

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 野上 貞雄

(副査) 教授 遠矢 幸伸

教授 丸山 総一

犬や猫を終宿主とする寄生虫のなかには、ヒトへ感染し人獣共通寄生虫症を引き起こす種が存在する。近年、動物病院に来院する犬や猫では寄生虫の陽性率は低下しているとされているが、これらの動物は予防獣医療を受けながら飼育されているため、実際の感染リスクが過少に評価されている可能性がある。また、家庭で飼育されている犬猫のなかには来院歴の無い動物も多数存在するため、そのような動物における寄生虫の感染実態は不明である。従って、犬猫の寄生虫感染の疫学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。本研究では、まず東京都の動物愛護相談センターに収容された犬猫を対象に、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) と犬糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) の感染様相の把握を目的とした調査研究を行った。

東京都動物愛護相談センターにて収容された近年と10年前の犬の血清計325検体および猫の血清337検体を検査した。なお2009-2011年に収容された犬の67.0%および猫の42.3%は、飼い主からの引き取り個体であった。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。品種別にみると、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、品種の陽性率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 ( $P < 0.05$ )。品種別にみると、雑種にのみ陽性個体が認められ、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、現在の東京都では、愛護施設に収容された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。収容された犬猫の陽性率は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陽性率は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、現在でもトキソプラズマの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。

犬糸状虫は、東京都動物愛護相談センターに収容された犬の血清計200検体（100検体は2009-2011年に、残りの100検体は1999-2001年に採取）を対象に検討した。なお、犬糸状虫感染の正確な診断が可能になるのは感染から8ヵ月以降であるため、成犬のみを対象とした。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に循環する成虫由来の排泄・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。地域別にみると、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。品種別にみると、雑種の陽性率は2009-2011年では50.0%、1999-2001年は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の疫学情報と大きく乖離している。動物病院で得られた情報は、母集団に犬糸状虫の予防投薬を受けているためにその感染の可能性が少ない犬を多く含むため、実際の犬糸状虫の感染リスクが過少評価されているものと考えられた。10年前に比べると、犬糸状虫の陽性率は半減したが、2009-2011年の時点でも収容犬の23.0%に犬糸状虫の感染が認められており、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年前の1999-2001年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。

犬糸状虫検査のGold Standard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マイクロフィラリア(mf)が認められない病態(無mf血症)が知られている。国内の犬のオカルト感染の状況は、1991年の収容犬における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を評価することを目的に、犬の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頭を対象に調査した。mf検査と抗原検査のいずれか一方でも陽性であったものは、犬糸状虫の感染を陽性と判定した。犬糸状虫の陽性率は、全体で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、オカルト感染の出現率は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。

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ており、その検査に対する有用性に注目が集まっている。そこで、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のcfDNAの存在を検討すると共に、分子生物学的診断法として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の有無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別して培養した培養液(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。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、全頭のmf陽性犬の血清から虫体DNAが確認された。また、成虫培養液では、mfを産出していた雌成虫の培養液からのみ虫体DNAが検出され、雄成虫の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由来のDNAが検出され、cfDNAの存在が初めて確認された。cfDNAがmf陽性犬の血清とmfを産出していた雌成虫の培養液からのみ検出されたことから、犬糸状虫のcfDNAの由来は主としてmfであり、成虫に由来するcfDNAの可能性は低いことが示唆された。これらの所見から、犬糸状虫の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の存在に依存した限界があることが判明した。一方で、cfDNAが検出された個体のなかには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の検査が補助診断として応用できる可能性が示された。

以上の様に、本研究では、東京都の動物愛護相談センターに収容された犬猫のトキソプラズマと犬糸状虫感染の現状を明らかにした。また、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。さらに、宿主の血清中には犬糸状虫のcfDNAが循環しており、その主たる由来がmfであることを明らかにした。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示し、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。

よって本論文は、博士(獣医学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成28年1月27日