は種小名の由来が女性の名前であることを理由に、国際動物命名規約に則って *Caryospora henryae* に改名されている [50]。さらに1982年、Böer はハヤブサ目に寄生し *C. henryae* とされていたコクシジウムに対しフクロウ目に寄生するものに新種 *Caryospora kutzeri* を提唱することでハヤブサ目とフクロウ目寄生種を分離し、さらにヒメコンドルに寄生する *C. tremula* も復帰させた [10]。結果として、*C. henryae* はワシミミズクを模式宿主とする鳥類で初めて記載された *Caryospora* 属となった [51, 62]。

今回、フクロウ目 5 種およびハヤブサ目 1 種より *A. henryae* が検出された。*Avispora* 属と *Caryospora* 属の形態学相違点として、前述の通り、2016年にSchusterらがスチーダボディの有無をあげている [56]。しかし、この特徴はすでに1933年にAllenによって提唱された *Eumonospora* 属の分類形質であり [3]、*Avispora* 属は明らかな新参シノニムである。従って、これらの混乱を解消するべく、今回 *Eumonospora* 属を再提唱し、また原記載論文を全て収集し、オーシスト内に1つのスポロシストを有し、そのスポロシストにスチーダボディが無い *Avispora* 属について、以下の通り *Eumonospora* 属に再編することとした [19]。

属： *Eumonospora* Allen, 1933

1. シノニム： *Isospora* Schneider, 1881; *Karyospora* Léger, 1904; *Caryospora* Léger, 1904; *Avispora* Schuster et al. 2016
2. 形態学的特徴：オーシストは楕円形から卵円形；オーシスト壁は2層で外層は円滑；極帽 (MC)、オーシスト残体 (OR)、極小体 (PG) は無し；スポロシスト (SP) は1つ；スチーダボディー (SB)、サブスチーダボディ (SSB)、パラスチーダボディ (PSB) は無し；スポロシスト残体 (SR) は有り、SP内に散在或いは膜様な構造に包まれている；スポロゾイト (SZ) は8つ、中間が太い楕円形。主に鳥類、特に猛禽類から検出される。

3. 模式種 : *Eumonospora henryae* (Yakimoff & Matikaschwili 1932)
4. 模試種のシノニム : *Isospora henryi* Yakimoff & Matikaschwili, 1932 ; *Eumonospora tremula* Allen, 1933 ; *Caryospora tremula* (Allen, 1933) Hoare, 1934 ; *Caryospora henryi* (Yakimoff & Matikaschwili, 1932) Yakimoff and Matikaschwili, 1936 ; *Caryospora henryae* (Yakimoff & Matikaschwili 1932) Yakimoff and Matschoulsky, 1936 ; *Avispora henryae* (Yakimoff & Matikaschwili 1932) Schuster et al., 2016.
5. 他の種 : *E. aquilae* (Volf et al., 2000) [67] ; *E. arcayae* (Volcán & Medrano, 1984) [65] ; *E. argentati* (Schwalbach, 1959) [57] ; *E. biarmicusis* (Alyousif et al., 2011) [5] ; *E. boeri* (Klüh, 1994) [32] ; *E. bubonis* (Cawthorn & Stockdale, 1981) [16] ; *E. cherrughi* (Alfaleh et al., 2013) [1] ; *E. circi* (Volf et al., 2000) [67] ; *E. daceloe* (Yang et al., 2014) [73] ; *E. falconis* (Wetzel & Enigk, 1937) [68] ; *E. hanebrinki* (McAllister et al., 2013) [39] ; *E. kansasensis* (Upton et al., 1990) [62] ; *E. kutzeri* (Böer, 1982) [11] ; *E. lindsayi* (Upton et al., 1990) [62] ; *E. megafalconis* (Klüh, 1994) [32] ; *E. microti* (Saxe et al., 1960) [53] ; *E. mochogalegoi* (Cardozo et al., 2017) [13] ; *E. neofalconis* (Böer, 1982) [11] ; *E. peneireiroi* (Cardozo et al., 2016) [12] ; *E. petersoni* (McAllister et al., 2013) [40] ; *E. strigis* (Gottschalk, 1972) [25] ; *E. tremula* Allen, 1933 [3] ; *E. undata* (Schwalbach, 1959) [57] ; *E. uptoni* (Lindsay et al., 1986) [36]

備考 : 上記のうち、以下の4種は、異同についてさらなる検討を要する。カモメ類より記載される *E. argentati* と *E. undata*、フクロウより検出される *E. strigis* のスポロシストは不明瞭あるいは消失している点で他の *Eumonospora* 属と区別でき、類似した特徴を備える *Tyzzeria* 属との異動を再検討する必要がある。そして *E. microti* は唯一哺乳類から記載された種であるが、そのオーシストは同じく哺乳類に寄生する *Cystoisospora* 属の異常型オーシスト [38] と形態学的に類似しており、再検討を要する (表 2-4)。

6. 寄生部位：不明。オーシストは糞便より検出。
7. スポロゾイト形成：体外。オーシストは未成熟状態で排出、二クロム酸カリウム溶液にて室温で約4日後にほぼスポルレーション（成熟）した。

フクロウ目由来コクシジウムで再提唱した様に *Eumonospora* 属のオーシストは、一つのスポロシスト内に8つのスポロゾイトを有し、スポロシストにスターダボディが無いという特徴を持つ。本属は主に鳥類に寄生し、タカ目、フクロウ目、ハヤブサ目、チドリ目、ブッポウソウ目、およびノガン目より検出されている [56, 62, 73]。

Eumonospora 属の宿主特異性に関しては様々な感染実験が行われてきた。タカ目ヒメコンドル由来 *E. tremula* は、キジ目ニワトリ (*Gallus domesticus*) への感染実験は成立せず、同じ鳥類でも宿主の目レベルを越えると水平伝播は成立しないとされた [3]。このほか、フクロウ目に寄生する *E. bubonis* では、同じフクロウ目の *Bubo* 属の別種間では感染成立するが、異なる *Asio* 属では感染成立しないことが感染実験により示され、宿主特異性は宿主の属レベルであることが示された [15]。同様に、ハヤブサ目寄生の *E. kutzeri* と *E. neofalconis* では、ハヤブサ目の *Falco* 属の異なる複数の別種間において相互感染が成立するが、フクロウ目とタカ目には相互感染は成立しなかった事例も示されている [11]。これらの結果は、*Eumonospora* 属は猛禽類に感染するが、個々の種の宿主特異性は、宿主の目レベルを超えないものであることが推察できる。この定説に従い、今回検出したオーシストをハヤブサ目寄生のそれと形態学的に比較し *E. kutzeri* と同定したが、遺伝子解析によりフクロウ目寄生の *E. henryae* と再同定した。今回、*E. kutzeri* を *E. henryae* に統合することは避けたが、*E. kutzeri* の記載された根拠である宿主特異性の根拠が崩れたことから、今後は、*E. kutzeri* の再記載あるいは *E. henryae* へのシノニム化も検討する必要がある。

今回、*E. henryae* が、フクロウ目とハヤブサ目といった系統的に離れた宿主に

感染することを示した。同様に、1939年には *E. falconis* がハヤブサ目からフクロウ目の感染が成立したとの報告がある [69]。また、2016年にはハヤブサ目に寄生するとされている *E. megafalconis* をノガン目のサバクフサエイショウノガンとフサエリショウノガンから検出している。感染ノガンの腸管粘膜を削り取り、未成熟オーシストおよびマクロガメートを検出したことから、ノガン目は *E. megafalconis* の終宿主であると考察している [56]。以上のことで *Eumonospora* 属は、その種によって宿主特異性が異なる可能性を示唆している。

古くから、オーシスト内に形成されるスポロシストとスポロゾイトの数でコクシジウムを分類する試みが行われてきた。しかし、これら限られた形態学的特徴のみで属または種同定を行うことは非常に困難である [24]。実際に、*Eumonospora* 属は 1 つのスポロシストを有するという形態学的特徴の類似性から 2020 年までは *Avispora* 属あるいは *Caryospora* 属と同等に扱われてきた [18]。*Eumonospora* 属のような分類の混乱は *Isospora* 属と *Cystoisospora* 属でもみられた。哺乳類に寄生する *Isospora* 属がその中間宿主のリンパ組織にモノ（ユニゾイト）シストを形成することから、鳥類や爬虫類などに寄生する *Isospora* 属から分離して新属 *Cystoisospora* Frenkel, 1977 および新亜科 *Cystoisosporinae* Frenkel et al., 1979 が Frenkel らによって 1970 年代に提唱された [22, 23] が、この説は Barta らが 2005 年に分子系統解析結果を根拠に発表するまでは受け入れられていなかった歴史がある [8]。今回、*Eumonospora* 属の終宿主の特異性が宿主の目レベルを超えていることが判明したことから、今後、近縁種を同定する際には、オーシストの形態だけでなく遺伝子解析を併用し、より精度の高い評価を行うことが必要不可欠であると思われる。そして新種記載の際にオーシストの形態学的特徴、宿主体内での寄生と発育部位の情報などは可能な限り記載し、そして遺伝子情報を模式種と同様に登録するべきである [30]。

5 小 括

2018年にフクロウ5種より検出した *Avispora* 属オーシストは形態学特徴から *Avispora henryae* と同定した。一方で文献調査の際、2016年に提唱された *Avispora* 属の、(1) オーシスト内に1つのスポロシストを有し、(2) そのスポロシストにスチーダボディが無い、という形態学的特徴はすでに1933年に *Eumonospora* 属の分類形質で提唱されており、*Avispora* 属は明らかな新参シノニムとなる。よってここに *Eumonospora* 属を再提唱し、*Avispora* 属は *Eumonospora* 属に再編することとした。更に *E. henryae* の18S、28S、および *cox1* 遺伝子の配列の解析から、その遺伝子配列を決定した。2019年にコチョウゲンボウより検出されたコクシジウムオーシストの形態も *Eumonospora* 属と一致し、DNA解析した結果、*E. henryae* と一致した。今回、*E. henryae* がフクロウ目およびハヤブサ目に感染することが判明し、そのことによって *Eumonospora* 属は定説であった属レベルの宿主特異性ではなく、その種によって宿主特異性が異なることが示唆された。

