

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14596

研究課題名（和文）我が国のイノシシに蔓延するヘパトゾオン属原虫の分類学的・生物学的特性の解明

研究課題名（英文）Taxonomic and parasitological characterization of Hepatozoon parasitizing wild boars in Japan

研究代表者

常盤 俊大 (Tokiwa, Toshihiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：50757755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本邦の野生イノシシにおいてマダニ媒介性のHepatozoon属原虫が広く蔓延していることを明らかとし、その形態学的特徴ならびに分子特性に基づき、Hepatozoon apriとして種記載を行った。本種は有蹄類から検出・記載された初めてのHepatozoon属原虫種であり、系統解析により食肉動物寄生種を祖先とするイノシシ固有種であると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hepatozoon属は各種動物に固有の原虫種が寄生するが、イヌ寄生種は宿主に重篤な原虫病を引き起こすことがあり、獣医学上重要なマダニ媒介感染症としても知られている。本研究では、国内に広く分布し個体数が増加傾向にあるイノシシにおいて、高い感染率でHepatozoon属原虫が寄生していることを明らかとし、形態学的特徴ならびに分子特性に基づきHepatozoon apriとして種記載した。効率的に検出する核酸検出法開発を開発できたことから、今後、市販猪肉の汚染状況についての調査が加速すると思われる。本種はマダニの経口摂取により伝播するため、ブタへの感染リスクについても考慮すべきである。

研究成果の概要（英文）：We found that tick-borne protozoan parasite of the genus Hepatozoon is widespread in wild boars in Japan, and described the species as Hepatozoon apri based on its morphological and molecular characteristics. This is the first species of protozoan parasite of the genus Hepatozoon to be detected and described from a hoofed animal, and phylogenetic analysis suggests that it is endemic to wild boar, whose ancestor is a carnivore parasite.

研究分野：寄生虫学

キーワード：イノシシ 野生動物 ジビエ 原虫 マダニ媒介感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Hepatozoon 属はアピコンプレックス門コクシジウム亜綱アデア亜目に属する原虫で、脊椎動物を中間宿主とし、吸血性の節足動物を中間宿主とする。哺乳類においてはマダニ類が媒介する原虫種が食肉類、食虫類、齧歯類および有袋類から報告され記載されている。いわゆる有蹄類からの検出報告は極めて少なく、種記載された原虫はいなかったが、近年、岐阜県で捕獲されたイノシシおよびタイの野生イノシシより得たカクマダニより *Hepatozoon* 属が検出報告されており、イノシシに寄生する *Hepatozoon* 属の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

近年、有害鳥獣として捕獲されるイノシシ (*Sus scrofa*) をジビエとして食用に利活用される機会が多く、その食肉の安全性を評価する過程において保有病原体の調査が盛んに実施されている。*Hepatozoon* 属のうち、イヌ寄生種の *Hepatozoon canis* および *Hepatozoon americanum* は、しばしば宿主に重篤な原虫病を引き起こすことから獣医学上重要な病原体としても知られている。本研究は、イノシシに寄生する *Hepatozoon* 属の感染状況を調べ、形態学的特徴、系統学的位置、寄生虫学的特徴を明らかに、生活環の解明や人や家畜 (ブタ) への感染リスクについて検討することにある。

3. 研究の方法

四国地方にて捕獲されたイノシシ 181 頭およびニホンジカ 113 頭について臓器、筋肉あるいは血液を採取した。この他、市販イノシシ筋肉 40 検体を調べた。岐阜で捕獲されたイノシシ 6 頭の体表より得たマダニ類 1,027 個体のうち成虫 93 個体についてオーシストの検出を試みた。検出には、顕微鏡下による観察に加え、semi-nested PCR 法の開発を試みた。イノシシ寄生種より得た 18S rRNA 遺伝子配列を用いて系統解析を行い、系統学的位置について検討した。

4. 研究成果

(1) イノシシ寄生 *Hepatozoon* 属原虫の発育段階および形態学的特徴

ガモント

血液内では白血球に寄生するガメトサイトが観察された (図1)。ガメトサイトは楕円形、大きさは約 $11.6 \times 6.7 \mu\text{m}$ 、細胞質は無色、類円形の核が偏在し、雌雄の鑑別はできなかった。寄生白血球は好中球と思われた。バッフィーコート塗抹染色標本における顆粒球寄生率は 0.03% ~ 0.2% と低値であった。

