

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

大井 誠明

2015

## 目次

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 第1章 序論                    | 1  |
| 第2章 収容犬・猫におけるトキソプラズマの感染様相 | 7  |
| 2.1 はじめに                  | 8  |
| 2.2 材料および方法               | 10 |
| 2.2.1 調査地域                |    |
| 2.2.2 収容犬・猫の血液検体          |    |
| 2.2.3 抗トキソプラズマ抗体検査        |    |
| 2.2.4 統計学的解析              |    |
| 2.3 結果                    | 12 |
| 2.3.1 収容犬の抗トキソプラズマ抗体陽性率   |    |
| 2.3.2 収容猫の抗トキソプラズマ抗体陽性率   |    |
| 2.4 考察                    | 14 |
| 2.5 小括                    | 19 |
| 第3章 収容犬における犬糸状虫の感染様相      | 23 |
| 3.1 はじめに                  | 24 |
| 3.2 材料および方法               | 26 |
| 3.2.1 収容犬の血液検体            |    |
| 3.2.2 ミクロフィラリア検査供試犬の血液検体  |    |
| 3.2.3 犬糸状虫抗原検査            |    |
| 3.2.4 ミクロフィラリア検査          |    |
| 3.2.5 統計学的解析              |    |
| 3.3 結果                    | 28 |
| 3.3.1 収容犬の犬糸状虫陽性率         |    |
| 3.3.2 オカルト感染の出現率          |    |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 3.4 考察                         | 30        |
| 3.5 小括                         | 33        |
| <b>第4章 宿主血清中の犬糸状虫遊離型DNAの解析</b> | <b>37</b> |
| 4.1 はじめに                       | 38        |
| 4.2 材料および方法                    | 40        |
| 4.2.1 犬の血液検体                   |           |
| 4.2.2 犬糸状虫成虫の培養                |           |
| 4.2.3 DNAの抽出                   |           |
| 4.2.4 Nested-PCR法による遺伝子の増幅     |           |
| 4.2.5 電気泳動                     |           |
| 4.2.6 ダイレクトシーケンス法によるDNA塩基配列の決定 |           |
| 4.2.7 遺伝子解析                    |           |
| 4.3 結果                         | 45        |
| 4.4 考察                         | 45        |
| 4.5 小括                         | 48        |
| <b>第5章 総括</b>                  | <b>51</b> |
| 謝辞                             | 60        |
| 引用文献                           | 62        |
| 業績一覧                           | 82        |
| 受賞等一覧                          | 84        |

# 第1章

## 序論

我が国で見られる寄生虫のうち、犬や猫を終宿主とする種には原虫類ではジアルジアやイソスポラ、トキソプラズマ、吸虫類では肺吸虫や横川吸虫、条虫類ではマンソン裂頭条虫や瓜実条虫、多包条虫、線虫類では回虫類や鉤虫類、鞭虫類、糞線虫類、犬糸状虫などの様々な種が知られている。これらの寄生虫のなかには、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含まれる。犬や猫は人間社会に最も身近な動物であり、ヒトと生活環境を共有しているため、これらの動物が保有する寄生虫がヒトに感染することが危惧される。

近年、動物病院に来院する犬や猫（以下、来院動物）の寄生虫の陽性率は低下していると報告されている（Asano et al. 2004; Morishima et al. 2007）。しかしながら、これらの動物は病気の治療や予防を目的に動物病院を訪れる動物であり、様々な感染症に対する予防獣医療を受けながら良質な環境で飼育されているため、実際の感染リスクが過小に評価されている可能性がある。一方で、動物病院への来院歴がない動物も多数存在するが、このような動物集団における疾病の疫学情報は不明である。このため、疫学様相の現状を正確に理解するためには、来院動物以外の動物も母集団に含めて、より幅広い飼育形態の犬や猫を調査する必要がある。

行政の動物愛護施設は、法律に基づいて野外で保護された動物（以下、保護動物）や飼い主から直接引き取った動物（以下、引き取り動物）を収容する施設である。保護動物は野外で生活していたため、野外の感染症汚染状況を反映する動物であると考えられる (Meireles et al. 2004)。また、引き取り動物は飼い主から直接引き取った飼育動物であるため、病気の治療や予防目的の来院動物に比べて、様々な飼育形態の動物が含まれていると考えられる。そこで、本研究では、動物愛護施設に収容された犬・猫を対象として、公衆衛生上重要なトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) と小動物临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。本原虫は世界中に蔓延しており、ヒトでは世界人口の約1/3が感染していると推測されている (Montoya & Liesenfeld 2004)。ヒトや動物は、猫が排出したオーシストや中間宿主の組織内に形成されたシストを経口摂取すること、あるいはタキゾイトが胎盤移行することで感染する (Dubey 2009)。犬や猫のトキソプラズマ症は通常不顕性に経過するとされるが、ヒトでは免疫能の低下によって発症することが知られている。トキソプラズマは細胞内寄生原虫であり、骨組織や赤血球以外のあらゆる細胞・組織に感染能を持つため、

中枢神経系に感染した場合は脳炎などの深刻な病害を引き起こすことがある。HIV感染者ではこの問題が顕著であり、AIDSを発症したHIV感染者がトキソプラズマ脳炎によって死亡する割合は米国では10%、欧州では30%、日本では8%前後とされている (Hill et al. 2005; 矢野ら 2007)。一方で、健常者のトキソプラズマ感染が問題とならないのは、免疫系の働きによるものであるが、原虫は完全に生体から排除されず、脳や筋肉内に抵抗型のシストを形成して終生感染が継続する。このため、HIV感染による免疫不全患者や免疫抑制剤を使用している臓器移植患者、抗癌剤を使用している担癌患者などは、免疫力の低下によってトキソプラズマ症を再燃することがある。

女性が妊娠中に初めてトキソプラズマに感染した場合、トキソプラズマは胎児へ垂直感染し、先天性トキソプラズマ症を引き起こすことがある。妊娠中の女性がトキソプラズマに初感染する割合は1%以下であるが、胎児への伝播率は15-60%とされ、妊娠期が進むにつれて高まる (Hill et al. 2005; 矢野ら 2007)。胎児が先天性トキソプラズマ症に罹患すると、死・流産や脈絡網膜炎、水頭症、脳内石灰化、精神運動障害などの先天性障害を併って出生することがある。近年の我が国における調査では、妊婦の10.3%が抗体陽性であり、妊娠中に初めてトキソプラズマに感染する割合は0.25%と推定されている (Sakikawa et al. 2012)。

犬糸状虫は主として犬科動物を終宿主とする蚊媒介性のオンコセルカ科線虫である。犬をはじめとする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、感染犬は肺高血圧症から循環障害を生じ、更には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 (Simón et al. 2012)。犬糸状虫の宿主域は広く、犬科動物以外にも猫やフェレット、ウサギ、クマ、アザラシ、オランウータン、ペンギンなど40種以上の哺乳類・鳥類の自然感染が報告されている (早崎 2013)。さらに、犬糸状虫の幼虫はヒトに感染することがあるため、人獣共通寄生虫症としても重要な疾病である。ヒトが犬糸状虫に感染した場合、肺に結節性の病変を形成することが多いため、肺犬糸状虫症と呼ばれる。肺犬糸状虫症では、肺動脈内で死滅した幼虫が塞栓し、肉芽腫が形成されることで、発咳や血痰喀出、胸痛などの呼吸器症状を引き起こすことがある (Simón et al. 2012)。肺犬糸状虫症の確定診断には病理組織診断が必要であり、また銭形陰影像と呼ばれる肺犬糸状虫症に特徴的なレントゲン所見が肺癌や肺結核に類似しているため、病変部は外科的に切除されることが多く、肺犬糸状虫症は直接の病害よりも医療過誤の原因として問題になる。また、犬糸状虫が心肺以外の皮膚や腹腔内、子宮壁、乳房、眼等から検出されることがあり、これらは肺外犬糸状虫症と呼ばれる。特に皮膚の犬糸状虫症では、感染蚊の刺咬部位に死滅幼虫による肉芽腫が形成されるため、皮下の腫瘍と誤診されることが多い。犬糸状虫



の人体寄生例は、日本、米国、南米、オーストラリアにおける報告が多い (Simón et al. 2012)。我が国では、1999年までに157例の肺犬糸状虫症と21例の肺外犬糸状虫症が報告されており (影井 1999)、現在までの人体寄生例は200例を超えると推定される。

## 第2章

### 収容犬・猫におけるトキソプラズマの感染様相

## 2.1 はじめに

トキソプラズマ症は、ヒトにおいては先天性疾患が最も重要な病害である。猫はトキソプラズマの終宿主として感染源となるオーシストを糞便中に排出するため、トキソプラズマの伝播経路における重要な動物である。猫のトキソプラズマ抗体の陽性率は、アルバニアでは62.3% (Silaghi et al. 2014)、ラトビアでは51.6% (Deksne et al. 2013)、オランダでは18.2% (Opsteegh et al. 2012)、ポルトガルでは35.8% (Lopes et al. 2008)、ハンガリーでは47.6% (Hornok et al. 2008)、メキシコでは21.8% (Besné-Mérida et al. 2008)、ブラジルでは15.7–40.0% (Meireles et al. 2004; Coelho et al. 2011)、中国では14.9% (Yu et al. 2008)、タイでは11.0% (Jittapalapong et al. 2007) と国や地域によって様々である。一方で、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排出しないが、オーシストの機械的な運搬宿主となる可能性が指摘されている (Frenkel & Parker 1996; Lindsay et al. 1997; Frenkel et al. 2003)。犬は臭気の強いものを好む習性があるため (Reiger 1979)、猫の糞を体に擦り付けるなどの行動をとることで、自身の被毛にトキソプラズマのオーシストを付着させることがある。ヒト、特に小児では、このような犬を撫でた後に、汚染された手を口に入れたり、その手で食物を食べたりすることでトキソプラズマに感染すると推測される (Frenkel et al. 1995; Etheredge et al.

