

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580377

研究課題名（和文）西日本におけるイノシシ猟犬の肺吸虫感染状況の調査研究

研究課題名（英文）A survey on infectious status among boar-hunting dogs with paragonimiasis in the western parts of Japan

研究代表者

堀井 洋一郎（HORII YOICHIRO）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80173623

研究成果の概要（和文）：西日本各地でイノシシ猟犬の血液中抗体検査と、糞便内虫卵検査を行ない、肺吸虫感染状況を調査した。国内の犬に感染する肺吸虫は、ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の3種であり、前2者は人へも感染する人獣共通寄生虫である。中国、四国および近畿の各県で131人のオーナーにより飼育されていた441頭のイノシシ猟犬の抗体検査の結果、195頭（44.2%）が陽性であり、肺吸虫に感染していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Infectious status among boar-hunting dogs with paragonimiasis in the western parts, Chugoku, Shikoku and Kinki districts, has been surveyed by using sero-diagnosis and fecal examination. It is well known that dogs are susceptible to lung flukes, *Paragonimus westermani*, *P. miyazakii* and *P. ohirai*, in Japan and former two species are zoonotic parasites. 195 (44.2%) dogs out of 441 dogs kept in these districts by total of 131 owners were seropositive and suggested to be infected with *Paragonimus* species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：ウエステルマン肺吸虫

1. 研究開始当初の背景

（1）我々が肺吸虫症と遭遇するきっかけとなった患畜は雄、5歳、雑種のイノシシ猟犬で、3年前から嘔吐を伴う発咳を常時認め、他院3ヶ所を受診し治療（鎮咳剤・抗生剤の処方）を受けたものの、症状が改善しなかったため発咳と軽度の運動不耐性を主訴に本学畜病院に来院した。胸部X線撮影により肺に虫嚢と思われる結節性陰影を、さらに血液検査では軽度の好酸球増多を認めたため、肺吸虫症を疑い血清免疫学的検査

（Multi-dot ELISA）及び糞便検査を実施したところ、ウエステルマン肺吸虫に対する特異抗体及び特徴的な肺吸虫卵が検出されたため本症は肺吸虫症と診断され、praziquantel（78mg/kg/day）の経口投与を行い、良好な治療結果を認めた。さらにオーナーへの詳細な聞き取り調査の結果、初発例の同居犬にも同様に発咳を認めること、また一緒に猟に行く他の猟犬3頭の存在が確認されたため、これらについても同様に検査を追加実施したところ、全頭について肺吸虫の感

染を認めたため、同様に治療を行った。これらに引き続き、我々は調査を進めていく過程で肺吸虫症によって死亡するという大変珍しい症例にも遭遇した。患犬は雄、4歳、雑種のイノシシ猟犬であり、生前の糞便検査及び血清免疫学的検査において、肺吸虫卵、肺吸虫抗体ともに陽性を示したイヌであった。オーナーから「突然呼吸困難に陥り、死亡した。」との報告を受け、本学で病理解剖を行ったところ、剖検時に胸腔内陽圧のため横隔膜が顕著に下垂していたこと、また肺吸虫寄生部位に裂孔が認められたことから、死因は肺吸虫による両側性の気胸であると診断された。これらの予備的な研究成果の一部は、国際誌 (Veterinary Parasitology) に公刊され、その他は投稿中である。これらの研究の一部成果は、平成16年度の日本小動物獣医学会会長賞を受賞している。

2. 研究の目的

(1) 日本においては3種の肺吸虫種 (*P. westermani* :Pw, *P. miyazakii* :Pm and *P. ohirai* :Po) が報告されており、特に九州、中国、近畿、そして四国地方に分布するとされている。PwとPmは人獣共通寄生虫であり、とりわけPwによる人の感染が問題視されている (Miyazaki, 1991)。1950年代初期には3-50万人もの肺吸虫症罹患者がいたといわれている (Kawanaka *et al.*, 1999)。しかしその後、予防のための教育普及、食文化の変化、また効果的駆虫薬による集団駆虫などにより、罹患率は劇的に低下した (Nishida, 1989)。ところが近年、かつて症例がみられていた地域において再び人の肺吸虫症がみられるようになり、その数は年間50例以上あるといわれている (Uchiyama *et al.*, 1999., Nakamura-Uchiyama *et al.*, 2003., Nishida, 1999., Maruyama and Nawa, 2007., Sugiyama, 2010)。そのため肺吸虫は公衆衛生上重要な寄生虫であるにも関わらず、日本における肺吸虫の現在の分布状況についての研究はあまり行われてはいない。

