

## 論文の内容の要旨

氏名：大井 誠明

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：犬・猫を終宿主とする人獣共通寄生虫症の疫学に関する研究

犬や猫を終宿主とする寄生虫のなかには、ヒトへ感染し重篤な症状を引き起こす種や動物自身に強い病害を与える種が存在する。近年、動物病院に来院する犬や猫では、寄生虫感染率は低下していると看做されているが、来院動物は予防獣医療を受けながら良質な飼育環境で生活しているため、実際の感染リスクを過小に評価している可能性がある。また、来院歴のない動物も多数存在し、そのような動物の感染実態は不明である。このため、疫学様相の現状を正確に理解するためには、来院動物以外にも母集団に含めて評価する必要がある。本申請論文では、動物愛護センターに収容された犬・猫を指標動物として、公衆衛生上重要なトキソプラズマ *Toxoplasma gondii* と小動物臨床上重要な犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* の、それぞれの感染様相の把握を目的とした研究を行った。

トキソプラズマは猫科動物を唯一の終宿主とし、ヒトを含めたほぼ全ての恒温動物を中間宿主とする原虫である。犬や猫のトキソプラズマ症は通常不顕性とされるが、ヒトでは世界人口の約1/3が感染していると推測され、妊婦では流産や新生児の水頭症、エイズ患者では重篤な脳炎の原因となる。猫は終宿主として感染源となるオーシストを糞便内に排出し、犬はトキソプラズマの中間宿主であるためオーシストは産生しないが、機械的な運搬宿主となる可能性が指摘されている。

犬糸状虫は犬科動物を終宿主とする蚊媒介性の線虫である。犬をはじめとした好適宿主においては成虫が右心室と肺動脈に寄生するため、感染犬は循環障害を生じ、大静脈症候群や多臓器不全によって死に至ることがある。犬糸状虫の幼虫は、稀にヒトにも感染し肺動脈を塞栓して肉芽腫を形成し呼吸器疾患を引き起こすため、人獣共通寄生虫症として重要である。

### 第1章 収容犬・猫におけるトキソプラズマの感染様相

来院犬・猫のトキソプラズマ陽性率は数%と報告されているが、動物病院以外で得られた疫学情報が少ないため、感染リスクを正確に反映したものであるかを判断することは難しい。そこで本章では、公衆衛生学的な観点からヒトへのトキソプラズマ感染リスクを評価することを目的に、東京都の収容犬・猫のトキソプラズマ感染状況の現状について調査し、さらに現状と10年前の比較を行うことで感染様相の変化について検討した。

東京都動物愛護相談センターにて収容された犬の血清325検体および猫の血清337検体を検査した。犬血清106検体および猫血清104検体は2009-2011年に、犬血清219検体および猫血清233検体は1999-2001年に採取したものである。近年に収容された犬の67.0%および猫の42.3%は、飼い主からの引取であった。トキソプラズマ感染の有無は、ラテックス凝集反応による血清中の抗トキソプラズマ抗体の検出によって確認した。犬における全体の陽性率は、2009-2011年では1.9%、1999-2001年は1.8%であった。地域別にみると、23特別区では2009-2011年は3.3%、1999-2001年は0.9%、多摩地区では2009-2011年は0%、1999-2001年は2.7%であった。品種別では、雑種の陽性率は2009-2011年では0%、1999-2001年では2.0%、純血種は2009-2011年では2.8%、1999-2001年は1.5%であった。年代や地域、品種に有意差は認められなかった ( $P>0.05$ )。猫における全体の陽性率は、2009-2011年では6.7%、1999-2001年は5.6%であった。地域

別にみると、23特別区では2009-2011年は1.7%、1999-2001年は2.5%、多摩地区では2009-2011年は13.6%、1999-2001年は8.8%であった。多摩地区の陽性率は、年代に関わらず23特別区に対して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。品種別では、雑種にのみ陽性個体を認め、その陽性率は2009-2011年では7.1%、1999-2001年では6.2%であったが、純血種との間に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

