

学 位 論 文 題 名

Studies on controlling *Echinococcus multilocularis*
infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hokkaido, Japan

(北海道におけるキツネ多包条虫症のコントロールに関する研究)

学位論文内容の要旨

多包条虫 *Echinococcus multilocularis* は北半球に広く分布しており、自然界ではキツネ（アカギツネ *Vulpes vulpes*）などの野生イヌ科動物（終宿主）と野ネズミ類（中間宿主）の間で生活環が維持されている。本寄生虫は人に重篤な疾患（多包虫症）を引き起こす人獣共通寄生虫であり、世界的規模で深刻な被害をもたらしている。北海道では、過去 20 年間で多包条虫の分布地域の拡大とキツネにおける感染率の上昇が認められ、人への感染リスクの上昇や本州への汚染地拡大が懸念されており、その流行の早急なコントロールが望まれている。

本研究では、キツネの多包条虫感染の有用なコントロール法として期待される駆虫薬ベイト散布法とベイト散布プログラムの立案において重要な基礎知見となる北海道のキツネの個体群構造について解析を行った。

第 I 章：テトラサイクリン（バイオマーカー）を利用した駆虫薬ベイト散布効果の評価

近年、プラジカンテル（条虫および吸虫に駆虫効果を示す）入りの餌（ベイト）の野外散布によってキツネの多包条虫感染をコントロールする試みが行われている。これまでに報告されている駆虫薬ベイト散布試験では、キツネ個体群における多包条虫感染率の低下が観察された。しかし、個々のキツネによるベイト摂取は評価されておらず、個体群のベイト摂取率や個体を対象としたベイト摂取と寄生虫感染の関係については解析されていない。これらの情報は、駆虫薬ベイト散布法の有効性の検討および効果的な散布プログラムの立案のために不可欠である。そこで、本研究では、硬組織に沈着し蛍光を発する性質からバイオマーカーとして汎用されるテトラサイクリン（TC）を添加した駆虫薬ベイトの使用によって個々のキツネのベイト摂取の評価を行い、キツネ個体レベルでの駆虫薬ベイト散布効果の解析を試みた。

調査地は小樽市中西部の約 110km² の地域とし、2001 年から 2004 年までの積雪のない 5-11 月に各年 2-7 回駆虫薬ベイトの散布を行った。ベイト散布は道路沿いに 1 km あたり 20

個の間隔で自動車から行った。効果の評価には、散布前の2年間を含む1999年から2004年の5-9月に捕獲されたキツネ、合計440頭の検体を使用した。

キツネの犬歯におけるTC標識検査の結果、39% (77/195) で捕獲年におけるTC標識が認められ、これらのキツネがベイトを摂取したことが示唆された。また、幼獣（当歳個体）におけるTC標識陽性率（56%, 49/87）は成獣のそれ（26%, 28/108）にくらべ有意に高く、感染虫体数が多いため多包条虫の伝播サイクルに重要と考えられている幼獣により効率的にベイト摂取されていることが示唆された。

捕獲年のTC標識陽性キツネ77頭のうち、70頭（91%）で多包条虫の感染が剖検で認められなかった。同様に、ベイト摂取による駆虫効果の第2指標種として調査した吸虫アラリアは、76頭（99%）で検出されなかった。各年におけるTC標識陽性群の寄生虫感染率（多包条虫：0-15%, アラリア：0-4%）は非標識群（多包条虫：18-43%, アラリア：18-38%）にくらべ有意に低く、キツネがベイト摂取により効果的に駆虫されていることが示唆された。一方で、TC標識群における多包条虫感染（9%, 7/77）はベイト摂取後の感染/再感染を意味するものであり、駆虫薬ベイトの頻回散布の重要性が示唆された。

