

(尿酸塩)が認められ、その周囲においてマクロファージおよび偽好酸球の浸潤による痛風結節が認められた。尿細管においては上皮の壊死、脱落が認められた。心臓周囲において、マクロファージ、偽好酸球、リンパ球および形質細胞の浸潤が認められ、心臓周囲において偽好酸球、リンパ球および形質細胞の浸潤(無結節性痛風)が認められた。

4) 腫瘍

動物園で長期飼育された2例において悪性腫瘍(腺胃腺癌、由来不明の癌)が認められた。1例は雄の成鳥のアメリカワシミミズク(No. 155)であり、高齢で、消瘦しており、剖検時の肉眼検査においては、肝臓、腺胃、筋胃などの臓器漿膜表面および腹壁腹膜は黄白色顆粒状を呈し、肥厚しており、肝臓は腹壁と高度に癒着していた。組織学的には、腺胃の粘膜固有層から筋層において、腫瘍細胞の不規則な管腔状増殖が認められた。腫瘍細胞は、円形の局在した核と、弱好酸性で円柱状の豊富な細胞質を有する良く分化したものも多数認められたが、大型・多形を示す核と立方状から扁平な細胞質を有する異型を有するものも認められた。腫瘍が腺胃表面から発生していることから腺胃上皮由来であることが示された。

雌のオナガフクロウの1例(No. 164)で、剖検時の肉眼検査において、胸骨の内側において小豆大の腫瘤が認められ、これにより胸部が圧迫されていた。組織学的には、胸壁漿膜下において、骨組織にて区画された腫瘍細胞は、中央に管隙を形成しつつ、胞巣状の増殖を示していた。病巣の中央部は、広範囲の壊死が認められた。腫瘍細胞は卵円形の核と淡明で豊富な細胞質を有していた。腫瘍細胞は、その核においては大小不同が高度に認められ、分裂像は散見され、胸壁に向かって浸潤性の増殖を示すなど、高度な悪性度を有していた。サイトケラチン、ビメンチン、S-100、デスミンそれぞれに対する一次抗体を用いて、免疫組織化学的検索を行

ったところ、いずれも陰性であった。しかし、HE染色標本にて、腫瘍細胞が互いに接着性を有し、胞巣状の増殖を示していたことから、上皮性の腫瘍であることが疑われ、異型性が高度であった点から、由来不明の癌が疑われた。

D. 考察

今回の調査では、死因としてもっとも多くみられたものは、外傷に起因したものであった。これは、海外における過去の報告(Morishitaら, 1998; Deemら, 1998; Michelle D. Wendellら, 2002)と同様である。Michelle D. Wendellら(2002)の報告では、猛禽類の外傷の原因としては、人間と関連のあるものが多いとされているが、今回の研究では、負傷した猛禽類の発見時の記載に乏しかったため、外傷の原因の特定はできなかった。

消化器官において寄生虫の寄生が認められた個体のほとんど(89.1%)が野生個体であった。その多くは寄生虫に対する炎症反応は認められず、臨床的には問題なかったと考えられるが、一部においては、消化管壁を貫通し、消化管漿膜位における、寄生虫性肉芽腫の形成が認められた。これは寄生虫による消化管壁の穿孔を示しており、寄生虫穿孔性の腹膜炎を惹き起こしたり、重度の症例では、敗血症に至る可能性を示唆する。今回の研究では寄生虫の同定を行っていないため、今回多くの検体でみられた寄生虫が同一のものか、別のものであるのかは確定できず、そのため、どの寄生虫も穿孔性腹膜炎を起こす可能性を有するかどうかは不明である。今後の研究では、穿孔性腹膜炎を示した寄生虫に対して、より詳細な形態学的検査または分子生物学的検査による種の同定が必要である。しかし、種に関わらず、駆虫薬は同様であるため、臨床的には種の鑑別は重要でなく、保護した個体に対しては、必要に応じて駆虫しておくべきかも知れない。