疫学調査があまり行われない理由のひとつに、野生動物を対象とした肺吸虫の感染状況の大規模調査を進める難しさがある。第2中間宿主である淡水産カニの調査では、同じ地域を流れる川であっても感染状況が大きく異なるという報告や、流行地域であってもメタセルカリアを保有するカニがほとんど見つからないこともあるという報告もある (Miyazaki, 1961., Sugiyama *et al.*, 1983., 1985)。さらにイタチやタヌキ、イノシシなどの終宿主の感染状況を調査した報告もあるが、その感染率は高くはなく (Ashizawa *et al.*, 1975., Shibahara and Nishida, 1985)、そのため肺吸虫の分布を知るには効率のよい方法ではないと考えられる。さらに、野生動物の捕獲には危険と困難を伴うというデメリットもある。

人への肺吸虫の感染経路について、以前のものとは近年のものとの興味深い比較がある。以前の症例は、第2中間宿主である淡水産カニを生もしくは加熱不十分で食したために感染したというものが大部分であった。しかし近年、イノシシの肉を生もしくは加熱不十分で食したために感染したという報告がしばしばされるようになってきている (Uchiyama *et al.*, 1999; Nawa, 2000; Nakamura-Uchiyama *et al.*, 2001, 2002;

Nawa and Nakamura-Uchiyama, 2005)。イノシシはPwの待機宿主として生活環の維持に関与することが知られている。第2中間宿主体内のメタセルカリアが待機宿主に摂取されると、幼若虫が筋肉へと移行し、未成熟なままで長期に渡り筋肉内にとどまる (Miyazaki *et al.*, 1976a, b, 1978, Nakamura-Uchiyama *et al.*, 2002)。そして未成熟虫が終宿主に摂取されると、その宿主体内で発育が再開し成熟する。したがってイノシシは、人を含む終宿主へのPwの感染源として非常に重要であると考えられている。環境省による鳥獣報告 (2009) によると、年間10万頭以上のイノシシが猟により捕獲されており、その一部は市場に流通している。そのため、イノシシを介した人へのPwの伝播リスクを評価することは重要であると考えられる。それにも関わらず、既に述べたように、イノシシにおける肺吸虫未成熟虫の保有状況の調査はわずかし報告されていない (Kawanaka *et al.*, 1999)。

近年、宮崎県内のイノシシ猟犬がPwに感染していたという症例が報告された (Kirino *et al.*, 2008, Nakano *et al.*, 2009)。イノシシは好んで淡水産カニを捕食し、さらにイノシシ猟犬は給餌や訓練の際に頻繁にイノシシの肉を与えられ、またしばしば猟でイノシシを捕食することもある。それゆえ、イノシシ猟犬はその地域のPw分布を知るための指標として非常に有用であると考えられる。実際、南九州地方のイノシシ猟犬におけるPw抗原に対する高率な抗体保有状況が報告されている (Kirino *et al.*, 2009)。

そこで本研究では、現在の肺吸虫の分布状況を知るために、かつての分布地域である西日本 (近畿、中国、四国地方) のイノシシ猟犬を対象に、肺吸虫感染状況の血清疫学調査を行った。さらに、猟犬に感染している肺吸虫種を、各種肺吸虫の抗原に対する血清の反応性の違いをもとに推定した。また、猟犬のイノシシ肉の生食状況などの背景とPw抗原に対する抗体保有状況の関係を検討し、それぞれの地域でのイノシシを介した終宿主への伝播リスクの評価を行った。

3. 研究の方法

(1) イノシシ猟犬の血清および糞便検体 : 131人のオーナーにより飼育されている441頭のイノシシ猟犬の静脈血および直腸便を採取した。中国および四国地方での調査は、2009年に地域内の11ヶ所に猟犬を連れてオーナーに集まってもらい採材を行った。集まってもらった地点名、猟犬の頭数、オーナー数は順に以下の通りである。山口, 7, 4, 広島, 49, 24, 浜田, 7, 1, 出雲, 16, 4, 鳥取, 38, 11, 岡山, 14, 9, 香川, 20, 7, 徳島, 36, 10, 南国, 15, 7, 仁淀川, 12, 4, 室戸, 22, 5。近畿地方での調査は、2010年に地域内のオーナーを直接訪問して猟犬からの採材を行った。採材に訪れた県名、猟犬の頭数、オーナー数は順に以下の通りである。兵庫, 84, 22, 京都, 14, 3, 大阪, 58, 11, 奈良, 5, 1, 和歌山, 44, 8。採取した静脈血は、3,500 rpm (2,150 g) で15分間遠心分離し、上清を回収し血清サンプルとした。使用までの間、血清サンプルは-30°C、糞便サンプルは4°Cで保存した。