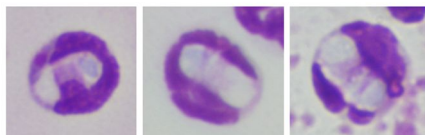


図1. ガモント

メロゾイトおよびメロント

筋肉にメロントを認めた (図2)。メロントは寄生体胞様の内部に存在し、辺縁は不整で、類縁形から楕円形で泡沫状の内部構造を有していた。メロント内部のメロゾイトの配置には差があり、周囲に偏在するものや小型のものが観察された。メロントの大きさはサルコシスティス属のサルコシストと大きさが類似していたが、メロントの壁構造は薄く不明瞭であることから容易に鑑別できた。

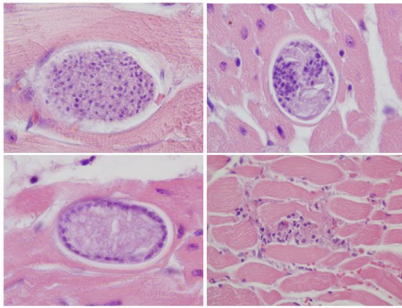


図2. メロントおよびメロゾイト

(2) イノシシからの *Hepatozoon* 属原虫検出法の開発

血球寄生数が低値であることおよび血液塗抹標本の入手が困難であることから、核酸検出法を検討した。1st PCR にはアピコンプレックス門プライマー（18S1F および 18S11R）に、2nd PCR に *Hepatozoon* 特異プライマーHap1F および 18S11R を用いた nested PCR 法を開発した。塗抹上で陽性検体に対して実施したところ、筋肉検体でも陽性判定を実施できることが確認された（表1）。

表1. イノシシ部位別の *Hepatozoon* 検出状況

IDs	血液	筋肉	心臓	肝臓	腎臓	脾臓
28-3	+	+	ND	ND	ND	ND
28-11	+	+	+	+	-	+
28-12	+	+	-	-	-	-
28-18	+	+	+	-	-	-
28-26	+	+	ND	ND	ND	ND

+, PCR amplicon with nested PCR
 -, no amplicon
 ND, not done.

(3) イノシシおよびニホンジカの *Hepatozoon* 感染率調査

筋肉を検体として、前項で開発した nested PCR 法による検査を実施した。徳島県のイノシシ 181 個体では 95 個体（53.0%）であった。年齢別の内訳（陽性/検査個体数）は、幼体（ウリボウ）で 1/11（9.1%）、若齢以降（縞模様消失）で 95/170（55.9%）であった。市販イノシシ筋肉の内訳は、広島 2/10、島根 5/10、山口 3/10、長崎 5/10 であった（販売時の表記を参考に産地表記）。一方、徳島のニホンジカ 113 頭は全て陰性であった。

(4) ベクターの調査

イノシシ 6 頭に由来するマダニ類 1027 匹を同定し、93 匹を解剖した（表2）。オオトゲチマダニ（雌、飽血）の血体腔からオーシスト様構造物を検出した。当該 DNA を抽出後、特異的 Semi-nested PCR 法では遺伝子が増幅しなかった。

表 2 マダニ類の調査.

種.		宿主番号.						計.
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	
タイワンカクマダニ.	成 (♂)	0	0	0	0	1 (1*)	0	1
オオトゲチマダニ.	成 (♀)	40 (26)	41 (13)	31 (3)	2	6 (3)	4 (4)	124
	成 (♂)	79 (20)	39 (3)	115 (2)	5	18	10 (7)	266
	若.	136 (1)	113	121 (2)	6	2	2	380
	幼.	0	7	1	0	0	0	8
キチマダニ.	成 (♀)	28 (5)	7	12	6	3	0	56
	成 (♂)	47 (3)	16	44	8	1	0	116
	若.	37	13	11	5	0	0	66
	幼.	8	2	0	0	0	0	10
計.		375 (55)	238 (16)	335 (7)	32	31(4)	16 (11)	1027 (93)

※括弧：解剖後に実顕顕微鏡観察済みの個体.

※アスタリスク：オーンスト様構造物が検出された個体.