肝臓に壊死や肉芽腫の形成が認められた個

体 64 例中, 30 例 (46. 9%) において, 消化管内, 腎臓, 肝臓および体腔内において寄生虫の寄生が認められた。このことから, 寄生虫が肝臓に障害を与えることが示唆された。過去の報告では, Broad-winged hawk の肝臓において, *Cyathostoma* spp. に典型的な化膿性肉芽腫病巣の形成が認められている。(Respiratory Nematodiasis in Raptors in Quebec) 呼吸器の寄生虫や, 住肉胞子虫など, 経口的に感染する多くの寄生虫は, 消化管内で孵化後, 消化管壁を貫通し, 血行性に標的臓器へ到達する。よって, 寄生虫はまず, 門脈を介して肝臓に達する。そのため, 肝臓において, 肉芽腫や壊死巣が形成されたのかもしれない。肺肉芽腫の形成はグリソン氏鞘周囲にて頻繁にみられたことや, 肝臓の肉芽腫や壊死巣に対するグラム染色にて細菌が検出されなかったことも, この考えを支持するかもしれない。また, 寄生虫の種の同定は行っていないが, 1 例のツミの肝臓において線虫の多数寄生が認められた。しかし, 肝臓の肉芽腫や壊死巣に対する PAS 染色にて, 虫体やそれに類した残骸などが検出されなかったことから, 虫体や虫卵そのものが肝臓病変を形成したとは考えられず, 消化管から吸収された毒物が肝細胞に影響を及ぼしたことは否定できないため, 今回の研究からは, 肝臓病変と寄生虫の関連性を明らかにすることはできなかった。

今回, 15 例において肺出血が認められた。肺出血の原因としては, 外傷, 炎症, 重度の充血, 急性感染症, 寄生虫寄生が挙げられる。そのうち 10 例において, 骨折が見られ, 2 例においては, 胸腹腔内出血といった外傷が示唆される病変を有していた。さらに, オジロシの 1 例は, ホルマリン固定材料のみが当研究室に送付されたものであり, 肉眼所見の添付がなかった。また, 組織検査においては, 肺出血以外の外傷を示唆する病変も認められなかった。このため, 組織学的には骨折を含めた外傷があ

ったかどうかは不明であるが, 風車に激突して死亡したという目撃情報があり, このことから外傷があったことは明らかである。トビの 1 例 (No. 105) においては, 組織学的に, 肺出血に加え, 心臓周囲における新鮮出血や心筋の新鮮な壊死がみられたことから, 外傷があったことが示唆された。1 例のフクロウにおいては, 広範囲な肺出血以外にも, 肺において骨片や肉片が認められ, 壊死および細菌の増殖がみられた。また, 組織学的に胸筋において, 変性および壊死が認められたことから, 外傷性化膿性肺炎と診断された。

以上のことから, 15 例にみられた肺出血は, すべて外傷により起こったものであると考えられた。

5 例において, 肺に線虫の寄生が認められた。今回は種の同定は行っていないが, *Serratospiculum* sp. がもっともよくみられる種であり, prairie falcon で多くみられ (Bigland et al ら, 1964; Ward and Fairchild, 1972; Croft and Kingston, 1975), その他の種にも感染するといわれている。(Kocan and Gordon, 1976; Sterner and Espinosa, 1988; Ackerman et al., 1992)。*Cyathostoma* sp. (HUNTER, D. B. ら, 1993) や, *Syngamus* sp. (SMITH, S. A. 1993) の猛禽類への感染も報告されているが, 少数である。肺において寄生虫の寄生が認められた個体 5 例中 4 例 (80%) という高い割合で, 骨折が認められた。また, 残りの 1 例のフクロウ (No. 187) においては, 民家で保護され, 臨床的に斜頸を呈していたため, 交通事故や何かに激突した可能性がある。以上のことから, 肺における寄生虫により外傷に遭うリスクが高まることを示唆しているかもしれない。Michelle D. Wendell ら (2002) の報告によると, 死に至らない程度の感染症や中毒によって, 罹患した猛禽類を外傷を負いやすくしていることが示唆された。しかし, 今回の研究における, このような検体は 5 例しかなく,