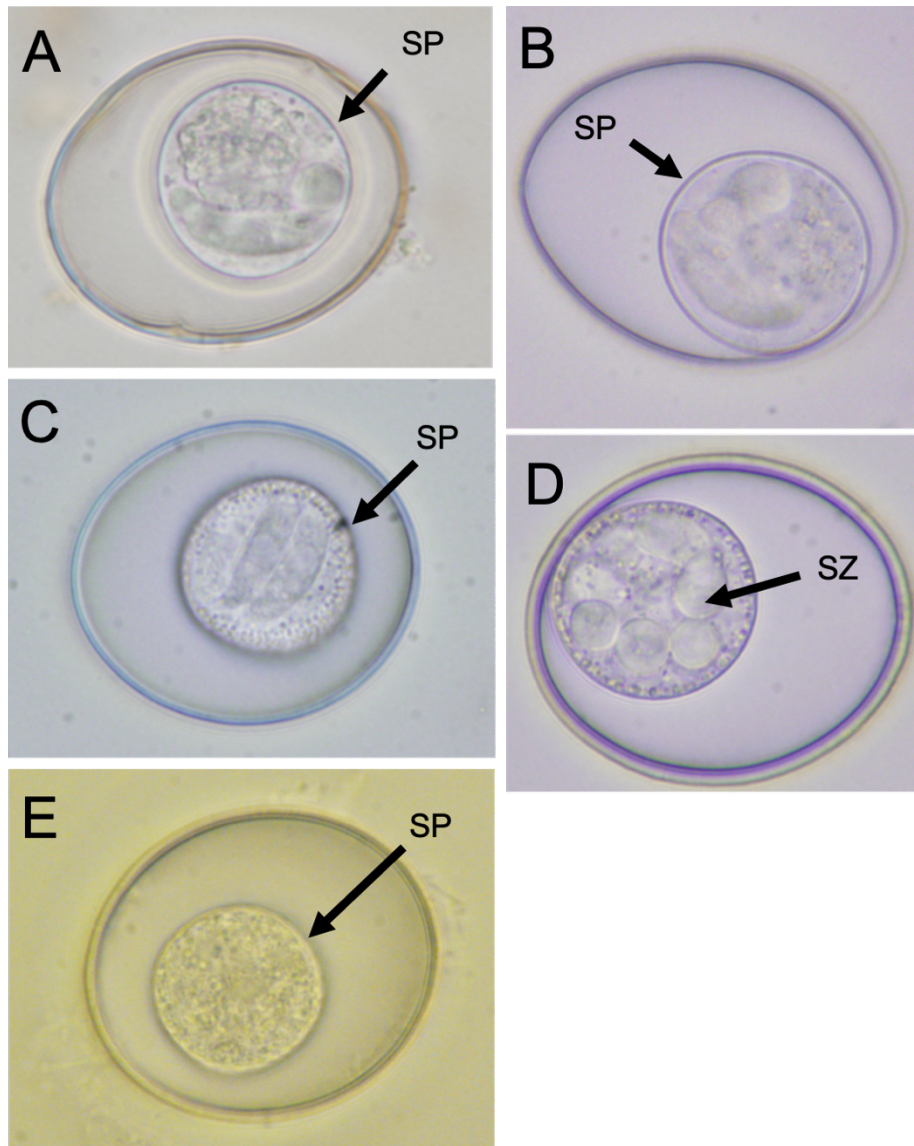


図 2-1 フクロウ目より検出されたコクシジウムのオーシスト

A : アフリカオオコノハズクより検出した成熟オーシスト。

B : シロフクロウより検出した成熟オーシスト。

C : コキンメフクロウより検出した成熟オーシスト。

D : メガネフクロウより検出した成熟オーシスト。

E : カラフトフクロウより検出した未成熟オーシスト。

SP : スポロシスト

SZ : スポロゾイト

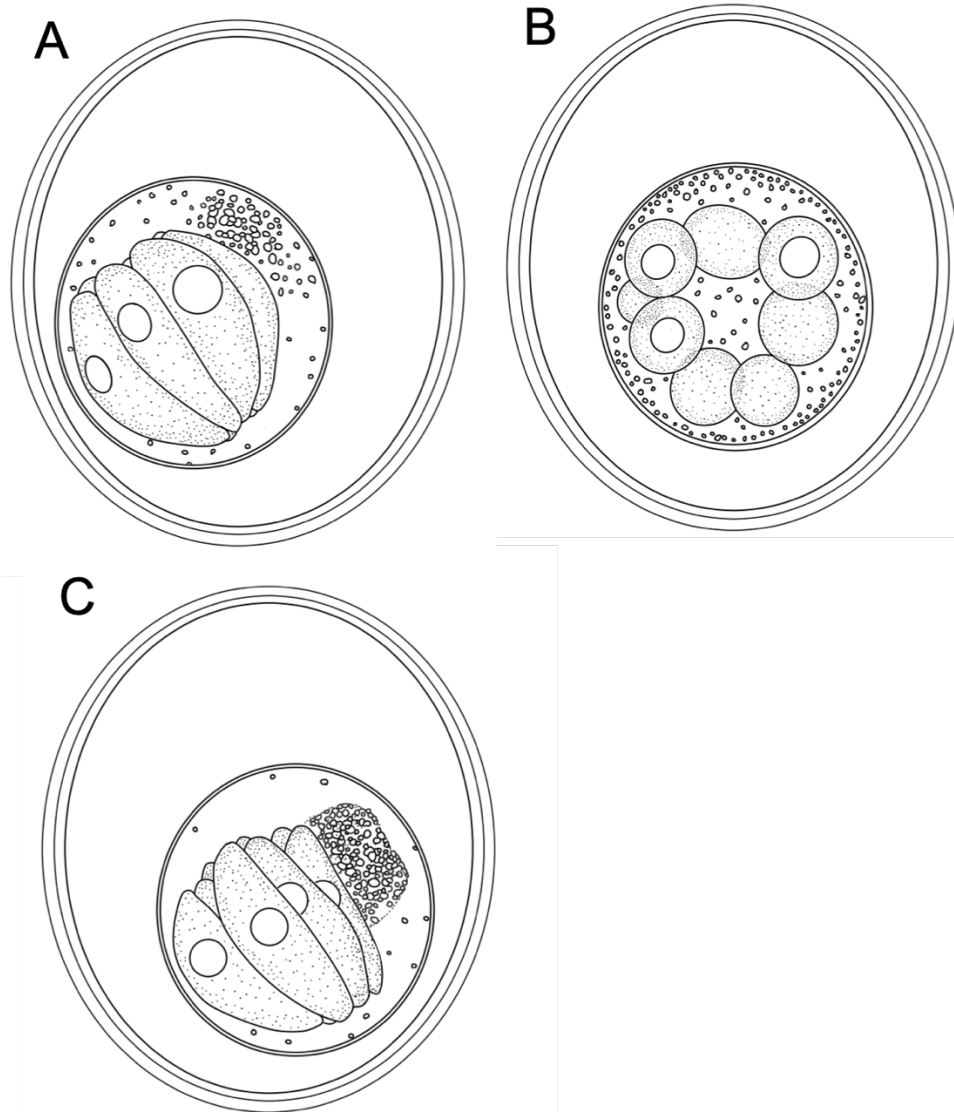


図 2-2 *Eumonospora henryae* の成熟オーシスト模式図

A : スポロシスト残体がスポロシスト全体に散在しつつ集約している。

B : スポロシスト残体がスポロシスト辺縁部に散在している。

C : スポロシスト残体が膜様な構造に包まれている。

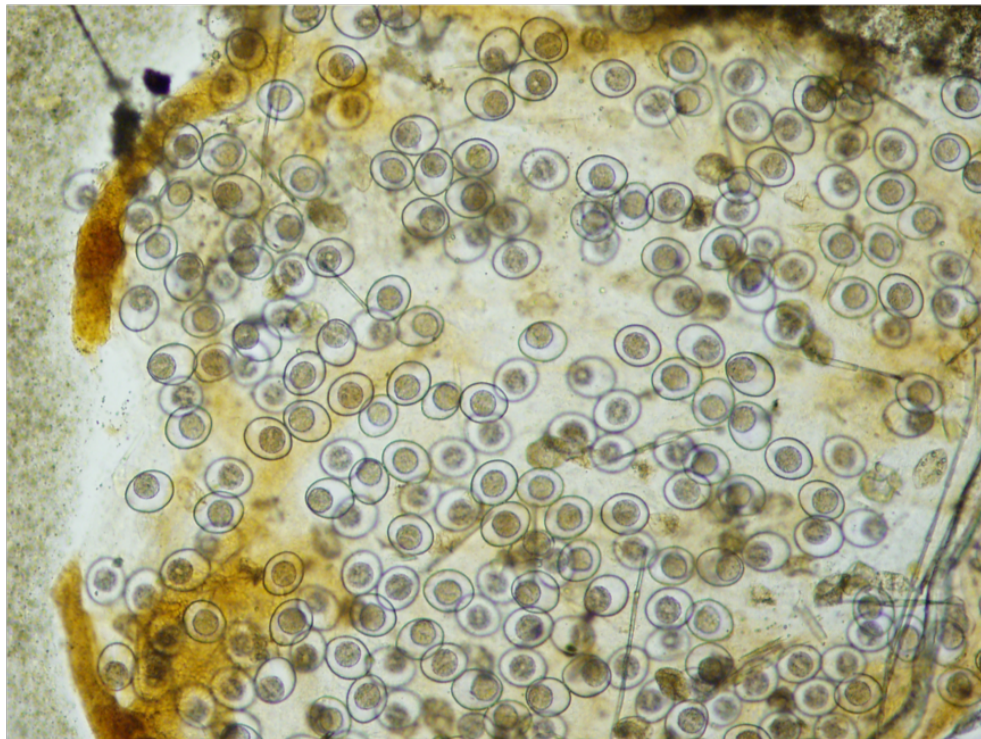
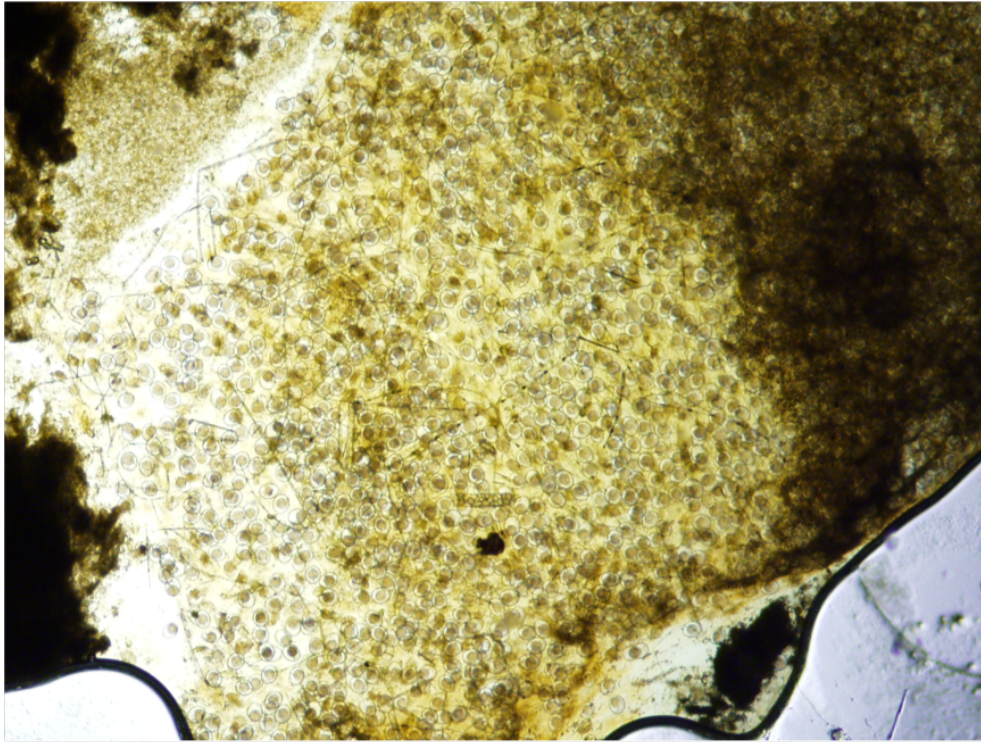


図 2-3 コチョウゲンボウの下痢便内に認められた大量の未成熟オーシスト

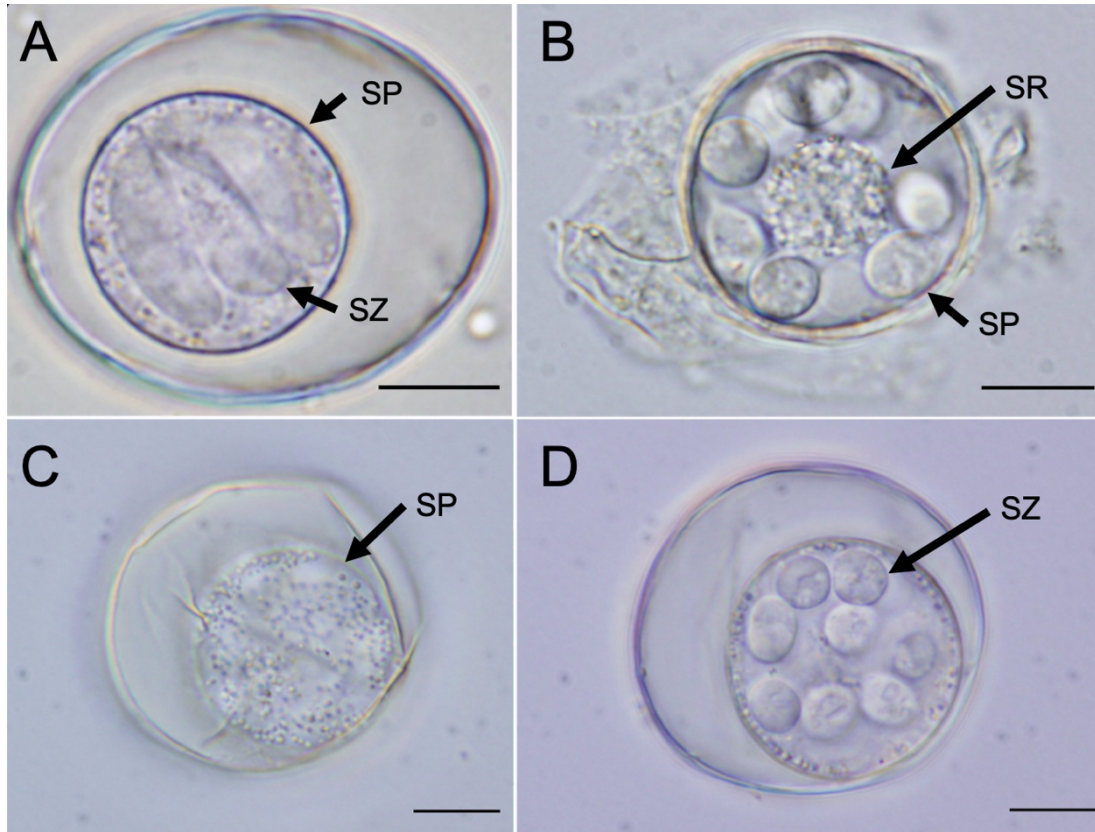


図 2-4 コチョウゲンボウの糞便より得た成熟オーシスト

A : スポロシスト (SP) 内部にスポロゾイト (SZ) がみられる。

B : オーシスト壁は崩壊し、スポロシスト (SP) の内部に 8 個のスポロゾイトと膜状構造に包まれるスポロシスト残体 (SR)。

C : スポロシスト (SP) 内に散在するスポロシスト残体 (SR)。

D : 8 つのスポロゾイト (SZ) と散在したスポロシスト残体 (SR)。

スケールバー : 10 μm

表 2-1 本研究で使用了したプライマー一覽

標的領域	名称	配列	文献
18S	CRYPTOF	5'- AACCTGGTTGATCCTGCCAGT -3'	[27]
	CRYPTOR	5'-GCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC -3'	
28S	KL1	5'- TACCCGCTGAACTTAAGC -3'	[55]
	KL3	5'- CMACCAAGATCTGCACTAG-3'	
<i>cox1</i>	Sdae-Cox1_260F	5'-GATCTTTATGTTYTTRATGCC-3'	[48]
	Sdae- Cox1_1147R	5'-CATTACCCATAACYACACC-3'	

表 2-2 フクロウ目に寄生する *Avispora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
本研究	41.2 × 35.2 (37.0–)	1.17 (1.03–)	23.8 × 23.3 (21.0–)	1.02 (1.00–)	NA	NA	コキンメフクロウ ^胸	日本	[19]
	44.0 × 33.0–38.0)	1.26)	26.0 × 20.0–25.0)	1.09)					
	43.2 × 37.8 (41.0–)	1.14 (1.05–)	23.8 × 23.3 (22.0–)	1.02 (1.00–)	NA	NA	シロフクロウ ^胸		
	46.0 × 34.0–41.0)	1.22)	26.0 × 21.0–25.0)	1.10)					
	42.6 × 35.7 (40.0–)	1.19 (1.13–)	24.2 × 24.0 (23.0–)	1.01 (1.00–)	NA	NA	アフリカオオコノ ハズク ^胸		
	46.0 × 34.0–38.0)	1.27)	25.0 × 23.0–25.0)	1.04)					
	42.8 × 37.6 (40.0–)	1.16 (1.05–)	24.2 × 23.8 (21.0–)	1.02 (1.00–)	NA	NA	メガネフクロウ ^胸		
	46.0 –33.0–38.0)	1.27)	26.0 × 21.0–25.0)	1.10)					
	42.2 × 36.2 (38.0–)	1.16 (1.04–)	24.0 × 23.5 (22.0–)	1.02 (1.00–)	NA	NA	カラフトフクロウ ^胸		
	45.0 × 33.0–39.0)	1.25)	26.0 × 22.0–26.0)	1.10)					
	* 未成熟								
<i>Avisporoa</i> <i>bubonis</i>	43.9 × 40.2 (38.0–)	1.1 (1.0–1.3)	26.6 × 25.6 (20.0–)	1.1 (1.0–1.2)	15.5 × 2.5 (13–)	6.2 (4.6–	アメリカワシミミ ズク ^胸	カナダ	[16]
	52.0 × 33.0–47.0)		33.0 × 20.0–32.0)		20.8 × 2.3–3)	8.7)			
<i>Avispora</i> <i>henryae</i>	45.4 × 37.4 (42.0–)	1.2 (1.1–1.4)	25.1 × 24.2 (24.0–)	1.04 (1.0–)	NA	NA	ワシミミズク ^胸	ポルト ガル	[14]
	49.0 × 34.0–40.0)		27.0 × 23.0–25.0)	1.1)					
	37.0–42.0 × 30.0–	NA	20.0 × 20.0	NA	NA	NA	ワシミミズク ^胸	ロシア	[71]
	35.0								
	41.0 × 37.0 (39.6–	1.11	21.6–25.2 × 19.8–	NA	10.8–14.4 ×	NA	ワシミミズク ^胸	ロシア	[72]
	43.2 × 36.0–39.6)		21.6		2.7–5.4				

表 2-2 (続き) フクロウ目に寄生する *Avispora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
<i>Avispora</i>	38.9 × 32.9 (37.0–)	1.18 (1.15–)	21.1 × 20.1 (20.0–)	1.02 (1.00–)	16.6 × 4.7	NA	コキンメフクロウ ^飼	ポルトガル	[14]
<i>mochogalegoi</i>	43.0 × 31.0–37.0)	1.23)	24.0 × 19.0–23.0)	1.07)	(15.0–18.0 × 4.0–5.0)				
<i>Avispora</i>	13.8 × 10.9 (11.9–)	NA	NA	NA	7.5 × 3.4	NA	メンフクロウ ^不	ヨーロッパ	[25,
<i>strigis</i>	15.0 × 10.3–12.5)							ツバ	62]