(2) 感染虫種が判明している犬の血清サン

プル： 宮崎県内の猟師により飼育されている12頭のイノシシ猟犬の血液を採取した。以前の調査で、この猟師の飼育していた他の猟犬がPwに感染していることが確認されており(Kirino *et al.*, 2008)、今回採材した猟犬についても糞便内虫卵のDNAを用いた分子同定により、Pw感染をしていることが確認された。また、本研究室での実験感染により、Pm感染をさせている1頭、およびPo感染をさせている3頭の犬の血液を採取した。これらの感染実験犬は、宮崎大学の動物実験規則に基づき飼育し、自由に市販ドッグフードと水を摂取できるように、各々個別に飼育していた(申請番号2006-043-6)。これらの血清は、2.1.に記載したのと同様の方法で血清分離し、保存した。

(3) 分子同定に用いるための各種肺吸虫成虫： Pwの成虫は福岡大学より分与された。この虫体は、中国吉林省の淡水産カニより得られたメタセルカリアを感染実験により成虫として取得したものである。Pmの成虫は日本の山口県岩国市において淡水産カニより得られたメタセルカリアを本研究室でラットに実験感染させ回収したものである。Poの成虫は日本の宮崎県宮崎市において淡水産カニより得られたメタセルカリアを本研究室でラットに実験感染させ回収したものである。これらの感染実験ラットは、宮崎大学の動物実験規則に基づき飼育し、自由に市販の餌と水を摂取できるように、各々個別に飼育していた(申請番号2006-043-6)。それぞれの成虫個体は使用までは-30°Cで保存した。

(4) 猟犬のオーナーへの猟犬の背景および飼育状況についての聞き取り調査： 猟犬に関する以下の項目について猟犬オーナーに聞き取り調査を行った。1)性別、2)年齢、3)犬種：日本系、洋系および雑種、4)主な狩猟地点、5)猟犬が淡水産カニやザリガニを捕食するのを見たことがあるか、6)猟犬に対しイノシシの生肉を給餌したことがあるか、7)1年あたりのイノシシの生肉の給餌回数、8)猟犬が猟の際にイノシシを捕食することがあるか。

(5) 肺吸虫感染のスクリーニング検査のための酵素標識免疫吸着測定法(ELISA)： 抗原を作製するにあたり、福岡大学より分与されたPw成虫を用い、以下の方法により粗抗原を作製した。

要約すると、それぞれの成虫を冷却PBS内でソニケーター(目盛3.5、BRANSON Sonifier 150, BRANSON, Connecticut, USA)を用い破碎したのち、4°C下で一晩攪拌した。次にこれを15,000 g、4°C、5分間遠心分離し、上清を回収した。そしてこの上清のタンパク質濃度を、BSAを用いた際の吸光度の標準線を参考に算出し、PBSで1 mg/mlに調整したものを粗抗原液とし、使用まで-30°Cで保存した。イノシシ猟犬の血清のPw抗原に対するIgG抗体価(OD値)はマイクロプレートELISAにより測定した。方法はNakamura-Uchiyama *et al.*

(2001)に改良を加え行った。まず、96ウェルマイクロプレート(Nunc MaxiSorp flat-bottom immuno 96 microwell plate; Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)に、10 µg/mlに調整したPw粗抗原を50 µlずつ加え、4°Cで一晩静置した。次に、0.05% Tween 20加PBS(PBST)で4

