

## 15. 糞便内 DNA 検出法を用いた愛知県における野犬のエキノコックス感染状況調査

○長谷川晶子、海野明広、柘植康、松本昌門（愛知県衛生研究所）

【研究目的】エキノコックス症は国内では北海道のみで流行している重要な人獣共通感染症である。2014年に愛知県内で初めてエキノコックス陽性犬(多包条虫：以下エキノコックスと記載の際は多包条虫を示す)が発見され、県は知多半島内の野犬等のエキノコックス感染状況調査を実施してきた。2018年3月に新たに3頭のエキノコックス陽性犬(野犬)が発見され、県内にエキノコックスが侵淫している可能性が高まったことから拡大防止策が急務である。施策立案の為、調査範囲を拡大し野犬等のエキノコックス汚染状況を調査する。

【研究の必要性】エキノコックス症は条虫綱円葉目テニア科のエキノコックス属(*Echinococcus spp.*)による人獣共通感染症で、4類感染症に定められている。終宿主＝捕食者(犬、キツネ等イヌ科動物)と、中間宿主＝被捕食者(ネズミ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヒト等)の間で生活環が維持され、ヒトなど中間宿主への感染は、犬やキツネの糞便に含まれる虫卵に汚染された水等を偶発的に経口摂取することで成立する。日本のエキノコックス症はほとんどが多包条虫(*E. multilocularis*)によるもので、主に北海道で流行しているが<sup>1)</sup>、2014年4月に愛知県内で初めて、本州で2例目となるエキノコックス陽性犬(野犬)が発見された<sup>2)3)</sup>。これを受け、愛知県は同年6月より野犬等の糞便を用いて知多半島内に生息する野犬等のエキノコックス感染状況調査を実施してきた。その調査の中で2018年3月に新たに3頭のエキノコックス陽性犬(野犬)が発見され、愛知県内にエキノコックスが侵淫している可能性が更に高まり、この3件の事例を受け、厚生労働省は平成30年3月28日付け事務連絡で、愛知県および全国の自治体等に注意喚起文書を通知した<sup>4)</sup>。

ヒトのエキノコックス症は、包虫が肝臓で増殖し、約10年の長い潜伏期間の後、肝腫大、肝機能障害などを起こし、さらに進行すると肝不全などで死亡例もあり、毎年20名程度が新規患者として報告され、数名が亡くなっている。長い無症状の潜伏期間を経て発症することから、感染初期の臨床診断が困難であり、また、外科的切除が根治的治療法であるため、感染予防にもっとも重点を置く必要がある疾患である。また、犬のエキノコックス症は、犬は終宿主であることから感染しても目立った症状を示さず、感染に気付くことは難

しい。これらのことから、エキノコックス症のヒトおよび伴侶動物である飼犬への最も効果的な対策は感染予防である。また、愛知県を含む本州には終宿主であるホンダギツネ及び中間宿主のハタネズミ等が広範に生息しており、エキノコックスの生活環が維持できる環境であり、本州は北海道と異なり陸続きである点から、エキノコックスが侵淫した場合は、汚染地域の急速な拡大のおそれと共に、排除は極めて困難になると考えられる。

以上のことから、発見地周辺の野犬等のエキノコックス汚染状況を明らかにし、必要な対策を取ることが公衆衛生上極めて重要である。本研究において調査地域を拡大して野犬等のエキノコックス汚染状況把握を行い、その結果を汚染拡大防止策の必要となる地理的範囲と、その方法の検討の基礎資料とする。

### 【材料と方法】

2018年4月～2019年8月の期間に愛知県動物保護管理センター知多支所で捕獲され当所に搬入された野犬及びその他の野生イヌ科動物(キツネ、タヌキ)の糞便 135 検体(野犬:128、キツネ:4、タヌキ:3)および、拡大調査地域として、愛知県動物保護管理センター本所管内の内、発生地域である知多半島と隣接し、野犬が確認されている地域で2019年4月～8月の期間に捕獲され、当所に搬入された野犬の糞便9検体の合計 144 検体を材料とした。調査対象地域は図1のとおり。

(1)－1 虫卵検査(顕微鏡検査):糞便約1gをホルマリン・酢酸エチル法(MGL変法)にて集卵後、光学顕微鏡下で虫卵を検索した。

(1)－2 虫卵検査(遺伝子検査):エキノコックス(多包条虫)虫卵はテニア科条虫の近似種との形態学的判別が困難であるため、顕微鏡検査において疑わしい虫卵を検出した際にはPCR法による虫卵のエキノコックス遺伝子の有無の検索及びPCR増幅産物のシーケンス解析を行った。