L: 長さ

W: 幅

NA: 不明

飼: 飼育下個体

不: 由来不明個体

表 2-3 ハヤブサ目に寄生する *Eumonospora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
本研究	41.0 × 34.5 (36.6–43.5 × 31.0–37.1)	1.16 (1.08–1.28)	23.0 × 22.6 (20.3–28.4 × 20.0–27.9)	1.02 (0.96–1.08)	13.5 × 4.9 (10.7–17.1 × 3.7–6.2)	2.84 (2.07–3.83)	コチウゲンボウ	日本	[18]
<i>Eumonospora biarmicusis</i>	40.2 × 34.7 (37.5–42.4 × 32.9–35.7)	1.16 (1.08–1.31)	20.1 (18.6–21.3)	1	NA	NA	ラナーハヤブサ	サウジアラビア	[5]
<i>Eumonospora boeri</i>	36.6–33.4 (33.2–39.6 × 31.1–36.6)	1.09 (1.0–1.14)	27.8 × 19.6 (25.8–30.9 × 17.9–21.2)	1.41 (1.24–1.51)	16.6 × 4.7 (15.0–17.0 × 4.0–5.0)	NA	チウゲンボウ	ヨーロッパ	[32]
	38.5 × 31.0 (38.0–39.0 × 30.0–32.0)	NA	24.5 × 20.5 (24.0–25.0 × 20.0–21.0)	NA	19.0 × 3.5 (18.0–20.0 × 3.0–4.0)	NA	チウゲンボウ	UAE	[37]
<i>Eumonospora cherrighi</i>	32.1 × 29.3 (31.0–35.0 × 28.0–30.0)	1.1 (1.0–1.3)	24.0 × 20.0 (23.0–26.0 × 19.0–21.0)	NA	15.0 × 4.0 (14.0–17.0 × 3.0–6.0)	NA	セーカーハヤブサ	サウジアラビア	[1]
	33.7 × 28.0 (29.0–35.0 × 23.0–32.0)	NA	22.6 × 18.9 (20.0–25.0 × 15.0–22.0)	NA	15.0 × 4.0 (12.0–20.0 × 3.0–5.0)	NA	セーカーハヤブサ	UAE	[37]
<i>Eumonospora falconis</i>	34.0 × 32.0	NA	23.0 – 21.0	NA	13.0–14.0	NA	ハヤブサ	ヨーロッパ	[62, 68]
	32.4 × 29.8 (29.0–36.0 × 23.0–35.0)	NA	21.7 × 20.6 (15.0–25.0 × 14.0–25.0)	NA	13.2 × 4.6 (10.0–17.0 × 2.0–4.0)	NA	チウゲンボウ チゴハヤブサ ハヤブサ	UAE	[37]

表 2-3 (続き) ハヤブサ目に寄生する *Eumonospora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
<i>Eumonospora</i>	38.7 × 34.1 (34.1–	NA	24.6 × 21.0 (21.4–	NA	NA	NA	ソウゲンハヤブサ ^不	ヨーロッパ	[11]
<i>kuizeri</i>	44.7 × 29.6–37.9)		27.1 × 19.2–23.5)				チヨウゲンボウ ^不 ラナーハヤブサ ^不 ラガーハヤブサ ^不 セーカーハヤブサ ^不 シロハヤブサ ^不 ハヤブサ ^不	ツバ	
	37.58 × 32.54	1.15	24.17 × 21.96	1.1	NA	NA	チヨウゲンボウ ^野	ドイツ	[33]
	(32.5–43.13 ×		(18.75–28.75 ×						
	30.0–35.0)		18.75–28.75						
	39.1 × 33.1 (33.0–	NA	22.5 × 21.3 (18.0–	NA	4.6 (2.0–7.0 ×	NA	シロハヤブサ ^胸	UAE	[37]
	46.0 × 28.0–40.0)		26.0 × 16.0–26.0)		2.0–7.0)		ハヤブサ ^胸 セーカーハヤブサ ^胸 チヨウゲンボウ ^胸		

表 2-3 (続き) ハヤブサ目に寄生する *Eumonospora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
<i>Eumonospora</i>	43.6 × 35.8 (39.4–)	1.12 (1.12–)	24.2–22.4	NA	18.6 × 4.6 (17.0–)	NA	チョウゲンボウ不	ヨーロッパ	[32]
<i>megafalconis</i>	48.3 × 32.1–41.0)	1.35)			20.0 × 4.0–6.0)		シロハヤブサ不 セーカーハヤブサ不	ツバ	
	42.25–43.77 × 35.36–37.14	1.19–1.23	23.93–22.7	NA	13.0–15.0 × 5.0– 6.0	NA	サバクフサエイシヨウ ノガン野	UAE	[56]
	42.2 × 35.9 (39.0–)	NA	23.6 × 22.7 (21.0–)	NA	16.5 × 4.2 (11.0–)	NA	フサエリシヨウノガン シロハヤブサ野	UAE	[37]
	49.0 × 30.0–40.0)		27.0 × 20.0–26.0)		20.0 × 3.0–6.0)		シロハヤブサ胸 ハヤブサ胸 セーカーハヤブサ胸		

表 2-3 (続き) ハヤブサ目に寄生する *Eumonospora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
<i>Eumonospora</i>	27.0 × 23.8 (23.0–)	NA	18.8 × 14.8 (16.5–)	NA	NA	NA	ソウゲンハヤブサ ^不	ヨーロ	[11]
<i>neofalconis</i>	32.4 × 20.4–29.4)		21.8 × 13.7–16.1)				チゴハヤブサ ^不 ラナーハヤブサ ^不 ハヤブサ ^不	ツパ	
	26.3 × 23.9	NA	17.9 × 14.8	NA	NA	NA	ハヤブサ ^飼	メキシ コ	[52]
	25.6 × 22.5 (20.0–)	NA	17.2 × 15.2 (13.0–)	NA	9.9 × 2.4 (8.0–)	NA	シロハヤブサ ^飼	UAE	[37]
	30.0 × 19.0–28.0)		19.0 × 12.0–19.0)		12.0 × 2.0–4.0)		シヤヒーハンハヤブサ ^飼 セーカーハヤブサ ^飼		
	26.9 × 23.2 (25.8–)	1.1	18.3 × 14.5 (15.8–)	NA	11.2 × 2.7	NA	アメリカチヨウゲンボウ ^飼	サウジ	[2]
	28.4 × 21.0–24.7)		19.5 × 13.8–16.0)				ハヤブサ ^飼 シヤヒーハンハヤブサ ^飼 セーカーハヤブサ ^飼 シロハヤブサ	アラビ ア	
<i>Eumonospora</i>	47.1 × 37.6 (42.0–)	1.25 (1.2–)	25.1 × 24.3 (24.0–)	1.03 (1.0–)	17.0 × 4.2 (15.0–)	NA	チヨウゲンボウ ^飼	ポルト ガル	[12]
<i>penerirei</i>	49.0 × 34.0–40.0)	1.4)	27.0 × 24.0–25.0)	1.1)	18.0 × 3.0–5.0)				

L: 長さ ; W: 幅 ; NA: 不明

UAE : アラブ首長国連邦

飼 : 飼育下個体 ; 野 : 野生個体 ; 不 : 由来不明個体

表 2-4 タカ目およびその他動物に寄生する *Eumonospora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
<i>Eumonospora aquilae</i>	43.0 × 37.5 (40.0–49.0 × 34.0–39.0)	1.15 (1.03–1.26)	23.8 × 23.3 (23.0–25.0 × 22.0–25.0)	1.02 (1.00–1.45)	13.5 × 4.5 (13.0–14.0 × 4.0–5.0)	NA	イヌワシ ^飼	チェコ	[67]
<i>Eumonospora arcayae</i>	32.9 × 29.4 (30.3–37.6 × 29.0–31.8)	NA	21.9 × 21.8	NA	NA	NA	ハネビロノスリ ^不	ベネズエラ	[65]
<i>Eumonospora argentati</i>	32.1 × 28.3 (29.0–36.0 × 26.4–30.4)	1.13 (1.06–1.22)	20.0 (18.4–21.0)	1	12.0 × 5.1 (10.4–13.6 × 4.8–5.6)	NA	オオハシノスリ ^飼	アメリカ	[63]
<i>Eumonospora circei</i>	20.3 × 16.9 (18.5–23.8 × 15.1–20.5)	NA	NA	NA	NA	NA	セグロカモメ ^不	ドイツ	[57, 62]
<i>Eumonospora daceloe</i>	24.5 × 21.8 (23.0–25.0 × 21.0–24.0)	1.12 (1.04–1.19)	16.2 × 15.6 (15.0–17.0 × 15.0–17.0)	1.04 (1.00–1.07)	10.4 × 4.3 (9.0–11.0 × 4.0–5.0)	NA	ヨーロッパ ^飼	チェコ	[67]
<i>Eumonospora hanebrinki</i>	31.4 × 29.3 (30.0–32.0 × 28.0–31.0)	1.05 (1.01–1.1)	21.2 × 20.6 (20.0–24.0 × 20.0–21.0)	1.03 (1.0–1.14)	17.0 × 4.8 (16.0–18.0 × 4.0–6.0)	3.54	ワライカワセミ ^野	オーストラリア	[73]
<i>Eumonospora kansasensis</i>	48.1 × 42.1 (42.0–54.0 × 37.0–50.0)	1.2 (1.0–1.4)	24.8 (23–28)	1	18.6 × 5.6 (16.0–20.0 × 4.0–6.0)	NA	ハクトウワシ ^飼	アメリカ	[39]
<i>Eumonospora lindsayi</i>	37.2 × 32.6 (32.8–40.0 × 29.6–36.0)	1.14 (1.07–1.24)	22.5 (20.8–24.8)	1	14.4 × 5.4 (13.6–15.2 × 5.0–6.0)	NA	アレチノスリ ^飼	アメリカ	[62]
	33.7 × 31.6 (31.2–36.0 × 30.4–32.8)	1.07 (1.02–1.13)	20.5 (19.2–22.0)	1	15.5 × 4.8 (14.4–16.8 × 4.4–5.0)	NA	アカオノスリ ^飼	アメリカ	[62]

表 2-4 (続き) タカ目およびその他動物に寄生する *Eumonospora* 属の形態学的特徴、宿主、および地域

種類	オーシスト		スポロシスト		スポロゾイト		宿主	地域	文献
	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W	大きさ (μm)	L/W			
<i>Eumonospora microti</i>	9.8 × 9.1 (9.0-10.5 × 8.5-10.0)	1.08 (1.0-1.2)	7.3 × 6.5 (7.0-8.5 × 6.0-7.0)	1.12 (1.0-1.4)	NA	NA	アメリカハタ ネズミ ^不	アメリカ	[53]
<i>Eumonospora petersoni</i>	43.1 × 39.8 (38.0-42.0)	1.08 (1.0-1.1)	23.4 × 23.3 (21.0-26.0)	1.05 (1.0-1.1)	15.6 × 4.2 (15.0-16.0 × 4.0-5.0)	NA	アシボゾハイ タカ ^野	アメリカ	[40]
<i>Eumonospora tremula</i>	33.0-35.0 × 28.0-30.0	NA	23.5-25.0	NA	20.0 × 6.0	NA	ヒメコンドル ^不	アメリカ	[3]
<i>Eumonospora undata</i>	33.4 × 28.0 (30.0-32.0)	1.2 (1.07-1.52)	20.4 × 20.1 (18.6-21.6)	1.01 (1.00-1.05)	16.3 × 5.2 (15.2-18.4 × 4.8-5.6)	NA	ヒメコンドル ^脚 野	アメリカ	[35]
<i>Eumonospora undata</i>	30.6 × 29.3 (26.6-33.3 × 24.0-32.0)	NA	22.0 × 21.0	NA	NA	NA	セグロカモメ ^不	ドイツ	[57]
<i>Eumonospora uptoni</i>	32.5 × 29.2 (27.0-42.0 × 24.0-35.0)	NA	NA	NA	NA	NA	ウミガラス ^不	オランダ	[51]
<i>Eumonospora uptoni</i>	30.5 × 27.6 (29.6-36.0 × 24.0-31.2)	1.1 (1.1-1.3)	20.3 (19.2-23.2)	NA	15.0 × 2.4 (13.6-16.8 × 1.8-3.2)	NA	エトピリカ ^脚	アメリカ	[64]
<i>Eumonospora uptoni</i>	28.1 × 26.4 (25.5-31.5 × 24.0-28.5)	1.07 (1.0-1.18)	18.2 × 17.9 (18.0-19.5 × 16.5-18.0)	1.01 (1.00-1.09)	12.6 × 4.2 (10.5-15.0 × 3.0-4.5)	NA	アカオノスリ ^脚	アメリカ	[36]

L: 長さ

W: 幅

NA: 不明

飼: 飼育下個体; 野: 野生個体; 不: 由来不明個体

第3章 猛禽類由来 *Eumonospora* 属コクシジウムの分子系統解析による分類

1 緒言

アピコンプレックス門 (Phylum Apicomplex) ・コクシジウム亜綱 (Subclass Coccidia) ・真コクシジウム目 (Eucoccidiorida) に属するコクシジウムのうち脊椎動物に寄生するアイメリア亜目 (Eimeriorina) は主にアイメリア科 (Eimeriidae) とサルコシステイス科 (Sarcocystidae) に分類されている [50]。鳥類および爬虫類に寄生するコクシジウムのうち、オーシスト内に 1 つのスポロシストを形成するものについては、長らくアイメリア科に分類されていた [62, 63]。本論文の第 2 章で、猛禽類由来の単一スポロシスト型のコクシジウムについて *Eumonospora* 属を再提唱したが、本属は遺伝子解析の結果から、サルコシステイス科コクシジウムとの近縁性が示唆されている [56, 73]。サルコシステイス科コクシジウムは、獣医学上重要な *Toxoplasma gondii*、*Neospora caninum*、*Cystoisospora* 属、および *Sarcocystis* 属などを含む分類群である。本科の一般的な特徴として、終宿主は肉食性哺乳類で、オーシスト内には 2 個のスポロシストを形成し、発育には中間宿主あるいは待機宿主を必要 (必須でないものも存在する) とし、それらの体内で組織シストを形成することが知られている [23, 59]。これらの性状、特に終宿主に関して、*Eumonospora* 属コクシジウムは該当するものではない。そこで本章では、複数の遺伝子領域を用いた分子系統解析により *Eumonospora* 属のアイメリア亜目内での系統分類学的位置を明らかにし、近縁な分類群との生物学的知見とを比較し、分類形質の推定と系統の比較を行うことにより、系統関係と宿主の関係性から共種分化の過程を推定することとした。

2 材料および方法

2-1 アイメリア亜目における分類的位置の検討

本論文の第2章にてフクロウ類およびコチョウゲンボウ由来 *E. henryae* の 18S 配列と、現在データベースに登録されている他の *Eumonospora* 属の 18S 配列、*E. neofalconis* (Accession nos. KT037081、MN629229、MN629230) と *E. daceloe* (Accession no. KJ634019) を遺伝子データとして使用した。更にデータセットにはアイメリア科およびサルコシステイス科の中から獣医学上重要な種で、爬虫類および鳥類寄生種から遺伝子情報を主に選別した。外群形成には *Cryptosporidium parvum* (Accession no. L25642) を用いた。系統解析には解析ソフトウェア Geneious Prime 2020.2.2 (<https://www.geneious.com>) を使用した。アライメントアルゴリズムは MAFFT [31] を使用し、アライメント後のデータセットは視認により明確なエラーを手動で修正した。系統樹解析は Geneious Prime 2020.2.2 にプラグインされている PHYML 3.3.2 で最尤法 (ML) を用いた [26]。進化モデルの選定はソフトウェア JModelTest 2.1.10 を使用し、Akaike Information Criterion (赤池情報量規準) を基準に解析し、GTR+I+G のモデルを適応した [20]。各ノードの信頼性は 500 回のブートストラップ検定にて求め、50 を下回る指示値は省略した。