少数であるため、さらに多くの症例を集めて検討する必要がある。

アスペルギルス感染症がみられた 9 例は動物園、保護飼育および人工飼育の飼育個体が 8 例であり、1 例の生活環境は不明であった。このことから、今回の調査では、飼育個体がアスペルギルスに感染するリスクが明らかに高いことが示された。この原因としては、①アスペルギルスに感染した野生個体は人目につきにくい野外で死亡し、発見されない、②飼育環境が、野外とは異なり、高湿度、換気不良などにより真菌が繁殖しやすい環境であったことが考えられる。

今回の調査では、趾瘤症を示した検体が 2 例みられた。趾瘤症は、猛禽類や水禽類に多く発生する。野生での発生はまれであり、今回の調査においてみられた個体は長期間保護飼育されたものであった。過去の報告では、保護飼育下の猛禽類において、もっとも頻繁にみられ、かつ、臨床的にもっとも重要な疾患のひとつであるといわれている。(Alfonso ら, 1997) 趾瘤症の発生には、まず、趾の負傷が先行する。そこへ細菌感染が起こり、組織学的には膿瘍や化膿性炎が形成される。原因菌は *Staphylococcus aureus* がもっとも多いという報告がある (Alfonso ら, 1997)。また、趾瘤症により、機能障害が発生したり、まれに敗血症から死亡することが過去に報告されている。(Oaks, 1993)。そのため、趾瘤症の防止には、趾の負傷の防止が重要である。種や趾の外傷、栄養失調、ビタミン A やビタミン E の欠乏、寄生虫の濃厚寄生および衛生状態の悪さが、趾瘤症の発生に関連しているとの報告がある。(Alfonso ら, 1997) 猛禽類を飼育する際には、趾の負傷の防止を目的とした飼育環境の改善のみならず、衛生状態、栄養状態および趾の負傷に十分注意すべきである。

また、今回の調査で趾瘤症がみられた個体はいずれもハヤブサであり、これは、フクロウ目

よりもタカ目において、趾瘤症のリスクが高いという報告 (Alfonso ら, 1997) と一致する。

5 例の心筋において住肉胞子虫の寄生 (サルコシストの形成) が認められた。住肉胞子虫は、イヌやネコなどの肉食獣を終宿主とし、鳥類は中間宿主の役割を果たす。通常、サルコシストが形成されていても、無症状で経過することが多く、健康上の問題にならないことが多い。組織学的にも炎症細胞の浸潤は認められないことが多い。しかし、なんらかの刺激により、サルコシストが崩壊または変性した場合、激しいアレルギー性炎を惹き起こす。今回住肉胞子虫の寄生がみられた個体においては、サルコシストに対する生体反応は認められなかったことから、宿主において、健康に与える影響はほとんどないと考えられた。5 例ともに、寄生が認められたのは標本上でわずかに 1 ヶ所のみであったことから、他個体においても、複数箇所での切り出しを行えば住肉胞子虫の寄生を発見できるかもしれない。

カンムリワシの 1 例 (No. 145) において、転移性の石灰沈着症が疑われた。転移性の石灰沈着症は、上皮小体機能亢進症やビタミン D 過剰症、骨組織の破壊を伴う腫瘍などにより惹起される高カルシウム血症が原因となる。今回の検体では、剖検時や臨床的に腫瘍は認められず、また、他のカンムリワシにはこのような病変がみられなかったことから、カンムリワシの生息地における餌にビタミン D が過剰に含まれていることは考えにくい。よって、上皮小体機能亢進がもっとも疑わしいが、今回の検体では上皮小体の採材がされていないため、確定はできなかった。

