

学 位 論 文 題 名

Molecular Epizootiology of *Blastocystis* Infection in Japan

（日本におけるブラストシスチス *Blastocystis* の分子動物疫学）

学位論文内容の要旨

ブラストシスチス *Blastocystis hominis* は人の消化管に寄生する原虫である。他の哺乳動物や鳥類からも *B. hominis* 様の微生物が見出され、それらは *B. hominis* と形態学的に区別できないことから *Blastocystis* sp. と称され、動物由来株とヒトの *B. hominis* との異同が論議の的になっている。人における疫学調査で動物取り扱い者の感染率が高いことから、人獣共通寄生虫の可能性が示唆されている。さらに、分子生物学的研究により、2 つの動物からの分離株が人由来株とほぼ同じであることが示された。したがって、人への感染の可能性を評価する上で、動物由来 *Blastocystis* を遺伝子レベルで特徴づけることが重要である。

国内の動物における *Blastocystis* の感染状況は明らかではなく、動物由来株と人の *B. hominis* との遺伝子レベルでの解析もほとんど手付かずの状態である。*Blastocystis* が人獣共通寄生性であるか容易に判断できない現在、様々な動物の疫学調査が必要である。また、動物由来株の遺伝子レベルの解析は世界的にも少数についてのみ実施されているに過ぎないので、人の *B. hominis* と動物由来株との異同を解明するためには、両者の系統関係をさらに解明する必要がある。このような観点から本研究では、国内の各種動物における *Blastocystis* の寄生状況を調査するとともに、分離株を分子生物学的手法により解析し、それらの系統分類学的特徴を明らかにした。

まず、西日本の動物疫学調査は、食肉センターで屠殺された牛（調査数：55頭）、豚（61頭）、動物管理センターで保護された犬（54頭）および動物園で飼育された哺乳類（霊長類 13 種 34 頭、草食動物 9 種 33 頭、肉食動物 11 種 25 頭）と鳥類（13 種 26 羽）を対象とした。高い感染率は家畜に見られ、牛で 71% (39/55)、豚で 95% (58/61) だったが、犬からは全く検出されなかった (0% : 0/54)。動物園の動物では、霊長類で 85% (29/34)、キジ類で 80% (8/10)、カモ類で 56% (9/16) だったが、他の肉食動物 (0% : 0/25) と草食動物 (0% : 0/33) からは全く見出されなかった。豚、霊長類および鳥類における本原虫の高い感

染率は世界各地でも報告されているが、牛における感染率はこれまで 15%以下と比較的低いことが知られていた。今回の調査により、国内の牛には本原虫が高率に感染していることが判明した。

次に、今回の調査で動物から分離された株とヒトの *B. hominis* との遺伝学的類似性について検討するために、*B. hominis* を遺伝学的に異なるグループに型別できることが知られている、サブタイプ特異プライマーを用いた PCR 法 (*B. hominis* を 4 つのサブタイプに型別) と小亜粒子リボソーム RNA 遺伝子 (SSUrDNA) をターゲットとした PCR-RFLP 法 (*B. hominis* を 7 つのリボデームに型別) を用いて、動物由来 41 分離株 (牛 10 株、豚 12 株、霊長類 12 株、鳥類 7 株) を解析した。牛、豚および霊長類からの 6 株はサブタイプ 1 に、霊長類からの他の 6 株はサブタイプ 1 の Variant に、牛と豚の他の 3 株はサブタイプ 3 に、そして、鳥類からの 3 株はサブタイプ 4 に相当する株であることが判明した。過去の報告によると、*B. hominis* のサブタイプ 1 と 3 はリボデーム 1 と 2 に各々相当することが知られているが、サブタイプ 1 であることが判明した動物由来 6 分離株の PCR-RFLP パターンはリボデーム 1 のパターンに一致し、サブタイプ 3 に相当した 3 株のそれらはリボデーム 2 のパターンと一致した。霊長類からの他の 3 株のサブタイプは同定できなかったが、それらの PCR-RFLP パターンはリボデーム 6 のパターンに一致していた。一方、各動物からの他の 20 分離株は、1 から 4 のサブタイプ特異プライマーを用いた PCR 法で全て陰性であり、さらに、それらの PCR-RFLP パターンも既に報告されている各リボデームのパターンとは異なっていた。これらのことから国内だけでも様々な変異があることが示された。さらに、動物由来株内には人の *B. hominis* と遺伝学的に類似した株の存在が明らかとなった。これまで鶏とモルモット由来株のみが人獣共通寄生性と報じられてきたが、サブタイプとリボデーム型別により、サブタイプ 1 (リボデーム 1) あるいはサブタイプ 3 (リボデーム 2) に相当した牛、豚および霊長類からの 9 分離株は人獣共通寄生性と考えられ、他の動物種にも人獣共通寄生性の可能性を有するものが存在することを初めて遺伝子レベルで明らかにした。