2004)。犬のトキソプラズマ抗体の陽性率は、猫と同様に地域によって差がある。ポルトガルでは38.0% (Lopes et al. 2011)、スペインでは58.7% (Cabezón et al. 2010)、メキシコでは67.3% (Alvarado-Esquivel et al. 2014)、ブラジルでは26.9–50.5% (Meireles et al. 2004; Langoni et al. 2013)、ナイジェリアでは25.0% (Kamani et al. 2010)、中国では10.0–40.3% (Yu et al. 2008; Yan et al. 2012; Li et al. 2012; Yang et al. 2013)、韓国では12.8% (Nguyen et al. 2012)、タイでは9.4% (Jittapalapong et al. 2007) と報告されている。

我が国における犬・猫のトキソプラズマ抗体の陽性率は、動物病院に来院した猫では4.4–8.7% (Maruyama et al. 1998, 2003; Nogami et al. 1998; 相馬・齋藤 2005)、犬では2.8–7.0% (相馬・齋藤 2008; 相馬ら 2015) と低い値である。しかしながら、動物病院以外で得られた疫学情報が少ないため、実際のトキソプラズマの感染リスクをどの程度反映したものであるかを判断することは困難である。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・猫におけるトキソプラズマの感染状況について、現状と10年前を比較検討することで、感染様相の変化について考察した。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 調査地域

調査地の東京都は、行政区分に従って23特別区と多摩地区の二つの地域に分けた。23特別区は、東京都の東部に位置し、23の特別区から構成され、繁華街や商業地区が多く、湾岸地域が含まれる。多摩地区は、東京都の西部に位置し、30市町村から構成され、住宅地が多く、林間地域が含まれる。東京都環境局による2013年の調査によれば、23特別区と多摩地区のみどり率\*は、それぞれ19.8%、67.1%であった (<http://www.metro.tokyo.jp/INET/CHOUSA/2014/09/60o9t300.htm>)。また、東京都は、ヒトと犬の密度が全国で最も高い地域である。猫における正確な情報はないが、犬と同様に高い密度であると推測される。

\*みどり率：緑が地表を覆う部分に公園区域・水面を加えた面積が、地域全体に占める割合。

### 2.2.2 収容犬・猫の血液検体

血液検体は、東京都動物愛護相談センターに収容された犬325頭および猫337頭から採取した。そのうち、犬106頭と猫104頭の血液は2009年4月から2011年3月にかけて採取し、残りの犬219頭と猫233頭の血液は1999年4月から2001

年3月にかけて採取した。血液は各動物から無菌的に採取した後、 $1,000 \times g$  で15分間遠心分離して血清を採取し、検査時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。引き取り犬の地域、性別、年齢、品種は、飼い主からの聞き取りにより記録した。飼い主が不明であった保護動物の性別、年齢、品種は、愛護施設の獣医師の診察によって記録し、地域は保護した場所を記録した。2009–2011年に収容された犬の67.0%および猫の42.3%が、飼い主からの引き取り個体であった。各収容犬・猫は愛護施設内では、それぞれ個別に飼育されていた。

### 2.2.3 抗トキソプラズマ抗体検査

各動物におけるトキソプラズマの感染は、トキソチェック<sup>®</sup>-MT‘栄研’（栄研化学）を用いたラテックス凝集反応（マイクロタイター法）により、血清中の抗トキソプラズマ抗体を検出することによって確認した。検査手順は、はじめに96穴のU字底マイクロタイタープレート（ディスポUプレート 32100:村上サイエンス）の6穴に付属の緩衝液を25  $\mu\text{L}$ ずつ分注し、予め付属緩衝液で16倍に希釈した被験血清の2倍階段希釈系列（16–1,024倍）を作製した。次に、付属のラテックス乳液をよく振盪して均一な懸濁液とした後、1穴あたり25  $\mu\text{L}$ を分注して、振盪機（マイクロ・ミキサー MX-4:三光純薬）にてよく混和した。各検体は、室温にて一晚（18時間以上）静置した後、プレートリーダー（テスト・リーディング・ミラー

220-16KD:三光純薬)を用いて凝集像を確認した。判定は添付の凝集像判定基準に従い、最終血清希釈倍数値(抗体価)が64倍以上を示したものをトキソプラズマ感染陽性とした。なお、検査は同一サンプルの希釈列を二列作製し、双方の結果から判定を行った。

#### 2.2.4 統計学的解析

地域(23特別区対多摩地区)、性別(雄対雌)、年齢(5歳以下対6歳以上)、品種(雑種対純血種)ごとに、同一年度における各因子間(例:1999-2001年における、23特別区対多摩地区)および同一因子における年度間(例:23特別区における、1999-2001年対2009-2011年)の抗体陽性率を比較検討した。解析方法にはそれぞれ、JavaScript-STAR ver. 5.5.7jソフトウェア(<http://www.kisnet.or.jp/nappa/software/star/>)を用いたFisherの正確確率検定にて比較し、 $P$ 値0.05未満を有意差があるものと判定した。

### 2.3 結果

抗トキソプラズマ抗体陽性の犬および猫の抗体価の分布は、表2-1に示した。また、地域、性別、年齢、品種別の犬と猫の抗体陽性率を、表2-2と表2-3に

それぞれ示した。

### 2.3.1 収容犬の抗トキソプラズマ抗体陽性率

犬における全体の抗体陽性率は、2009–2011年では1.9% (2/106)、1999–2001年は1.8% (4/219) であった。地域別にみると、23特別区の陽性率は2009–2011年は3.3% (2/60)、1999–2001年は0.9% (1/108)、多摩地区では2009–2011年は0%、1999–2001年は2.7% (3/111) であった。雌雄別にみると、雄の陽性率は2009–2011年では0%、1999–2001年は0.8% (1/126)、雌は2009–2011年では3.8% (2/53)、1999–2001年は3.2% (3/93) であった。年齢別にみると、5歳齢以下の陽性率は2009–2011年では0%、1999–2001年は1.0% (1/98)、6歳齢以上は2009–2011年では2.0% (2/98)、1999–2001年は2.5% (3/121) 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年は2.0% (3/151)、純血種は2009–2011年では2.8% (2/72)、1999–2001年は1.5% (1/68) であった。年代や地域、性別、年齢、品種間に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

### 2.3.2 収容猫の抗トキソプラズマ抗体陽性率

猫における全体の抗体陽性率は、2009–2011年では6.7% (7/104)、1999–2001年は5.6% (13/233) 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1.7% (1/60)、1999–2001年は2.5% (3/119)、多摩地区では2009–2011年は13.6% (6/44)、1999–2001年は8.8% (10/114) で、両年代ともに多摩地区の陽性率は23特別区に比べて有意に高かった ( $P < 0.05$ )。雌雄別にみると、雄の陽性率は2009–2011年では1.9% (1/52)、1999–2001年は4.5% (4/88)、雌は2009–2011年では11.5% (6/52)、1999–2001年は6.2% (9/145) であった。年齢別にみると、5歳齢以下の陽性率は2009–2011年では10.7% (3/28)、1999–2001年は4.2% (6/142)、6歳齢以上は2009–2011年では5.3% (4/76)、1999–2001年は7.7% (7/91) であった。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% (7/98)、1999–2001年は6.2% (13/210) であった。年代や性別、年齢、品種に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

## 2.4 考察

犬や猫がヒトのトキソプラズマ症の感染源となり得るにも関わらず、近年の東京都におけるそれらの感染状況については不明であった。本研究では、収容犬のトキソプラズマ陽性率が2009–2011年では1.9%、1999–2001年は1.8%、収容猫の陽性率は2009–2011年では6.7%、1999–2001年は5.6%であることを明らかにした。

これらの成績から、この10年間に於ける収容犬・猫のトキソプラズマ陽性率は殆ど変化していないため、犬や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。また、検査対象の収容動物の多くは、元は飼育動物であったことから、これらの結果は飼育犬や飼育猫の平均的なトキソプラズマ感染状況を表していると考えられる。猫のトキソプラズマ陽性率が犬よりも高かったことは、猫は犬に比べネズミや鳥などのトキソプラズマの中間宿主となる小動物を狩猟する本能が強いことが (Loss et al. 2013)、トキソプラズマの感染機会を増加させたと推測される。犬や猫がトキソプラズマに曝露される機会は加齢とともに増加するため、陽性率も同様に上昇すると考えられている (Lopes et al. 2011; Deksne et al. 2013)。しかしながら、本研究では有意差は認められなかったものの、2009–2011年の5歳齢以下の猫に於ける陽性率は、6歳齢以上の猫に比べ2倍以上高かった。抗体陽性猫のなかには1歳齢未満の幼猫は含まれておらず、また母猫からの移行抗体は通常、生後12週目までに消失することから、移行抗体が影響しているとは考えにくい (Omata et al. 1994; Dubey et al. 1995a)。また、5歳齢以下の猫の抗体価は高値 (256–1,024倍) である個体が多かったことから、最近の感染や再感染が示唆される。一方で、抗体価の低かった6歳齢以上の猫は、トキソプラズマの慢性感染であることが示唆される。このため、詳細な原因は不明であるが、現在の東京都の猫に於けるトキソプラズマ感染は、

若齢個体の間で広く流行していると推測される。雌雄別の陽性率は、雌猫でやや高い傾向が観察された。猫のトキソプラズマ陽性率に性差はないとする報告が多いが (Maruyama et al. 1998, 2003; Nogami et al. 1998)、Besné-Mérida et al. (2008) は、雌猫で高い陽性率が認められる場合には、調査した雌猫の遺伝的要因や性ホルモンによる影響を推測している。

我が国における犬のトキソプラズマ陽性率は2.8–7.0% (相馬・齋藤 2008; 相馬ら 2015)、猫では4.4–8.7% (Maruyama et al. 1998, 2003; Nogami et al. 1998; 相馬・齋藤 2005) と報告されている。また、関東地方に限局した場合は、犬の陽性率は1.7%、猫の陽性率は5.7%である (相馬・齋藤 2005, 2008)。本研究における犬のトキソプラズマ陽性率は1.8–1.9%、猫では5.6–6.7%と、両動物種ともに既報の値に類似するものであった。これらの疫学情報から、犬や猫のトキソプラズマ陽性率は低値で推移しているものの、ヒトの生活環境中には依然として感染動物が存在していることから、現在でも一定のトキソプラズマ感染リスクがあることが示唆される。