調査地域におけるキツネ個体群全体の多包条虫感染率は、ベイト散布前（1999年-2000年）の58%（88/153）から、散布4年目（2004年）の11%（5/45）にまで減少がみられた。散布4年目ではTC非標識群における多包条虫感染率も18%（4/22）と低く、長期間の散布によってこの地域における感染圧が低下したことが示唆された。

以上から、駆虫薬ベイト散布の有効性がキツネ個体レベルで確認されるとともに、効果的な散布プログラムの立案のためにTCを利用したベイト摂取の解析が有用であることが示された。

第II章：ミトコンドリアDNAによる北日本のキツネ集団の遺伝学的構造の解析

駆虫薬ベイト散布プログラムを計画する際、北海道内におけるキツネの地域分集団の存在や移動・分散パターンを把握することが必要と考えられる。また、北海道から本州への多包条虫感染キツネの移入を監視する上で、北海道と本州のキツネを判別することは重要である。日本のキツネは津軽海峡（ブラキストン線）を境にキタキツネ *V. v. shrencki* とホンドキツネ *V. v. japonica* の2亜種に分類されているが、遺伝子情報を用いた系統解析はこれまでに行われていない。そこで、本研究では、主に北海道と青森県のキツネについてミトコンドリアDNA（mtDNA）塩基配列を用いて系統地理学的解析を行い、北海道内のキツネの個体群構造および北海道産キツネと本州産キツネの遺伝学的差異について検討した。

使用した検体は北海道56頭、本州28頭（青森23、秋田1、神奈川4）、九州1頭（宮崎）、ロシア沿海州3頭で、まずチトクロームb遺伝子（cyt b）の375 bpとコントロール領域の

397bp の部分塩基配列を決定し解析した。cyt *b* については既報告のヨーロッパ産キツネの配列も解析に用いた。さらに、検出されたハプロタイプ間の系統関係を詳細に検討するため、各ハプロタイプ 1 検体について cyt *b* からコントロール領域の 1672 bp の配列を決定し、解析を行った。

系統樹解析の結果、検出された mtDNA ハプロタイプは大きく 2 群（グループ I, II）に分かれ、両グループ間では cyt *b* で 2.7%、コントロール領域で 3.1%の塩基置換が認められた。グループ I には、北海道のハプロタイプに加え、本州、九州、沿海州およびヨーロッパで検出されたハプロタイプも含まれたが、グループ II は北海道のみで検出された。また、グループ I 内において、北海道のハプロタイプはさらに 2 つのサブグループ（Ia, Ib）に分かれた。分類された 3 グループ（Ia, Ib, II）は北海道内において混在して分布しており、明瞭な分集団構造は認められなかった。

一方、本州・九州のハプロタイプは、他のグループ I のそれとは別に 1 群を形成し、両者の間には cyt *b* で 1.0%、コントロール領域で 2.6%の塩基置換が認められた。このことから、北海道と本州のキツネ集団が異なる遺伝学的背景をもっており、mtDNA 塩基配列により判別できる可能性が示唆された。

今回の解析では北海道内におけるキツネの分集団構造は認められなかった。より多型性の遺伝子マーカーを用いたさらなる解析が必要ではあるが、分集団構造の欠如は北海道全域におけるキツネの交流および移動を示唆する。解析に用いた mtDNA は母系遺伝であるため、世代を経たオス個体の移動は反映されない。オスの分散距離はメスよりも長いことが知られており、オスの移動が反映される核 DNA の解析ではさらに分集団構造が不明瞭になることが推測される。駆虫薬ベイト散布の実施にあたっては、感染ギツネの移入を考慮する必要がある、継続的な散布の重要性が今回のキツネの遺伝学的な解析からも示唆された。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

Studies on controlling *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hokkaido, Japan

(北海道におけるキツネ多包条虫症のコントロールに関する研究)

多包条虫は人に重篤な多包虫症を引き起こす人獣共通寄生虫で、北海道では主にキツネと野ネズミ類の間で生活環が維持されている。近年、北海道における分布地域の拡大とキツネにおける感染率の上昇が認められ、人への感染リスクの上昇や本州への汚染地拡大が危惧されており、早急なコントロールが望まれている。