本研究によって、現在の東京都における収容犬・猫のトキソプラズマ陽性率は、低値であることが明らかとなった。収容犬・猫の陽性率は10年前から変化していないことから、都市部における犬・猫のトキソプラズマ感染リスクは陽性率が平衡状態に達するまで低下していると考えられる。しかしながら、多摩地区の猫では23特別区より有意に高い陽性率を示しており、この傾向は10年前と変化していない。この結果は、多摩地区のような郊外では、一部に高い感染リスクが継続している地域が存在していることを示唆している。多摩地区では、23特別区に比べて自然環境が豊かであるため、中間宿主となる動物の多様性や密度が高く、これらの動物と猫との接触機会が多いことが高い陽性率を認めた一因と考えられる。このため、多摩地区に住む人々は、猫の排泄物に汚染された環境を通してトキソプラズマに感染するリスクが高いため、衛生管理には注意を払う必要がある。

## 第2章 収容犬における犬糸状虫の感染様相

犬の犬糸状虫陽性率が高まれば、ヒトへの感染機会も増加することが予測されるため、犬糸状虫は小動物臨床だけでなく公衆衛生上も重要である。そこで本章では、犬糸状虫感染リスクの現状を明らかにすることを目的に、東京都で収容された犬を指標動物に犬糸状虫感染状況の評価を行い、あわせて現状と10年前との比較を行い、感染様相の変化について検討した。

東京都動物愛護相談センターにて収容された犬の血清200検体を検査した。そのうち100検体は2009-2011年に、残りの100検体は1999-2001年に採取したものである。なお、犬糸状虫感染の正確な診断が可能になるのは感染8ヵ月以降であるため、成犬のみを検査対象とした。犬糸状虫感染の有無は、イムノクロマトグラフ法によって血液中の成虫由来排泄・分泌物を血清学的に検出することによって確認した。全体の犬糸状虫陽性率は2009-2011年では23.0%、1999-2001年は46.0% ( $P < 0.01$ ) であった。地域別に見ると、23特別区の陽性率は2009-2011年では18.2%、1999-2001年は46.0% ( $P < 0.01$ )、多摩地区は2009-2011年では28.9%、1999-2001年は46.0%であった。品種別では、雑種の陽性率は2009-2011年では50.0%、1999-2001年では58.5%、純血種は2009-2011年では10.3%、1999-2001年は22.9%であった。年代に関わらず、雑種の陽性率は純血種よりも有意に高かった ( $P < 0.01$ )。

本研究によって、東京都のような都市部においても依然として犬糸状虫の感染リスクが高いことが明らかとなった。この所見は、陽性率が数%と見做されている来院犬由来の情報と大きく乖離しており、動物病院で得られた情報は母集団に予防投薬を受けているために犬糸状虫感染の可能性が殆どない犬を多く含むため、実際の犬糸状虫感染リスクを過少評価するものと考えられた。10年前に比べ陽性率は半減したが、現在でも収容犬の23.0%に犬糸状虫感染が認められ、特に多摩地区や雑種の犬では、その陽性率はそれぞれ28.9%、50.0%と、より高値を示した。また、2009-2011年の雑種の陽性率は10年前と比べて大きく変化していないことが本研究により明らかとなった。雑種の陽性率が有意に高いことは、屋外飼育などにより媒介蚊に曝露される機会が多いことを示唆している。

犬糸状虫検査のゴールド・スタンダードとされるmf検査では診断不可能なオカルト感染と呼ばれる血液中にミクロフィラリア (mf) を認めない病態 (無mf血症) が知られている。オカルト感染は、1991年の25.2%の報告を最後に、現状は不明である。そこで、オカルト感染の現状について評価を行うことを目