次に、動物由来株と人の *B. hominis* との異同を解明するために、SSUrDNA のシーケンスデータを基に、両者の系統関係について解析した。解析に際し、サブタイプまたはリボデーム型別された動物由来 19 株 (牛、豚、霊長類、鳥類を含む) の当該領域のシーケンスを明らかにし、それらと GenBank に登録されている人の *B. hominis* および動物由来数株のシーケンスデータ (25 株) を用いて解析した。シーケンスの相同性は比較した 44 株間で 84.7~100%であった。

人の *B. hominis* と動物由来株は 7 つのグループ (Groups I~VII) に分類され、グループ I は人を含む霊長類、家畜 (牛、豚) および鳥類、II は人を含む霊長類、III は人と家畜 (牛、豚)、IV は霊長類、鳥類、齧歯類、V は家畜 (牛、豚)、VI と VII は人と鳥類からの分離株を含み、多くは人獣共通寄生性であることが示唆された。過去の報告によると、異なる宿主間での本原虫の交差伝播が実験的に確認されていることから、これらのグループに分類される動物由来株は、交差感染性を有した株であると推測された。分子系統樹で示された *Blastocystis* の 7 つのグループ (I~VII) は、サブタイプおよびリボデーム型別の結果と相関した。すなわち、グループ I はサブタイプ 1 (リボデーム 1) に、グループ II はリボデーム 6 に、グループ III はサブタイプ 3 (リボデーム 2) に、グループ VI はサブタイプ 4 に、グループ VII はサブタイプ 2 に相当する株で構成された。一方、グループ IV と V は新たなグループであった。

多様な動物種から見出される *Blastocystis* は、ヒトから検出される *B. hominis* と形態学的に区別できないが、分離された動物種、形態的特徴および核型解析などから幾つかの新種が提唱されている。新種として報告された *Blastocystis* の SSUrDNA のシーケンスは明らかではないので、今後の研究が必要である。多くの人と動物由来株が人獣共通寄生性で、異宿主間で容易に交差伝播するならば、宿主名に基づいた種名の提唱は不適切と考えられる。本原虫の分類は分子系統学的解析が現在最も有効であることから、今後より多くのヒトと動物由来株の遺伝子のシーケンス情報が蓄積されることにより、より適切な分類法が確立されるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 神 谷 正 男
副 査 教 授 大 泰 司 紀 之
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 助 教 授 奥 祐 三 郎

学 位 論 文 題 名

Molecular Epizootiology of *Blastocystis* Infection in Japan

(日本におけるブラストシスチス *Blastocystis* の分子動物疫学)

ブラストシスチス *Blastocystis hominis* は人の消化管に寄生する原虫で、他の哺乳動物や鳥類からも *B. hominis* 様の微生物が見出されている。これらは *Blastocystis* sp. と称され、人獣共通寄生虫の可能性が示唆されている。したがって、人への感染の可能性を評価する上で、動物由来 *Blastocystis* を遺伝子レベルで特徴づけることが重要である。国内の動物における *Blastocystis* の感染状況は明らかではなく、動物由来株と人の *B. hominis* との遺伝子レベルも未解明の部分が多い。これらの類縁関係をさらに解明する必要がある。このような観点から申請者は、国内の様々な動物における *Blastocystis* の感染状況を調査するとともに、分子生物学的手法により分離株の類縁関係を明らかにした。

まず、国内の家畜及び動物園動物(哺乳類 33 種、鳥類 13 種)合計 288 個体を調べ、動物園の肉食獣と草食獣からは検出できなかったが、その他の動物からブラストシスチスが検出され、広く分布していることを初めて明らかにした。特に、牛において高度に流行していることを発見した。

次に、これらのブラストシスチス分離株の遺伝的な特徴づけを試み、すでに一部でおこなわれている特異プライマーを用いた PCR 法(サブタイプ分け)と、リボソーム RNA 遺伝子をターゲットとした PCR-RFLP 法(リボデーム分け)を用いて解析した。これらの方法ではカテゴリー分けができない分離株が多く、動物由来株は遺伝的に多様であることを示し、さらに、牛、豚および霊長類由来株の中に、人の *B. hominis* と遺伝学的に類似した株の存在を明らかにした。

さらに、動物由来株と人の *B. hominis* との類縁関係を解明するために、リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列データをもとにこれらの系統関係について解析し、7 グループに分類した。それらの中で、5 グループは人と動物由来株を含むことを示し、動物由来株の多くは人獣共通寄生性であることを示唆した。

以上のように、申請者はブラストシスチスの国内における様々な動物における流行状況、

さらにこれらの調査で得た分離株の遺伝子解析により類縁関係を解明し、ブラストシスチスの動物疫学に関する新たな情報を提供した。よって、審査員一同は申請者、阿部仁一郎氏が博士(獣医学)の学位を受ける資格があるものと認める。