(5) イノシシに寄生する *Hepatozoon* 属の系統解析

イノシシに寄生する *Hepatozoon* 属原虫の系統学的位置を明らかにする目的で、他の脊椎動物に寄生する原虫種の 18S rRNA 遺伝子配列を収集し、系統樹を作製した。イノシシ寄生種は、タイのカクマダニから報告された *Hepatozoon* sp. と単系統群を形成した。イノシシ寄生種のクレードが食肉類寄生種からなるクレード内に位置すること、およびタイからもイノシシ寄生種が検出されることから、食肉動物に寄生する種を祖先としてイノシシに定着した *Hepatozoon* 属原虫が、イノシシの拡散とともに分布域を広げた可能性が考えられた。

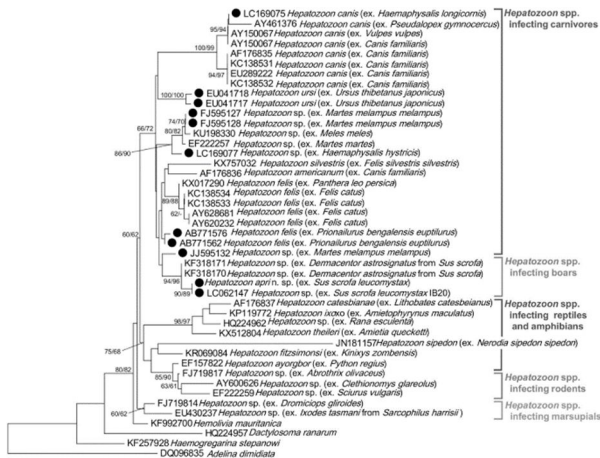


図 3. 18S rRNA 遺伝子に基づく遺伝子系統樹

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jian Xu, Rikito Hiramatsu, Hamizah Suhaimi, Tatsuya Kato, Akari Fujimoto, Toshihiro Tokiwa, Kazunori Ike, Enoch Y. Park	4. 巻 37
2. 論文標題 Neospora caninum antigens displaying virus-like particles as a bivalent vaccine candidate against neosporosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6426-6434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2019.09.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshihiro Tokiwa, Hisashi Yoshimura, Sayoko Hiruma, Yukie Akahori, Ayami Suzuki, Keiko Ito, Masami Yamamoto, Kazunori Ike	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma gondii infection in Amami spiny rat on Amami-Oshima Island, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife	6. 最初と最後の頁 244-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijppaw.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rie Kubota, Matsubara Katsuki, Kenichi Tamukai, Kazunori Ike, Toshihiro Tokiwa	4. 巻 68
2. 論文標題 Molecular and histopathological features of Cryptosporidium ubiquitum infection in imported chinchillas Chinchilla lanigera in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2018.09.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 常盤俊大	4. 巻 22
2. 論文標題 豚のкокシジウム症の実態と対策	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pig Journal	6. 最初と最後の頁 49-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rie Maruko, Toshihiro Tokiwa, Junji Nakai, Shin-ichi Nakamura	4. 巻 83
2. 論文標題 Theileria infection with severe anemia and unhealed fracture in a sika deer <i>Cervus nippon aplodontus</i> (Cervidae: Cetartiodactyla)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumiya Urushiyama, Katsuki Matsubara, Kandai Doi, Masakatsu Taira, Tomoyoshi Komiya, Toshihiro Tokiwa	4. 巻 78
2. 論文標題 First record of infestation of a pet sloth in Japan with the exotic tick <i>Amblyomma geayi</i> (Acari: Ixodidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 常盤俊大、山本瑞希、飛梅三喜、赤松茂、松尾加代子、森部絢嗣、池和憲
2. 発表標題 二ホンイノシシに寄生する住血原虫の 1 新種 <i>Hepatozoon apri</i> (Apicomplexa: Adeleorina)
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 常盤俊大 (担当:分担執筆, 範囲:<第7章 微生物検査> 犬ヘパトゾーン症)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 インターズー	5. 総ページ数 836
3. 書名 犬と猫の検査・手技ガイド2019	

1. 著者名 常盤俊大ほか	4. 発行年 2019年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 384
3. 書名 最新 獣医寄生虫学・寄生虫病学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------