2-2 サルコシステイス科における分類的位置の検討

Eumonospora 属のサルコシステイス科内における系統的位置を解明するために 18S、28S、および *cox1* の各配列と、それぞれの配列を連結させた結合配列の計 6 種のデータセット (18S、28S、*cox1*、18S+28S、18S+*cox1*、28S+*cox1*) を遺伝子系統解析に用いた。

系統樹を作成するにあたり *Eumonospora* 属は属間および種間の関係性を明瞭にするため、本属の配列は全て単独で使用した。データベース上に登録されてい

る *Eumonospora* 属は *E. neofalconis*、*E. daceloe*、*E. henryae* の 3 種類である。*E. daceloe* の 28S 配列 (Accession no. KJ634020) は BLSATN の結果、*Isospora anthochaerae* (Accession no. KF766053) と 100%一致し、誤登録と思われるため本研究では使用しなかった。データベース上に同一種の配列が複数登録されている場合、コンセンサス配列を作成した。すなわち、同種が 10 配列以上の登録されている場合は 90%ルールを、10 配列未満は 50%ルールを適応し、コンセンサス配列を作成した [47]。使用した配列および適応したルールは表 3-1 に示した。全てのデータセットを用いた解析では *Sarcocystis rileyi* を外群とした。18S および 28S の配列は MAFFT [31] を使用し、*cox1* の配列は Geneious アライメントアルゴリズムを使用してマルチプルアライメントを行った。アライメント後、視認による明確なエラーは手動で修正した。その後 PHYML3.3.2 で最尤法 (ML) [26]、MrBayes3.2.6 でベイズ推定 (BI) [29] の系統解析を行なった。JModelTest2.1.10 で進化モデルを Akaike Information Criterion (赤池情報量規準) を基に解析し、GTR+I+G のモデルを適応した [20]。ML の各ノードの信頼性は 1,000 回のブートストラップ検定にて求め、50 を下回る指示値は省略した。ベイズ推定では系統樹を事後確率にて評価するにあたって 1.1×10^6 世代のマルコフ連鎖モンテカルロにより事後確率を推定し、事後確率の数値が 0.5 未満のノードは記載を省略した。

3 結果

3-1 アイメリア亜目における分類的位置の検討

アイメリア亜目の 18S データセットは 82 配列あり、配列長 1,864 bp となった。系統樹解析の結果、アイメリア亜目はアイメリア科とサルコシスティス科の 2 つの大きなクレードを形成した (図 3-1)。サルコシスティス科クレードでは、*Sarcocystis* 属からなるクレードと、*Hyaloklossia* 属、*Besnoitia* 属、*Nephroisospora*

epetesici、*Toxoplasma gondii*、*Neospora caninum*、*Hammondia hammondi*、*Heydornia* 属、および *Cystoisospora* 属からなる多系統クレードを形成した。*Eumonospora* 属はサルコシステイス科内に位置し、上記の多系統クレードに属した。この結果は *Eumonospora* 属がサルコシステイス科に属する事を示していた。

一方、アイメリア科をみると、*Acroeimeria* 属と *Choleoeimeria* 属からなるクレードと、*Eimeria* 属、*Isospora* 属、および *Caryospora* 属等からなるクレードに大別された。これらのクレードは、スポロシストのスチーダボディの有無により形態形質によって区別可能で、前者のオーシストではスチーダボディがみられない。後者のスチーダボディを有するクレードをみると、爬虫類寄生種の *Caryospora* 属 (*C. bigenetica*、*C. cheloniae*、*C. ernsti*) は単一スポロシストを形成するが、アイメリア科内において多系統群となった。また、アイメリア科のクレードにおいて *Eimeria* 属は多系統であり、フクロウに寄生する *Eimeria* 属 (*E. bubonis*、*E. megabubonis*) はキジ目に寄生する *Eimeria* 属 (*E. tenella*、*E. brunettii*、*E. maxima* 等) と姉妹群となった。

3-2 サルコシステイス科における分類学的位置の検討

系統解析の結果、6つのデータセット (18S、28S、cox1、18S+28S、18S+cox1、28S+cox1) はそれぞれ 1,744 bp、3,259 bp、1,039 bp、5,003 bp、2,783 bp、4,298 bp であった

結合配列のデータセット (18S+28S、18S+cox1、28S+cox1) を ML および BI で作成した 6つの系統樹の樹形 (トポロジー) は全て類似していた (図 3-2、3-3、3-4、3-5、3-6、3-7)。すなわち、サルコシステイス科内で *Sarcocystis* 属を外群にすると、カエルに寄生する *Hyaloklossia* 属と哺乳類に寄生する *Cystoisospora* 属が最初に分岐し、それぞれが単系統を形成した。次に *Eumonospora* 属が分岐し単系統を形成した。最後にトキソプラズマ亜科 (*Besnoitia* 属、*Neospora cininum*、*Hammondia hammondi*、*Heydornia* 属、*Toxoplasma gondii*) が分岐し多系統を形成

した。一方、コウモリの腎臓に寄生する *Nephroisospora eptesici* は信頼性の高い分岐を得られなかった。この解析結果により、*Hyaloklossia* 属、*Cystoisospora* 属、*Eumonospora* 属、およびトキソプラズマ亜科の関係性が判明し、*Eumonospora* 属はトキソプラズマ亜科と姉妹群となった。

4 考 察

4-1 アイメリア亜目における分類的位置の検討

これまで、脊椎動物に寄生するコクシジウムのうち、オーシスト内に 1 つのスポロシストと 8 個のスポロゾイトを形成するものはアイメリア科のカリオスポラ亜科 (Caryosporinae) に分類されていたが [3, 50]、鳥類に寄生する *Eumonospora* 属はアイメリア科とは異なりサルコシステイス科に編成する必要があることが本研究および先行研究 [56, 73] から示された。サルコシステイス科は、宿主体内での発育様式や、中間宿主の有無等の生物学的特徴からトキソプラズマ亜科 Toxoplasmatinae (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Heydornia* 属、*Hammondia hammondi*)、シストイソスポラ亜科 Cystoisosporinae (*Cystoisospora* 属)、およびサルコシステイス亜科 Sarcocystinae (*Sarcocystis* 属、*Frenkelia* 属) の 3 亜科に分類されている [23]。今回の系統解析で *Eumonospora* 属はサルコシステイス亜科とは系統的に異なり、トキソプラズマ亜科またはシストイソスポラ亜科との近縁性が示された。一般的にこれら 2 亜科のコクシジウムは、肉食哺乳類の消化管で有性生殖を行い、中間宿主あるいは待機宿主の体内でシストを形成する特徴を持つ。*Eumonospora* 属の生活環は不明な部分が多いが、アメリカワシミミズクの小腸で *E. bubonis* の各種発育ステージ (メロゴニーおよびガメトゴニー) が確認され [15]、また他の種も糞便内にオーシストを確認できていることから、終宿主体内での寄生部位は腸管であると思われる。しかし、終宿主は原則として鳥類であり、トキソプラズマ亜科やシストイソスポラ亜科が肉食性哺乳

類であるのとは明らかに異なる。また、生活環をみると、*Eumonospora* 属は任意の複数宿主性(多宿主性: heteroxenous) とされる [62]。*E. bubonis* および *E. kutzeri* のオーシストは、終宿主となる同属の鳥類間に感染するが、オーシストを実験的に投与したマウスを摂取することでも終宿主に感染が成立することが示されている [15, 66]。一方で、*Eumonospora* 属は実験感染マウス体内では無性増殖しないとされており [14, 35, 66]、*Cystoisospora* 属のように単一のスポロゾイト(あるいはユニゾイトシスト) が待機宿主内で形成される可能性が推測された [62]。

アイメリア亜目のアイメリア科 *Caryospora* 属およびサルコシステイス科 *Eumonospora* 属はオーシスト内に 1 つのスポロシストと 8 個のスポロゾイトを有する点で類似しているが、両者はスチーダボディの有無により明確に区別できる(表 3-2)。一方、Barta らが 2001 年にスチーダボディとスポロゾイト内のリフラクタイトボディの有無はアイメリア科とサルコシステイス科の形態学的鑑別基準になると提唱したが [7]、爬虫類の胆管に寄生する *Choleoimeria* 属と *Acroeimeria* 属はアイメリア科にも関わらずスチーダボディが認められない。従って、スポロシストにスチーダボディが無いことはサルコシステイス科の共通の形態形質ではあるが、アイメリア科においては科レベルの分類形質にはならない可能性が示された。

以上のように、*Eumonospora* 属はアイメリア亜目内でサルコシステイス科に位置することが確かめられた。一方、サルコシステイス科の共通派生形質であると考えられた、(1) 終宿主は肉食動物(主に哺乳類)であること、(2) オーシスト内に 2 個のスポロシスト(それぞれ 4 個のスポロゾイトを含む) がみられること [23, 59]、という性質は *Eumonospora* 属ではみられなかった。宿主動物でみると、サルコシステイス科では肉食動物の他に、*Nephroisospora eptesici* がコウモリの腎臓から [70]、*Hyaloklossia* 属がカエルの腎臓からそれぞれ記載されている [60]。コクシジウム類は化石標本がないことから祖先原虫の推定は困難であるが、肉食動物と共種分化したサルコシステイス科の祖先が、肉食動物以外の動物

に宿主転換 (host switching) した可能性が想定される。また、*Caryospora* 属と *Eumonospora* 属のオーシストが 1 つスポロシストに 8 つのスポロゾイトを備えるという形質は共有形質ではなく、収斂進化 (convergent evolution) によるものと想定された。これは系統的に遠いグループの生物において類似した形質を獲得する現象のことで、コクシジウムにおいては、*Lankesterella* 属 (ランケステレルラ科) と *Schellackia* 属 (シェラッキア科) でみられる終宿主がオーシストを外界に排出しないという生物特性でも想定されている [43]。サルコシステイス科のうち、*Cystoisospora* 属ではしばしばスポロシスト数の異常型が排出されることがあり [38]、*Eumonospora* 属の祖先原虫もスポロシスト異常型であった可能性も考えられる。

以上、今回の遺伝子系統解析では *Eumonospora* 属がアイメリア亜目内でサルコシステイス科に位置することが確かめられた。しかしながら、*Sarcocystis* 属を除く他の原虫との系統関係は十分に推定できなかった。

4-2 サルコシステイス科における分類学的位置の検討

Eumonospora 属のサルコシステイス科内における系統関係を詳細に調べるために、18S に加え他の遺伝子領域を用いて解析を試みた。*Eumonospora* 属内をみると、2つのクレードに分けられた。すなわち *E. neofalconis* タイプ A (Accession no. KT037081) [52] とタイプ B (Accession no. MN629229) [2] は単系統を形成したが、タイプ C (Accession no. MN629230) [2] は *E. daceloe* と *E. henryae* の複合クレードに属した。これら 3つの配列は全て *E. neofalconis* として登録されていたが、マルチプルアライメントの結果タイプ C は *E. daceloe* と *E. henryae* に 99%以上の相同性を示し、それぞれ 11 塩基と 5 塩基の差異が認められた。一方で、タイプ C と *E. neofalconis* (タイプ A とタイプ B) の相同性は 98.87%であり、16 塩基の差異が認められ、タイプ A とタイプ B では 6 塩基の差異を示し

た。更に今回の系統解析の結果から、タイプ C の配列を *E. neofalconis* と鑑別するにあたって、再考の余地があると思われた。

Eumonospora 属と宿主となる猛禽類の系統樹を比較したところ、*Eumonospora* 属の樹形（トポロジー）は宿主猛禽類の樹形と大きく類似する事も判明した。宿主の系統についてみると、近年定義された陸鳥クレード（テルルラウエス、Telluraves）は大きく 2 つに分けられ、1 つはハヤブサ目、オウム目、およびスズメ目を含む Australaves で、他方はタカ目、ブッポウソウ目、フクロウ目、およびコンドル目を含む Afroaves である [41]。今回 *Eumonospora* 属は *E. neofalconis*（タイプ A とタイプ B）の単一クレードと *E. daceloe*、*E. henryae* と *E. neofalconis*（タイプ C）の複合クレードで別れており、この樹形は Australaves と Afroaves の樹形と呼応している（図 3-8）。このような宿主と寄生虫の系統樹形と呼応は共種分化（cospeciation）が起きていることを示唆しており、スズメ目鳥類に寄生する *Isospora* 属でも見られている [55]。そして *E. henryae* がフクロウ目およびハヤブサ目より検出されたことは、本種に宿主転換（host switching）が発生した可能性を示唆しており、類似した現象は鳥類の *Plasmodium* 属と *Cryptosporidium* 属でも観察されている [9, 44]。

今回コクシジウムの 18S、28S、および *cox1* を解析することによって、*Eumonospora* 属の分類学的立場をより鮮明にすることを可能とした。一方で日本国内から連続して海外輸入猛禽類より *E. henryae* が検出されおり、アジア圏で本種が流行する恐れがある。本属は鳥類に対して一定の病原性を示し、死に至ることもある。よって生物保全の観点から鳥類在来種でも慎重に調査をし、本属の生物学的影響を把握する必要がある。

最後に、サルコシスチス科は哺乳類などに寄生し、その特徴として (1) オースト内に 2 個のスपोシストを形成する、(2) 1 つのスपोシスト内に 4 つのスプロゾイトを形成する、(3) 多宿主性である、(4) 中間宿主内でシストを形成する、などが挙げられる [23, 59]。現在では本科内に生物学的特徴からトキソプ

ラズマ亜科、シストイソスポーラ亜科、およびサルコシスティス亜科の3つの亜科に分類することができる [23, 59]。前述の通り、中間宿主リンパ組織にモノシストを形成する特徴を根拠にシストイソスポーラ亜科が提唱されていることから、著者は *Eumonospora* 属の1つスポロシストに8つのスポロゾイトという、明確に他亜科と区別がつく形態学的特徴を鑑別ファクターとし、新亜科エウモノスポーラ (*Eumonosporinae*) を提唱する (表 3-3) [18]。シスト形成能力、位置と形態学的特徴および生活環など解明すべき点が多いが、系統解析結果もサルコシスティス科内での単系統を示すことから、本新亜科は分類学的に重要な有意義を有することが示された。更に今までのサルコシスティス科に関するオーシスト形態の定義についても再考する必要があると考えられた。

