

ペットショップの子イヌにおけるクリプトスポリジウム感染の実態調査

Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* species in pet shop puppies

北里大学獣医学部獣医学科 伊藤 直之
Naoyuki Itoh, Kitasato University

キーワード: クリプトスポリジウム、子イヌ、ペットショップ

keywords: *Cryptosporidium* species, puppy, pet shop

1. はじめに

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) は、一般的な消化管内寄生原虫であり、世界中に分布してヒトやイヌを含む哺乳類、鳥類など多種の動物に寄生し、宿主に対してしばしば急性ないし慢性の消化器障害を引き起こすことが知られている^{1,2)}。クリプトスポリジウムは、少なくとも20種、40以上の遺伝子型に分類され、ヒトに寄生する種はヒトに特異的な *C. hominis* と人獣共通感染性の *C. parvum* であり、イヌに寄生する種はイヌに特異的な *C. canis* であることが示されている^{3,4)}。一方、少数ではあるが、ヒトの *C. canis* 感染例やイヌの *C. parvum* 感染例が報告されていることから⁴⁾、クリプトスポリジウムは人獣共通感染性の原虫として注目されている。ヒトとイヌとの関係が親密になった現在、イヌにおけるクリプトスポリジウム感染状況を明らかにすることは、イヌとヒトの健康維持に重要と考えられる。特に、一般家庭で飼育されているイヌの最大の供給源と考えられるペットショップで飼育されている子イヌは、やがて一般家庭で飼育され、ヒトと親密に関わるようになることを考えれば、これらの子イヌがクリプトスポリジウムを保有している場合、ヒトの感染に対するレゼルボアとして重要な意義を持つことになる。しかしながら、日本国内に限らず、ペットショップの子イヌにおけるクリプトスポリジウム感染状況は、解明されていないのが現状である。

そこで今回、ペットショップで飼育されている子イヌを対象に、クリプトスポリジウムの感染状況を PCR (polymerase chain reaction) 法

で調査すると同時に、一部の陽性検体について、その PCR 増幅産物をシーケンス解析することで種を特定し、イヌからヒトへのクリプトスポリジウム伝播について考察した。

2. 材料と方法

2.1 糞便材料

2012年4月~12月の期間に、東日本の4カ所のペットショップで飼育されている3カ月齢以下の子イヌ471頭から採取した新鮮な糞便を調査の材料とした。糞便は、その性状を肉眼的に分類した(固形便と軟便・下痢便)。

2.2 クリプトスポリジウムのオーシスト回収
糞便材料からのクリプトスポリジウムオーシストの回収は、ショ糖遠心浮遊法⁵⁾を用いて行った。

2.3 クリプトスポリジウム DNA の抽出

クリプトスポリジウムオーシストの懸濁液を、100°Cで5分間インキュベートした後、4°Cで5分間冷却する操作を3回繰り返し、QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて説明書に従いクリプトスポリジウムのDNAを抽出した。DNA抽出物は、nested PCRに使用するまで-20°Cで冷凍保存した。

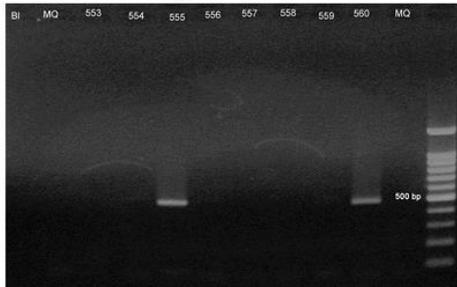
2.4 クリプトスポリジウム検出の nested PCR

クリプトスポリジウムの検出は、18S(SSU) rRNA 遺伝子をターゲットとして、特異的なプライマーペアを用いた nested PCR 法で実施した⁶⁾。

2.5 アガロースゲル電気泳動

2nd PCR の増幅産物は、臭化エチジウムを添加した 1.5%アガロースゲル上で電気泳動を行い、目的とする約 500 bp の遺伝子断片が確認できた検体をクリプトスポリジウム陽性と判定した (図 1)。

図 1 特異的プライマーによるクリプトスポリジウム 18S rRNA 遺伝子の検出 (約 500 bp)



2.6 シークエンス解析

クリプトスポリジウム陽性検体から無作為に 55 検体を抽出し、外部業者 (グライナー・ジャパン (株)) にシークエンス解析を依頼した。解析した各検体のシークエンスデータは、MEGA Version 5.05 を用いて DNA 配列のアラインメント処理と編集を行い、検体の DNA 配列を完成させた。各 DNA 配列は、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使って GenBank データベースに登録されているクリプトスポリジウムの DNA 配列と比較し、種を特定した。