猫のトキソプラズマ陽性率は地域によって様々であり、1つの国のなかにおいても差がある (Dubey 2009)。また、郊外や地方に住む猫は、都市部の猫に比べ、トキソプラズマに感染しやすいとされる (Hornok et al. 2008)。本研究では、東京都の郊外である多摩地区の猫におけるトキソプラズマの陽性率は、両年代ともに

都市部である23特別区の猫に比べ有意に高かった。これは多摩地区の猫が、トキソプラズマの感染源となる中間宿主や感染猫、またはトキソプラズマのオーシストに汚染された土壌や水との接触頻度が高いことを示唆している。猫における地域間の陽性率の差は、野外におけるオーシストの汚染状況や中間宿主となる小動物の密度、猫の食習慣の違いによる可能性がある。実際に、飼育猫では屋外への自由な移動や狩猟行動が、トキソプラズマ感染のリスク因子となっている (Afonso et al. 2010; Lopes et al. 2011; Opsteegh et al. 2012)。その他の要因として、コンクリートの路上に糞便と共に排出されたオーシストは、直射日光に曝露されて死滅したり (Yilmaz & Hopkins 1972)、雨などで容易に流されたりすると考えられる。多摩地区は23特別区に比べて土壌や樹木の占める割合が多いため (67.1% 対 19.8%)、これがオーシストの生残に影響を与えている可能性も否定できない。

平成21年度における都内の飲食店の数は、23特別区では72,219件であるのに対し、多摩地区では17,024件と大きな差がある。23特別区の猫は、人がゴミとして排出した残飯を容易に確保できる環境にあるため、中間宿主となる小動物を捕食する機会が少ないと推測される。このことも、23特別区の猫の陽性率が、多摩地区の猫より低くなった要因の一つとなっている可能性がある。

猫と同様に犬のトキソプラズマ陽性率も都市部に比べ地方で高いことが報告されている (de Brito et al. 2002; de Souza et al. 2003)。しかしながら、本研究の犬の陽性率には地域間に有意な差は認められなかった。これは犬の陽性個体数が少なかったため、地域差として表れなかったと考えられる。

本研究では、東京都の収容犬・猫におけるトキソプラズマ陽性率が、この10年間低値で推移していることを明らかにした。実験的には、トキソプラズマのシストを摂取したほぼ全ての猫がオーシストを排出し、抗体が陽転することが報告されている (Dubey & Frenkel 1972; Dubey & Thulliez 1989; Dubey et al. 1995b)。このため、抗体陽性の猫は過去に多量のオーシストを排出し、ヒトの生活環境を汚染していたと考えられる (Dubey 2009)。従って、多摩地区の人々は、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23特別区の人々よりも高いと考えられる。また、ヒトのトキソプラズマ感染における犬の役割は、猫ほど重要ではないと考えられているが、コホート研究では猫よりも犬と接触していた小児の方が、トキソプラズマの感染リスクが高いことが報告されている (Frenkel et al. 1995; Etheredge et al. 2004)。従って、小児や妊娠女性、免疫抑制状態にある人々は土壌や猫だけでなく犬に触れた後も、十分な衛生対策を行う必要がある。

## 2.5 小括

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特別区よりも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。この成績は、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。多摩地区は、23特別区に比べて自然環境が豊かであり、中間宿主となる動物の多様性や密度が高いため、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の一因であると考えられる。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ことから、衛生管理には注意を払う必要がある。また、猫だけでなく犬にもトキソプラズマの陽性個体が認められ、犬はトキソプラズマの運搬宿主となる可能性が指摘されているため、土壌や猫だけでなく犬に触れた後も、十分な衛生対策を行う必要がある。

表2-1. 東京都の収容犬・猫における抗トキソプラズマ抗体陽性率と抗体価の分布

| 動物種 | 年代        | 検査数 | 陽性数 (%)  | 陽性個体の抗体価 |       |       |       |         |
|-----|-----------|-----|----------|----------|-------|-------|-------|---------|
|     |           |     |          | 1:64     | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1,024 |
| 犬   | 1999-2001 | 219 | 4 (1.8)  | 0        | 2     | 0     | 0     | 2       |
|     | 2009-2011 | 106 | 2 (1.9)  | 0        | 1     | 1     | 0     | 0       |
| 猫   | 1999-2001 | 233 | 13 (5.6) | 5        | 5     | 1     | 0     | 2       |
|     | 2009-2011 | 104 | 7 (6.7)  | 0        | 1     | 3     | 2     | 1       |

表2-2. 東京都の収容犬における因子別の抗トキソプラズマ抗体陽性率

| 因子    | 1999-2001 |         | 2009-2011 |         |
|-------|-----------|---------|-----------|---------|
|       | 検査数       | 陽性数 (%) | 検査数       | 陽性数 (%) |
| 地域    |           |         |           |         |
| 23特別区 | 108       | 1 (0.9) | 60        | 2 (3.3) |
| 多摩地区  | 111       | 3 (2.7) | 46        | 0       |
| 性別    |           |         |           |         |
| 雄     | 126       | 1 (0.8) | 53        | 0       |
| 雌     | 93        | 3 (3.2) | 53        | 2 (3.8) |
| 年齢    |           |         |           |         |
| 5歳齢以下 | 98        | 1 (1.0) | 8         | 0       |
| 6歳齢以上 | 121       | 3 (2.5) | 98        | 2 (2.0) |
| 品種    |           |         |           |         |
| 純血種   | 68        | 1 (1.5) | 72        | 2 (2.8) |
| 雑種    | 151       | 3 (2.0) | 34        | 0       |
| 計     | 219       | 4 (1.8) | 106       | 2 (1.9) |



表2-3. 東京都の収容猫における因子別の抗トキソプラズマ抗体陽性率

| 因子     | 1999–2001 |                       | 2009–2011 |                       |
|--------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
|        | 検査数       | 陽性数 (%)               | 検査数       | 陽性数 (%)               |
| 地域     |           |                       |           |                       |
| 23特別区  | 119       | 3 (2.5) <sup>a</sup>  | 60        | 1 (1.7) <sup>b</sup>  |
| 多摩地区   | 114       | 10 (8.8) <sup>a</sup> | 44        | 6 (13.6) <sup>b</sup> |
| 性別     |           |                       |           |                       |
| 雄      | 88        | 4 (4.5)               | 52        | 1 (1.9)               |
| 雌      | 145       | 9 (6.2)               | 52        | 6 (11.5)              |
| 年齢 (歳) |           |                       |           |                       |
| 5歳齢以下  | 142       | 6 (4.2)               | 28        | 3 (10.7)              |
| 6歳齢以上  | 91        | 7 (7.7)               | 76        | 4 (5.3)               |
| 品種     |           |                       |           |                       |
| 純血種    | 23        | 0                     | 6         | 0                     |
| 雑種     | 210       | 13 (6.2)              | 98        | 7 (7.1)               |
| 計      | 233       | 13 (5.6)              | 104       | 7 (6.7)               |

<sup>a, b</sup>: Fisherの正確確立検定にて有意差あり ( $P < 0.05$ ).

## 第3章

### 収容犬における犬糸状虫の感染様相

### 3.1 はじめに

犬糸状虫の成虫が寄生虫学的に確認されたのは、1845年のWrightによる報告が最初である (Wright 1845)。我が国では、いつから犬糸状虫が存在していたかは不明であるが、少なくとも1890年代の時点で、犬の間に蔓延していたことが知られている (Railliet 1890; Janson & Tokishige 1892)。その後の継続的な調査によって、全国の犬には高率に犬糸状虫が感染している実態が明らかにされ、1990年代では31.6–62.8%の陽性率が報告されている (Uga et al. 1990; Tada et al. 1991; Hatsushika et al. 1992; Okamoto et al. 1995; Nogami & Sato 1997; Toma et al. 1998; 栗山ら 1999)。近年では、予防薬の普及によって犬糸状虫の陽性率は大きく減少し、動物病院に来院した犬を対象に行なわれた全国規模の調査では、犬糸状虫の陽性率は3.85%と報告されている (小動物疾病発生状況調査結果解析委員会 2002)。しかしながら、予防投薬を受けている来院犬を対象とした疫学調査だけでは、実際の犬糸状虫の分布や感染リスクを正確に判断することは困難である。

犬糸状虫感染には、オカルト感染と呼ばれる、成虫が右心室に寄生しているにも関わらず末梢の血液中にミクロフィラリア (mf) の寄生を認めない病態が知られている。オカルト感染の原因について、Rawlings et al. (1982) は、4つのタイ

ブに分類している。すなわち、1) 未成熟虫の感染 (前顕性感染): 虫体が性成熟に至っていないもの (感染から8カ月未満の時期)。2) 単性感染: 雄成虫または雌成虫のみの感染であるもの。3) 薬物誘発性不妊: マクロライド系をはじめとした抗糸状虫薬により生殖機能に異常をきたし、mfの形成が見られないもの。また、雌成虫の老化により、不妊となることも考えられる。4) 免疫介在性: mfの体表 (クチクラ) に対する抗体の関与により、mfが殺滅されるもの。

オカルト感染犬の存在は、犬糸状虫感染検査のGold Standardの一つであるmf検査のみでは、本感染を正しく診断することができないことを意味している。オカルト感染は近年増加傾向にあると看做されているが (大石 2001)、その実態を報告する文献は1991年以降見当たらず (Tada et al. 1991)、現状が充分把握されているとは言い難い。

犬糸状虫はヒトにも感染することがあるため、本症は小動物臨床だけでなく公衆衛生上も重要な寄生虫症である。犬の犬糸状虫陽性率が高まれば、ヒトへの曝露機会も増加することが予測されるため、正確な犬の犬糸状虫感染状況を把握することが求められる。そこで本章では、犬糸状虫の感染リスクの現状を明らかにすることを目的に、東京都動物愛護相談センターに収容された犬を対象に犬糸状虫の感染状況の評価を行い、あわせて現状と10年前との比較を行うことで、感染様相の変化について検討した。さらに、犬のオカルト感染の現状を評価する

