

学 位 論 文 題 名

北海道の野生動物に見られるトリヒナの分類と
トリヒナ症の流行状況

学位論文内容の要旨

トリヒナ症は、現在でも世界中で多くの患者が報告されている人獣共通寄生虫症である。以前は人体トリヒナ症の感染源として豚が重要視されていたが、野生動物にも広く流行していることが明らかとなっている。これに関連して、トリヒナはさまざまな種もしくは遺伝型を含むことが明らかにされてきた。近年、トリヒナの種あるいは遺伝型の同定に有用な multiplex PCR 法が開発され、野外での各トリヒナの世界的な分布が明らかになってきた。国内では 1970-80 年代に野生動物のトリヒナの疫学調査が広く行われたが、当時は数例の感染例が見つかったのみであり、日本の野生動物におけるトリヒナ症の感染率はきわめて低いと考えられた。その後、国内のトリヒナ症の疫学調査はほとんど行われてこなかった。

北海道においても 1980 年代に行われたトリヒナの調査では、キツネ 198 頭およびヒグマ 89 頭を含む野生動物が検査されたが、筋肉トリヒナは検出されなかった。しかし、1999 年になって小樽市でキツネ 43 頭中 5 頭にトリヒナ感染が見つかった（このトリヒナは *T. nativa* として報告されたが、後に *Trichinella* T9 と訂正された）。また同じ頃に、以前に本州から分離されたトリヒナが *Trichinella* T9 として新記載された。これは日本からのみ報告されている種（もしくは遺伝型）である。このようなことから日本におけるトリヒナ症の動物疫学調査を再び行う必要があると考えられた。本研究では北海道の野生動物におけるトリヒナ症の調査を行い、分離されたトリヒナの特徴を生物学的大体および分子生物学的に調べた。

第 I 章では 2000-2006 年に北海道で捕獲された野生のキツネ 319 頭、タヌキ 77 頭、ヒグマ 126 頭、イタチ 4 頭、齧歯類 344 頭および食虫類 27 頭について、ペプシン消化法によって、筋肉トリヒナの検索を行った。その結果、キツネ 44 頭（感染率=13.8%）、タヌキ 6 頭（7.8%）、ヒグマ 4 頭（3.2%）から筋肉トリヒナが検出された。このうちキツネ 41 頭、タヌキ 6 頭は小樽市で、残るキツネ 3 頭は札幌市、士別市および音更町で捕獲されたもので、ヒグマ 4 頭は熊石町 1 頭と赤平市 3 頭であった。小樽市市街地近郊の山林間

の農地を中心に捕獲されたキツネの成獣と札幌市の市街化調整区域で捕獲したキツネの成獣のトリヒナ感染率を比較したところ、小樽市のキツネに有意に高い感染率が認められた(4.5%, 1/22) (χ^2 test, $p < 0.05$)。

小樽市で捕獲したキツネ 206 頭およびタヌキ 66 頭について犬歯のセメント質年輪から宿主の年齢を推定した。宿主の性別、年齢および捕獲年がトリヒナ感染率へ及ぼす影響を調べるためロジスティック回帰分析を行ったところ、キツネでは年齢の上昇に伴いトリヒナ感染率が上昇する事が分かった(オッズ比 = 2.006, 95% 信頼区間 = 1.501-2.681, $p < 0.001$)。一方、タヌキではそのような相関は認められなかった。

得られた筋肉トリヒナを用いて multiplex PCR およびミトコンドリア COI 遺伝子の塩基配列解析による同定を試み、音更町のキツネから得られたトリヒナは *T. nativa*、その他の 5 市町において捕獲されたキツネ 21 頭、タヌキ 2 頭およびヒグマ 4 頭から得られたトリヒナは *Trichinella* T9 と同定された。この結果から北海道東部には *T. nativa*、西部には *Trichinella* T9 という分布が示唆された。

第 II 章では野外におけるトリヒナの感染経路、特にキツネの主たる餌であるエゾヤチネズミの関与の可能性を解明するために、エゾヤチネズミに対するトリヒナの感染実験を試みた。感染には北海道において分離された *T. nativa* および *Trichinella* T9 を用い、コントロールとして *T. spiralis* を使用した。また、比較のためにスナネズミ、マウスおよびラットについても感染を行った。マウスおよびラットでは *T. spiralis* 感染動物から *T. nativa* および *Trichinella* T9 感染と比較し、顕著に多くの筋肉トリヒナが回収されたが、エゾヤチネズミでは 3 種の筋肉トリヒナの寄生虫体数に差は見られなかった。また、エゾヤチネズミの *T. nativa* および *Trichinella* T9 感染ではマウスおよびラットよりも多くの筋肉トリヒナが得られる傾向があった。一般にスナネズミが最も感受性が高いことが示唆され、エゾヤチネズミにも感染することが明らかとなった。さらに、感染エゾヤチネズミより得られた筋肉トリヒナをスナネズミに実験感染させたところ、その感染能が確認された。第 I 章のエゾヤチネズミ 217 頭の調査ではトリヒナは検出されなかったが、この感染実験によりエゾヤチネズミがキツネへの感染源となる可能性があることが示された。

