

博士（獣医学） アルムア フエルナンデズ マリア テレサ

学位論文題名

Development of molecular diagnostic tools
for canine taeniosis

(犬のテニア科条虫症に対する分子生物学的診断法の開発)

学位論文内容の要旨

テニア科に分類されるテニア属とエキノコックス属条虫は家畜に大きな被害を与えていているのみならず、人獣共通寄生虫として重要である。イヌ科動物はしばしば複数種のテニア科条虫に感染し糞便中に虫卵を排泄する。そのため、テニア科条虫感染症の予防・制圧には、終宿主としてのイヌ科動物における感染状況を把握する必要がある。しかし、テニア科条虫の虫卵を形態学的に種レベルで鑑別診断することは困難である。そこで本研究では、イヌ科動物を終宿主とするテニア科条虫の種レベルでの分子生物学的診断法の開発を目的として、ミトコンドリアのNADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*)遺伝子を標的とした寄生虫種特異的オリゴスクレオチドプローブ(species-specific oligonucleotide probe: S-SONP)を設計し、PCRドットプロットハイブリザイゼーション(PCR/dot blot)法とPCRリバースラインプロットハイブリザイゼーション(PCR/RLB)法の2つのDNA診断法を開発した。

まず、テニア科条虫の*nad1*遺伝子をPCR増幅するために、GenBankに登録されているテニア科条虫の同遺伝子の配列をアライメントし、保存されている塩基配列からPCRプライマー(*nad1T-Fw*と*nad1T-Rv*)を設計した。これを用いて、世界各地で採取され、形態学的に*Echinococcus canadiensis*、*E. granulosus* (genotype 1)、*E. multilocularis*、*E. vogeli*、*T. crassiceps*、*T. hydatigena*、*T. multiceps*、*T. ovis*、および*Taenia taeniaeformis*と同定されたテニア科条虫ならびに*Dipylidium caninum*、*Mesocestoides vogae*と同定されたテニア科以外の条虫の成虫または幼虫から抽出したgenomic DNA (gDNA)をテンプレートにPCRを行なった。その結果、全てのサンプルで*nad1*遺伝子の特異的な増幅が確認され、検出可能なgDNAの最低量は5 pgであった。虫卵1個に含まれるgDNAは約8 pgであることから、*nad1T-Fw*と*nad1T-Rv*プライマーを用いたPCR法は高感度であることが示された。

次に、*E. canadiensis*以外の上記テニア科条虫について、*nad1*遺伝子の多型が認められる領域から8つの種にそれぞれ特異的なS-SONPを設計し、digoxigeninで標識したのち、PCR/dot blot法を実施した。その結果、各S-SONPはそれぞれの標的となる条虫種に由来するPCR産物を特異的に検出することができた。さらに本法を野外サンプルの診断に応用するため、ザンビア共和国で採取した49頭のイヌの糞便からショ糖浮遊法で回収したテニア科条虫卵についてgDNAを抽出し、PCR/dot

blot解析を行なった。その結果、42頭は*T. hydatigena* に、3頭は*T. multiceps*に、そして4頭は両種に混合感染していたことが明らかとなつた。

PCR/RLB法では、メンブランに吸着させた複数のS-SONPにビオチン化したPCR産物をハイブリダイズさせるため、陽性コントロールとしてPCR産物を共通に認識するプローブが必要となる。そこで、上述の8つのS-SONPに加えて、条虫類一般の*nad1*遺伝子を共通に認識するオリゴヌクレオチドプローブ(ONP)とエキノコックス属*nad1*遺伝子を共通に認識するONPを設計し、PCR/RLBを行なつた。その結果、条虫類共通ONPは用いた全ての条虫に由来するPCR産物を、エキノコックス属特異的ONPは用いた全てのエキノコックス属条虫に由来するPCR産物を検出した。また、8つのS-SONPは標的とするテニア科条虫種に由来するそれぞれのPCR産物を特異的に検出することができた。

以上、本研究で開発したテニア科条虫の*nad1*遺伝子を標的としたPCR/dot blot法とPCR/RLB法は、8種のテニア科条虫を種レベルで特異的に鑑別することが可能であった。また、PCR/dot blot法はテニア科条虫のゲノムDNAや虫卵由来DNAを高感度に検出することが可能であり、さらに、テニア科条虫2種の混合感染も検出することができた。今後、糞便から抽出したDNAを用いた検討が必要ではあるが、両診断法はDNAシークエンサーを用いなくとも実施が可能であり、テニア科条虫感染症が蔓延する発展途上国の検査機関などにおける活用が期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　片　倉　　賢