ことを目的に、mfの保有状況について検討を加えた。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 収容犬の血液検体

血液検体は、東京都動物愛護相談センターに収容された犬200頭から採取した。そのうち100頭は2009年4月から2011年3月にかけて採取し、他の100頭は1999年4月から2001年3月にかけて採取した。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、成犬のみを検査対象とした。血清の分離と保管法および犬の個体情報については、第2章の2.2.2 収容犬・猫の血液検体に従った。

### 3.2.2 ミクロフィラリア検査供試犬の血液検体

2011年5月から6月にかけて、福島県から神奈川県へ移送された成犬123頭から血液を採取した。血液1 mLを無菌的に採取し、ヘパリン添加チューブ（ベノジエクト®真空採血管 VT-032H: テルモ）に注入して抗凝固処理を施した。その後、 $1,000 \times g$  で15分間遠心分離し血漿を採取して、検査時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。残った血球成分は、mf検査に供試した。

### 3.2.3 犬糸状虫抗原検査

犬糸状虫感染は、Solo Step<sup>®</sup> CH (ノバルティス) を用いたイムノクロマトグラフ法によって、血液中の成虫由来の排泄・分泌物を血清学的に検出することによって確認した。検査手順は、添付文書に従い付属のスポイトを用いてデバイス上に3滴の被験血漿/血清を滴下し、10分間静置した。その後、測定管理用対照ラインが青色に発色し、かつ検体ラインが赤色に発色したものを抗原陽性と判定した。測定管理用対照ラインのみが青色に発色したものは、抗原陰性と判定した。

### 3.2.4 ミクロフィラリア検査

Mf血症は、アセトン集虫法によって血液中のmfを寄生虫学的に検出することにより確認した。はじめに、蒸留水90 mLにアセトン5 mL、0.5%メチレンブルー溶液 5 mL、クエン酸ナトリウム0.2 gを加えてよく混合し、検査液（以下、アセトン集虫液）を作製した。次に、遠心管に被験血液（血漿分離の際に残った血球成分0.5 mL）とアセトン集虫液9.5 mLを加えて総量10 mLとした。血液とアセトン集虫液をよく混和した後、250 × g で5分間遠心分離した。ピペットを使用して上清9 mLを静かに除去した後、蒸留水9 mLを加えて再度250 × g で5分間遠心分離した。上清9 mLを除去し、残った沈渣をよく攪拌してスライドグラス上に滴下（20 μL）し、22 × 24 mmのカバーグラスをのせて光学顕微鏡下でmfを確認した。

規定量でmfが認められなかった検体は、沈渣全量 (1 mL) を鏡検した。

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、犬糸状虫感染陽性と判定した。

### 3.2.5 統計学的解析

地域 (23特別区 対 多摩地区)、性別 (雄 対 雌)、品種 (雑種 対 純血種) ごとに、同一年度における各因子間 (例: 1999–2001年における、23特別区 対 多摩地区) および同一因子における年度間 (例: 23特別区における、1999–2001年 対 2009–2011年) の陽性率を比較検討した。解析方法にはそれぞれ、JavaScript-STAR ver. 5.5.7jソフトウェア (<http://www.kisnet.or.jp/nappa/software/star/>) を用いたFisherの正確確率検定にて比較し、*P* 値0.05未満を有意差ありと判定した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 収容犬の犬糸状虫陽性率

全体の犬糸状虫陽性率は2009–2011年では23.0% (23/100)、1999–2001年は46.0% (46/100) であった。2009–2011年の血清では、有意な陽性率の減少が

認められた ( $P < 0.01$ ) (表3-1)。地域別に見ると、23特別区における2009–2011年の陽性率は18.2% (10/55)、1999–2001年は46.0% (23/50)、多摩地区における2009–2011年の陽性率は28.9% (13/45)、1999–2001年は46.0% (23/50)であった。23特別区でのみ、年代による陽性率の有意な減少が認められた ( $P < 0.01$ )。雌雄別では、雄における2009–2011年の陽性率は24.0% (12/50)、1999–2001年は46.0% (23/50)、雌における2009–2011年の陽性率は22.0% (11/50)、1999–2001年は46.0% (23/50)であった。品種別では、雑種における2009–2011年の陽性率は50.0% (16/32)、1999–2001年は58.5% (38/65)、純血種における2009–2011年の陽性率は10.3% (7/68)、1999–2001年は22.9% (8/35)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 ( $P < 0.01$ )。

### 3.3.2 オカルト感染の出現率

福島県の成犬における全体の犬糸状虫陽性率は、38.2% (47/123)であった (表3-2)。また、mf検査と抗原検査の陽性率は、それぞれ25.2% (31/123)、37.4% (46/123)であった。犬糸状虫感染が陽性と判定された犬47頭のうち、抗原とmfが共に陽性であった個体は30頭、抗原のみ陽性でmfは陰性であったオカルト感染犬は16頭 (34.0%)、抗原は陰性でmfのみ陽性であった個体は1頭であった。



### 3.4 考察

本研究で、2009–2011年の収容犬における犬糸状虫の陽性率が、23.0%と高い値で推移していることが判明した。10年前の1999–2001年の結果（46.0%）に比べると陽性率は半減したとはいえ、この結果は現在も依然として犬糸状虫の感染リスクは存在しており、予防をしていない犬では犬糸状虫症を発症する危険性が高いことを示している。今回得られた成績は、陽性率が数%と見做されている動物病院へ来院した犬の成績と大きく乖離していた。これは、動物病院に来院する犬の多くは、犬糸状虫症の予防を受けているために、その感染の可能性が低い犬を多く含んでいることが原因であると考えられる。このため、来院犬のみを対象にした疫学調査では、犬糸状虫の感染リスクを過小評価しているものと考えられる。また、調査対象とした収容犬の多くは飼い主から引き取られた個体であったことから、今回得られた成績は非来院犬と同等の犬糸状虫感染状況を表していると考えられる。

全体の犬糸状虫陽性率は、1999–2001年の46.0%から2009–2011年の23.0%へと有意に減少していた。この10年の間に様々なタイプの犬糸状虫症予防薬が上市され、広く飼育犬に使用されるようになったことが、陽性率減少の大きな要因であると考えられる。陽性率の減少は、23特別区と多摩地区の両地域で確認さ

れたが、とりわけ23特別区における変化が顕著であった。これは、23特別区は多摩地区に比べ自然環境が少なく、媒介蚊の生息できる環境が限られ、蚊の密度が低いためと推測される。一方で、純血種の陽性率が22.9% (1999–2001年) から10.3% (2009–2011年) へと半減したのに対し、雑種の陽性率は58.5% (1999–2001年) から50.0% (2009–2011年) と大きな変化が見られなかった。これは、雑種犬は屋外などの蚊に曝露されやすい環境で飼育されていること、また飼育環境や予防薬の使用状況がこの10年間で変化がないことを示唆している。

参照として、本研究における結果を、日本と同緯度にある地域の犬の犬糸状虫陽性率と比較を行った。各国の犬糸状虫陽性率は、韓国では6.9–20.9% (Song et al. 2010; Jung et al. 2012)、中国では1.17% (Xia et al. 2011)、ポルトガルでは3.6–8.9% (Cardoso et al. 2012)、ギリシャでは34.13% (Founta et al. 1999)、米国では1.0–12.5% (Lee et al. 2010) と報告されている。このように、犬糸状虫の陽性率は国毎の差が大きいものの、日本では現在でも犬糸状虫が広く流行していることが分かる。

犬糸状虫の陽性率が38.2%という状況下におけるオカルト感染の出現率は、34.0%であった。このため、mf検査だけでは本症を診断できない感染犬が、全体の1/3を占めている現状が明らかとなった。既報のオカルト感染の出現率は10–83% (平均39%) とされ、調査地によって大きな差が見られる (大石 1990)。犬

糸状虫の陽性率が5–10%の状況下におけるオカルト感染の出現率は平均68.5%、21–24%では平均36.5%、59–60%では平均27.0%と、陽性率の低い地域程、オカルト感染の出現率が高い傾向にある。

Mf血症を呈していないオカルト感染犬を診断するためには、mf検査以外の方法で診断する必要がある。現在、最も有効な検査法は、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方法である。抗原検査は感度ならびに特異度が高い検査法である。そこで、本調査においてもmf検査と同時に、イムノクロマトグラフ法による抗原検査を実施した。しかしながら、一部の感染犬ではmfが寄生していたにも関わらず、抗原陰性となる稀有な個体が観察された。同様の事例は諸外国でも報告されており、アルゼンチンでは、犬糸状虫の陽性率が1.8%という状況下では、mf陽性犬の22%が抗原検査で陰性であったと報告されている (Vezzani et al. 2008)。また、ポルトガルでも、犬糸状虫の陽性率が15.1%の時、mf陽性犬の45.6%は抗原陰性であったと報告されている (Alho et al. 2014)。この原因としては、成虫の寄生数が5隻未満と少数であった可能性や、検査に使用した捕捉抗体以外の抗体によって成虫抗原が既に被覆されていた可能性が考えられる (Wong & Thomford 1991; Martini et al. 1996; Klotins et al. 2000; Atkins 2003)。

このように、犬糸状虫検査のGold Standardとされるmf検査でも、診断不可能な感染犬が高率に存在する現状が明らかとなった。予防薬の普及によって、犬糸状虫の感染率が今後さらに低下すれば、感染機会の減少により少数寄生や単性寄生の割合が増加し、mf検査や抗原検査で偽陰性となる頻度が増加することが予測される。従って、今後はより感度と特異度の高い検査法の開発が望まれる。