集卵した検体から実体顕微鏡下で虫卵10個程度を1.5 mLチューブに採取し、アルカリ熱処理法を用いてDNAを抽出し、12 SrRNA領域約250 bpを増幅する2種類のプライマーセットを用いたnested PCR法<sup>5)</sup>によりテニア科条虫ならびにエキノコックス種特異的DNAの増幅の有無を確認した。増幅産物が得られた検体については、増幅産物の塩基配列のシーケンス解析を実施した。

(2)遺伝子検査:糞便250 μgを採取し、DNA抽出キットのプロトコールに従いDNAを抽出し、PCR法により糞便中のエキノコックス遺伝子の検索を行った。糞便からのDNA抽出にはPowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN)を、PCR試薬はKAPA 2G Robust HS(日本ジェネティクス)を用いた。PCR反応以降の操作は(1)－2と同様に実施した。

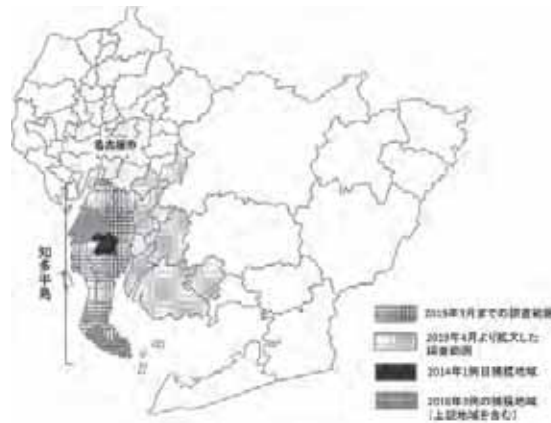


図1 調査対象地域

【結果】

(1) 虫卵検査：144 検体(野犬：137、キツネ：4、タヌキ：3)について検査を実施し、エキノコックス虫卵は検出されなかった。顕微鏡検査において1 検体からテニア科条虫卵が検出された。虫卵の遺伝子検査を行った結果、エキノコックス遺伝子は検出されず、シーケンズ解析によりテニア科の連節条虫と判明した。

また、顕微鏡検査においてマンソン裂頭条虫卵 18 件、犬回虫卵 18 件、犬鞭虫卵 2 件、犬鉤虫卵 1 件、毛細線虫卵 1 件が検出された。虫卵陽性検体数は野犬で 33 件 (24.1%)、キツネで 1 件 (22.5%)、タヌキで 2 件 (66.7%) であった (括弧内は陽性率)。野犬は全て雑種で、その内訳は成犬 46.7%、幼犬(離乳後～生後 90 日以内) 53.3%で、虫卵陽性率は成犬で 20.3%、幼犬で 27.4%であった(表 1)。

(2) 遺伝子検査：144 検体(野犬:137、キツネ:4、タヌキ:3)について検査を実施し、エキノコックス遺伝子は検出されなかった。

表1 寄生虫別虫卵陽性検体数及び陽性率

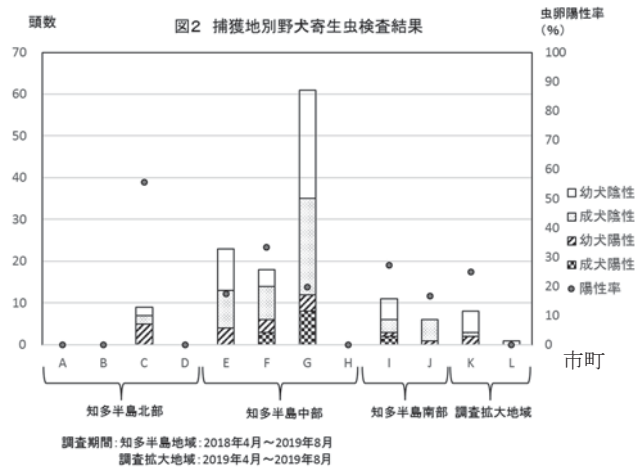
寄生虫	野 犬						キツネ (4検体)		タヌキ (3検体)	
	成犬 (64検体)		幼犬 (73検体)		合計 (137検体)		陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)
	陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)	陽性数	陽性率(%)				
エキノコックス	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
連節条虫	1	1.6	0	0.0	1	0.7	0	0.0	0	0.0
マンソン裂頭条虫	7	10.9	9	12.3	16	11.7	0	0.0	2	66.7
犬回虫	4	6.3	12	16.4	16	11.7	1	25.0	1	33.3
犬鞭虫	2	3.1	0	0.0	2	1.5	0	0.0	0	0.0
犬鉤虫	0	0.0	1	1.4	1	0.7	0	0.0	0	0.0
毛細線虫	0	0.0	1	1.4	1	0.7	0	0.0	0	0.0
延べ検出数	14 <sup>※</sup>	20.3% (13/64)	23 <sup>※</sup>	27.4% (20/73)	37 <sup>※</sup>	24.1% (33/137)	1	22.5% (1/4)	3 <sup>※※</sup>	66.7% (2/3)