心臓において、新鮮な出血や心筋の壊死が 8 例において認められた。このうち 3 例のトビは銃殺された個体であったことから、銃傷による出血であると考えられた。その他の 3 例においては、胸椎脱臼や、腹腔内出血および頸部における皮下出血がみられたことから、外傷による

ものであると考えられた。トビの1例(No. 105)においては心臓以外に、肺においても新鮮な出血が認められたことから、外傷が疑われた。カヌムリワシの1例(No. 133)においては、肺および脳における高度なうっ血がみられたことから、ショック死の可能性が考えられた。外傷など、他の病変が認められないことから、ストレスの関与が疑われた。

腎臓出血が認められた6例のうち5例において、骨折や腹腔内出血、創傷など、外傷やそれを示唆する病変が認められた。このことから、腎出血は外傷によるものと考えられた。

1例の動物園飼育下の雌のオオスズメフクロウ(No. 163)において、内蔵型痛風が認められた。内蔵型痛風は、尿の排泄障害、腎障害、または脱水に続発して発生する。今回の症例においては、肉眼的、組織学的には尿路の閉塞は認められなかった。また、線維化など、慢性の腎疾患を示唆する病変も認められなかった。尿細管の壊死、脱落が認められたが、これが内蔵型痛風の原因となったものか、または結果として生じたものであるかは不明であったが、急性に経過したものであることが示唆された。カドミウム、鉛、水銀などの毒性濃度、鶏インフルエンザ、伝染性気管支炎、西ナイルウイルス感染症などが腎臓に病変を起こす疾患として考えられるが、本症例は動物園飼育されていたものであり、同時期に他個体に同様な症状を示すものがみられなかったことから、中毒や感染症の可能性は低いと考えられ、何らかの原因による脱水の可能性が強く疑われた。

オジロワシの1例(No. 21)において、肉眼検査、組織学的検査および電子顕微鏡学的検査にて、ボックスウイルス感染症と診断された。猛禽類を含む、鳥類におけるボックスウイルスの感染が、Annette L. Bolteら(1999)によって過去に報告されているが、オジロワシへの感染は未だ報告されていない。Greenwood(2003)によると、ボックスウイルスは全身性の疾患ある

いは二次感染がない場合は、致命的な疾患ではないとされているが、猛禽類は、他の鳥類に比べ、ボックスウイルスによる致死率が高いと報告されている。そのため、猛禽類におけるボックスウイルス感染症のより詳細な研究を行うことが重要である。

今回の研究においては、野外例および飼育例とも種々の背景病変を示したが、双方の病変の種類と発生にやや差が認められた。野外例では比較的外傷の発生頻度が高い傾向があり、外傷に続発した敗血症も散見されている。外傷に続発した二次感染により、罹患鳥の感染への抵抗力が一層低下し、鳥インフルエンザや鳥ボックスなどの新興・再興感染症に罹患し易い状態に陥ると考えられる。また、野外・飼育例ともに比較的高い呼吸器病変の発生を示した。多くは慢性の軽微な呼吸器病変であるが、鳥インフルエンザの鑑別診断の場合に、考慮する必要がある。

<参考文献>

1. ACKERMAN, N., C. ISAZA, E. GREINER, AND C. R. BERRY. 1992. Pneumocoelom associated with *Serratospiculum amaculata* in a bald eagle. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 33: 351-355.
- Alfonso J. Rodriguez-Lainz, David W. Hird, Philip H. Kass, Dale L. Brooks. 1997. Incidence and risk factors for bumblefoot (pododermatitis) in rehabilitated raptors. *Preventive Veterinary Medicine* 31 (1997) 175-184.
2. Annette L. Bolte, J. M., Erhard F. Kaleta (1999). Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathology* 28:415 - 432.
3. BIGLAND, C. H., L. SI-KWANG, AND M. L. PERRY. 1964. Five cases of *Serratospiculum amaculata* (Nematoda: Filarioidea) infection