2.7 統計解析

統計学的解析は、カイ二乗検定を用いて危険率が 5%以下 ($P < 0.05$) の場合に有意差があると判断した。

3. 成績

3.1 全体のクリプトスポリジウム検出率

クリプトスポリジウムは、調査した子イヌ 471 頭の 31.6% (149 頭) から検出された。

3.2 糞便性状別のクリプトスポリジウム検出率

糞便性状別のクリプトスポリジウム検出率は、固形便 31.5% (136/432)、非固形便 33.3% (13/39) であり、糞便性状による差は認められなかった (表 1)。

表 1 糞便性状別のクリプトスポリジウム検出率

	固形便	非固形便
調査頭数	432	39
陽性頭数	136	13
検出率	31.5%	33.3%

2.3 ペットショップ別のクリプトスポリジウム検出率

ペットショップ別の検出率は、ペットショップ A : 40.0% (60/150)、B : 23.5% (53/226)、C : 42.4% (25/59)、D : (11/36) であり、ペットショップ B の検出率は、ペットショップ A および C に比較して有意に低かった (それぞれ $P < 0.001$ および $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 ペットショップ別のクリプトスポリジウム検出率

	ペットショップA	ペットショップB	ペットショップC	ペットショップD
調査頭数	150	226	59	36
陽性頭数	60	53	25	11
検出率	40%(a)	23.5%(b)	42.4%(c)	30.6%

(a) vs (b) : $P < 0.001$ (b) vs (c) : $P < 0.01$

2.3 陽性検体のシークエンス解析

クリプトスポリジウム陽性検体から無作為に抽出した 55 検体のシークエンス解析では、すべてが *C. canis* (GenBank accession No. JQ413439.1, EU754826, JN543385.1) に 99% ~ 100% 一致した (図 2)。

図 2 シークエンス解析の 1 例

```
CAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTAACAGTTTTGTAATTTGGAA
TGAGTTGAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCT
CGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATATAATTTAACATATTTATATAATTTAA
CATAATT CATATTAATAATTTATAGTATATGAACTTTACTTTI GAGAAAATAGAGTGCT
TAAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTAGAGCATGGAATAATATTTAAAGATTTTTATCT
TTCTTATTGGTTCTAAGATAGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTGTGTA
TTTAAACAGTTAGAGGTGAAATTTCTAGATTTGTTAAAGACAAAATAATGCGAAAAGCA
TTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAG
```

JQ413439.1

Cryptosporidium canis strain W23645 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Identities = 499/499 (100%)

4. 考察

クリプトスポリジウムの検出方法としては、ショ糖浮遊法で回収したオーシストを好酸染色

や蛍光染色後、光学顕微鏡や蛍光顕微鏡で観察するのが一般的な方法である^{2,7,8)}。しかしながら、クリプトスポリジウムオーシストは微小であり、また、オーシストの糞便への排泄が間欠的であるために、検出が困難な場合がある²⁾。これに対して、PCR法は少数のオーシストからも高感度にDNAを検出することが可能であり^{2,3)}、さらに、PCRで得られた増幅産物をシーケンス解析することで、クリプトスポリジウムの種を特定することができることから^{9,10)}、人獣共通感染性を考察するための重要なツールでもある。

これまで、日本国内のイヌにおけるクリプトスポリジウムの感染状況に関しては、一般家庭で飼育されているイヌを対象としたPCR法を用いた調査で、検出率が3.9% (3/77)であり、すべて*C. canis*であったことが報告されている¹¹⁾。また、不要イヌを対象としたPCR法を用いた調査では、9.3% (13/140)の検出率であり、すべてが*C. canis*であったと報告されている¹²⁾。一方、ペットショップは、一般家庭で飼育される子イヌの最大の供給源であると考えられるにもかかわらず、それらの施設で飼育されている子イヌの感染状況や感染しているクリプトスポリジウムの種については、国の内外を問わず明らかにされていない。本研究の成績で、クリプトスポリジウムの検出率は31.6% (149/471)と高く、ペットショップ内、あるいは、それ以前の繁殖施設でクリプトスポリジウムの感染サイクルが存在し、これらの施設がクリプトスポリジウムの感染源として重要であることが示唆された。イヌのクリプトスポリジウム検出率は、若齢のイヌや繁殖施設のイヌで高いことが指摘され^{2,4,13)}、免疫学的な未熟さや限られた空間での多頭飼育が関与していると推察されている²⁾。さらに、クリプトスポリジウムオーシストは、消毒薬に耐性であること¹⁴⁾もペットショップや繁殖施設での蔓延に関与していると考えられる。他方、クリプトスポリジウムの検出率がペットショップ間で差があったことは、各施設における衛生管理の違いによるものと推察される。