副　査　教　授　杉　本　千　尋

副　査　教　授　奥　　祐三郎（鳥取大学）

副　査　准教授　野　中　成　晃（宮崎大学）

学　位　論　文　題　名

Development of molecular diagnostic tools for canine taeniosis

(犬のテニア科条虫症に対する分子生物学的診断法の開発)

テニア科に分類されるテニア属とエキノコックス属条虫は家畜に大きな被害を与えておりのみならず、人獣共通寄生虫として重要である。イヌ科動物はしばしば複数種のテニア科条虫に感染し、糞便中に家畜や人への感染源となる虫卵を排泄する。そのため、テニア科条虫感染症の予防・制圧には、終宿主としてのイヌ科動物における感染状況を把握する必要がある。しかし、終宿主生体検査法である虫卵検査において、テニア科条虫の虫卵を形態学的に種レベルで鑑別診断することは困難である。そこで本研究では、イヌ科動物を終宿主とするテニア科条虫の種レベルでの分子生物学的診断法の開発を目的として、ミトコンドリアのNADH dehydrogenase subunit 1(*nad1*)遺伝子を標的とした寄生虫種特異的オリゴヌクレオチドプローブ(species-specific oligonucleotide probe: S-SONP)を設計し、PCR ドットプロットハイブリダイゼーション(PCR/dot blot)法とPCRリバースラインプロットハイブリダイゼーション(PCR/RLB)法の2つのDNA診断法を開発した。

まず、テニア科条虫の*nad1*遺伝子をPCR増幅するために、GenBankに登録されているテニア科条虫の同遺伝子の配列をアライメントし、保存されている塩基配列からPCRプライマー(*nad1T-Fw*と*nad1T-Rv*)を設計した。これを用いて、世界各地で採取され、形態学/遺伝学的に *Echinococcus canadensis*、*E. granulosus*、*E. multilocularis*、*E. vogeli*、*Taenia crassiceps*、*T. hydatigena*、*T. multiceps*、*T. ovis*、および*T. taeniaeformis*と同定されたテニア科条虫ならびに *Dipylidium caninum*、*Mesocestoides vogae*と同定されたテニア科以外の条虫の成虫または幼虫から抽出したgenomic DNA (gDNA)をテンプレートにPCRを行なった。その結果、全てのサンプルで*nad1*遺伝子の特異的な増幅が確認され、検出可能なテンプレートDNAの最低量は5 pgであった。この量は虫卵1個に含まれるgDNA量よりはるかに少ないことから、*nad1T-Fw*と*nad1T-Rv* プライマーを用いたPCR法は高感度であることが示された。

次に、*E. canadensis*以外の上記テニア科条虫について、*nad1*遺伝子の多型が認められる領域から8つの種にそれぞれ特異的なS-SONPを設計し、digoxigeninで標識したのち、PCR/dot blot法を実施した。その結果、各S-SONPはそれぞれの標的となる条虫種に由来するPCR産物を特異的に検出することができた。さらに本法を野外サンプルの診断に応用するため、ザンビア共和国で採取した49頭のイヌの糞便からショ糖浮遊法で回収したテニア科条虫卵(5-10個)についてgDNAを抽出し、PCR/dot blot解析を行なった。その結果、46頭が*T. hydatigena*に、7頭が*T. multiceps*に感染しており、そのうちの4頭は両種に混合感染していたことが明らかとなつた。

PCR/RLB法では、メンブレンに吸着させた複数のS-SONPにビオチン化したPCR産物をハイブリダイズさせるため、陽性コントロールとしてPCR産物を共通に認識するプローブが必要となる。そこで、上述の8つのS-SONPに加えて、条虫類一般の*nad1*遺伝子を共通に認識するオリゴヌクレオチドプローブ(ONP)とエキノコックス属*nad1*遺伝子を共通に認識するONPを設計し、PCR/RLBを行なった。その結果、条虫類共通ONPは用いた全ての条虫に由来するPCR産物を、エキノコックス属特異的ONPは用いた全てのエキノコックス属条虫に由来するPCR産物を検出した。また、8つのS-SONPは標的とするテニア科条虫種に由来するそれぞれのPCR産物を特異的に検出することができた。

以上、本研究で開発したテニア科条虫の*nad1*遺伝子を標的としたPCR/dot blot法とPCR/RLB法は、8種のテニア科条虫を種レベルで特異的に鑑別することを可能とするものであり、DNAシークエンサーを用いなくとも実施が可能であることから、テニア科条虫感染症が蔓延する発展途上国における活用が期待される。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者アルムア・フェルナンデス・マリア・テレサ君の博士論文は、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。