回洗浄したのち、ブロッッキングバッファー(1% casein in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6: casein buffer)を200 µlずつ加え、37°Cに1時間静置した。ブロッッキングバッファーを捨てたのち、各ウェルに1000倍希釈した検体血清を50 µlずつ加え、37°Cに1時間静置した。PBSTで4回洗浄したのち、casein bufferで2000倍希釈したhorseradish peroxidase-labeled goat anti-canine IgG1 (g-chain-specific; Bethyl Laboratories Inc., Texas, USA)を各ウェルに50 µlずつ加え、37°Cに1時間静置した。PBSTで5回洗浄したのち、各ウェルに2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) Peroxidase Substrate (one component type; Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Maryland, USA)を50 µlずつ加え、37°C下で10分間反応させた。その後各ウェルに1% sodium dodecyl sulphate (SDS)を50 µlずつ加え反応を停止させた。そして450 nmでの吸光度(OD値)をELISA reader (Benchmark Plus; BIO-RAD, California, USA)により測定した。Kirino *et al.* (2008)をもとに、OD値0.200をカットオフ値とし判定を行った。また、Kirino *et al.* (2009)を参考に、抗体陽性犬はOD値をもとに次の3つのグループに分けられた。1) low antibody titer group: OD値0.7未満、2) medial antibody titer group: OD値0.7以上1.2未満、3) high antibody titer group: OD値1.2以上。

(6) 感染虫種推定のためのELISA (Serotyping)： 感染虫種を推定するために、3種肺吸虫それぞれの祖抗原に対する、段階希釈した検体血清のIgG抗体レベルを、2.5と同様にELISA法により測定した。PmおよびPoの虫体祖抗原は2.5.に記載したPw虫体祖抗原の作製法と同様である。まず、感染虫種の明らかな犬(section 2.2.)の血清を用い、各種肺吸虫祖抗原に対する反応性の違いを評価し、Serotypingのための基準を決定した。次に、スクリーニングテストにおいて陽性を示した検体血清(section 2.1.)を用い、上記の基準をもとに各々のSerotypeを決定した。

(7) 糞便内虫卵検査： スクリーニングテストにおいて陽性を示した検体の直腸便について糞便内虫卵検査を行った。まず、本研究室独自の検査法であるエーテルトラップ法により検査を行った。これは、糞便と水、そしてエーテルの混和物を遠心分離した際に、肺吸虫卵が効率的にエーテル層に集まるという性質を利用した方法である(投稿準備中)。簡潔には、遠心分離後のエーテル層を回収し、さらにこれを目開き30 µmのナイロンメッシュを用いて濾過することで虫卵より小さな夾雑物は取り除く。そして虫卵を含むメッシュ上の残差を水で流して回収し、実体顕微鏡下で検査するという方法である。次に肺吸虫卵の回収のために、エーテルトラップ法において虫卵陽性であった検体について簡易沈殿法を行った。すなわち、簡易沈殿を3回行った後、沈渣を目開き30 µmのナイロンメッシュを用いて濾過することで虫卵より小さな夾雑物は取り除き、虫卵を含むメッシュ上の残差を水で流して回収し、実体顕微鏡下で虫卵を回収した。回収された虫卵は分子同定に使用するまで70%エタノール中で保存した。

(8) 虫卵DNAを用いた肺吸虫種の分子同定：

感染虫種の同定のためには、虫卵を用い同定を行うことが最も確実な方法といえる。肺吸虫卵については、日本に分布する3種を形態学的に同定・分類することが可能であるとする報告がある(Isshiki, 1953., Kamo *et al.*, 1961., Miyazaki 1961, 1964)。しかしながら、虫卵の形態には個々にばらつきがあるため、形態学に基づく同定には熟練が必要である。そこで今回は、より確実に同定を行うために、虫卵DNAを用いた分子同定により感染虫種の特定を試みた。虫卵DNAのPCR産物に対し、直接シーケンス解析を行った。虫卵が回収できた各犬について、1-3個の虫卵について検査を行った。PCRはDoanh *et al.* (2011) の手法を参考に、多少の変更を加え行った。まず、個々の虫卵をPCRチューブに写し、実体顕微鏡下で針を用いて機械的に破壊した。そしてproteinase K digestion solution (10% proteinase K, 100 mM Tris-HCl, 12.5 mM MEDTA and 150 mM NaCl, 1% SDS)を0.5 μ l加え、55°Cで2時間インキュベートし、ゲノムDNAを抽出した。DNAを含むこの抽出液をテンプレートとし、PCRを以下の手順で行った。Nuclear ribosomal second internal transcribed spacer region (ITS2) 領域のDNAをPCRにより増幅した。プライマーは3S (forward, 5' -CGC TGG ATC ACT CGG CTC GT-3') およびA28 (reverse, 5' -CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3') (Bowles *et al.* 1995)を用いた。PCR後、アガロースゲル電気泳動により目的のバンドサイズの産物 (Pw および Po: 463 base pairs (bp), Pm: 461 bp) が得られたことを確認したのち、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., California, USA)を用いDNAを精製した。次に、Big-Dye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems of Life Technologies Corporation, California, USA)を用いサイクルシーケンスを行った。サイクルシーケンスにはPCRと同様のプライマーを用い、それぞれのssDNAについて直接解析を行った (Model 3100, Applied Biosystems of Life Technologies Corporation, California, USA)。得られたシーケンスはBLAST (Basic Local Alignment Search Tool)を用いGenBank登録配列と比較し、種の同定を行った。また、本研究室で保有する肺吸虫成虫 (section 2.3.) のDNAとも比較を行った。

