

称号及び氏名 博士（獣医学） 吉内 龍策

学位授与の日付 平成23年3月31日

論文名 犬猫における消化管内寄生原虫の分子疫学的解析

論文審査委員 主査 笹井 和美
副査 大橋 文人
副査 小崎 俊司

論文要旨

諸 言

イヌおよびネコは伴侶動物（コンパニオンアニマル）としてヒトと緊密な関係を保っている。わが国では、少子高齢化社会を背景として年々家庭での飼育動物数が増加し、2008年には家庭飼育動物の総数が23,991,000頭となった。消化管内寄生蠕虫類および原虫類は、家庭飼育動物を診療する獣医師にとって最も一般的に遭遇する病原体のひとつである。2007年以降、わが国の小動物診療においても、消化管内寄生蠕虫類の定期的な駆虫プログラムの普及が本格化したのに対し、消化管内寄生原虫類では保有動物のモニタリングや調査データが少なく、その病原性や人への感染についても不明な点が多い。諸外国においては、少数ではあるが家庭飼育動物を対象とした原虫保有調査が実施されているが、わが国では、家庭飼育動物における消化管内寄生原虫類の調査の報告はない。

犬、猫において公衆衛生学的に重要な原虫として、クリプトスポリジウム、ジアルジア、イソスポラ/シストイソスポラが挙げられる。クリプトスポリジウムは、世界的に広く分布し、ヒト、イヌ、ネコをはじめとして広範な動物から検出されており、ヒトに重篤な下痢を引き起こすことからヒトと動物に共通の感染性を有する寄生虫として注目されている。感染は宿主の糞便中に排出されたオーシスト、あるいはこれらの原虫に汚染された飲水の経口摂取によるが、オーシストは塩素系消毒薬などによる不活化が困難であり環境中で長期にわたり感染性を有する。クリプトスポリジウムではヒトを含む広範な哺乳類を宿主とする *C.parvum* がよく知られているが、現在、

分子生物学的手法に基づき 20 の種が同定され多くの遺伝子型が示されている。これまでに著効を示す治療法は確立されていないため、免疫不全の宿主、例えば HIV 患者、急性白血病患者などが感染した場合、下痢が慢性的に持続し重篤化して死に至ることがある。

ジアルジアについては形態や宿主域から 6 つの種が報告されているが、幅広い宿主域に感染性を有する *G. intestinalis* が公衆衛生学的に重要である。*G. intestinalis* は多様な遺伝子型集団であることが世界的に認識されており、分子系統学的解析から Assemblage A~G に分類されている。Assemblage A および B はヒトを含む広範な動物から検出されており、インドのアッサム地方における調査ではイヌとその飼育者から同じ遺伝子型のジアルジアが検出されるなど、イヌ-ヒト間における双方向の感染伝播が疑われている。一方、Assemblage C~G はイヌ、ネコ、ウシなどから分離され宿主域は狭いと考えられているがヒトへの共通感染リスクは不明のままである。

イソスポラ/シストイソスポラはアイメリア、トキソプラズマなどとともに孢子虫綱に含まれ、Apicomplexa の偏性細胞内寄生原生動物の多様なグループを形成している。イヌでは *I. ohioensis* および *I. canis*、ネコでは *I. felis* などが報告されているが、これらの寄生虫の分子疫学的調査は実施されておらずイヌ科とネコ科を含む肉食動物間の宿主域については不明である。

本研究では、ヒトと動物が密集している大都市圏、大阪において家庭飼育されているイヌおよびネコを中心に消化管内寄生原虫の保有状況を調査し、検出された原虫について分子疫学的手法を用いて解析することにより、ヒトと動物の共通感染症としての危険性について評価することを目的とした。

第1章 寄生虫学的検査

2006 年 11 月から 2010 年 3 月までの期間に大阪の小動物診療施設を受診した飼主から同意の元に提供されたイヌおよびネコの直腸便を検体とした。イヌでは 3 ヶ月齢~15 歳齢(平均 7.12 歳齢)の 77 個体、ネコでは 5 ヶ月齢~21 歳齢(平均 6.45 歳齢)の 55 個体が検査に供された。

クリプトスポリジウムは、イヌで 3 検体(陽性率は 3.9%)、ネコで 7 検体(陽性率は 12.7%)から検出された。下痢症状の有無で陽性率に有意な差は見られなかった。しかし、1 歳未満のイヌ 12 個体中 2 検体(陽性率は 16.7%)、1 歳未満のネコ 9 個体中 6 検体(陽性率は 66.7%)で検出されたことから、イヌ、ネコともに 1 歳未満の個体における陽性率は 1 歳以上と比較して有意に高かった。オーシストの排出期間はイヌで 21-88 日間、ネコでは 48-116 日間であり、イヌ 1 例でクリプトスポリジウムとジアルジアの混合感染が認められた。