トリヒナは異なる種同士の交雑が可能であることが知られており、野外における自然交雑個体も報告されている。また一つの宿主に複数種のトリヒナが同時感染している例も数多く知られている。第 III 章では *T. nativa* と *Trichinella* T9 を用いて交雑感染実験を行い、*T. nativa* ♀ vs. *Trichinella* T9 ♂ の組み合わせの時にのみ両種の F1 交雑個体が出来ることを示した。しかし交雑群の筋肉トリヒナ数はコントロール群に比べ有意に少なく、筋肉トリヒナの体長はコントロール群に比べ有意に短いことが示された。また、コントロール群の筋肉トリヒナの性構成は雄の比率が 39.5 - 50.0%であったのに対

し、交雑群では 98-100%が雄で、F2 世代が出来ないことが示唆された。

現在知られているトリヒナの同定方法では F1 交雑個体を鑑別することは出来ないため、PCR-RFLP 法による交雑個体検出法の開発を試みた。*T. nativa* および *Trichinella* T9 の核 DNA の ITS2 領域を増幅する共通プライマーを作成し、*T. nativa* および *Trichinella* T9 の ITS2 領域の塩基配列を決定した後、両種で異なる切断パターンを示す制限酵素 Apo I を用い PCR-RFLP を試みた。まず *T. nativa*、*Trichinella* T9 および両種の抽出 DNA を混合したものを PCR で増幅したところいずれも 400bp 付近に単一のバンドが見られ、この PCR 産物の制限酵素 Apo I 処理では *T. nativa* では 3 本 (65bp, 153bp, 179bp)、*Trichinella* T9 では 2 本 (179bp, 219bp) のバンドが見られた。しかし、両種の抽出 DNA を混合したものと F1 交雑個体の DNA を用いて PCR-RFLP を行ったところ、*Trichinella* T9 のパターンのみ検出され、雌親 (*T. nativa*) 由来の核 DNA が検出できなかった。この PCR-RFLP の改善の必要性はあるものの、雄親 (*Trichinella* T9) の核 DNA が F1 に引き継がれていることは確認された。さらに、F1 交雑個体のミトコンドリア COI 遺伝子の塩基配列解析では、*T. nativa* の COI 遺伝子を保有することが確認された。このように、PCR-RFLP 法による F1 交雑個体の検出法の開発は出来なかったが、今回作出した F1 交雑個体が、*T. nativa* と *Trichinella* T9 の両方の遺伝子を持つ交雑個体であることは確認できた。

第 IV 章では 1968 年に札幌市円山動物園のホッキョクグマ (スカンジナビア半島産) から分離された *Trichinella* sp. を用い、このトリヒナの分子生物学的および生物学的な解析を行い、北海道に分布する *T. nativa* (音更) との近縁関係について考察した。まず、Multiplex PCR によりこの虫体は *T. nativa* であることが判明した (以下 *T. nativa* (札幌 1968) と呼ぶ)。この *T. nativa* (札幌 1968)、北海道産の *T. nativa* (音更) および他のトリヒナ種について GenBank のデータも含めて詳細に比較したところ、*T. nativa* (札幌 1968) が北欧の *T. nativa* より *T. nativa* (音更) に近いことが示唆された。さらに、両者の交雑実験では正常に F1 が作出された。これらの結果をもとにホッキョクグマの感染経路について考察した。

以上のように、本研究では、北海道の野生動物から検出されたトリヒナの分類学的位置を、遺伝子解析と寄生虫の交雑実験から明らかにし、また、その流行状況を解明し、その感染経路を考察した。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	奥	祐三郎
副 査	教 授	片 倉	賢
副 査	教 授	高 島	郁 夫
副 査	助教授	鈴 木	正 嗣