(9) 多重ロジスティック回帰分析：
Microsoft Excel 2010のプログラムであるエクセル統計2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用い、猟犬の背景および飼育状況と抗体陽性状況との関係を解析した。まず、抗体陽性に影響を与える因子を推定するために、section 2.3. に挙げた猟犬の背景それぞれについて、カイ2乗検定により抗体保有状況との関係を検討した。次に、カイ2乗検定において有意差を示した因子を独立変数とし、従属変数である抗体保有の有無に対する多重ロジスティック回帰分析を行った。このとき、P値0.2を基準とし、因子の投入・除去を行った。

(10) イノシシ肉の生食とPw感染の関係：
Pwの待機宿主であるイノシシは、イノシシ猟犬へのPw伝播源として非常に重要である。そのためscreening ELISAにおいて抗体陽性を示した猟犬のうち、イノシシの肉の生食経験

があるものについては、他種肺吸虫よりもPwの感染を受けている疑いが強いと考えられる。そこで、イノシシ肉の摂食と、Pw抗原に対する抗体保有との関係について、以下の方法により評価を行った。この中では、給餌や訓練でイノシシの生肉を与えられる、もしくは猟でイノシシを捕食することを一括して“暴露”と表現する。まず、Pw感染が特に強く疑われる猟犬 (Pwの虫卵を排出していた、もしくはPw-serotypeを示した) について、暴露経験があるかをオーナーへの聞き取り結果をもとに調査した。次に、調査地をいくつかのエリアに分け、各エリアについて、暴露による抗体保有のリスクを、オッズ比および寄与危険度により評価した。そして、Pw感染の強く疑われた猟犬のいた地域に着目し、イノシシ肉の生食経験の程度とPw抗原に対する抗体価 (OD値) との関係求めた。繰り返し肺吸虫感染を受け、抗原による感作を受けている犬は高いOD値を示すと考えられる。加えて、イノシシの生肉を給餌される、もしくは猟で捕食するものは、特にPwにより頻繁に感作されていると考えられる。猟犬のイノシシ肉の生食経験の程度は、年あたりの生肉給餌回数と年齢との積により算出した。この値をもとに、猟犬を5つのグループに分けた。1) No risk group : まったく給餌を受けず、捕食をすることもない猟犬、2) Low risk group : 捕食の有無に関わらず、給餌回数と年齢の積が10以下の猟犬、3) Middle risk group : 捕食の有無に関わらず、給餌回数と年齢の積が100以下の猟犬、4) High risk group : 捕食の有無に関わらず、給餌回数と年齢の積が100以上の猟犬、5) Predation group : 給餌はまったく受けないが、猟でイノシシを捕食することのある猟犬。そして各グループについて、Pw抗原に対するOD値 (section 2.5.) の構成割合を求めた。

4. 研究成果

(1) 肺吸虫感染のスクリーニング検査 (スクリーニングテスト) : 131人のオーナーにより飼育されていた441頭のイノシシ猟犬の血清検体のうち、195 (44.2%) 検体がスクリーニングテストにおいて陽性を示した。このとき、陽性検体のOD値の平均は0.841であり、標準偏差(SD)は0.483であった。また、これらをOD値により3群に分けたところ、89検体はlow antibody titers (45.6%)、57検体は medial antibody titers (29.2%)、そして49検体は high antibody titers (25.1%) であった。各オーナーにより飼育されていた猟犬頭数は1から12頭であり、平均3.4頭であった。猟犬1頭のみを飼育していたのは20.6% (27/131) であり、血清陽性を示した猟犬を飼育していたのはそのうち66.7% (18/27) であった。猟犬2頭以上を飼育していたオーナーは79.4% (104/131) であり、少なくとも1頭の抗体陽性犬を飼育していたのはそのうち78.8% (82/104) であった。このときオーナーごとの猟犬の抗体保有率は0から100%であり、平均は42.8%であった。