### 3.5 小括

本研究では、2009–2011年の犬の犬糸状虫陽性率 (23.0%) は、1999–2001年の値 (46.0%) に比べて半減したものの、東京都の収容犬には現在でも高率に犬糸状虫が感染している現状を明らかにした。疫学的な解析結果から、犬と蚊の間では現在もなお犬糸状虫の感染環が維持されており、都市部でも犬糸状虫の感染リスクは高く、依然として流行が継続していること、特に雑種犬では、10年前からの高い感染リスクに変化がないことが明らかとなった。また、大都市の収容犬における犬糸状虫の疫学様相の変遷を評価したのは、本研究が初めてである。

犬糸状虫に感染している犬の1/3が、オカルト感染状態にある現状を明らかにした。さらに、31頭中1頭だけではあるが、mfが寄生していたにも関わらず抗原検査で偽陰性となった個体を認めたことから、現行の検査法の問題点と新たな検査法の必要性を示すことができた。

表3-1. 東京都の収容犬における因子別の犬糸状虫陽性率

| 因子    | 1999–2001 |                        | 2009–2011 |                        |
|-------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|
|       | 検査数       | 陽性数 (%)                | 検査数       | 陽性数 (%)                |
| 地域    |           |                        |           |                        |
| 23特別区 | 50        | 23 (46.0) <sup>a</sup> | 55        | 10 (18.2) <sup>a</sup> |
| 多摩地区  | 50        | 23 (46.0)              | 45        | 13 (28.9)              |
| 性別    |           |                        |           |                        |
| 雄     | 50        | 23 (46.0) <sup>b</sup> | 50        | 12 (24.0) <sup>b</sup> |
| 雌     | 50        | 23 (46.0) <sup>c</sup> | 50        | 11 (22.0) <sup>c</sup> |
| 品種    |           |                        |           |                        |
| 純血種   | 35        | 8 (22.9) <sup>d</sup>  | 68        | 7 (10.3) <sup>e</sup>  |
| 雑種    | 65        | 38 (58.5) <sup>d</sup> | 32        | 16 (50.0) <sup>e</sup> |
| 計     | 100       | 46 (46.0) <sup>f</sup> | 100       | 23 (23.0) <sup>f</sup> |

<sup>a, d, e, f</sup>: Fisherの正確確立検定にて有意差あり ( $P < 0.05$ ).

<sup>b, c</sup>: Fisherの正確確立検定にて有意差あり ( $P < 0.01$ ).

表3-2. 犬の犬糸状虫陽性率と成虫抗原およびマイクロフィラリア (mf) の検出状況

| 性別 | 検査数 | 陽性数 (%)   | 検査成績              |                     |                   |
|----|-----|-----------|-------------------|---------------------|-------------------|
|    |     |           | 抗原 (+) /<br>Mf(+) | 抗原 (+) /<br>Mf(-) † | 抗原 (-) /<br>Mf(+) |
| 雄  | 76  | 29 (38.2) | 20                | 8                   | 1                 |
| 雌  | 47  | 18 (38.3) | 10                | 8                   | 0                 |
| 計  | 123 | 47 (38.2) | 30                | 16                  | 1                 |

†: オカルト感染、+: 陽性、-: 陰性

## 第4章

### 宿主血清中の犬系状虫遊離型DNAの解析



#### 4.1 はじめに

犬糸状虫感染は、血液中に循環するmfを寄生虫学的に検出すること、または虫体抗原をイムノクロマトグラフ法や酵素標識抗体法によって血清学的に検出することで診断される (Simón et al. 2012)。Mf検査は血液中の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血症犬や前章で述べたオカルト感染（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排泄・分泌物を検出するため、幼虫寄生期や成虫の寄生数が5隻未満となる少数寄生例を診断することは難しい (Wong & Thomford 1991; Martini et al. 1996; Klotins et al. 2000; Atkins 2003)。前章においては、実際に上述の検査法では犬糸状虫の診断が困難である事例を提示し、新たな検査法が必要であることを示した。

これまで、宿主の血液中にはmfと成虫抗原以外の虫体由来物質が存在するかについては不明であったが、1990年代以降から、ヒトの糸状虫感染者の血漿/血清中に虫体由来の遊離型DNA (cell-free DNA; 以下、cfDNA) が存在することが報告されるようになった (Lizotte et al. 1994; Furtado et al. 1997; Lucena et al. 1998; Cox-Singh et al. 1999, 2000; Fischer et al. 2000; Albers et al. 2014)。cfDNAとは、細胞から遊離した状態で血液や尿、唾液などの体液中に存在する

核酸断片である (Kato-Hayashi et al. 2015)。ヒトの医療では、cfDNAが腫瘍の診断/予後判定や胎児の出産前診断 (例: ダウン症候群やエドワーズ症候群、パトウ症候群)、女性レシピエントにおける男性ドナー由来の臓器との拒絶反応診断、外傷患者における急性呼吸窮迫症候群や急性肺障害の予後判定のマーカ―として有用視されている (Chan et al. 2003; Butt & Swaminathan 2008; Schwarzenbach et al. 2011)。寄生虫分野におけるcfDNAの報告は、赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* (Parija & Khairnar 2007; Khairnar & Parija 2008)、マラリア原虫類 *Plasmodium* spp. (Mharakurwa et al. 2006; Nwakanma et al. 2009; Buppan et al. 2010)、住血吸虫類 *Schistosoma* spp. (Pontes et al. 2003; Sandoval et al. 2006; Enk et al. 2012; Hussein et al. 2012; Xu et al. 2012; Wichmann et al. 2013; Lodh et al. 2013; Kato-Hayashi et al. 2015)、バンクロフト糸状虫 *Wuchereria bancrofti* (Furtado et al. 1997; Lucena et al. 1998)、マレー糸状虫 *Brugia malayi* (Lizotte et al. 1994; Cox-Singh et al. 1999, 2000; Fischer et al. 2000; Albers et al. 2014) における報告はあるが、犬糸状虫での報告はない。

そこで本章では、現状の問題点を解決する、新たな検査法開発について検討することを目的に、宿主の血清中における犬糸状虫cfDNAの存在を証明すると共に、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。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 犬の血液検体

2012年8月から9月にかけて、抗原検査（イムノクロマトグラフ法）、mf検査（アセトン集虫法）および剖検にて犬糸状虫感染の有無を確認した青森県の犬12頭の血清を供試した。内訳は、mf陽性の感染犬（以下、mf陽性犬）8頭、mf陰性の感染犬（以下、mf陰性犬）4頭であった。Mf陽性犬の抗原検査では、7頭が抗原陽性、1頭は陰性であった。Mf陰性犬は、3頭が抗原陽性、1頭は陰性（剖検にて虫体を確認）であった。また、抗原検査とmf検査によって、犬糸状虫の感染が陰性と判定された犬4頭の血清を、陰性対照に用いた。血清の分離と保管法については、第2章の2.2.2 収容犬・猫の血液検体に従った。

### 4.2.2 犬糸状虫成虫の培養

安楽死した犬の右心室と肺動脈から、注意深く犬糸状虫の成虫（雌成虫28隻、雄成虫50隻）を回収した。虫体の培養液はハンクス液にペニシリン100 IU/mL、ストレプトマイシン100 µg/mL、1%D-グルコースを添加したものを使用した。はじめに虫体をハンクス液のなかで丁寧に3回洗浄した後、雌雄を分けて500 mLの培養液で、37°Cで培養した（以下それぞれ、雌成虫培養液、雄成虫培養

液)。培養24時間後、雄成虫培養液から培養液のみを回収し、DNA抽出時まで-30°Cで保存した。一方、雌成虫培養液は、産出されたmfや虫体細胞成分を取り除くために、孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで培養液を濾過し、DNA抽出時まで-30°Cで保存した。

#### 4.2.3 DNAの抽出

血清および培養液の検体は、 $2,000 \times g$  で5分間遠心分離し、上清の100–200  $\mu\text{L}$ を一つ穴のホールグラスに取り、mfの混入がないことを光学顕微鏡下で確認した後、血清は100  $\mu\text{L}$ 、培養液は200  $\mu\text{L}$ をDNA抽出用の検体とした。DNAの抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Sciences, Germantown, MD, USA) を用いて行った。方法は添付文書の「血液あるいは体液からのDNA精製プロトコール」に従い、DNAは50  $\mu\text{L}$ の付属のBuffer AE中に溶出した。

#### 4.2.4 Nested-PCR法による遺伝子の増幅

抽出したDNAを用いて犬糸状虫の遺伝子を検出するために、犬糸状虫のミトコンドリア チトクローム *c*遺伝子 (co1) の部分配列を対象にしたnested-PCR法を実施した。1st PCR用プライマーには、*Dirofilaria* 属を含めたオンコセルカ科糸状虫のco1部分領域 (689 bp) を特異的に増幅するCOIintF (5'-TGATTGGT

GGTTTTGGTAA-3') およびCOIintR (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3') を用いた (Casiraghi et al. 2001)。2nd PCR用プライマーには新規に設計した、同領域 (502 bp) を特異的に増幅するDF1F (5'-TGAACCTTTTATCCTCCTTTGAGTG-3') およびDF1R (5'-TATACATATGATGACCCCAAACAG-3') を用いた。

PCRは、10× Ex *Taq* Buffer (TaKaRa) を2.5 μL、2.5 mMのdNTP Mixtureを4.0 μL、10 μMの 各プライマーを1.0 μL、TaKaRa Ex *Taq* DNA Polymerase (TaKaRa) を0.2 μL (1 U) およびDNA Templateを1 μL加えて、蒸留水で最終容量を25 μLとした溶液中で反応を行った。1st PCRは、94°Cで2分間熱処理した後、94°Cで30秒間の熱変性、53°Cで30秒間のアニーリングおよび72°Cで1分間の伸長の工程を1サイクルとして計35サイクル行い、最後に72°Cで10分間の最終伸長反応を行った。2nd PCRは、1st PCR産物を蒸留水で10倍に希釈した物を1.0 μL使用して、アニーリング温度を56°Cにし同反応条件で計35サイクル行った。