ジアルジアはイヌで 2 個体(陽性率は 2.6%)、ネコで 1 個体(陽性率は 1.8%)から検出された。下痢症状の有無で、陽性率に有意な差は認められなかった。イヌ、ネコともに陽性サンプルはすべて 1 歳未満の個体から検体であった。ジアルジアシストの排出期間はイヌで 88 日間であった。

イソスポラはイヌで 1 個体、ネコで 2 個体から検出された。その他の虫体としては、回虫がイヌで 1 個体、ネコで 4 個体から検出された。

第2章 クリプトスポリジウムの分子疫学的解析

現在、分子生物学的手法に基づき 20 のクリプトスポリジウムの種が同定されている。これらの内、ヒトの優勢種である *C. hominis* や広範な宿主域を有するとされる *C. parvum* 以外に *C.*

canis、*C. felis*、*C. meleagridis* がヒトのクリプトスポリジウム症の主な原因とされるなど、個々の種や遺伝子型における宿主域などの知見が蓄積されつつある。しかし、これらを形態学的に識別することは不可能であり、その同定には分子生物学的解析が必要となる。本章では、第1章の調査で検出されたクリプトスポリジウムオーシストの塩基配列を解析し、種の同定を実施することにより、人と動物の共通感染症としての危険性を評価することを目的とした。

第1章の糞便検査にてクリプトスポリジウムオーシストが検出された検体について、全糞便から、シヨ糖遠心浮遊法により上層のオーシストを回収し、QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用してゲノム DNA を精製し、*Cryptosporidium* 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene および *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene 領域を増幅する特異プライマーを用いて PCR を実施し、それらの増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した。クリプトスポリジウム陽性のイヌ3頭は *C.canis*、ネコ7頭は *C.felis* であった。

第3章 ジアルジアの分子疫学的解析

Gintestinalis はヒト、伴侶動物、家畜など広範な宿主域を有し、消化器症状を引き起こす。ヒトは Assemblage A もしくは B からのみ感染を受けるが、両者ともイヌおよびネコを含む広い宿主域を有している。したがって、ヒトと動物の共通感染症としての危険性を評価する上で、感染動物が Assemblage A もしくは B のジアルジアを保有しているかどうか重要となる。本章では、第1章で検出されたジアルジアシストを分子生物学的に解析し、種の同定を実施した。

第1章の糞便検査にてジアルジアシストが検出された検体について、残りの全糞便（約1~5g）から、シヨ糖遠心浮遊法により上層のシストを回収し、QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用してゲノム DNA を精製し、PCR の鋳型とした。*Gintestinalis* が特異的に保有する *Giardia* 18S rRNA (18S rRNA) gene、ジアルジアの遺伝子型に特異的な Glutamate dehydrogenase (GDH) gene および β -giardin genes 領域を増幅する特異プライマーを用いて PCR を実施し、得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。ジアルジア陽性のイヌ2頭は *Gintestinalis* の Assemblage D、ネコ1頭は Assemblage F であった。

第4章 イソスポラ/シストイソスポラの分子疫学的解析

現在に至るまでイソスポラ/シストイソスポラの分類学上の論争が存在するにもかかわらず塩基配列の解析はほとんど行われず、シストイソスポラ様コクシジウムの系統発生は包括的に解析されることがほとんどなかった。本章では検出されたイソスポラオーシストの 18S rRNA gene 部分塩基配列を既知の種のそれと比較し、系統発生上の位置を決定し、宿主域を評価することを目的とした。

第1章で回収された2頭のネコのイソスポラのオーシスト、保護施設で分離したイヌの2検体および鳥獣駆除施設で分離したタヌキの7検体を、分子疫学的手法を用いて解析した。マイクロマニピュレータを用いて単離したオーシストのゲノム DNA を精製し、18S rRNA gene 領域を nested PCR によって増幅した。

イヌ2頭、ネコ2頭、タヌキ4頭から分離された *Cystoisospora* 18S rRNA gene の部分塩基配列を解析したところ、イヌ2頭とタヌキ4頭のシストイソスポラ分離株のそれぞれの塩基配列は同

一であった。同様にネコ 2 検体のそれぞれの塩基配列も同一であった。以上成績から、イヌに感染するシストイソスポラが異なる食肉目のタヌキにも感染可能であることが示唆された。また、イヌとタヌキの塩基配列は、既報の *C. ohioensis* (AY618555) と 99.7% の高い相同性を、ネコの塩基配列は、既報の *C. felis* (L76471) と 99.0% の高い相同性を示した。しかし、分離株の塩基配列が完全に同一ではないことから、わが国においては既知の遺伝子型とは異なる遺伝子型のシストイソスポラをイヌ、ネコ、タヌキが保有している可能性が示唆された。