- in prairie falcons (*Falco mexicanus*). Avian Diseases 8: 412- 419.
4. Cooper, J.E., 1985. Veterinary Aspects of Captive Birds of Prey, 2nd ed. The Standfast Press, Saul, UK, 256 PP.
 5. CROFT, R. E., AND N. KINGSTON. 1975. Babesia moshkoviskii (Schurenkova, 1938) Laird and Lari, 1957; from the prairie falcon, Falco mexicanus, in Wyoming; with comments on other parasites found in the host. Journal of Wildlife Diseases 11: 229-233.
 6. DEEM, S. L., S. P. TERRELL, AND D. J. FORRESTER. 1998. A retrospective study of morbidity and mortality of raptors in Florida: 1988-1994. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 29: 160-164.
 7. Greenwood A. (2003). DISEASES COMMON TO MULTIPLE TAXA: Pox Disease in All Taxa: AVIPOXVIRUS INFECTION IN BIRDS. In M. E. Fowler, *et al.* (eds), *ZOO AND WILD ANIMAL MEDICINE*, 5 th ed. (pp. 737-741). Philadelphia, PA: SAUNDERS.
 8. HUNTER, D. B., K. MCKEEVER, AND C. BARTLETT. 1993. *Cyathostoma* infections in screech owls, saw-whet owls, and burrowing owls in southern Ontario. In Raptor Biomedicine, P. T. Redig, J. E. Cooper, J. D. Remple, and D. B. Hunter (eds.). University of Minnesota Press, Minneapolis, Minnesota, pp. 56-57.
 9. Martin Lavoie, Igor Mikaelian, Mauritz Sterner, Alain Villeneuve, Guy Fitzgerald, John D. McLaughlin, Stephane Lair, Daniel Martineau. 1999. Respiratory Nematodiases in Raptors in Quebec. Journal of Wildlife Diseases, 35(2), 1999, pp. 375-380.
 10. Kim, E.-Y., R. Goto, H. Iwata, Y. Masuda, S. Tanabe, and S. Fujita. Preliminary survey of lead poisoning of Steller's sea eagle (*Haliaeetus pelagicus*) and white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Hokkaido, Japan. Environ. Toxicol. Chem. 18:448-451. 1999.
 11. KOCAN, A. A., AND L. R. GORDON. 1976. Fatal air sac infection with *Serratospiculum amacaluta* in a prairie falcon. Journal of the American Veterinary Medical Association 169: 908.
 12. Michelle D. Wendell, Jonathan M. Sleeman, and Gail Kratz. 2002. RETROSPECTIVE STUDY OF MORBIDITY AND MORTALITY OF RAPTORS ADMITTED TO COLORADO STATE UNIVERSITY VETERINARY TEACHING HOSPITAL DURING 1995 TO 1998. Journal of Wildlife Diseases, 38(1), 2002, pp. 101-106.
 13. Oaks, J.L., 1993. Immune and inflammatory responses in falcon staphylococcal pododermatitis. In: P.T. Redig, J.E. Cooper, J.D. Remple and D.B. Hunter (Editors), Raptor Biomedicine. University of Minnesota Press, Minneapolis, pp. 72-87.
 14. OAKS, J. L., M. GILBERT, M. Z. VIRANI, R. T. WATSON, C. U. METEYER, B. A. RIDEOUT, H. L. SHIVAPRASAD, S. AHMED, M. J. I. CHAUDHRY, M. ARSHAD, S. MAHMOOD, A. ALI, AND A. A. KHAN. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature 427: 630- 633.
 15. Saito, K. Lead poisoning in Steller's sea eagles (*Haliaeetus pelagicus*) and white-tailed eagles (*Haliaeetus albicilla*) caused by the ingestion of lead rifle bullets and slugs, in eastern Hokkaido Japan. World Assoc. Wildl. Vet., Newsl. 38:10-11. 2000.
 16. SMITH, S. A. 1993. Diagnosis and treatment of heminths in birds of prey. In Raptor biomedicine, P. T. Redig, J. E. Cooper, J. D. Remple, and D. B. Hunter (eds.). University of Minnesota Press, Minneapolis, Minnesota,

pp. 21-27.