#### 4.2.5 電気泳動

Tris-acetate-EDTA (TAE) Bufferを Mupid<sup>®</sup>-2plus電気泳動槽 (Advance) に入れた後、1.5% アガロースゲル (Lonza) を泳動槽に設置した。PCR産物20 μLに対して4.0 μLの6× Loading Buffer Dye (TaKaRa) を混和し、そのうちの

20  $\mu\text{L}$ をゲルの穴内に注入した。また、DNAサイズマーカーは、100-bp DNA Ladder (TaKaRa) を 5  $\mu\text{l}$  使用した。100V で約30分間電気泳動し、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の臭化エチジウム溶液で15分間染色した後、紫外線ゲル撮影装置 (Atto) を用いてゲルの写真を撮影して、増幅産物の有無を確認した。

#### 4.2.6 ダイレクトシーケンス法によるDNA塩基配列の決定

PCRにより増幅シグナルが認められた検体について、電気泳動後のゲルから目的とする塩基長のPCR増幅産物バンドを切り出し、1.5 mL尖底プラスチックチューブに入れた。ゲルの入ったチューブを95°Cで10分間加熱し、アガロースゲルが完全に融解したことを確認した後、2.0  $\mu\text{L}$  (2 U) のThermostable  $\beta$ -Agarase (ニッポン・ジーン) を加えて50°Cで10分間保温し、DNA溶液を作製した。シーケンス反応は以下の通りに行った。

0.2 mLのPCR用尖底マイクロチューブにDNA溶液を2.5  $\mu\text{L}$ 、2 pMのDNAシーケンス用プライマーを1.0  $\mu\text{L}$ 、5 $\times$  Sequencing Bufferを2.0  $\mu\text{L}$ 、およびBigDye (Applied Biosystems) を0.5  $\mu\text{L}$ 加えて充分混和した後、蒸留水で全量を10  $\mu\text{L}$ に調整した。

サイクルシーケンス反応は、96°Cで1分間熱処理した後、96°Cで30秒間の熱変性、50°Cで15秒間のアニーリングおよび60°Cで4分間の伸長反応を1サイクルとして、計25サイクル行った。サイクルシーケンス反応終了後、反応液全量を1.5 mL尖底プラスチックチューブに移した。反応液にエタノール沈澱溶液として95%エタノールを50  $\mu$ Lと3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を2.0  $\mu$ L加えてボルテックスで十分攪拌した後、室温で15分間静置した。20,000  $\times$  g で20分間遠心分離した後、上清を除去し、70%エタノールを250  $\mu$ L加え、さらに20,000  $\times$  g で5分間遠心分離した。再度上清を除去し、10分間室温で静置、乾燥させた。完全に乾燥したことを確認した後、本学部付属の総合研究所に塩基配列の解析を依頼した。

#### 4.2.7 遺伝子解析

増幅産物のシーケンスデータは、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) にてGenBank上に登録されている既知の塩基配列と比較した。

### 4.3 結果

犬血清の検討では、mf陽性犬の全頭から犬糸状虫DNAが検出されたが、いずれのmf陰性犬からも犬糸状虫DNAは検出されなかった（表4-1）。また、陰性対照の非感染犬からは、非特異産物の増幅は認められなかった。

一方、雌成虫の培養液から犬糸状虫DNAが検出されたが、雄成虫の培養液からは検出されなかった。

増幅産物のDNAシーケンス解析では、mf陽性犬の血清および雌成虫の培養液から検出されたDNAは、いずれも犬糸状虫と99-100%の相同性を示した(KF692101、KC107805、EU159111)。

### 4.4 考察

本章では、はじめに犬の血清中における犬糸状虫由来のcfDNAの存在について検討した。血液中には犬糸状虫のmfが多数循環していることから、犬糸状虫由来のcfDNAの存在を証明するためには、血液中の虫体細胞成分や虫体の残骸と区別する必要がある。McCarthy et al. (1996) は、mf血症を呈したバンクロフト糸状虫感染者の血漿では、PCRによる虫体DNAの検出感度は全血検体よ



りも低いことを報告している。彼らの研究では、全血から虫体DNAが確認された18人のうち、血漿でも虫体DNAを確認できたのは5人のみで、血漿中に存在する虫体DNAは虫体の細胞に関連したものである可能性が高く、例え虫体DNAが存在しても普遍的に遊離した状態で循環しているものではないと考察している。

一方で、Furtado et al. の研究グループ (Furtado et al. 1997; Lucena et al. 1998) は、mf血症および無mf血症を呈したバンクロフト糸状虫感染者の血漿から虫体DNAを高率に検出しており、血液中にはバンクロフト糸状虫由来のcfDNAが存在することを示唆している。同様の報告は、マレー糸状虫感染者を対象にした研究においても報告されている (Lizotte et al. 1994; Cox-Singh et al. 1999, 2000; Fischer et al. 2000; Albers et al. 2014)。本研究では、DNA抽出材料に血清を使用し、mfの混入がないことを光学顕微鏡下で確認していることから、mf陽性犬の血清から検出された犬糸状虫のDNAは、cfDNAであると考えられる。

過去の糸状虫類のcfDNA研究では、寄生虫の核DNAが用いられてきたが (Lizotte et al. 1994; McCarthy et al. 1996; Furtado et al. 1997; Lucena et al. 1998; Cox-Singh et al. 1999, 2000; Fischer et al. 2000; Albers et al. 2014)、本研究では、1細胞中におけるミトコンドリアDNAは核DNAよりもコピー数が多く、血清中にも多くの細胞外ミトコンドリアDNAが存在することに着目し (Mehra et al.

2007)、犬糸状虫のミトコンドリアDNAを標的に行った。その結果、犬の血清から糸状虫類のミトコンドリアDNAを初めて検出することができた。

Mf陽性犬の全頭から犬糸状虫のcfDNAが検出された一方で、雌雄の成虫寄生が確認されているmf陰性犬からはcfDNAは全く検出されなかった。このため、犬糸状虫のcfDNAは、成虫よりもmfに関連したものであると考えられる。そこで、本仮説を検証することを目的に、雌雄を分別して培養した成虫培養液を使ったcfDNAの検討を行った。その結果、雌成虫の培養液からのみcfDNAが検出された。今回培養に用いた雌成虫はmfを産出していたことから、cfDNAの主たる由来はmfであり、雄成虫はcfDNAの産生に関与していないと考えられる。

バンクロフト糸状虫やマレー糸状虫感染者では、mf血症の有無に関わらずcfDNAが検出されているが、犬糸状虫感染犬ではmf血症を呈した個体でのみcfDNAが検出された。バンクロフト糸状虫やマレー糸状虫では、mf以外の発育期の虫体からもcfDNAが放出されていた可能性が考えられる。一方、日本住血吸虫を単性または雌雄を混合して実験的に感染させたウサギでは、日本住血吸虫のcfDNAは主に虫卵に由来し、単性の成虫感染（虫卵排泄のない成虫寄生）ではcfDNAを検出できないことから、寄生虫によっては、cfDNAの由来は成虫ではなく虫卵であるとする研究もある (Xu et al. 2012)。

宿主の血清中に存在する犬糸状虫のcfDNAを検出できたのは、mf陽性犬のみであったことから、犬糸状虫のcfDNAを診断マーカーとして利用する分子生物学的診断法は、mfの存在に依存にした限界があることが判明した。このため、感染犬の1/3を占める、mf血症を呈さないオカルト感染犬を診断することは難しいと思われる。その一方で、cfDNAが検出された個体の中にはmfが寄生していたにも関わらず、抗原が検出できなかった犬も存在したことから、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唆された。

#### 4.5 小括

本研究により、犬糸状虫感染犬の血清中には犬糸状虫のcfDNAが存在することを初めて明らかにした。犬糸状虫cfDNAは、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検出されたが、雄成虫の培養液からは検出されなかった。従って、感染犬の血清中における犬糸状虫cfDNAの由来は主としてmfであり、成虫に由来するcfDNAの占める割合は少ないことが示唆された。これらの所見から、cfDNAを利用した分子生物学的診断法は、mfの存在に依存にした限界があることが判明した。その一方で、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となるような感染に対しては、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。

表4-1. Nested-PCRによる犬糸状虫感染犬と非感染犬の血清および犬糸状虫の成虫培養液における犬糸状虫DNAの検出結果

|              | 犬血清    |        |       | 犬糸状虫培養液 |     |
|--------------|--------|--------|-------|---------|-----|
|              | Mf陽性感染 | Mf陰性感染 | 非感染   | 雌成虫     | 雄成虫 |
| Nested-PCR結果 | +      | -      | -     | +       | -   |
| (陽性数/検査数)    | (8/8)  | (0/4)  | (0/4) |         |     |

Mf: ミクロフィラリア、+: 陽性、 -: 陰性

## 第5章

### 総括

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良質な環境で飼育されているため、実際の感染リスクが過小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な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、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、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*) の感染様相の把握を目的とした研究を行った。

## 5.1 収容犬・猫におけるトキソプラズマの感染様相

動物病院に来院した犬・猫のトキソプラズマ陽性率は数%と報告されているが、動物病院以外での疫学情報が少ないため、飼育環境中の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、東京都の動

物愛護相談センターに収容された犬・猫を対象に現在と10年前のトキソプラズマ感染状況を比較することで、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。また、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、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。多摩地区は、23特別区に比べて自然環境が豊かであるため、猫から排出されたオーシストが生残しやすく、また中間宿主となる小動物の多様性や密度も高いことから、猫はトキソプラズマに感染する機会が高いことが一因であると考えられる。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、十分な衛生対策を行う必要がある。

## 5.2 収容犬における犬糸状虫の感染様相

犬糸状虫は、犬に対して重篤な循環器障害をもたらす線虫であるばかりでなく、

その幼虫は稀にヒトにも感染することが知られている。従って、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、犬糸状虫症は小動物臨床だけでなく公衆衛生上も重要な寄生虫症である。そこで本章では、犬糸状虫の感染リスクの現状を明らかにすることを目的に、東京都の動物愛護相談センターに収容された犬を対象に犬糸状虫感染状況の現在と10年前と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収容された犬の血清200検体を対象に検討した。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。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ィ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%と見做されている動物病院に来院する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を過少評価し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。雑種の陽性率が純血種に比べ有意に高い理由として、雑種犬は屋外飼育されることが多く、媒介蚊に曝露される機会が多いことが原因として考えられる。