(2) 抗体保有に関与する猟犬の背景 : 抗体保有に影響を与える猟犬の因子を特定するため、まずカイ2乗検定により、聞き取りによって得られた猟犬の背景ごとに抗体保有状況との関係を評価し、次に多重ロジスティック回帰分析により詳細を検討した。

まずカイ 2 乗検定により各因子と抗体保有との関係性を評価した。項目は以下の通りである。

1) 性別: スクリーニングテストにおいて、オス犬 43.3% (107/247)、メス犬は 45.4% (88/194) 抗体陽性を示した。このとき性別による有意差は得られなかった ($P=0.6684$)。

2) 年齢: 猟犬の年齢は 0.4 歳から 17 歳であった。年齢により猟犬は 4 群に分けられた。: 幼犬 (1 歳未満)、若犬 (5 歳未満)、成犬 (10 歳未満) そして老犬 (10 歳以上) の 4 群である。各群の抗体保有率は、幼犬 20.4% (10/49)、若犬 47.1% (120/255)、成犬 48.3% (57/118)、そして老犬 42.1% (8/19) であった。このとき幼犬において有意に低い抗体陽性率が示された ($P=0.0048$)。

3) 犬種: 日本系の犬の抗体陽性率は 45.6% (104/228)、洋系の犬の抗体陽性率は 44.9% (35/78)、そして雑種の抗体陽性率は 41.5% (56/135) であった。このとき犬種による有意差はみられなかった ($P=0.7395$)。

4) 主な狩猟地点: 猟師は猟犬を連れていくつかの地点にイノシシ猟に行くが、そのうちで最も猟に訪れる地点を聞き取った。その結果、主な狩猟地点として 33 地点が挙げられた (Fig. 1)。各地点平均 13.4 頭の猟犬が猟をしており、その範囲は 2 から 35 頭であった。地点ごとの抗体陽性率を Table 1 に示した。33 地点の猟地のうち 28 地点 (84.8%) で抗体陽性犬が得られている。

5) 猟犬の淡水産カニやザリガニの捕食の有無: ただ 2 人のオーナーが、彼らの飼育する猟犬が淡水産カニを捕食するのを見たことがあると回答した。一方のオーナーにより飼育される 3 頭の猟犬のうち、1 頭が抗体陽性を示した。この猟犬は猟地番号 28 番で主に猟をしていた。もう一方のオーナーにより飼育される 9 頭の猟犬のうち、5 頭が抗体陽性を示した。この猟犬は猟地番号 30 番で主に猟をしていた。淡水産カニを捕食することのある猟犬の抗体陽性率は合計で 50% (6/12) であった。一方で、淡水産カニやザリガニを捕食しない猟犬の抗体陽性率は 44.1% (189/429) であり、有意差は得られなかった ($P=0.6826$)。

6) 猟犬のイノシシ肉の生食経験の有無: 131 人のオーナーのうち 100 人 (76.3%) が、彼らの飼育する猟犬に給餌や訓練でイノシシの生肉を与えたことがあると回答した。また、53 人 (40.5%) が彼らの飼育する猟犬が猟の際にイノシシを捕食したことがあると回答した。合計で、114 人 (87.0%) のオーナーにより飼育される 371 頭 (84.1%) の猟犬がイノシシ肉を生食した経験があることが分かった。これらの猟犬の抗体陽性率は 47.4% (176/371) であり、イノシシ肉の生食経験のない猟犬の陽性率 (27.1%; 19/70) に対し有意に高かった ($P=0.0017$)。

次に、有意差の見られた因子 (年齢およびイノシシ肉の生食経験) について、多重ロジスティック回帰分析を行った。独立変数として、以下の 5 つの因子を用いた。すなわち、量的変数としての年齢、イノシシ生肉の給餌経験の有無、年あたりの生肉給餌回数、イノシシの捕食経験の有無、および年あたりのイノシシ捕獲頭数である。解析の結果、抗体保有にはこのうち 3 つの因子が強く関与することが明らかとなった。その因子とは、量的変数としての年齢、イノシシ生肉の給餌経験の有無、