本研究は、多包条虫のコントロール法として期待される駆虫薬入りの餌(ベイト)散布法に注目し、北海道におけるベイト散布プログラムの立案に関する基礎的知見を得ることを目的として、キツネの駆虫薬ベイトの摂取状況と駆虫効果を調べるとともに、北海道のキツネの個体群構造について解析を行ったものである。

まず、駆虫薬(ブラジカンテル)入りベイトにバイオマーカーとしてテトラサイクリン(TC)を添加したベイトを使用して、個々のキツネのベイト摂取状況と、キツネ個体レベルの多包条虫の感染状況を解析した。調査地として小樽市を選定し、2001年から2004年までの4年間道路沿いに駆虫薬入りベイトを散布し、散布前の2年間を含む1999年から2004年に捕獲されたキツネ、合計440頭を剖検した。その結果、調査地域におけるキツネ個体群の多包条虫感染率は、ベイト散布4年目までに顕著に減少し、長期間の散布によってこの地域における感染圧が低下したことが示された。

キツネの犬歯を検査したところ、捕獲キツネの39%においてベイト摂取を表すTCの沈着が認められたが、特に幼獣が効率的にベイトを摂取していることが示された。さらに、TC沈着陽性のキツネでは多包条虫およびアラリア(吸虫)の感染率は低く、摂取したベイトに含まれる駆虫薬によって効果的に駆虫されていることが示された。しかし、一部のTC標識個体においても多包条虫感染が認められたことは、ベイト摂取後の感染/再感染を示唆するものであり、駆虫薬ベイトの頻回散布の必要性が考えられた。

駆虫薬ベイト散布プログラムを計画するにあたり、北海道内におけるキツネの地域分集団の存在や移動・分散パターンを把握することが必要である。また、北海道から本州へ

の多包条虫感染キツネの移入を監視する上で、北海道と本州のキツネを判別することは重要である。日本のキツネはブラキストン線を境にキタキツネ *Vulpes vulpes shrenckii* とホンドキツネ *V. v. japonica* の2亜種に分類されているが、遺伝子情報を用いた系統解析はこれまでに行われていなかった。そこで、北海道と本州(主に青森県)のキツネについてミトコンドリア DNA(mtDNA)塩基配列を用いて系統地理学的解析を行い、北海道内のキツネの個体群構造および北海道産と本州産キツネの遺伝学的差異について検討した。チトクローム *b* 遺伝子とコントロール領域の部分塩基配列を解析した結果、mtDNA ハプロタイプは大きく2群(グループ I, II)に分かれた。グループ I には北海道、本州、九州、沿海州およびヨーロッパで検出されたハプロタイプが含まれたが、グループ II は北海道のキツネのみから検出された。グループ I の北海道のハプロタイプはさらに2つのサブグループ(Ia, Ib)に分かれた。北海道内のキツネから検出された3グループ(Ia, Ib, II)は北海道内で混在して分布しており、明瞭な分集団構造は認められなかった。この分集団構造の欠如は北海道内全域におけるキツネの交流および移動を示唆しているものと考えられた。一方、本州・九州のハプロタイプは、北海道のキツネとは離れた1群を形成したことから、北海道と本州のキツネ集団が異なる遺伝学的背景をもっており、mtDNA 塩基配列により両集団を判別できる可能性が示唆された。

以上、申請者は、多包条虫のコントロール法である駆虫薬ベイト散布法およびキツネの個体群について検討し、駆虫薬ベイト散布の有効性をキツネ個体レベルで確認するとともに、効果的な散布プログラムの立案のために TC を利用したベイト摂取の解析が有用であること、また、感染ギツネの移入を考慮したうえでの継続的な散布の重要性を明らかにした。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者井上貴史の博士論文は、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。