17. STERNER, M. C., AND R. H. ESPINOSA. 1988. *Serratospiculoides amaculata* in a Cooper' s hawk (*Accipiter cooperii*). Journal of Wildlife Diseases 24: 378-379.
18. WARD, F. P., AND D. G. FAIRCHILD. 1972. Air sac parasites of the genus *Serratospiculum* in falcons. Journal of Wildlife Diseases 8: 165-168.

- ・2000年8月～2007年8月に岐阜大学獣医病理学講座に送付
全身材料または主要臓器ホルマリン標本検体200例
タカ目：16種149例；フクロウ目：20種51例

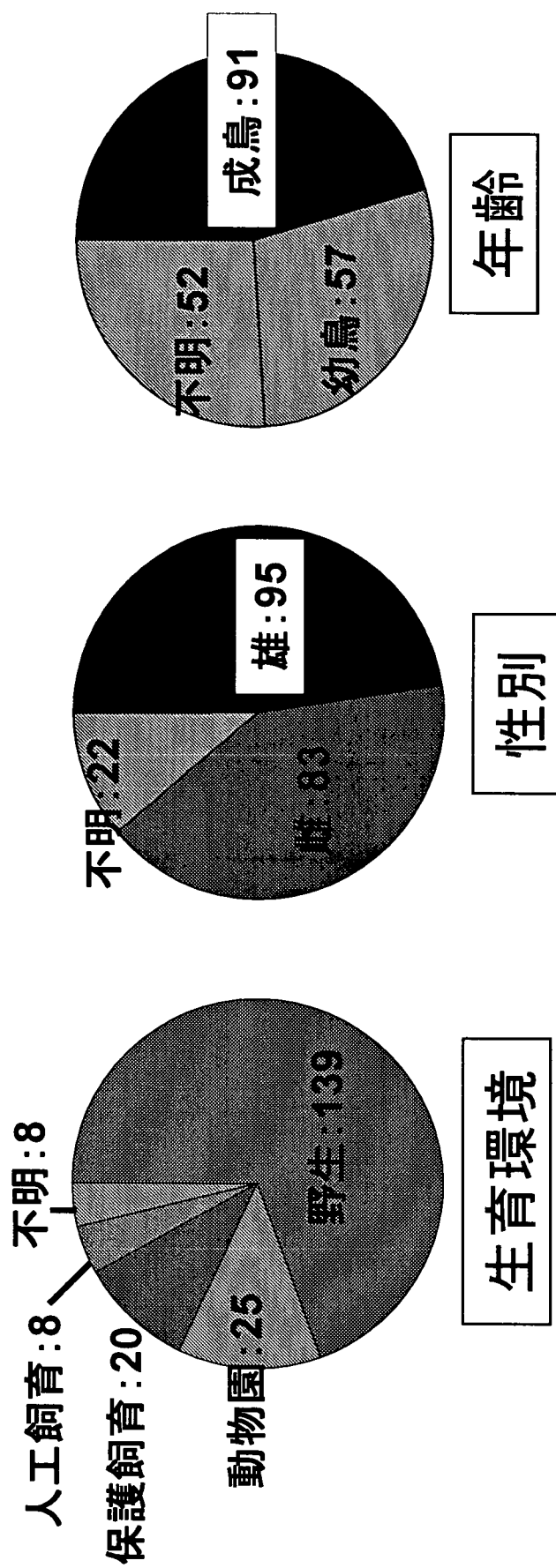
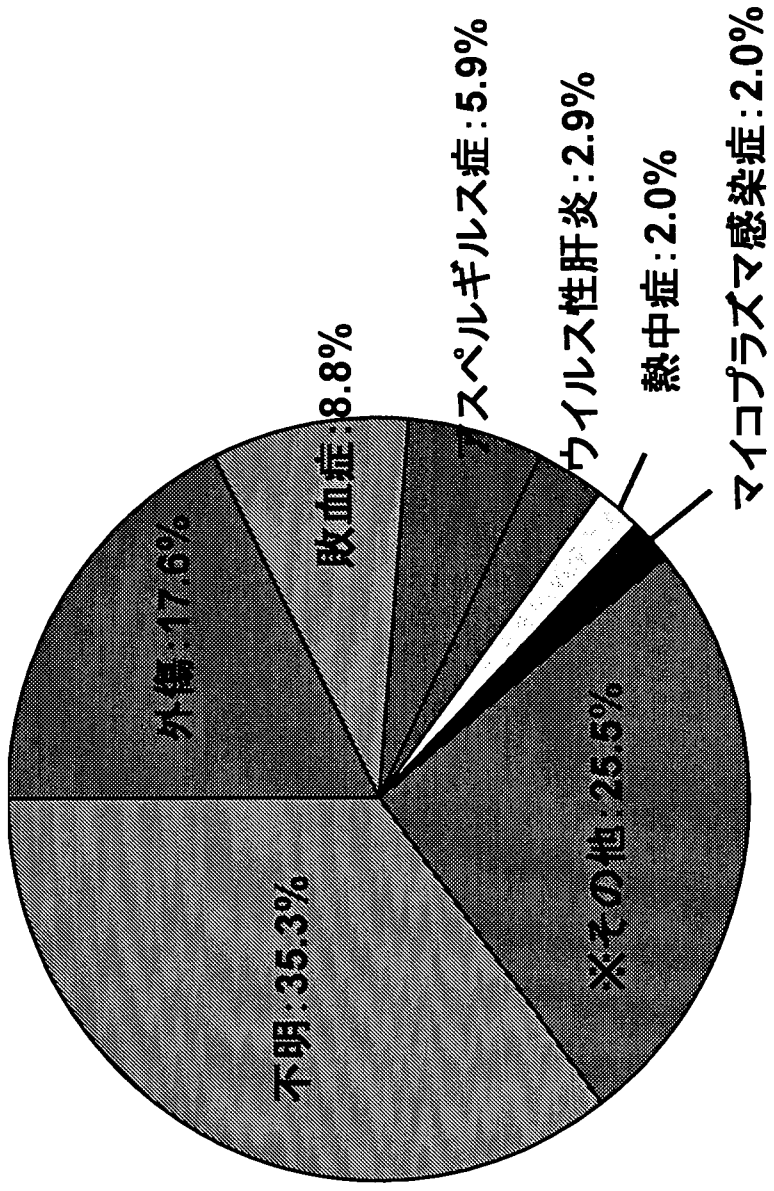