総 括

1. クリプトスポリジウムにおいては、本調査で *C. parvum* は検出されず、これまでの結果と同様にイヌでは *C. canis*、ネコでは *C. felis* のみが検出された。
2. クリプトスポリジウム感染動物におけるオーシストの排出期間は、最も長いものでイヌ約 13 週間、ネコ約 17 週間にも及ぶことが確認された。
3. ジアルジアにおいては、今回の調査で Assemblage A、B は検出されず、種特異的な Assemblage D および F のみであった。
4. イソスポラにおいては、イヌとタヌキの分離株の 18S rRNA gene 部分塩基配列は *C. ohioensis* と、ネコの分離株のそれは *C. felis* と高い相同性を示した。

審査結果の要旨

イヌおよびネコは伴侶動物（コンパニオンアニマル）としてヒトと緊密な関係を保っている。わが国では少子高齢化社会を背景に年々家庭での飼育動物数が増加し、2008 年には総数が約 2,400 万頭に達している。消化管内寄生蠕虫類および原虫類は、家庭飼育動物を診療する獣医師にとって最も一般的に遭遇する病原体のひとつである。2007 年以降、わが国の小動物診療においては、消化管内寄生蠕虫類の定期的な駆虫プログラムの普及が本格化しているが、消化管内寄生原虫類では保有動物のモニタリングや調査データが少なく、その病原性やヒトへの感染については不明な点が多い。諸外国においては、少数ではあるが家庭飼育動物を対象とした原虫保有調査が実施されているが、わが国では家庭飼育動物における消化管内寄生原虫類の調査の報告はない。本研究では、ヒトと動物が密集している大都市圏、大阪において家庭飼育されているイヌおよびネコを中心に消化管内寄生原虫の保有状況を調査し、検出された原虫について分子疫学的手法を用いて解析することにより、ヒトと動物の共通感染症としての危険性について評価した。

第 1 章では、2006 年 11 月から 2010 年 3 月までの期間に大阪の小動物診療施設を受診した

飼主から同意の元に提供されたイヌおよびネコの直腸便を検体とした原虫の保有状況を調べた。クリプトスポリジウムは、イヌで3検体(陽性率は3.9%)、ネコで7検体(陽性率は12.7%)から検出された。オーシスト排出期間はイヌで21~88日間、ネコでは48~116日間であり、イヌ1例でクリプトスポリジウムとジアルジアの混合感染が認められた。ジアルジアはイヌで2個体(陽性率は2.6%)、ネコで1個体(陽性率は1.8%)から検出された。ジアルジアシスト排出期間はイヌで88日間であった。イソスポラはイヌで1個体、ネコで2個体から検出された。その他の虫体としては、回虫がイヌで1個体、ネコで4個体から検出された。すべての陽性症例において下痢症状の有無で陽性率に差は見られなかった。

第2章では、クリプトスポリジウムオーシストが検出された糞便検体について、ショ糖遠心浮遊法によりオーシストを回収し、QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用してゲノムDNAを精製し、*Cryptosporidium* 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene および *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene 領域を増幅する特異プライマーを用いてPCRを実施した。これらの増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した結果、イヌ3頭は *C.canis*、ネコ7頭は *C.felis* と同定された。

第3章では、ジアルジアシストが検出された糞便検体からシストを回収し、精製したゲノムDNAを用いて *G.intestinalis* が特異的に保有する *Giardia* 18S rRNA (18S rRNA) gene、ジアルジアの遺伝子型に特異的な Glutamate dehydrogenase (GDH) gene および β -giardin genes 領域を増幅する特異プライマーでPCRを実施した。得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した結果、イヌ2頭は *G.intestinalis* の Assemblage D、ネコ1頭は Assemblage F であった。

第4章では、ネコ2検体、保護施設で分離したイヌ2検体および鳥獣駆除施設で分離したタヌキ7検体からマイクロマニピュレータを用いてオーシスト単離し、ゲノムDNAを鋳型に nested PCR を行った。イヌ2頭、ネコ2頭、タヌキ4頭から分離され 18S rRNA gene の部分塩基配列を解析した結果、イヌ2頭とタヌキ4頭のシストイソスポラ分離株のそれぞれの塩基配列は同一であった。同様にネコ2検体のそれぞれの塩基配列も同一であった。これらの成績は、イヌに感染するシストイソスポラが異なる食肉目のタヌキにも感染可能であることを示唆している。イヌとタヌキの塩基配列は既報の *C. ohioensis* (AY618555) と 99.7% の高い相同性を、ネコの塩基配列は既報の *C.felis* (L76471) と 99.0% の高い相同性を示した。しかし、分離株の塩基配列が完全に一致しないことから、わが国においては既知の遺伝子型とは異なる遺伝子型のシストイソスポラをイヌ、ネコ、タヌキが保有している可能性が示唆された。

本研究は、大都市圏で家庭飼育されている犬猫の消化管寄生原虫に対する初めての分子疫学調査である。下痢症状を示していない家庭飼育動物からヒトと動物に共通感染性を有する

原虫が検出されたことから、飼い主に対して適切な衛生管理を実施することが家庭で動物を飼育するためには必要不可欠であることを明示した。これらの成績は獣医学ならびに医学に大きく貢献するものと評価できる。したがって、最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。