犬糸状虫感染には、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。我が国の犬におけるオカルト感染の状況は、1991年の滋賀県の収容犬における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、犬糸状虫感染陽性と判定した。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、mf検査では診断不可能な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。

### 5.3 宿主血清中の犬糸状虫遊離型DNAの解析

犬糸状虫の感染は、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検査は血液中の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血症犬や前章で述べたような無mf血症のオカルト感染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排泄・分泌物を検出するため、少数寄生例や幼虫寄生期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、宿主血清中における犬糸状虫のcfDNAの存在を証明すると共に、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 (剖検にて虫体を確認) 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、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の存在に依存に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。

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・猫における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の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すことができた。また、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と思われる。

## 謝辞

本研究を完遂するに至るまで、終始にわたり御指導を賜りました、日本大学大学院獣医学研究科 野上貞雄 教授に深甚なる謝意を表すとともに、本研究に対して多くの有益な御助言を賜りました同研究科 丸山総一 教授 ならびに 遠矢幸伸 教授に心より御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり特別な御配慮と御助言ならびに献身的な御指導を頂いた本学大学院獣医学研究科 松本 淳 准教授 ならびに 佐藤雪太 准教授に心より感謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり多くの御助言を賜りました、新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 中垣和英 特任教授 ならびに 動物アレルギー検査株式会社 市川康明 博士、貴重な収容犬・猫の血清検体を提供して頂きました東京都健康安全研究センター 獣医師 吉川聡一氏、そして技術的な御協力をして頂いた本学獣医学科実験動物学研究室 加藤麻美氏に篤く御礼申し上げますとともに、御厚意に深く感謝致します。最後に、各種実験を実施するにあたり様々な形で御協力頂いた医動物学研究室の室員諸氏に対し、篤く感謝致します。

本研究の一部は、文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成事業「人獣共通感染症の戦略的国際疫学研究の推進と若手研究者の育成」(研究代表者: 酒井健夫 日本大学名誉教授) および 同事業「グローバル化社会における動物由来感染症制御のための国際共同研究と若手研究者育成」(研究代表者: 丸山総一 日本大学教授) ならびに 日本学術振興会 科学研究補助金 基盤研究 (C) No. 26450484 (研究代表者: 佐藤雪太 日本大学准教授) による助成を得て行われました。



## 引用文献

- Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. 2010. Local meteorological conditions, dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. *Epidemiol Infect.* 138:1105–1113.
- Albers A, Sartono E, Wahyuni S, Yazdanbakhsh M, Maizels RM, Klarmann-Schulz U, Pfarr K, Hoerauf A. 2014. Real-time PCR detection of the *HhaI* tandem DNA repeat in pre- and post-patent *Brugia malayi* infections: a study in Indonesian transmigrants. *Parasit Vectors.* 7:146.
- Alho AM, Landum M, Ferreira C, Meireles J, Goncalves L, de Carvalho LM, Belo S. 2014. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Vet Parasitol.* 206:99–105.
- Alvarado-Esquivel C, Romero-Salas D, Cruz-Romero A, García-Vázquez Z, Peniche-Cardena Á, Ibarra-Priego N, Ahuja-Aguirre C, Pérez-de-León AA, Dubey JP. 2014. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in Veracruz, Mexico. *BMC Vet Res.* 10:191.

Asano K, Suzuki K, Matsumoto T, Sakai T, Asano R. 2004. Prevalence of dogs with intestinal parasites in Tochigi, Japan in 1979, 1991 and 2002. *Vet Parasitol.* 120:243–248.

Atkins CE. 2003. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *J Am Vet Med Assoc.* 222:1221–1223.

Besné-Mérida A, Figueroa-Castillo JA, Martínez JJ, Luna-Pastén H, Calderón-Segura E, Correa D. 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Vet Parasitol.* 157:310–313.

Buppan P, Putaporntip C, Pattanawong U, Seethamchai S, Jongwutiwes S. 2010. Comparative detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malar J.* 9:72.

Butt AN, Swaminathan R. 2008. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Ann NY Acad Sci.* 1137:236–242.

- Cabezón O, Millán J, Gomis M, Dubey JP, Ferroglia E, Almería S. 2010. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol Res.* 107:1505–1508.
- Cardoso L, Mendao C, de Carvalho LM. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasit Vectors.* 5:62.
- Casiraghi M, Anderson TJ, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitol.* 122:93–103.
- Chan AKC, Chiu RWK, Lo YMD. 2003. Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 40:122–130.

- Coelho WMD, Amarante AFT, Apolinário J de C, Coelho NMD, Lima VMF, Perri SHV, Bresciani KDS. 2011. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol Res.* 109:1009–1013.
- Cox-Singh J, Pomrehn AS, Rahman HA, Zakaria R, Miller AO, Singh B. 1999. Simple blood-spot sampling with nested polymerase chain reaction detection for epidemiology studies on *Brugia malayi*. *Int J Parasitol.* 29:717–721.
- Cox-Singh J, Pomrehn AS, Wolfe ND, Rahman HA, Lu H-Y, Singh B. 2000. Sensitivity of the nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for *Brugia malayi* and significance of “free” DNA in PCR-based assays. *Int J Parasitol.* 30:1177–1179.
- de Brito AF, de Souza LC, da Silva AV, Langoni H. 2002. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:31–35.

- de Souza S, Gennari SM, Yai L, D'Auria S. 2003. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 12:1–3.
- Deksne G, Petrusēviča A, Kirjušina M. 2013. Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from urban areas in Latvia. *J Parasitol.* 99:48–50.
- Dubey JP, Frenkel JK. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 19:155–177.
- Dubey JP, Lappin MR, Thulliez P. 1995a. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *J Am Vet Med Assoc.* 207:179–185.
- Dubey JP, Lappin MR, Thulliez P. 1995b. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Parasitol.* 81:887–893.
- Dubey JP, Thulliez P. 1989. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Am Vet Med Assoc.* 194:1297–1299.
- Dubey JP. 2009. *Toxoplasmosis in animals and humans.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. 2012. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. PLOS ONE. 7:e38947.

Etheredge GD, Michael G, Muehlenbein MP, Frenkel JK. 2004. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. Pan Am J Public Health. 16:176–186.

Fischer P, Supali T, Wibowo H, Bonow I, Williams SA. 2000. Detection of DNA of nocturnally periodic *Brugia malayi* in night and day blood samples by a polymerase chain reaction-ELISA-based method using an internal control DNA. Am J Trop Med Hyg. 62:291–296.

Founta A, Theodoridis Y, Frydas S, Chliounakis S. 1999. The presence of filarial parasites of dogs in Serrae Province. J Hell Vet Med Soc. 50:315–320.

Frenkel JK, Hassanein KM, Hassanein RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *Am J Trop Med Hyg.* 53:458–468.

Frenkel JK, Lindsay DS, Parker BB, Dobesh M. 2003. Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection of young children. *Int J Infect Dis.* 7:292–293.

Frenkel JK, Parker BB. 1996. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*: the probable importance of xenosmophilia. *Ann NY Acad Sci.* 791:402–407.

Furtado AF, Abath FG, Regis L, Gomes YM, Lucena WA, Furtado PB, Dhalia R, Miranda JC, Nicolas L. 1997. Improvement and application of a polymerase chain reaction system for detection of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* and human blood samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92:85–86.

Hatsushika R, Okino T, Shimizu M, Ohyama F. 1992. The prevalence of dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs in Okayama, Japan. *Kawasaki Med J.* 18:75–83.

早崎峯夫. 2013. 犬糸状虫症研究今昔物語. *日獣会誌.* 66:281–291.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev.* 6:41–61.

Hornok S, Edelhofer R, Joachim A, Farkas R, Berta K, Répási A, Lakatos B. 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection of cats in Hungary. *Acta Vet Hung.* 56:81–88.

Hussein HM, El-Tonsy MM, Tawfik RA, Ahmed SA-E-G. 2012. Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis *mansoni* by detection of free circulating DNA in serum. *Parasitol Res.* 111:475–478.

Janson JL, Tokishige H. 1892. *Filaria immitis* und andere bei hunden in Japan vorkommende Parasiten. *Mitt Deut Gesell Natur- Völker Osta.* 5:349–360.



Jittapalapong S, Nimsupan B, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Kabeya H, Maruyama S. 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. *Vet Parasitol.* 145:138–141.

Jung BY, Gebeyehu EB, Seo MG, Byun JW, Kim HY, Kwak D. 2012. Prevalence of vector-borne diseases in shelter dogs in Korea. *Vet Rec.* 171:249.

影井 昇. 1999. ディロフィラリア症. 大鶴正満、亀谷 了、林 滋生. 日本における寄生虫学の研究 第7巻. 初版. 東京: 目黒寄生虫館. pp. 521–549.

Kamani J, Mani AU, Kumshe HA, Yidawi JP, Egwu GO. 2010. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *Acta Parasitol.* 55:94–95.

Kato-Hayashi N, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MNB, Apin J, Agsolid LM, Chua JC, Villacorte EA, Kirinoki M, Kikuchi M, Ohmae H, Haruki K, Chigusa Y. 2015. Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines. *Acta Trop.* 141:178–183.

Khairnar K, Parija SC. 2008. Detection of *Entamoeba histolytica* DNA in the saliva of amoebic liver abscess patients who received prior treatment with metronidazole. *J Health Popul Nutr.* 26:418–425.

Klotins KC, Martin SW, Bonnett BN, Peregrine AS. 2000. Canine heartworm testing in Canada: are we being effective? *Can Vet J.* 41:929–937.

栗山政彦、星 英之、井上 博、山本 博. 1999. 動物実験センターに搬入された雑犬の犬糸状虫検査について. *実験動物技術.* 34:27–32.