年あたりの生肉給餌回数であった。それぞれの変数の偏回帰係数は、順に 0.0994、0.7107、そして 0.0099 であった。このとき、それぞれの偏回帰係数はいずれも 95% 信頼区間に 0 を含まず、すべて $P < 0.005$ で有意であった。

(3) 糞便内虫卵検査、および虫卵 DNA を用いた肺吸虫種の分子同定: スクリーニングテストにおいて Pw 抗原に対し陽性を示した 195 頭のうち、エーテルトラップ法により 28 頭 (14.4%) で肺吸虫卵が検出された。このうち、簡易沈殿法で虫卵が回収できたものが 17 検体あり、これらについて虫卵 DNA から種の同定を行った。17 頭の猟犬由来の虫卵 DNA の ITS2 領域の配列は 3 つの型に分かれた。このとき同一の猟犬から得られた虫卵はすべて同一の配列を示した。得られた配列を BLAST 検索により GenBank 登録配列との相同性を調べたところ、*P. westermani* (98.9% similarity: 458/463, AB354217.1)、*P. miyazakii* (99.8%: 460/461, AB629937.1) そして *P. ohirai* (100%: 363/363, U96911.1; 現在までに GenBank に登録されている Po の ITS2 領域の配列はこれのみであった) の ITS2 領域の配列に対し、8 頭、3 頭、6 頭の猟犬由来の配列がそれぞれ高い相同性を示した。また、本研究室で保有する肺吸虫成虫の ITS2 領域の塩基配列とも比較を行ったところ、それぞれ Pw、Pm、Po の成虫由来の配列と完全に一致した。これらの結果、8 頭の猟犬が Pw、3 頭が Pm、そして 6 頭が Po に感染していることが明らかとなった。

(4) 感染虫種推定のための ELISA (Serotyping): まず、Serotyping のための基準を決定するために、感染虫種の明らかな犬の血清を用い、各種肺吸虫祖抗原に対する反応性の違いを評価した。このとき、Pm-serotype を決定するにあたり、Pm の虫卵を排出していた島根県の 2 頭の猟犬の血清をあわせて用いた。その結果、単独の肺吸虫種による感染を受けている猟犬の血清は、その感染虫種の抗原に対し、他種の抗原に対するよりも高い OD 値を示す傾向にあった。そこで、抗原間での OD 値の差が最も大きくなる血清希釈倍率での、OD 値の平均と標準偏差 (SD) を求めた。そして、平均-SD の値を、感染虫種を推定するための便宜上の基準とした (serotyping)。次に、この基準に基づき、スクリーニングテストにおいて抗体陽性を示した猟犬の血清に対し Serotyping を行った。195 頭の抗体陽性犬うち、34 頭 (17.4%) の猟犬で serotype が決定された。: 19 頭が Pw-serotype、15 頭が Pm-serotype を示し、Po-serotype を示す猟犬はいなかった。しかしながら、他の 161 頭の抗体陽性犬は serotype の基準にあてはまらなかった。

(5) 虫卵 DNA からの感染種同定と Serotyping による感染種推定の結果の比較: 猟犬に感染している肺吸虫種を知るための上記の 2 つの方法において、6 頭の犬で両者の結果が一致した。すなわち、4 頭は Pw の虫卵を排出しており、かつ Pw-serotype を示した。また 2 頭は Pm の虫卵を排出しており、かつ Pm-serotype を示した。どちらか一方の方法でのみ虫種の同定もしくは推定が可能であった猟犬は 37 頭であった。そのうち 27 頭は虫卵の排出はみられなかったが

Serotyping によりいずれかの serotype を示し感染虫種が推定された。また他の 10 頭は serotype には適合しなかったが肺吸虫卵を排出しており、その DNA から感染種が同定された。全体として、43 頭の猟犬について感染肺吸虫種が同定もしくは推定された。一方で、1 頭の猟犬において Serotyping (Pm-serotype) と虫卵 DNA からの分子同定 (Pw egg) が食い違う結果が得られた。