的に、mfの保有状況について検討した。Mf検査にはアセトン集虫法、抗原検査にはイムノクロマトグラフ法を用い、2011年5月から6月にかけて保護された福島県の成犬123頭を検査した。全体の犬糸状虫陽性率は、38.2%であった。Mf検査および抗原検査の陽性率はそれぞれ、25.2%、37.4%であり、mf検査での診断が不可能なオカルト感染の出現頻度は34.0%と高値である現状が明らかとなった。さらに、mf陽性でもイムノクロマトグラフ法で抗原陰性となる病態が1頭の犬に認められたため、犬糸状虫検査における新たな問題点が抽出された。

### 第3章 宿主血清中の犬糸状虫遊離型DNAの解析

犬糸状虫感染の診断は、血液中に循環するmfを寄生虫学的に検出すること、または虫体抗原を血清学的に検出することで証明される。Mf検査は血中mfを鏡検によって直接検出する方法であるため、低密度のmf血症犬や前述のようなオカルト感染（無mf血症）犬を診断することはできない。また、抗原検査は主に成虫由来の血中抗原を検出するため、幼虫寄生期や少数寄生例を診断することは難しい。近年、一部の寄生虫症において虫体由来の核酸断片（遊離型DNA；cfDNA）が、宿主の血液中に存在することが報告され、その有用性に注目が集まっている。そこで本章では、現状の問題点を解決する新たな検査法について検討することを目的に、宿主血清中に存在する犬糸状虫cfDNAの存在を証明し、分子生物学的診断法への応用の可能性について検討した。

本研究には、mf検査、抗原検査および剖検により犬糸状虫感染が確認された自然感染犬12頭（mf陽性8頭、mf陰性4頭）と非感染犬4頭の血清および犬糸状虫の成虫を雌雄に分けて培養した培養液（雄成虫培養液、mf産出雌成虫培養液）を用いた。供試犬の抗原検査では、mf陽性犬のうち7頭が抗原陽性、1頭は抗原陰性、mf陰性犬は3頭が抗原陽性、1頭は抗原陰性であった。全ての検体は、DNA抽出直前にmfの混入がないことを鏡検にて確認した。犬糸状虫DNAの検出には、mtDNA *cyt c* 遺伝子の部分領域を標的にnested PCR法を行った。その結果、mf陰性犬と非感染犬の血清からは虫体DNAは確認されなかったが、mf陽性犬全頭の血清から虫体DNAが確認された。また、成虫培養液では、mfを産出した雌成虫培養液からのみ虫体DNAが検出され、雄成虫培養液からは検出されなかった。

本研究により感染犬の血清中から犬糸状虫のDNAが検出され、cfDNAの存在が初めて確認された。cfDNAがmf陽性犬血清とmf産出雌成虫培養液からのみ検出されたことから、犬糸状虫cfDNAの由来は主としてmfであり、成虫由来のcfDNAは少ないことが示唆された。これらの所見から、犬糸状虫cfDNAを検出できるのはmf陽性犬であり、cfDNAを利用した分子生物学的診断法にはmfの存在に依存にした限界があることが分かった。一方で、cfDNAが検出された個体の中にはmf陽性/抗原陰性であった犬も含まれていたことから、少数寄生のために抗原検査で偽陰性になりやすい感染に対しては、cfDNA検査が補助診断として応用できる可能性が示された。

### 総括

本研究によって、収容犬・猫を指標動物とすることで、トキソプラズマと犬糸状虫感染の現状を明らかにした。東京都におけるトキソプラズマ感染リスクが低い一方で、犬糸状虫の感染リスクは現在も高いことが明らかとなった。さらに、現行の犬糸状虫診断法における限界の実例を示すことで、新たな診断法開発の必要性を示した。また、宿主の血清中には犬糸状虫cfDNAが循環していることを明らかにし、その主たる由来がmfであることを示した。これらの結果は、犬糸状虫感染における新たな診断法としてのcfDNA検出の特性と限界を明らかにし、寄生虫症の病態解明研究の発展に関わるcfDNAの基礎的知見を提供するものである。