5 小 括

従来、コクシジウムのオーシスト内に1つのスポロシストと8つのスポロゾイトを形成する *Caryospora* 属や *Eumonospora* 属の様なコクシジウムはアイメリア科に分類されていた。しかし複数の研究で *Eumonospora* 属はサルコシスティス科と系統学的に近縁であることが示唆されている。従って、本研究では *Eumonospora* 属のアイメリア亜目内での系統分類学的位置の解明することを試みた。*Eumonospora* 属の18S配列とアイメリア亜目の18Sデータセットを系統解析した結果、*Eumonospora* 属はサルコシスティス科に属し、トキソプラズマ亜科、シストイソスポーラ亜科、*Hyaloklossia* 属、および *Nephroisospora eptesici* と単系統群となった。更に *Sarcocystis* 属を外群とした18S、28S、*cox1* 領域、およびそれぞれの領域を結合した結合配列の計6つのデータセットを使用し、最尤法とベイズ推定にて系統樹を作成した。その結果全ての解析にて類似した系統樹が作成され、*Eumonospora* 属はトキソプラズマ亜科と姉妹群を形成した。一方、*Eumonospora* 属の系統樹トポロジーは宿主猛禽類系統樹トポロジーと大きく類

似する事も判明した。そして *E. henryae* が異なる目の鳥類から検出されたことは、本種に宿主転換が起きた可能性を示唆していた。サルコシステイス科は現在大きくトキソプラズマ亜科、シストイソスポーラ亜科、およびサルコシステイス亜科の3つの亜科に分類することができるが、本研究では *Eumonospora* 属の1つのスポロシストに8つのスポロゾイトという、明確に他亜科と区別がつく形態学的特徴を鑑別根拠とし、新亜科エウモノスポーラ (*Eumonosporinae*) を提唱した。更に今までのサルコシステイス科に関するオーシスト形態の定義についても再考する必要があると思われた。

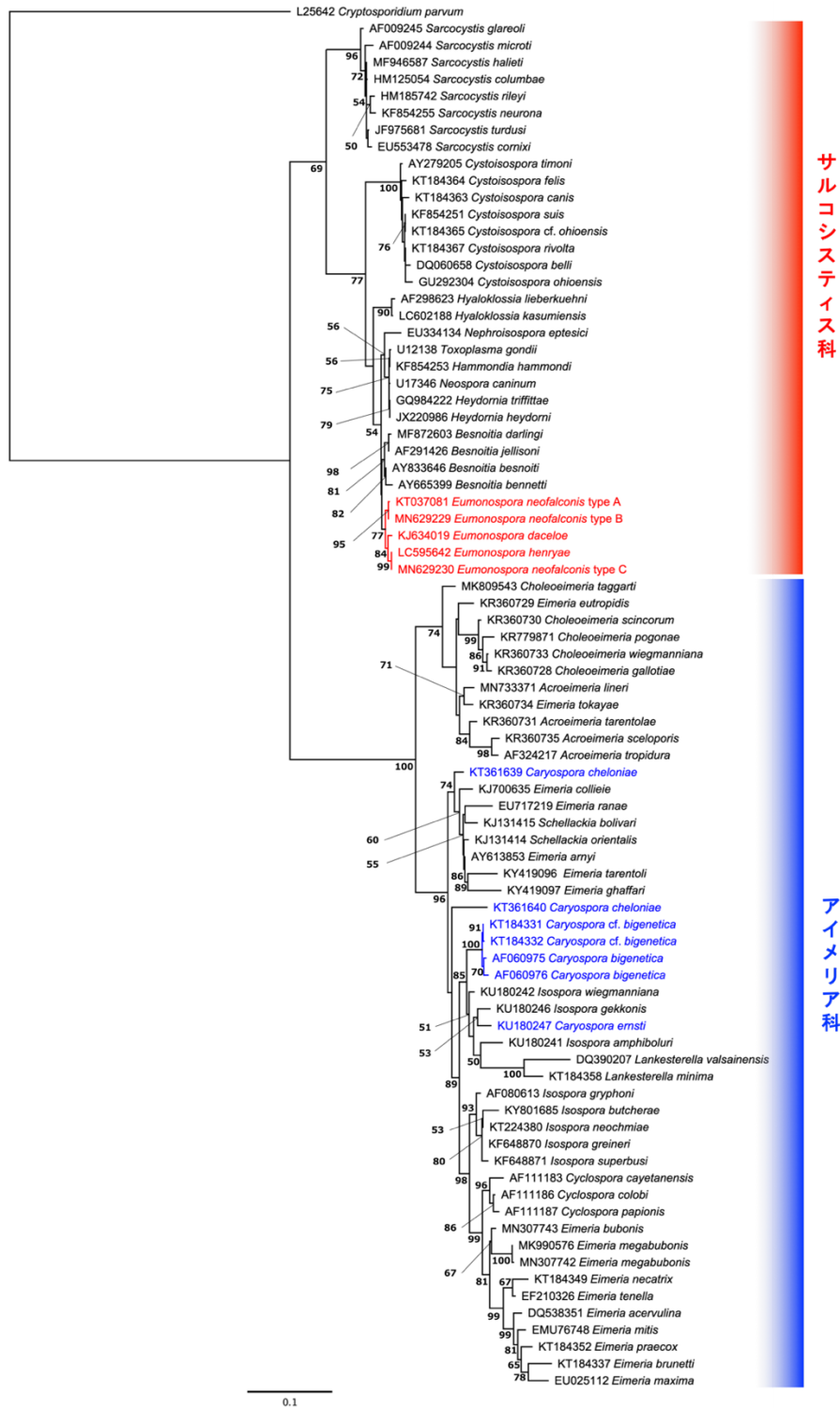


図 3-1 アイメリア亜目 18S 領域の ML 系統樹

Eumonospora 属は赤色、*Caryospora* 属は青色で示した。ブートストラップ検定にて 50 を下回るノードの数値は省略した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。

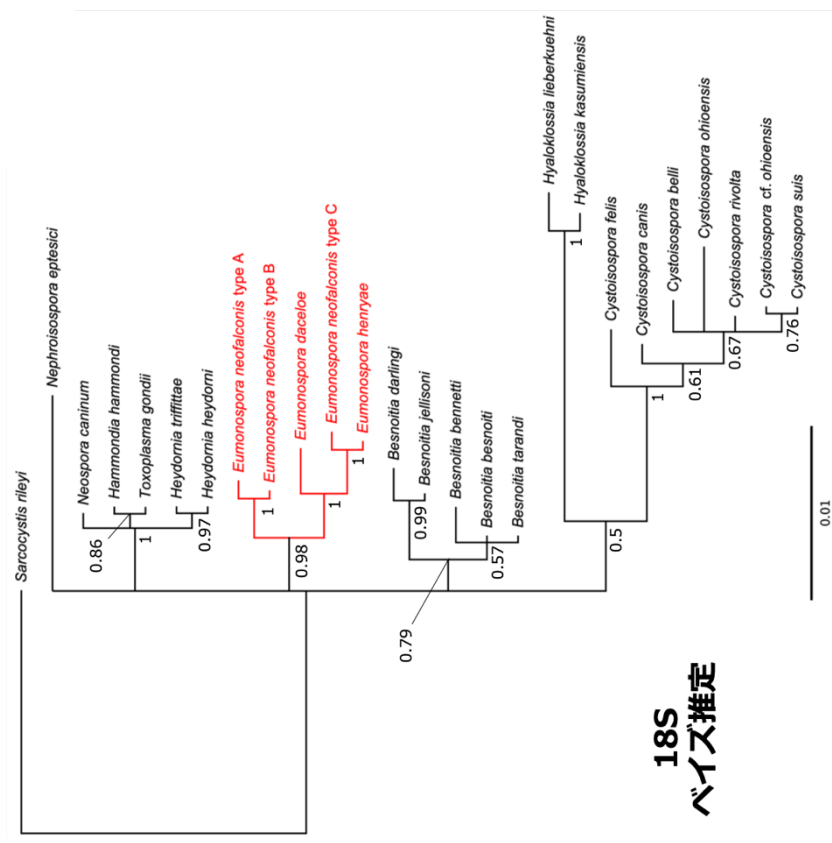
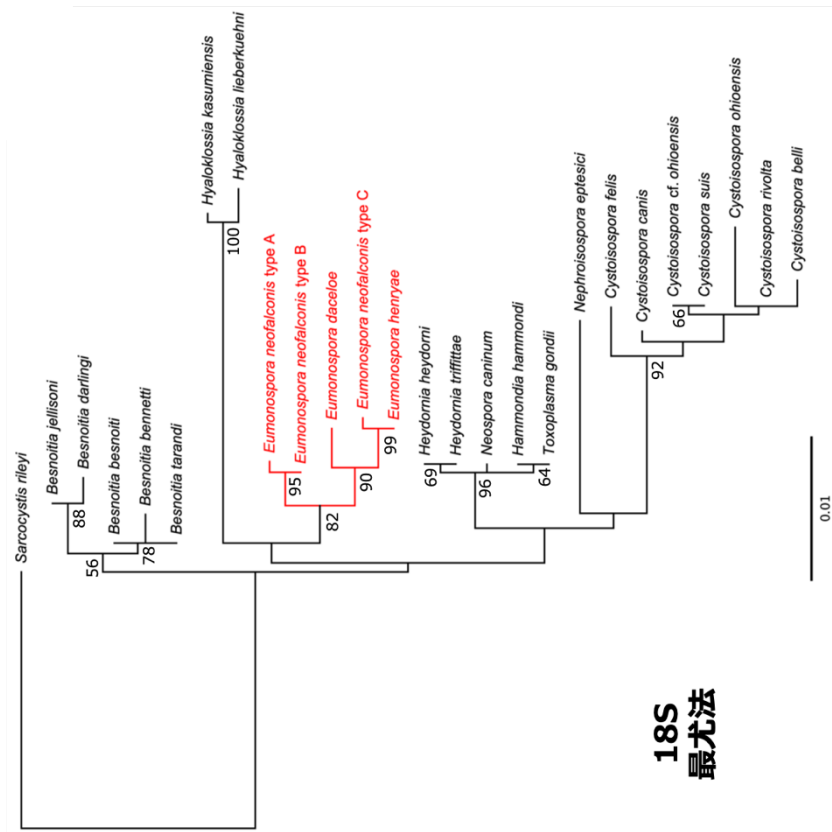


図 3-2 *Sarcocystis rileyi* を外群とした、サルコシステイ科における 18S の系統樹

バイズ推定にてトキソプラズマ亜科と *Eumonospora* 属は互いに信頼性の高い系統関係を得られなかったが、それぞれ信頼性の高いグレードを形成した。*Hyaloklossia* 属と *Nephrospora eptesici* は両方の解析法にて信頼性の高い関係を得られなかった。事後確率数値が 0.5 未満およびブートストラップ指示値が 50 を下回るノードの記載を省略した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。

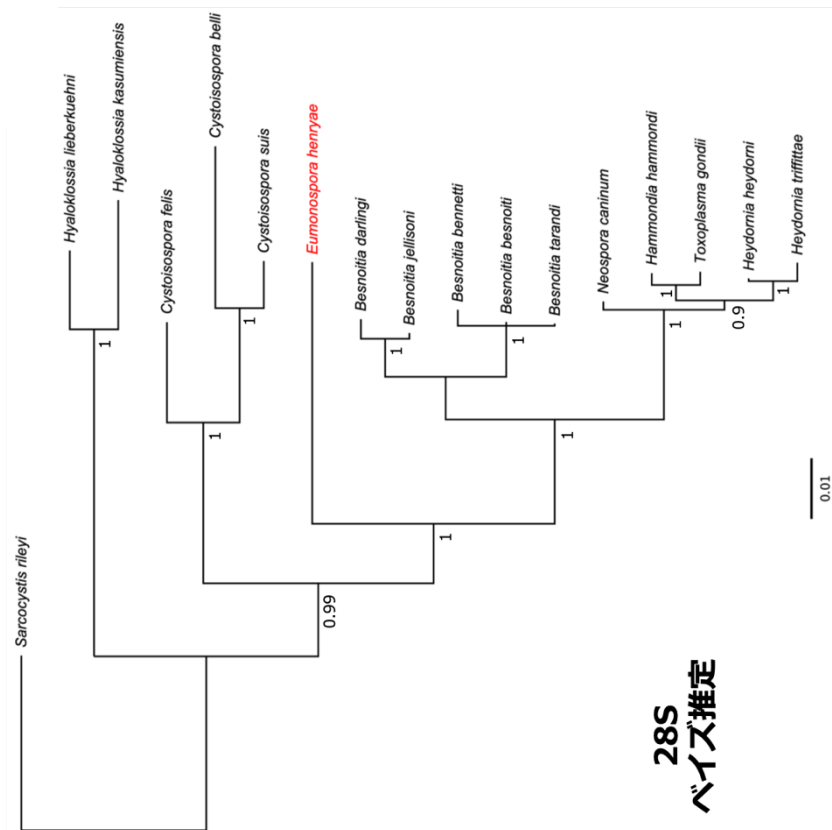
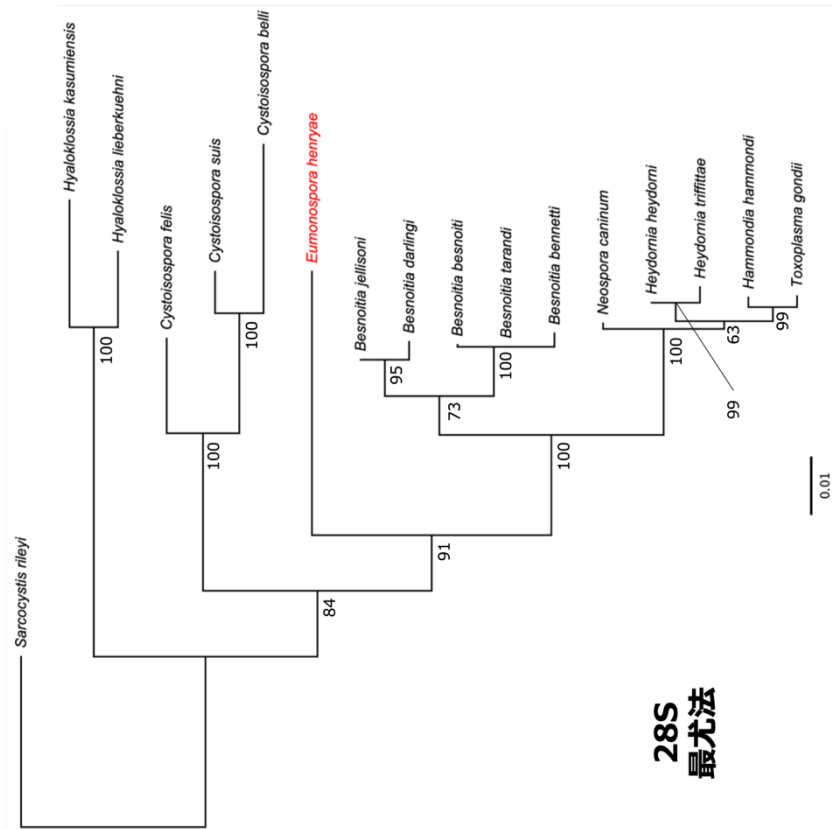


図 3-3 *Sarcocystis rileyi* を外群とした、サルコシステイス科における 28S の系統樹

両方の解析法にて同じ系統樹が作成された。*Hyaloklossia* 属、*Cystoisospora* 属、*Eumonospora* 属とトキンプラズマ亜科の順に分岐した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。