学 位 論 文 題 名

北海道の野生動物に見られるトリヒナの分類と

トリヒナ症の流行状況

トリヒナ症は公衆衛生上重要な人獣共通寄生虫症で、人の感染源として豚が重要視されていた。しかし、トリヒナの分子生物学的解析が発達し、これを用いた動物疫学調査や生物学的特徴の研究がなされ、様々な種が含まれることが知られるようになった。特に、ほとんどの種が野生動物において広く流行していることが明らかになってきた。国内における人の集団発生に関連して行われた 1970-80 年代の調査で、野生動物におけるトリヒナの感染率はきわめて低いと考えられた。しかし、1999 年になって北海道でトリヒナが流行していることが示唆され、より大規模な動物疫学調査とトリヒナの分子生物学解析が必要と考えられた。

そこで、申請者は動物疫学調査として 2000-2006 年に北海道において捕獲されたキツネ 319 頭、タヌキ 77 頭、ヒグマ 126 頭、イタチ 4 頭、齧歯類 344 頭および食虫類 27 頭について、ペプシン消化法によって筋肉トリヒナの検索を行った。その結果、キツネ(感染率=13.8%)、タヌキ(7.8%)、ヒグマ(3.2%)から筋肉トリヒナが検出され、キツネでは年齢に伴いトリヒナ感染率が上昇する事が示された。また、キツネの感染率における顕著な地域差が認められ、山林間の農地が主である小樽市では感染率が高く、市街化調整区域が主である札幌市では感染率が低かった。

北海道のトリヒナの分子生物学的解析のために、上記の調査で検出された筋肉トリヒナを用いて multiplex PCR およびミトコンドリア COI 遺伝子の塩基配列を解析したところ、音更町のキツネ 1 頭から得られたトリヒナは *Trichinella nativa*、その他の 5 市町において捕獲されたキツネ 21 頭、タヌキ 2 頭およびヒグマ 4 頭から得られたトリヒナは *Trichinella* T9 と同定された。

これらのトリヒナの伝播におけるキツネの重要な餌である齧歯類の関与の可能性を検討するために、野ネズミの調査を行ったが、筋肉トリヒナは検出されなかった。一方、北海道において分離された *T. nativa* および *Trichinella* T9 を用いた感染実験では、エゾヤチネズミがこれらのトリヒナに対し高い感受性を有している事が示された。

なお、国外において別種のトリヒナが野外において交雑することが報告されているが、北海道で分離された *T. nativa* と *Trichinella* T9 を用いて交雑の可能性について調べた。すなわち、両トリヒナの交雑実験を行い、*T. nativa* ♀ vs. *Trichinella* T9 ♂ の組み合わせ時にのみ両種の F1 交雑個体が産出されることを示した。しかし、交雑群の筋肉トリヒナ数はコントロール群(同種感染群)に比べ少なく、また筋肉トリヒナの体長はコントロール群に比べ小さいことが示された。さらに、コントロール群の筋肉トリヒナの雄の比率が 36-50%であったのに対し、交雑群では 98-100%であった。これらの結果は F2 世代が産出困難であること示唆し、*T. nativa* と *Trichinella* T9 は生殖隔離されていると考えられた。

これらの交雑トリヒナ検出のために、*T. nativa* および *Trichinella* T9 の ITS2 領域を増幅し、制限酵素を用いた PCR-RFLP を試みた。プライマーが適切でなかった為と予想されるが、PCR-RFLP 法による F1 交雑個体の検出法の開発は出来なかった。しかし、ミトコンドリア COI 遺伝子の解析結果も含めて、今回作出した F1 交雑個体が、*T. nativa* と *Trichinella* T9 の両方の遺伝子を持つ交雑個体であることは確認された。

最後に、1968 年に札幌市円山動物園のホッキョクグマ(スカンジナビア半島産)から分離された *Trichinella* sp. と北海道に分布するトリヒナとの近縁関係について検討した。multiplex PCR によりホッキョクグマの虫体は *T. nativa* であることを解明した(以下 *T. nativa*(札幌))。この *T. nativa*(札幌)、前述の *T. nativa*(音更)および他のトリヒナ種について詳細に比較したところ、*T. nativa*(札幌)が北欧の *T. nativa* より *T. nativa*(音更)に近いことが示唆された。また、*T. nativa*(札幌)と *T. nativa*(音更)の交雑実験では正常に F1 が産出された。これらの結果をもとに円山動物園のホッキョクグマの感染経路について考察した。

以上、申請者は北海道における野生肉食獣のトリヒナ症の流行状況調査と分子生物学的な解析から新知見を得て、我が国におけるトリヒナ症の基礎情報を提供した。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者金井祐太の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。