※野犬陽性検体3検体(成犬1検体、幼犬2検体)は2種類以上の虫卵を検出

※※タヌキ1検体は2種類の虫卵を検出

(3) 捕獲地別の野犬検体数と虫卵陽性率：図 2 にグラフを示す。成犬と幼犬および、寄生虫卵検出の有無で区別し、1 本の棒グラフがその市町で捕獲された野犬検体数を表す。地域を知多半島北部、中部、南部および調査拡大地域の 4 地域に分けた。北部は検体

数は9件と少なく、検体はC市のみで、C市の虫卵陽性率は55.6%で他市町と比較して高かった。中部はH町は0検体であるが、他3市町の検体数は多く、この地域の検体数が全検体数の7割以上を占めた。調査拡大地域は調査期間が他地域よりも短いので比較は難しいが、仮に調査期間を同一にして計算するとK市はG市に次ぐ検体数であった {8(K市検体数)/5(調査拡大地域調査月数)×17(半島地域調査月数)=27.2}。



### 【考察と今後の課題】

本研究期間内に新たなエキノコックス陽性犬は発見されなかった。野犬、キツネ、タヌキ計144件中36件の糞便検体より6種の寄生虫卵が検出され、この中にはウサギ類を中間宿主とする感染環を持つ連節条虫が含まれていた。連節条虫はウサギ類に加えてエキノコックスと同様にげっ歯類も中間宿主になり得る<sup>6)</sup>。また、調査地域は丘陵地が多く自然豊かで、キツネ、タヌキなどのエキノコックスの終宿主となる野生動物も多く生息しており、本研究の調査期間内にも誤捕獲された4頭のキツネと3頭のタヌキの糞便検体が搬入されており(犬以外は再放逐)、これは当該地域で野犬とキツネ等野生動物の生活圏が隣接していることを裏付けるものであり、これらのことは、当該地区がエキノコックス生活環の維持可能な環境であることを示唆するものである。

エキノコックス症は北海道において1980年代から約10年の間に道内のほぼ全域が流行地になるという急速な分布域の拡大の歴史があるが、これはエキノコックスが好適な終宿主のキタキツネと中間宿主のエゾヤチネズミが揃った自然環境の中に持ち込まれ、急速に分布を広げて定着したためと考えられている<sup>17)</sup>。愛知県ではこれまでに知多半島で4例のエキノコックス陽性犬の発見があり、当該地区は北海道同様エキノコックス定着の可能性が高まっているが、今回の研究結果からも示唆されるとおりエキノコックスの生活環が維持できる環境であることから、汚染地域の急速な拡大及び、排除の難しさが危惧される。今後も本研究

を継続し、結果を蓄積する必要がある。

#### 【引用文献】

- 1) 神谷正男 他 厚生労働科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業 動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究 平成 16 年報告書「犬のエキノコックス症対策ガイドライン 2004」 2004.
- 2) Morishima Y, et al. Jpn J Infect Dis 69: 448-449, 2016.
- 3) Yamamoto N, et al. Jpn J Infect Dis 59: 351-352, 2006.
- 4) 「愛知県知多半島の犬におけるエキノコックス(多包条虫)感染事例について(情報提供)」平成 30 年 3 月 28 日付け 厚生労働省健康局結核感染症課 事務連絡, 2018.
- 5) Dickel A, et al. J Clin Microbiol 36(7):1871-1876, 1998.
- 6) Tenia Infection. the Center for Food Security & Public Health Institute for International Cooperation in Animal Bilogics P1-8, 2005.
- 7) 日本における寄生虫学の研究 7 P275-295, 1999.

#### 【謝辞】

本研究に研究助成をして頂きました公益財団法人 大同生命厚生事業団に深謝いたします。また、本研究にあたり、多大なるご指導をいただきました国立感染症研究所森嶋康之先生、検体採取にあたり、ご協力いただきました愛知県動物保護管理センターはじめ関係機関職員の皆様に深謝いたします。

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
検体安全輸送用ケース (スギヤマゲン/DGP 社 2セット)	56,808 円
電動ピッペッター (ザルトリウス 3台)	92,016 円
糞便処理消耗品	2,430 円
DNA 抽出キット (キアゲン 1箱)	88,074 円
遺伝子検査用試薬 (PCR 試薬等)	60,456 円
振込手数料 (2件)	216 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円