図 3-4 *Sarcocystis rileyi* を外群とした、サルコシステイ科における *cox1* の系統樹

両方の解析法にて同じ系統樹が作成された。*Hyaloklossia kasumiensis* と *Cystoisospora* 属がクレードを形成した。相対するクレードでは *Eumonospora* 属とトキソプラズマ亜科の順に分岐した。事後確率数値が 0.5 未満およびブートストラップ指示値が 50 を下回るノードの記載を省略した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。

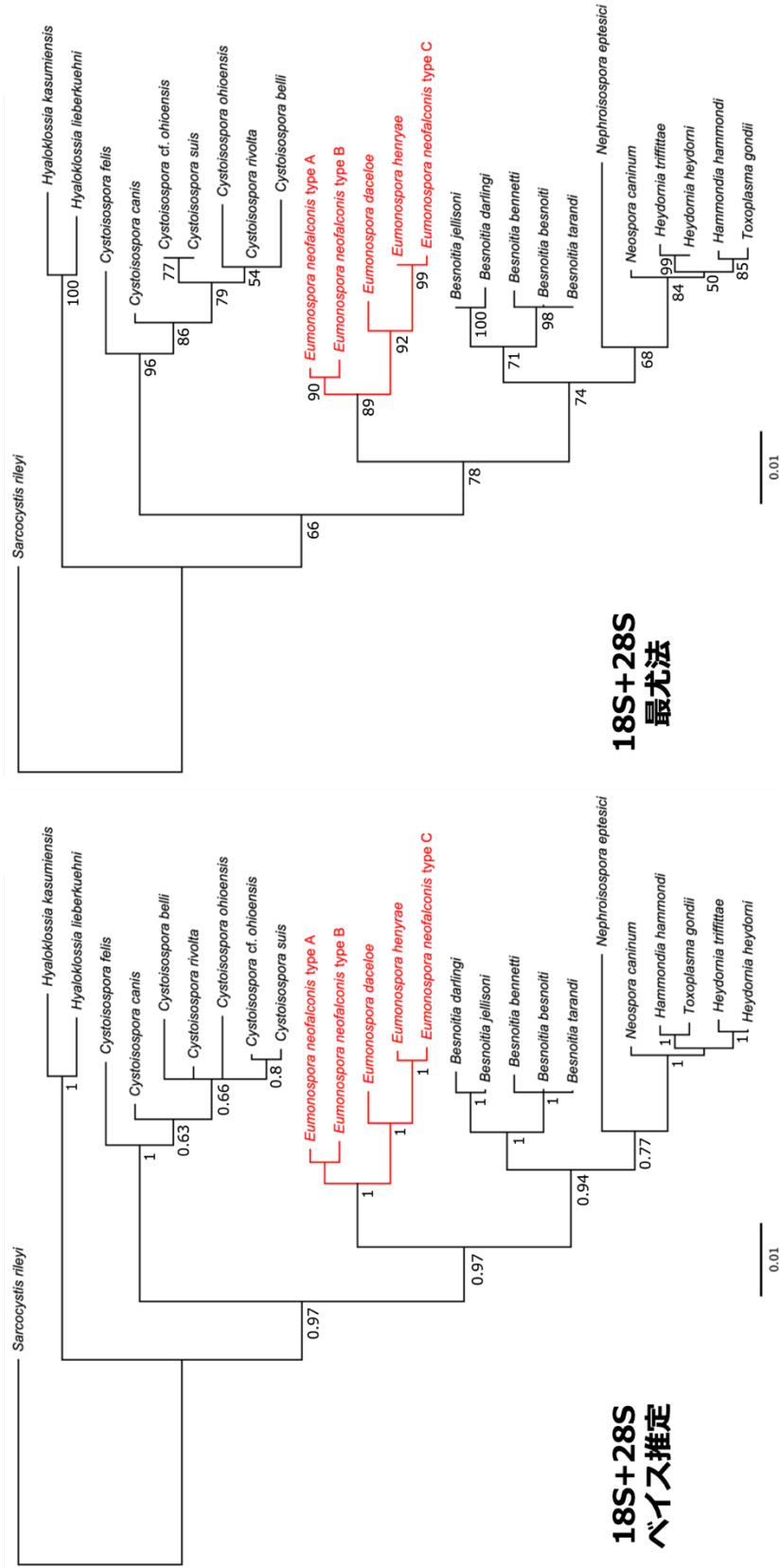


図 3-5 *Sarcocystis rileyi* を外群とした、サルコシステイスキ科における 18S+28S の系統樹

両方の解析法にて同じ系統樹が作成された。*Hyaloklossia* 属、*Cystoisospora* 属、*Eumonospora* 属とトキンプラズマ亜科の順に分岐した。*Nephrosispora eptesici* はトキンプラズマ亜科内に属した。事後確率数値が 0.5 未満およびブートストラップ指示値が 50 を下回るノードの記載を省略した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。

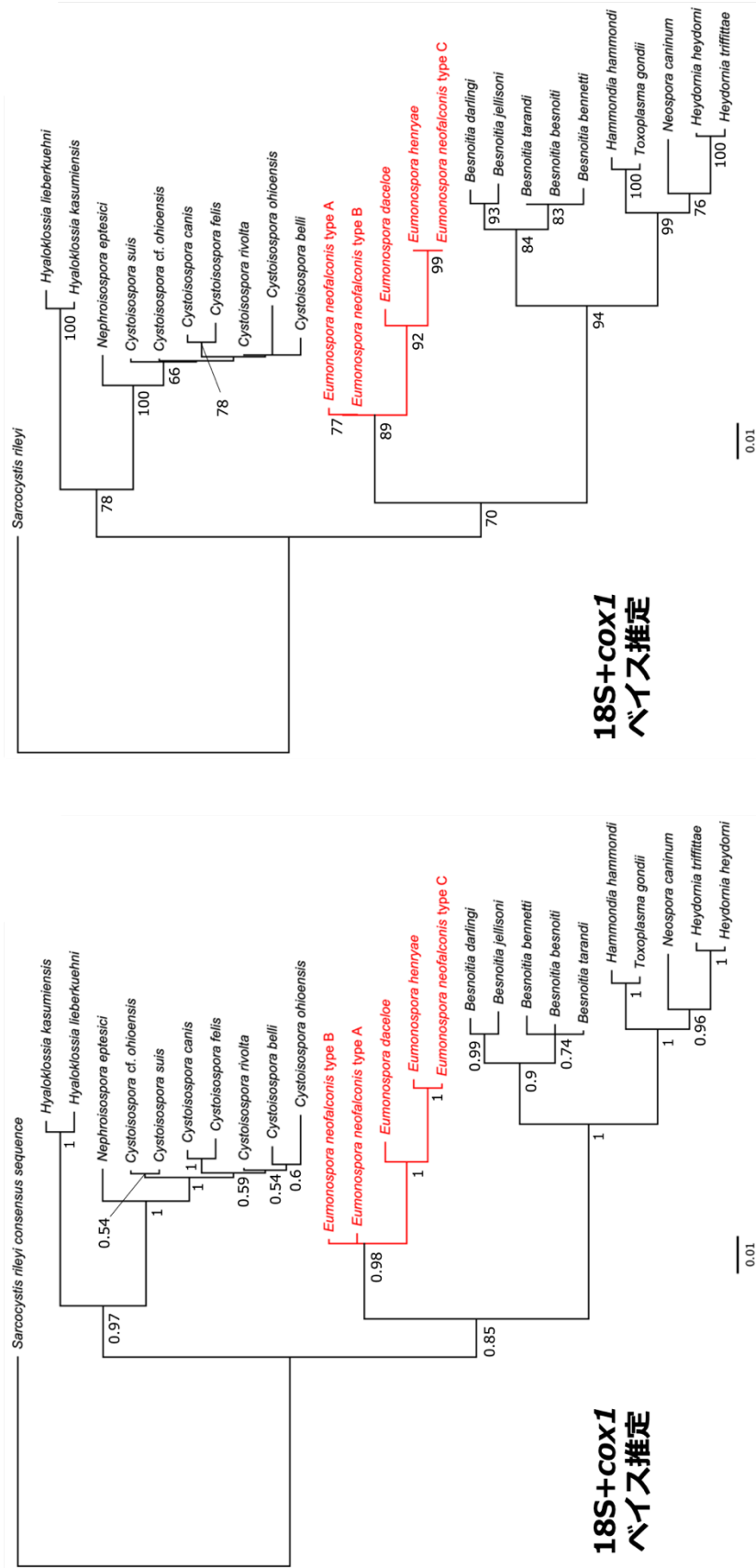


図 3-6 *Sarcocystis rileyi* を外群とした、サルコシステイスキ科における 18S+cox1 の系統樹

両方の解析法にて同じ系統樹が作成された。*Hyaloklossia* 属、*Nepthroisospora eptesici* と *Cystoisospora* 属の順でクレードを形成した。相対するクレードでは *Eumonospora* 属、*Besnoitia* 属とトキソプラズマ亜科の順に分岐した。事後確率数値が 0.5 未満およびブートストラップ指示値が 50 を下回るノードの記載を省略した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。

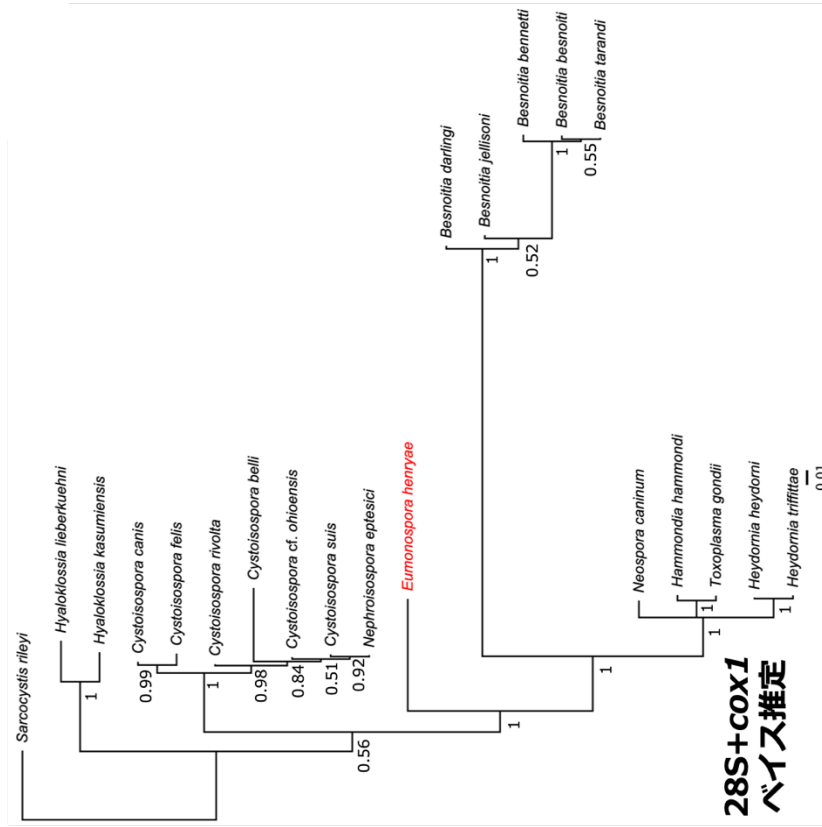


図 3-7 *Sarcocystis rileyi* を外群とした、サルコシステイスキ科における 28S+cox1 の系統樹

両方の解析法にて同じ系統樹が作成された。*Hyaloklossia* 属、*Cystoisospora* 属、*Eumonospora* 属、*Besnoitia* 属、とトキソプラズマ亜科の順に分岐した。*Nephroisospora eptesici* は *Cystoisospora* 属クレード内に属した。事後確率数値が 0.5 未満およびブートストラップ指示値が 50 を下回るノードの記載を省略した。スケールバーは座位あたりの置換の数を示している。

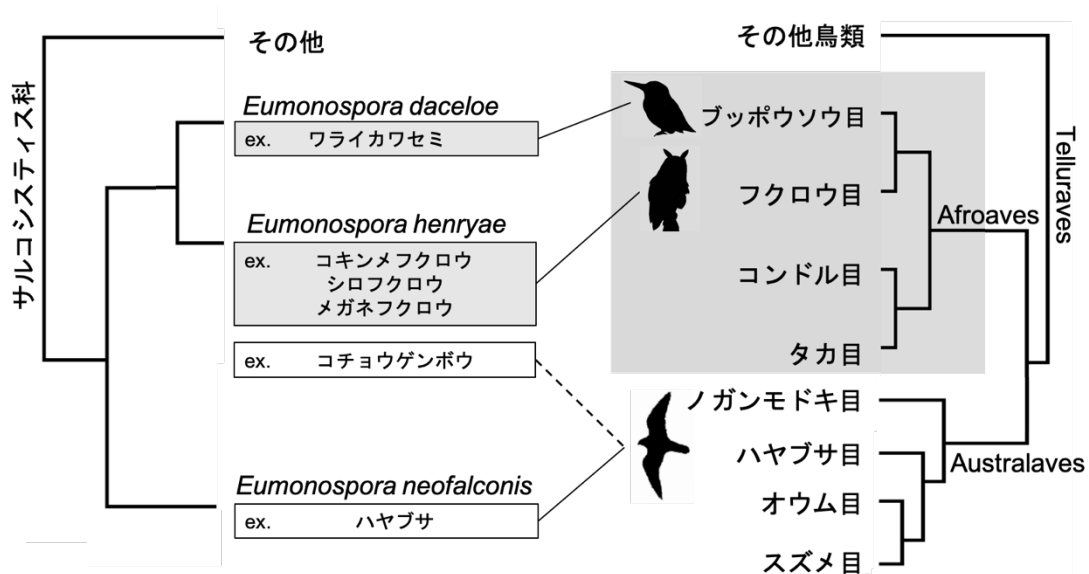


図 3-8 宿主猛禽類と *Eumonospora* 属の系統関係比較図

右側の猛禽類系統樹は McClure らの系統樹を一部修正して示した[41]。左側の寄生虫系統樹の *Eumonospora* 属名下ボックスには報告されている宿主を記載した。灰色にハイライトしているのは Afroaves に属することを示している。実線は宿主と寄生虫の関連を示し、点線は目を超える宿主転換が起きたことを示している。