(6) 感染虫種が同定もしくは推定された猟犬が訪れる猟地をもとにした肺吸虫の分布状況の推察： 感染虫種が同定もしくは推定された猟犬が猟に訪れる地点は、今回の調査で聞き取りにより得られた 33 地点の主な狩猟地点のうちの 19 地点であった。Pw の感染が疑われる猟犬は、近畿地方北部から中国地方中央部にかけての 9 地点(猟地番号 4-20)、および瀬戸内海の島である因島(猟地番号 26)で猟をしていた。この範囲には、合計 113 頭のスクリーニングテストで陽性を示した猟犬が含まれていた。そのうち、26 頭について感染虫種が同定もしくは推定されており、22 頭が Pw、3 頭が Pm による感染が疑われている。また、Serotyping (Pm-serotype) と虫卵 DNA からの分子同定 (Pw egg) の結果が一致しなかった猟犬もこの範囲に含まれていた。Pm 感染が疑われる犬は 8 地点で猟をしていた。これらの地点は近畿、中国、四国地方の広い範囲に点在していた。また、Po 感染の疑われる犬は 4 地点でのみ見つかった。また、2 地点において、疑われた感染肺吸虫種が異なる猟犬が見つまっている。猟地番号 26 番では、Pw-serotype を示した猟犬と Pm-serotype を示した猟犬が見つまっている。また、猟地番号 30 番では、Pm-serotype を示した猟犬と、Po の虫卵を排出していた猟犬が見つまっている。

(7) Pw 感染と猟犬のイノシシ肉の生食経験との関係： 設定した Pw 地域に本当に Pw が分布するかを確認するために、Pw の待機宿主であるイノシシの肉の生食経験と抗体保有とに相関関係があるかを評価した。まず、Pw 感染が強く疑われる犬に対して、その背景にイノシシ生肉の暴露があるかを確認した。その結果、Pw の虫卵を排出していた、もしくは Pw-serotype を示した 22 頭の猟犬のうち、21 頭(95.5%)が暴露を経験していた。次に、感染虫種が同定、推定できなかった猟犬について、暴露と抗体保有の関係をオッズ比(OR)および寄与危険度(AR)により評価した。このとき、Pw の分布が確認はされていない地域について、四国内の地域(猟地番号 27-33)および本州・瀬戸内海内の地域(猟地番号 1-3, 21-25)とにわけ、同様に OR と AR を求めた。その結果、Pw の分布が疑われた地域の猟犬についてのみ、暴露の有無による抗体保有に有意差がみられ、このとき他の地域に比較し高い OR がみられた。さらに、Pw の分布が疑われた地域の猟犬について、異なる暴露頻度の猟犬群ごとに Pw 抗原に対する OD 値の構成割合を求めた (Fig3)。暴露の頻度が増加するにつれ、抗体保有率が高くなり、また高い OD 値を示す猟犬も増える傾向にあった。また、猟での捕食によってのみイノシシの生肉を摂食する 40 頭の犬において、11 頭 (27.5%) の抗体陽性犬がみられ、このうち 7 頭 (63.6%) は Pw 抗原に対し高い OD 値を示して

いた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 入江隆夫、山口洋平、P. N. Doanh、波部重久、野中成晃、堀井洋一郎：近畿・中国・四国地方のイノシシ猟犬における肺吸虫感染状況とその背景、第 64 回日本寄生虫学会南日本支部大会、2011 年 9 月 13 日、宮崎
- ② 山口洋平、入江隆夫、数面麻子、波部重久、野中成晃、堀井洋一郎：糞便内肺吸虫卵検査におけるホルマリンエーテル法 (MGL 法) の低検出率の原因とエーテルトラップ法の提案、第 64 回日本寄生虫学会南日本支部大会、2011 年 9 月 13 日、宮崎
- ③ 山口洋平、入江隆夫、数面麻子、野中成晃、堀井洋一郎：糞便内肺吸虫卵検査におけるホルマリンエーテル法 (MGL 法) の再検討と新しい検査法、エーテルトラップ法の提案、第 152 回日本獣医学会、2011 年 9 月 20 日、堺
- ④ 入江隆夫、山口洋平、P. N. Doanh、波部重久、野中成晃、堀井洋一郎：近畿・中国・四国地方におけるイノシシ猟犬の肺吸虫感染状況調査、第 152 回日本獣医学会、2011 年 9 月 20 日、堺

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
堀井 洋一郎 (HORII YOICHIRO)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号：8 0 1 7 3 6 2 3

(2) 研究分担者
野中 成晃 (NONAKA NARIAKI)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：5 0 2 8 1 8 5 3

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：