Langoni H, Fornazari F, da Silva RC, Monti ET, Villa FB. 2013. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. *Braz J Microbiol.* 44:1327–1330.

Lee ACY, Montgomery SP, Theis JH, Blagburn BL, Eberhard ML. 2010. Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends Parasitol.* 26:168–173.

Li Y, Liu Q, Li S, Wei F, Jin H, Yang M. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dogs in Jiangsu Province, eastern China. *J Parasitol.* 98:878–879.

- Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol.* 73:27–33.
- Lizotte MR, Supali T, Partono F, Williams SA. 1994. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *Am J Trop Med Hyg.* 51:314–321.
- Lodh N, Mwansa JCL, Mutengo MM, Shiff CJ. 2013. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infection from filtered urine in Zambia. *Am J Trop Med Hyg.* 89:46–50.
- Lopes AP, Cardoso L, Rodrigues M. 2008. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Vet Parasitol.* 155:184–189.
- Lopes AP, Santos H, Neto F, Rodrigues M, Kwok OCH, Dubey JP, Cardoso L. 2011. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs from northeastern Portugal. *J Parasitol.* 97:418–420.

- Loss SR, Will T, Marra PP. 2013. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. *Nat Commun.* 4:1396.
- Lucena WA, Dhaliya R, Abath FG, Nicolas L, Regis LN, Furtado AF. 1998. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaraemic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92:290–293.
- Martini M, Capelli G, Poglayen G, Bertotti F. 1996. The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. *Vet Res Commun.* 20:331–339.
- Maruyama S, Hiraga S, Yokoyama E, Naoi M, Tsuruoka Y, Ogura Y, Tamura K, Namba S, Kameyama Y, Nakamura S. 1998. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* infections among pet cats in Kanagawa and Saitama Prefectures. *J Vet Med Sci.* 60:997–1000.
- Maruyama S, Kabeya H, Nakao R, Tanaka S, Sakai T, Xuan X, Katsube Y, Mikami T. 2003. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol Immunol.* 47:147–153.

- McCarthy JS, Zhong M, Gopinath R, Ottesen EA, Williams SA, Nutman TB. 1996. Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection. *J Infect Dis.* 173:1510–1514.
- Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. 2007. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13:421–426.
- Meireles LR, Galisteo AJ, Pompeu E, Andrade HF. 2004. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Trop Med Int Health.* 9:876–881.
- Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. 2006. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malar J.* 5:103.
- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363:1965–1976.
- Morishima Y, Sugiyama H, Arakawa K, Kawanaka M. 2007. Intestinal helminths of dogs in northern Japan. *Vet Rec.* 160:700–701.

- Nguyen TT-D, Choe S-E, Byun J-W, Koh H-B, Lee H-S, Kang S-W. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from Korea. *Acta Parasitol.* 57:7–12.
- Nogami S, Moritomo T, Kamata H, Tamura Y, Sakai T, Nakagaki K, Motoyoshi S. 1998. Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* in domiciled cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 60:1001–1004.
- Nogami S, Sato T. 1997. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in cats in Saitama, Japan. *J Vet Med Sci.* 59:869–871.
- Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, Locke E, Conway DJ. 2009. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. *J Infect Dis.* 199:1567–1574.
- 大石 勇. 1990. 犬糸状虫症. 初版. 東京: 文永堂出版.
- 大石 勇. 2001. 犬糸状虫症研究の歴史的概観. *動物の循環器.* 34:67–83.
- Okamoto M, Nogami S, Shibuya S, Inoue I, Asanome K. 1995. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in stray dogs in Saitama, Japan. *Jpn J Parasitol.* 44:325–327.

- Omata Y, Oikawa H, Kanda M, Mikazuki K, Dilorenzo C, Claveria FG, Takahashi M, Igarashi I, Saito A, Suzuki N. 1994. Transfer of antibodies to kittens from mother cats chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 52:211–218.
- Opsteegh M, Haveman R, Swart AN, Mensink-Beerepoot ME, Hofhuis A, Langelaar MFM, van der Giessen JWB. 2012. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. *Prev Vet Med.* 104:317–326.
- Parija SC, Khairnar K. 2007. Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiol.* 7:41.
- Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A. 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 68:652–656.
- Railliet A. 1890. Les parasites des animaux domestiques au Japon. *Naturaliste.* 4:142–143.

Rawlings CA, Dawe DL, McCall JW, Keith JC, Prestwood AK. 1982. Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs. J Am Vet Med Assoc. 180:1323–1326.

Reiger I. 1979. Scent rubbing in carnivores. Carnivores. 2:17–25.

Sakikawa M, Noda S, Hanaoka M, Nakayama H, Hojo S, Kakinoki S, Nakata M, Yasuda T, Ikenoue T, Kojima T. 2012. Anti-*Toxoplasma* antibody prevalence, primary infection rate, and risk factors in a study of toxoplasmosis in 4,466 pregnant women in Japan. Clin Vaccine Immunol. 19:365–367.

Sandoval N, Siles-Lucas M, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, Lopez Aban J, Muro A. 2006. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. Parasitol. 133:581–587.

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. 11:426–437.



小動物疾病発生状況調査結果解析委員会. 2002. 平成11年度 小動物生産

等獣医事対策事業 (その2). 日獣会誌. 55: 51-58.

Silaghi C, Knaus M, Rapti D, Kusi I, Shukullari E, Hamel D, Pfister K, Rehbein

S. 2014. Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*,

haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats

from Albania. Parasit Vectors. 7:62.

Simón MF, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón

E, Montoya-Alonso JA. 2012. Human and animal dirofilariasis: the

emergence of a zoonotic mosaic. Clin Microbiol Rev. 25:507-544.

相馬武久、今本成樹、長谷隆司、加藤 玲、砂川一浩、尾原正和、玄 学南.

2015. 近畿及び四国の一部地域の臨床上健康な家庭犬におけるトキソ

プラズマとネオスポラに対する抗体保有状況. 日獣会誌. 68:581-585.

相馬武久、齋藤奈美子. 2005. 1993-2004年の本邦の家猫におけるトキソプラズ

マ抗体の保有率. 環境と病気. 14:5-9.

相馬武久、齋藤奈美子. 2008. 犬におけるトキソプラズマ抗体の保有状況.

環境と病気. 17:1-5.

- Song KH, Park JE, Lee DH, Lee SH, Shin HJ. 2010. Serological update and molecular characterization of *Dirofilaria immitis* in dogs, South Korea. Res Vet Sci. 88:467–469.
- Tada Y, Ohta T, Soohara S, Suzuki Y. 1991. Helminth infections of dogs in Shiga, Japan with reference to occult infection of *Dirofilaria immitis*. J Vet Med Sci. 53:359–360.
- Toma T, Miyagi I, Tokuyama Y, Asato R, Kudaka J. 1998. Prevalence of canine heart filaria, *Dirofilaria immitis*, in dogs in Okinawa Prefecture, Japan, 1991–1992. Jap J Trop Med Hyg. 26:161–166.
- Uga S, Matsumura T, Ishibashi K, Yatomi K, Yoda Y, Kataoka N. 1990. Occult infection of *Dirofilaria immitis* in stray dogs captured in Hyogo Prefecture, Japan. Jpn J Parasitol. 39:425–430.
- Vezzani D, Fontanarrosa MF, Eiras DF. 2008. Are antigen test kits efficient for detecting heartworm-infected dogs at the southern distribution limit of the parasite in South America? Preliminary results. Res Vet Sci. 85:113–115.

Wichmann D, Poppert S, Thien Von H, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, Parola P, Richter J, Schunk M, Stich A, Zanger P, Burchard GD, Tannich E. 2013. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis.* 13:55.

Wong MM, Thomford JW. 1991. Serodiagnosis of prepatent dirofilariasis: problems and significance. *J Am Anim Hosp Assoc.* 27:33–38.

Wright T. 1845. An interesting case of worms. *Veterinarian.* 18:52–53.

Xia Z, Yu D, Mao J, Zhang Z, Yu J. 2011. The occurrence of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophium* in dogs in China. *J Helminthol.* 86:185–189.

Xu J, Liu A-P, Guo J-J, Wang B, Qiu S-J, Sun H, Guan W, Zhu X-Q, Xia C-M, Wu Z-D. 2012. The sources and metabolic dynamics of *Schistosoma japonicum* DNA in serum of the host. *Parasitol Res.* 112:129–133.

Yan C, Fu L-L, Yue C-L, Tang R-X, Liu Y-S, Lv L, Shi N, Zeng P, Zhang P, Wang D-H. 2012. Stray dogs as indicators of *Toxoplasma gondii* distributed in the environment: the first report across an urban-rural gradient in China. *Parasit Vectors*. 5:5.

Yang N, Mu M, Li H, Hu J, Gao W. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pet dogs in Shenyang, northeastern China. *J Parasitol*. 99:176–177.

矢野明彦、青才文江、野呂瀬一美. 2007. 日本におけるトキソプラズマ症. 初版. 福岡: 九州大学出版会.

Yilmaz SM, Hopkins SH. 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*. 58:938–939.

Yu J, Ding J, Xia Z, Lin D, Li Y, Jia J, Liu Q. 2008. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in pet dogs and cats in Beijing, China. *Acta Parasitol*. 53:317–319.

## 業績一覽

本論文に関わる研究業績は、以下に示す通りである。

**Oi M**, Yoshikawa S, Maruyama S, Nogami S. 2015. Comparison of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in shelter cats and dogs during 1999–2001 and 2009–2011 in Tokyo, Japan. PLOS ONE. 10:e0135956.

**Oi M**, Sato Y, Nakagaki K, Nogami S. 2015. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. Parasitol Res. 114:3645–3648.

**Oi M**, Yoshikawa S, Ichikawa Y, Nakagaki K, Matsumoto J, Nogami S. 2014. Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999–2001 and 2009–2011. Parasite. 21:10.

## 受賞等一覧

本論文に関わる受賞および表彰等は、以下に示す通りである。

1. 平成27年度 日本大学古田奨学生 (平成27年6月)
2. 平成26年度 日本大学生物資源科学部特別研究生 (平成26年6月)