クリプトスポリジウム検出と糞便性状には関連性が認められず、従来の報告と一致していた^{2,11,13)}。しかしながら、クリプトスポリジウムの感染に関係したイヌの下痢症も報告され²⁾、また、ヒトでは免疫が低下した状態での易感染性や症状の重篤化が指摘されている⁴⁾。一方で、

糞便性状に異常が認められない場合、ペットショップの管理者が子イヌのクリプトスポリジウム感染に気づく可能性は低いと推測され、感染が蔓延する一因であると考えられる。

本研究で、クリプトスポリジウム陽性検体から無作為に抽出してシーケンス解析した55検体は、すべてが*C. canis*に一致した。これまでの報告でも、イヌから分離したクリプトスポリジウムのほとんどが、*C. canis*である^{4,11,12)}。また、ヒトの感染例は、*C. hominis*と*C. parvum*がほとんどである^{3,4,9)}。以上のことから、日本国内のペットショップで飼育されている子イヌのクリプトスポリジウム検出率は高いものの、ヒトへの感染源となる可能性は低いと考えられる。ただし、*C. canis*はHIVに感染した下痢をともなったヒトや、まれには健康なヒトからも検出されていること^{4,9,15)}、そして、*C. parvum*がイヌからも検出されていることから⁴⁾、*C. parvum*と*C. canis*は人獣共通感染性であるとされている。さらに、室内で飼育されるイヌが増加していることやヒト・イヌともに高齢化の加速と腫瘍性疾患の増加によって、免疫低下の個体が多く存在すると推測されることから、今後、イヌからヒトへのクリプトスポリジウムの感染機会は、増大する可能性があると考えられる。したがって、ペットショップの子イヌを中心に、一般家庭で飼育されているイヌにおいても、クリプトスポリジウムの感染を注意深く監視する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Robertson, ID., Thompson, RCA., 2002. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes Infect.* 4, 867-873.
- 2) Scorza, V., Tangtrongsup, S., 2010. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Topics Companion Anim. Med.* 25, 163-169.
- 3) 阿部仁一郎, 2003. 人獣共通寄生性原虫 *Cryptosporidium* (クリプトスポリジウム) の分類と診断上の問題点. *生活衛生.* 47, 350-355.
- 4) Lucio-Forster, A., Griffiths, JK., Cama, VA., et al., 2010. Minimal zoonotic risk of

- cryptosporidiosis from pet dogs and cats. Trends Parasitol. 26, 174-179.
- 5) Ogasawara, S., Benassi, S., 1980. Experimental infection of cats through parasitic bovine heart with *Sarcocystis* spp. Arq. Inst. Biol. 47, 27-32.
 - 6) Sevá, AP., Funada, MR., Richtzenhain, L., et al., 2011. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. Vet. Parasitol. 175, 27-32.
 - 7) Morgan, UM., Pallant, L., Dwyer, BW., et al., 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 36, 995-998.
 - 8) 古屋宏二, 八木田健司, 遠藤卓郎, ほか, 1997. クリプトスポリジウム原虫に関する研究(第1報)糞便内 *Cryptosporidium parvum* オーストの検出と同定のためのPCR法と免疫酵素染色法. 道衛研所報. 47, 1-7.
 - 9) Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp. Parasitol. 124, 80-89.
 - 10) Xiao, L., Morgan, UM., Limor, J., et al., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3386-3391.
 - 11) Yoshiuchi, R., Mathsubayashi, M., Kimata, I., et al., 2010. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. Vet. Parasitol. 174, 313-316.
 - 12) Abe, N., Sawano, Y., Yamada, K., et al., 2002. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. Vet. Parasitol. 108, 185-193.
 - 13) 伊藤直之, 村岡 登, 金井一享, ほか, 2008. 家庭飼育犬および猫におけるクリプトスポリジウム抗原の検出. 動物臨床医学. 17, 19-23.
 - 14) 黒木俊郎, 泉山信司, 遠藤卓郎, 2005. クリプトスポリジウムの最近の知見. モダンメディア. 51, 75-80.
 - 15) Cama, V., Gilman, RH., Vivar, A., et al., 2006. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. Emerg. Infect. Dis. 12, 1025-1028.