表 3-1 コンセンサス配列に使用した配列および適応したコンセンサスルール

属	18S アクセション番号 (% コンセンサス)	28S アクセション番号 (% コンセンサス)	coxI アクセション番号 (% コンセンサス)
<i>Besnoitia bennetti</i>	AY665399; AY827839 (50%)	AY778965; AY827838 (50%)	NA
<i>Besnoitia besnoiti</i>	AF109678; AY833646; DQ227418; DQ227419; DQ227420; EU789637; FJ314861; KJ746531 (50%)	AF076866; AF076869; AF076900; AY833646; DQ227418; DQ227419; DQ227420 (50%)	XM_029360591; XM_029361817; XM_029361819; XM_029362707; XM_029362708; XM_029362742; XM_029362743; XM_029363575; XM_0293625381; XM_029365384 XM_029365940; XM_029364799 (90%)
<i>Besnoitia darlingi</i>	GU479631; MF872603 (50%)	AF489697; MF872604 (50%)	NA
<i>Besnoitia jellisoni</i>	AF291426	AF076868	NA
<i>Besnoitia tarandi</i>	MH217579	AY616164	NA
<i>Cystoisospora belli</i>	DQ60658; DQ60659; DQ60660; DQ60661; JX025649; JX025650; JX025651; U94787 (50%)	AY063483	NA
<i>Cystoisospora canis</i>	KT184360; KT184361; KT184362; KT184363; KT184368 (50%)	NA	KT184385; KU057674 (50%)
<i>Cystoisospora cf. ohioensis</i>	AY618555; KT184359; KT184365; KT184366 (50%)	NA	KT184384; KF854260; KF854261 (50%)
<i>Cystoisospora felis</i>	KT184364; L76471 (50%)	AF076872; U85705 (50%)	JN227478; KF854256; KF854257; KF854258; KF854259; KT184386; KT363922 (50%)
<i>Cystoisospora ohioensis</i>	AF029303; GU292304; GU292305 (50%)	NA	NA
<i>Cystoisospora rivolta</i>	KT184367	NA	KT184383
<i>Cystoisospora suis</i>	KF854251; KF854252; U97523 (50%)	AF093428	KF854263; KF854264; KF854265; KT363923; LC212986; LC212987 (50%)
<i>Eumonospora daceloe</i>	KJ634019	NA	NA

表 3-1 (続き) コンセンサス配列に使用した配列および適応したコンセンサスルール

属	18S アクセッション番号 (% コンセンサス)	28S アクセッション番号 (% コンセンサス)	cox1 アクセッション番号 (% コンセンサス)
<i>Eumonospora henryae</i>	LC521947; LC521948; LC521949; LC595642; LC595644 (50%)	LC595641; LC595645 (50%)	LC521950; LC521951; LC521952; LC595643; LC595646 (50%)
<i>Eumonospora neofalconis</i>	KT037081(type A); MN629229(type B); MN629230(type C) *以上の配列は単独で使用	NA	NA
<i>Hammondia hammondi</i>	AF096498; AH008381; KT184369; KF854253 (50%)	AF101077	KF854267; KT184387 (50%)
<i>Heydorina heydorni</i>	GQ984224; JX220986; JX220987; KT184370 (50%)	AF159240; AF432125; AF432126; AF487893; AY168878; KU253798 (50%)	JX473250; JX473251; KF854268; KF854269; KF854270; KF854271; KT184388 (50%)
<i>Heydorina truffittae</i>	GQ984222	KJ396594	JX473247-9
<i>Hyalklossia liberkuehni</i>	AF298623	AF513499	NA
<i>Neospora caninum</i>	AL271354; GQ899206; L24380; U03069; U16159; U17346 (50%)	AF001946; AF432124; GQ899207; KU253800 (50%)	HM771688; JX473252; MN077085; MN077114 (50%)
<i>Nephroisospora eptesici</i>	EU334134	NA	KU215383
<i>Sarcocystis rileyi</i>	GU1200921; HM185742; KJ396583 (50%)	GU188426; HM185743; KJ396585 (50%)	KJ396582; KT184389 (50%)
<i>Toxoplasma gondii</i>	EF472976; L24381; M97703; L37415; U00458; U12138; U03070 (50%)	AF076901; L25635; X75429; X75430; X75453 (50%)	AB000136; AF187882; FM177204; FM177466; FM177517; HM771689; HM771690; JX473253; KF854273; KF854274; KF854275; KF854276; KF854277; KF854278; KF854279; KF854280; KM657810; KT363924; LC547469; LC547470; MN077082; MN077090 (90%)

NA:データ無し

表 3-2 *Eumonospora* 属と *Caryospora* 属の特性比較

属	<i>Eumonospora</i>	<i>Caryospora</i>
科	Sarcocystidae Poche, 1913	Eimeriidae Minchin, 1903
オーシスト形態	1つのスポロシストに8つのスポロゾイト	
スチーダボディ	—	+
終宿主	鳥類	爬虫類と鳥類
生活環	任意多宿主性	
シスト形成	不明	カリオシスト

表 3-3 サルコシステイス科内亜科の生物特性

亜科	Cystoisosporinae		Toxoplasmatinae			Sarcocystinae		Hyaloklossinae		Incertae		Eumonosporinae	
	Frenkel, 1979		Biocca, 1956			Poche, 1913		Tokiwa et al., 2021		subfamiliae		Chou et al., 2020	
属	<i>Cystoisospora</i>		<i>Toxoplasma</i>	<i>Besnoitia</i>	<i>Hammondia</i> , <i>Heydornia</i>	<i>Neospora</i>	<i>Sarcocystis</i> (<i>Frenkelia</i>)		<i>Hyaloklossia</i>		<i>Nephroisospora</i>		<i>Eumonospora</i>
形態	2SP/4SZ		2SP/4SZ	2SP/4SZ	2SP/4SZ	2SP/4SZ	2SP/4SZ		2SP/4SZ		2SP/4SZ		1SP/8SZ
SZ形成	体外		体外	体外	体外	体外	体内		体内		体内		体外
終宿主	+		+	-	-	+	-		+		不明		+
への感	+		+	-	-	+	-		+		不明		+
染力	+		+	-	-	+	-		+		不明		+
ZTの数	単一		複数	複数	複数	複数	複数		不明		不明		不明
ZTの	BZ		BZ	BZ	BZ	BZ	MTとBZ		不明		不明		不明
種類	-		+	-	+	+	-		-		+?		+?
中間宿	-		+	-	+	+	-		-		+?		+?
主への	-		+	-	+	+	-		-		+?		+?
感染力	-		+	-	+	+	-		-		+?		+?
文献	[22, 23, 59]		[22, 23, 59]			[60]		[70]		[18]		[18]	

SP：スポロシスト

SZ：スポロゾイト

ZT：ゾイト

BZ：ブラディゾイト

MT：メトロサイト

総 括

近年日本では小説や映画の影響によるフクロウ目認知度の高まりや、鳥カフェや動物カフェの増加が影響し、外国で繁殖された猛禽類が輸入され、ペットとして飼育される機会が増加している。動物の輸入届出制度によると、タカ目（法律上、ハヤブサ目も含める）は 200 羽から 400 羽前後で推移しているが、フクロウ目は 2006 年に 609 羽、2016 年には 1,741 羽と、2.8 倍増加している。海外より猛禽類を日本に輸入する際は、届出書と衛生証明書を日本の検疫所に提出する必要がある。衛生証明書ではウエストナイル熱並びに鳥インフルエンザに関する証明が必要であるが、その他病原体は届出の義務はない。実際に輸入された鳥類において人獣共通感染症を引き起こす病原体の検出報告もある。以上のように、日本では社会情勢により猛禽類の輸入が増加し、飼育動物診療施設等に訪れる機会が増加していると想定されるが、それらが保有する病原体の知見については不明なものが多い。本研究では日本に輸入される猛禽類の寄生虫について調査を行い、その過程において見出したコクシジウム類について形態学的ならびに分子系統学的特徴について調べ、系統分類学的位置について再検討を行い、また、既知のコクシジウム類との比較を行った。

1 猛禽類由来寄生虫の感染状況の調査

輸入猛禽類の糞便内寄生虫検査の結果、10 種の猛禽類が陽性であった。ハヤブサ、セーカーハヤブサ、およびアカトビから回虫卵が、ミミヒダハゲワシより吸虫卵が、検出された。一方、フクロウ目 5 種とハヤブサ目 1 種から大きさの異なる 2 種類のコクシジウムのオーシストを検出した。メガネフクロウから検出された小型の成熟オーシストは形態学的特徴より *Eimeria* 属と同定した。一方、大型の成熟オーシストは 1 つのスपोロシスト、スपोロシスト内に 8 つのスプロゾイトを備え、スपोロシストにスチーダボディは確認できなかった。この形

態学的特徴よりこのコクシジウムは *Avispora* 属と同定した。*Avispora* 属コクシジウムの検出は日本国内で初めてのことで、またメガネフクロウ、アフリカオオコノハズク、およびコチョウゲンボウについては初宿主報告となった。

2 猛禽類由来コクシジウムの形態学のおよび分子系統学的解析

2018年にフクロウ5種より検出した *Avispora* 属オーシストは形態学特徴から *Avispora henryae* と同定した。一方で文献調査の際、2016年に提唱された *Avispora* 属の、(1) オーシスト内に1つのスポロシストを有し、(2) そのスポロシストにスチーダボディが無い、という形態学的特徴はすでに1933年に *Eumonospora* 属の分類形質で提唱されており、*Avispora* 属は明らかな新参シノニムとなる。よってここに *Eumonospora* 属を再提唱し、*Avispora* 属は *Eumonospora* 属に再編することとした。更に *Eumonospora henryae* の18S、28S、および *cox1* 遺伝子の配列の解読および解析から、遺伝子配列を決定した。2019年にコチョウゲンボウより検出されたコクシジウムオーシストの形態も *Eumonospora* 属と一致し、DNA解析した結果、*E. henryae* と一致した。今回、*E. henryae* がフクロウ目およびハヤブサ目に感染することが判明し、そのことによって *Eumonospora* 属は定説であった属レベルの宿主特異性ではなく、その種によって宿主特異性が異なることが示唆された。

3 猛禽類由来 *Eumonospora* 属コクシジウムの分子系統解析による分類

従来、コクシジウムのオーシスト内に1つのスポロシストと8つのスポロゾイトを形成する *Caryospora* 属や *Eumonospora* 属の様なコクシジウムはアイメリア科に分類されていた。しかし複数の研究で *Eumonospora* 属はサルコシスティス科と系統学的に近縁であることが示唆されている。従って、本研究では *Eumonospora* 属のアイメリア亜目内の系統分類学的位置の解明することを試みた。*Eumonospora* 属の18S配列とアイメリア亜目の18Sデータセットを系統

解析した結果、*Eumonospora* 属はサルコシステイス科に属し、トキソプラズマ亜科、シストイソスポラ亜科、*Hyaloklossia* 属、および *Nephroisospora eptesici* と単系統群となった。更に *Sarcocystis* 属を外群とした 18S、28S、*cox1* 領域、およびそれぞれの領域を結合した結合配列の計 6 つのデータセットを使用し、最尤法とベイズ推定にて系統樹を作成した。その結果全ての解析にて類似した系統樹が作成され、*Eumonospora* 属はトキソプラズマ亜科と姉妹群を形成した。一方、*Eumonospora* 属の系統樹トポロジーは宿主猛禽類系統樹形と大きく類似する事も判明した。そして *E. henryae* が異なる目の鳥類から検出されたことは、本種に宿主転換が起きた可能性を示唆していた。サルコシステイス科は現在大きくトキソプラズマ亜科、シストイソスポラ亜科、およびサルコシステイス亜科の 3 つの亜科に分類することができるが、本研究では *Eumonospora* 属の 1 つのスポロシストに 8 つのスポロゾイトという、明確に他亜科と区別がつく形態学的特徴を鑑別根拠とし、新亜科エウモノスポーラ (*Eumonosporinae*) を提唱した。更に今までのサルコシステイス科に関するオーシスト形態の定義についても再考する必要があると思われた。

本研究は日本国内において連続して海外輸入猛禽類から *E. henryae* が検出されたことを報告する。コクシジウムは環境耐性および化学耐性が高く、一旦環境に広まると根絶が難しい病原体である。そして病原体が耐性または免疫を持たない生物群に対して壊滅的な大量死を引き起こすことはカエルツボカビという真菌にて確認されており、世界的にこのような新興感染症は危惧されている。*Eumonospora* 属は鳥類に対して病原性を示しており、この原虫が誤って輸入猛禽類より野外に分布した場合、日本在来鳥類は重症化または死亡する恐れがある。しかしながら、日本における猛禽類輸入に関する法規定は他国と比べると比較的寛容であり、本研究のように検疫をすり抜けて病原体が日本に侵入していると仮定すると、輸入動物検疫規定の抜本的な見直しが必要であると思われる。

本研究成果は今後における *Eumonospora* 属の分類学的及びサルコシステイス科の分子系統学的な基盤知見となると思われる。更なる知見を得るため日本在来および輸入鳥類の定期的寄生虫調査、*Eumonospora* 属の宿主域、寄生部位の確認、生活環、中間宿主または待機宿主の発見、シストの形成能力、および生物特性などの研究が必須であると思われる。しかし本属の病原性や病態解析および治療法については、終宿主が主に猛禽類であり、1 個体が高額で SPF 個体が入手できないことから感染実験による証明が困難である。今後も、宿主情報、臨床症状、および死亡個体の病理組織検査に関する情報を継続して収集していくことが期待される。

謝 辞

本研究の実施に際して、終始指導を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医寄生虫学研究室 池和憲 教授に深甚なる謝意を表します。また、学位論文執筆、サンプル解析、および系統解析に際して専門的見地から様々な助言を賜りました同研究室 常盤俊大 講師に深く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり貴重な検体を提供していただきました獣医師、飼い主、および関係各員の皆様に篤く御礼申し上げます。さらに、本研究の実施にあたり、分子生物学的手技について様々な技術的助言と協力をいただいた同研究室の 窪田理恵さんと 羽田野眞一郎君、そして各種実験を実施するにあたり、様々な形にて御協力をいただいた同研究室の室員諸氏に篤く感謝致します。

最後に、慣れない海外の地にて、4年間家庭を支えてくれた妻に心から最大の謝意と敬意を表します。

参考文献

1. Alfaleh, F. A., Alyousif, M. S., Al-Shawa, Y. R. and Al-Quraishy, S. 2013. *Caryospora cherrughi* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting *Falco cherrug* in Saudi Arabia. *Parasitol. Res.* **112**: 971–974.
2. Alfaleh, F., Alyousif, M. and Elhaig, M. 2020. The emergence of *Caryospora neofalconis* in falcons in Central Saudi Arabia. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **7**: 530–536.
3. Allen, E. A. 1933. *Eumonospora tremula* gen. et sp. nov., a coccidium from the intestine of the turkey buzzard, *Cathartes aura septentrionalis* Wied. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **52**: 192–194.
4. Allen, E. A. 1934. *Eumonospora tremula* (Allen, 1933) Emended to *Caryospora tremula* (Allen, 1933) Hoare, 1934. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **53**: 293.
5. Alyousif, M. S., Alfaleh, F. A. and Al-Shawa, Y. R. 2011. *Caryospora biarmicusis* sp.n. (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting falcons from the genus *Falco* in Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **41**: 1–6.
6. Averbek, G. A., Cooney, J. D., Guarnera, T. R., Redig, P. and Stromberg, B. E. 1998. Exogenous Stages of *Eimeria bemricki* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Great Gray Owl, *Strix nebulosa* (Foster). *J. Parasitol.* **84**: 976.
7. Barta, J. R., Martin, D. S., Carreno, R. A., Siddall, M. E., Profous-Juchelkat, H., Hozza, M., Powles, M. A. and Sundermann, C. 2001. Molecular phylogeny of the other tissue coccidia: *Lankesterella* and *Caryospora*. *J. Parasitol.* **87**: 121–7.
8. Barta, J. R., Schrenzel, M. D., Carreno, R. and Rideout, B. A. 2005. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. *J. Parasitol.* **91**: 726–727.

9. Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Örjan, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H. and Pinheiro, R. T. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **267**: 1583–1589.
10. Berto, B. P., McIntosh, D. and Lopes, C. W. G. 2014. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **23**: 1–15.
11. Böer, B. 1982. Untersuchungen über das Vorkommen von Kokzidien bei Greifvögeln und über die Entwicklung von zwei *Caryospora*-Arten der Falken (*Caryospora neofalconis* n. sp. und *Caryospora kutzeri* n. sp.). Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
12. Cardozo, S. V., Berto, B. P., Caetano, I., Maniero, V. C., Fonseca, I. P. da and Lopes, C. W. G. 2016. *Caryospora peneireiroi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in the common kestrel, *Falco tinnunculus* (Falconiformes: Falconidae), in mainland Portugal. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária.* **25**: 202–206.
13. Cardozo, S. V., Berto, B. P., Caetano, I., Maniero, V. C., Santos, M., Da Fonseca, I. P. and Lopes, C. W. G. 2017. *Avispora mochogalegoi* n. Sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the little owl, *Athene noctua* (Strigiformes: Strigidae), in mainland Portugal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **26**: 348–351.
14. Cardozo, S. V., Berto, B. P., Caetano, I., Thomás, A., Santos, M., da Fonseca, I. P. and Lopes, C. W. G. 2019. Coccidian parasites from birds at rehabilitation centers in portugal, with notes on *Avispora bubonis* in old world. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **28**: 187–193.
15. Cawthorn, R. J. and Stockdale, P. H. G. 1982. The developmental cycle of *Caryospora bubonis* Cawthorn and Stockdale 1981 (Protozoa: Eimeriidae) in the great horned owl, *Bubo Virginianus* (Gmelin) . *Can. J. Zool.* **60**: 152–157.
16. Cawthorn, R. J. and Stockdale, P. H. G. 1981. Description of *Eimeria bubonis* sp.n.

- (Protozoa: Eimeriidae) and *Caryospora bubonis* sp.n. (Protozoa: Eimeriidae) in the great horned owl, *Bubo virginianus* (Gmelin), of Saskatchewan. *Can. J. Zool.* **59**: 170–173.
17. Chitty, J. and Lierz, M. 2008. BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Passerine Birds, British Small Animal Veterinary Association.
 18. Chou, S., Izawa, N., Ike, K. and Tokiwa, T. 2021. Detection of *Eumonospora henryae* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from *Falco columbarius* (Falconiformes: Aves): Comparison of host–parasite phylogram and comments on the family Sarcocystidae Poche, 1913. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **14**: 75–83.
 19. Chou, S., Tokiwa, T., Hadano, S., Izawa, N., Ueda, M., Kojima, A. and Ike, K. 2020. Resurrection of the genus *Eumonospora* (Apicomplexa: Sarcocystidae) for *Caryospora* species without Stieda body. *Parasitol. Int.* **77**: 102101.
 20. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nat. Methods.* **9**: 772.
 21. Forbes, N. A. and Simpson, G. N. 1997. *Caryospora neofalconis*: An emerging threat to captive-bred raptors in the United Kingdom. *J. Avian Med. Surg.* **11**: 110–114.
 22. Frenkel, J. K. 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *J. Parasitol.* **63**: 611–628.
 23. Frenkel, J. K., Heydorn, A. O., Mehlhorn, H. and Rommel, M. 1979. Sarcocystinae: Nomina Dubia and available names. *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* **58**: 115–139.
 24. Ghimire, T. R. 2010. Redescription of Genera of Family Eimeriidae Minchin, 1903. *Int. J. Life Sci.* **4**: 26–47.
 25. Gottschalk, C. 1972. Beitrag zur Faunistik der Vogelkokzidien Thüringens und Sachsens. *Beiträge zur Vogelkd.* **18**: 61–69.

26. Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**: 307–321.
27. Herwaldt, B. L., Cacciò, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S. B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S. and Pieniazek, N. J. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 942–8.
28. Hoare, C. A. 1934. On the systematic status of *Eumonospora tremula* Allen, 1933 (Coccidiida Eimeriidae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* **53**: 6–7.
29. Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* **17**: 754–755.
30. Jirků, M., Jirků, M., Oborník, M., Lukeš, J. and Modrý, D. 2009. A model for taxonomic work on homoxenous coccidia: Redescription, host specificity, and molecular phylogeny of *Eimeria ranae* Dobell, 1909, with a review of anuran-host *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriorina). *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**: 39–51.
31. Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 772–780.
32. Klüh, P. N. 1994. Untersuchungen zur Therapie und Prophylaxe der *Caryospora*-Infektionen der Falken (Falconiformes: Falconidae) mit Toltrazuril sowie die Beschreibung von zwei neuen *Caryospora*-Arten (*C. megafalconis* n.sp. und *C. boeri* n.sp.). Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
33. Krone, O. 2002. Fatal *Caryospora* infection in a free-living juvenile Eurasian Kestrel (*Falco tinnunculus*). *J. Raptor Res.* **36**: 84–86.
34. Léger, L. 1904. Protozoaires parasites des Viperes (*Vipera aspis*). *Bull. Mens.*

- Assoc. Fr. pour l'avancement des Sci.* **9**: 268.
35. Lindsay, D. S., Upton, S. J., Sundermann, C. A., McKown, R. D. and Blagburn, B. L. 1994. *Caryospora tremula* and *Sarcocystis* sp. from turkey vultures, *Cathartes aura*: Descriptions of oocysts and sporocysts and attempted transmission to rodents. *J. Helminthol. Soc. Washingt.* **61**: 12–16.
 36. Lindsay, D. S. and Blagburn, B. L. 1986. *Caryospora uptoni* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from Red-Tailed Hawks (*Buteo jamaicensis borealis*). *J. Parasitol.* **72**: 762–765.
 37. Mateuta, V. D. S. and Samour, J. H. 2017. Prevalence of *Caryospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) in falcons in the United Arab Emirates. *J. Avian Med. Surg.* **31**: 327–334.
 38. Matsui, T., Ito, S., Fujino, T. and Morii, T. 1993. Infectivity and sporogony of *Caryospora*-type oocysts of *Isospora rivolta* obtained by heating. *Parasitol. Res.* **79**: 599–602.
 39. McAllister, C. T., Duszynski, D. W. and McKown, R. D. 2013. A new species of *Caryospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the bald eagle, *Haliaeetus leucocephalus* (Accipitriformes: Accipitridae), from Kansas. *J. Parasitol.* **99**: 287–289.
 40. McAllister, C. T., Duszynski, D. W. and McKown, R. D. 2013. A New Species of *Caryospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Sharp-Shinned Hawk, *Accipiter striatus* (Aves: Accipitriformes) . *J. Parasitol.* **99**: 490–492.
 41. McClure, C. J. W., Schulwitz, S. E., Anderson, D. L., Robinson, B. W., Mojica, E. K., Therrien, J. F., Oleyar, M. D. and Johnson, J. 2019. Commentary: Defining raptors and birds of prey. *J. Raptor Res.* **53**: 419–430.
 42. McMillan, S. E., Dingle, C., Allcock, J. A. and Bonebrake, T. C. 2021. Exotic animal cafes are increasingly home to threatened biodiversity. *Conserv. Lett.* **14**:

- 1–9.
43. Megía-Palma, R., Martínez, J., Nasri, I., Cuervo, J. J., Martín, J., Acevedo, I., Belliure, J., Ortega, J., García-Roa, R., Selmi, S. and Merino, S. 2016. Phylogenetic relationships of *Isospora*, *Lankesterella*, and *Caryospora* species (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting lizards. *Org. Divers. Evol.* **16**: 275–288.
 44. Morgan, U. M., Monis, P. T., Fayer, R., Deplazes, P. and Thompson, R. C. A. 1999. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: Evidence for several new species. *J. Parasitol.* **85**: 1126.
 45. Müller, M. G., Kinne, J., Schuster, R. K. and Walochnik, J. 2008. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Vet. Parasitol.* **152**: 67–78.
 46. Nijman, V. and Nekaris, K. A. I. 2017. The Harry Potter effect: The rise in trade of owls as pets in Java and Bali, Indonesia. *Glob. Ecol. Conserv.* **11**: 84–94.
 47. Ogedengbe, M. E., El-Sherry, S., Ogedengbe, J. D., Chapman, H. D. and Barta, J. R. 2018. Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa). *Int. J. Parasitol.* **48**: 59–69.
 48. Ogedengbe, M. E., Ogedengbe, J. D., Whlae, J. C., Elliot, K., Juárez-Estrada, M. A. and Barta, J. R. 2016. Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidia (Sarcocystidae; Apicomplexa) based on nuclear 18s RDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus *Hammondia*. *Parasitol. Open.* **2**: e2.
 49. Papazahariadou, M. G., Georgiades, G. K., Komnenou, A. T. and Ganoti, M. 2001. *Caryospora* species in a snowy owl (*Nyctea scandiaca*). *Vet. Rec.* **148**: 54–55.
 50. Pellérdy, L. P. 1965. Coccidia and coccidiosis, 1st ed., Akadémiai Kiadó, Budapest.
 51. Poelma, F. G. and Strik., W. J. 1966. *Caryospora undata*, Schwalbach 1959, a

- coccidian from the intestine of a Guillemot, *Uria aalge*, Pontoppidan, 1763. *Tijdschr. Diergeneeskd.* **91**: 917–919.
52. Santana-Sánchez, G., Flores-Valle, I. T., González-Gómez, M., Vega-Sánchez, V., Salgado-Miranda, C. and Soriano-Vargas, E. 2015. *Caryospora neofalconis* and other enteroparasites in raptors from Mexico. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **4**: 351–355.
53. Saxe, L. H., Levine, N. D. and Ivens, V. 1960. New species of coccidia from the Meadow Mouse, *Microtus pennsylvanicus*. *J. Protozool.* **7**: 61–63.
54. Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* **9**: 671–675.
55. Schrenzel, M. D., Maalouf, G. A., Gaffney, P. M., Tokarz, D., Keener, L. L., McClure, D., Griffey, S., McAloose, D. and Rideout, B. A. 2005. Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. *J. Parasitol.* **91**: 635–647.
56. Schuster, R. K., Woo, P. C. Y., Poon, R. W. S., Lau, S. K. P., Sivakumar, S. and Kinne, J. 2016. *Chlamydotis macqueenii* and *C. undulata* (Aves: Otidae) are new hosts for *Caryospora megafalconis* (Apicomplexa: Eimeriidae) and proposal of the genus *Avispora* gen. nov. *Parasitol. Res.* **115**: 4389–4395.
57. Schwalbach, G. 1959. Untersuchungen und Beobachtungen an Coccidien der Gattungen *Eimeria*, *Isospora* und *Caryospora* bei Vögeln mit einer Beschreibung von sechzehn neuen Arten. *Arch. für Protistenkd.* **104**: 431–491.
58. Scott, D. E. 2016. Raptor Medicine, Surgery, and Rehabilitation, 2nd ed., CABI, United Kingdom.
59. Smith, D. D. 1981. The Sarcocystidae: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia*, and *Cystoisospora*. *J. Protozool.* **28**: 262–266.
60. Tokiwa, T., Chou, S., Tochigi, Y., Katayama, K. and Duszynski, D. W. 2021.

- Hyaloklossia* Labbé, 1896 (Alveolata: Apicomplexa) in frogs: Description of a new species and proposing a new subfamily to accommodate these enigmatic parasites. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **15**: 199–207.
61. Une, Y. 2011. Infectious diseases of imported exotic animals. *Japanese J. Zoo Wildl. Med.* **16**: 103–109.
 62. Upton, S. J., Campbell, T. W., Weigel, M. and McKown, R. D. 1990. The Eimeriidae (Apicomplexa) of raptors: review of the literature and description of new species of the genera *Caryospora* and *Eimeria*. *Can. J. Zool.* **68**: 1256–1265.
 63. Upton, S. J., Current, W. L. and Barnard, S. M. 1986. A review of the genus *Caryospora* Léger, 1904 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Syst. Parasitol.* **8**: 122–135.
 64. Upton, S. J., Odell, D. K. and Walsh, M. T. 1992. Description of the oocysts of *Caryospora undata* (Apicomplexa) from tufted puffins, *Lunda cirrhata* (Charadriiformes). *Texas J. Sci.* **44**: 79–82.
 65. Volcán, G. S. and Medrano, C. E. 1984. Esporozoario de aves Falconiformes en el estado Bolívar, Venezuela *Caryospora arcayae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae). In: Cuadernos de geografía médica de Guayana, vol. 1. Grafiset S.R.L., Venezuela.
 66. Volf, J., Modrý, D. and Koudela, B. 2001. Experimental transmission of *Caryospora kutzeri* (Apicomplexa: Eimeriidae) by rodent hosts. *Folia Parasitol. (Praha)*. **48**: 11–14.
 67. Volf, J., Koudela, B. and Modrý, D. 2000. Two new species of *Caryospora* Leger, 1904 (Apicomplexa, Eimeriidae) from accipitrid raptors. *Syst. Parasitol.* **46**: 23–27.
 68. Wetzel, R. and Enigk, K. 1937. *Caryospora falconis* n. sp. (Eimeriidea) aus dem Wanderfalken. *Sitzungsberichte Ges. Naturforschender Freunde Berl.* 6–9.
 69. Wetzel, R. and Enigk, K. 1939. Beobachtungen über parasitäre Erkrankungen der Falken und Vorschläge zu ihrer Bekämpfung. *Dtsch. Falkenorden.* **1**: 24–33.

70. Wünschmann, A., Wellehan, J. F. X., Armien, A., Bemrick, W. J., Barnes, D., Averbek, G. A., Roback, R., Schwabenlander, M., D’Almeida, E., Joki, R., Childress, A. L., Cortinas, R., Gardiner, C. H. and Greiner, E. C. 2010. Renal infection by a new coccidian genus in Big Brown Bats (*Eptesicus fuscus*). *J. Parasitol.* **96**: 178–183.
71. Yakimoff, W. L. and Matschulsky, S. N. 1932. La coccidie du hibou-Sur la coccidie du porc sauvage. *La Coccidiose du Daim. Bull. la Soc. Pathol. Exot.* **25**: 1045–1049.
72. Yakimoff, W. L. and Matschulsky, S. N. 1936. On the coccidia of birds of prey. *J. R. Microsc. Soc.* **56**: 372–375.
73. Yang, R., Brice, B. and Ryan, U. 2014. A new *Caryospora* coccidian species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the laughing kookaburra (*Dacelo novaeguineae*). *Exp. Parasitol.* **145**: 68–73.
74. 二木謙一 2006. 戦国織豊期の社会と儀礼, 吉川弘文館, 東京, 日本.
75. 森田喜久男 2018. 日本古代の王権と鷹狩. *J. hawks, hawking grounds, Environ. Stud.* **2**: 1–16.
76. 泉沢幾子 2020. 国内の飼育下鳥類における消化管寄生原虫感染症に関する研究. 博士論文. 獣医研究科, 日本大学.
77. 秋吉正博 2018. 日本古代の放鷹の技術と形象に関する覚書 (その3) 大鏡から. *Bull. Yashima Gakuen Univ.* **14**: 1–20.
78. 日本鳥学会 (目録編集委員会) 2012. 日本鳥類目録改訂第7版, 日本鳥学会, 千葉, 日本.