図1 検査材料

- ・斃死体：102例
- ・頭蓋骨折や体腔内出血など、外傷がもつとも多かった



※その他：腫瘍、ポックスウイルス感染症、内臓型痛風など1例ずつの症例

図2 全体を通じての死因

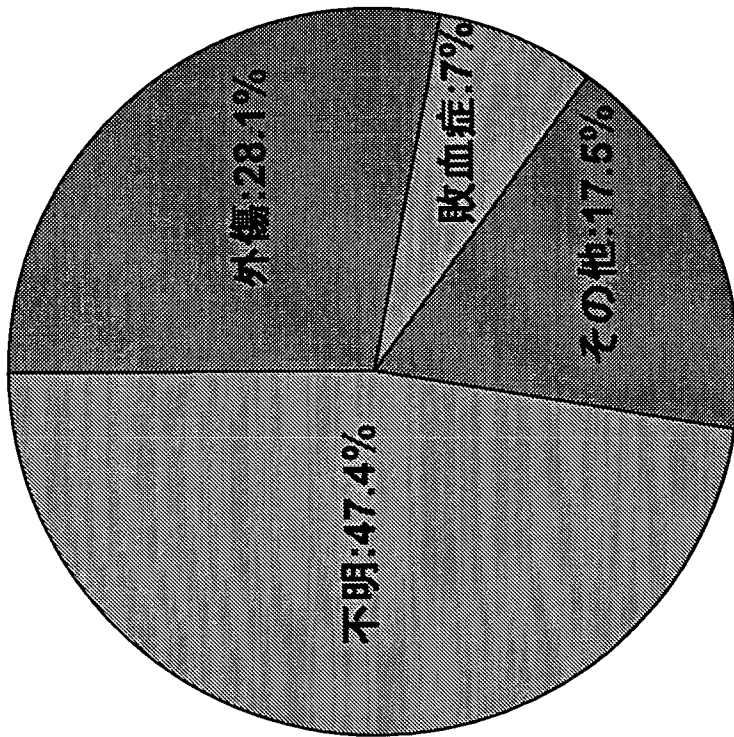


No. 167 コミミズク
外傷による体腔内出血



No. 172 シロフクロウ
アスペルギルス感染により
高度に肥厚した気嚢

野生: 57例



飼育下: 41例

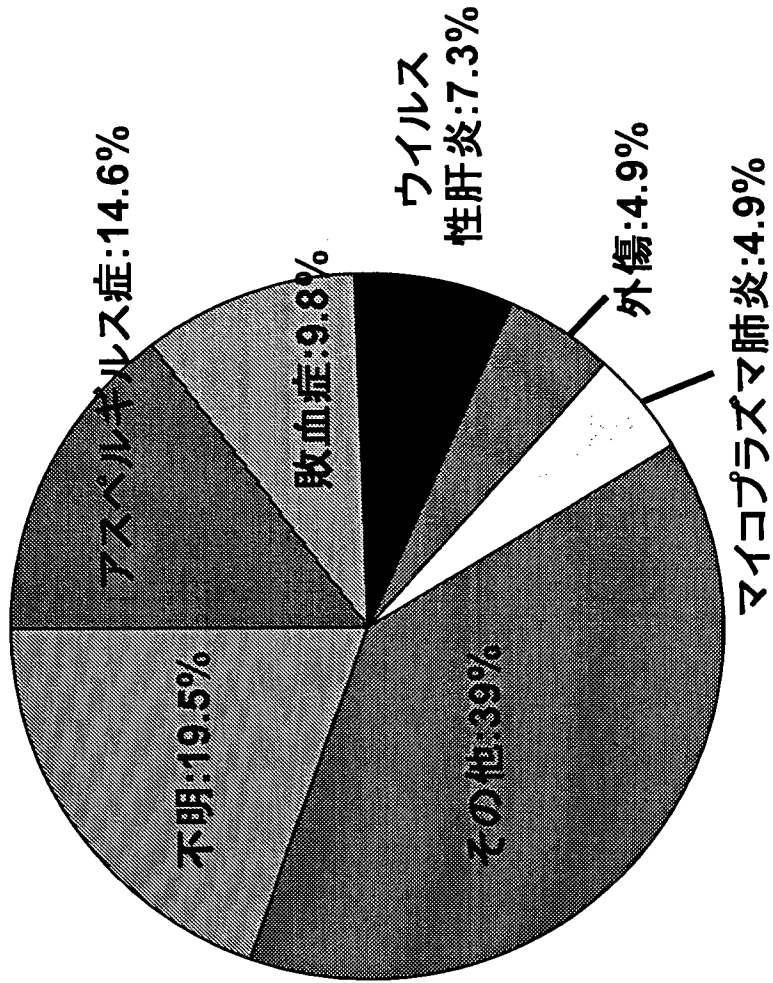


図3 由来別の死因

外傷; 51例(25.5%)

- ・脊椎, 上腕骨, 大腿骨, 頭蓋骨, 鎖骨などの骨折
- ・体腔内出血, 硬膜下出血など



体腔内出血

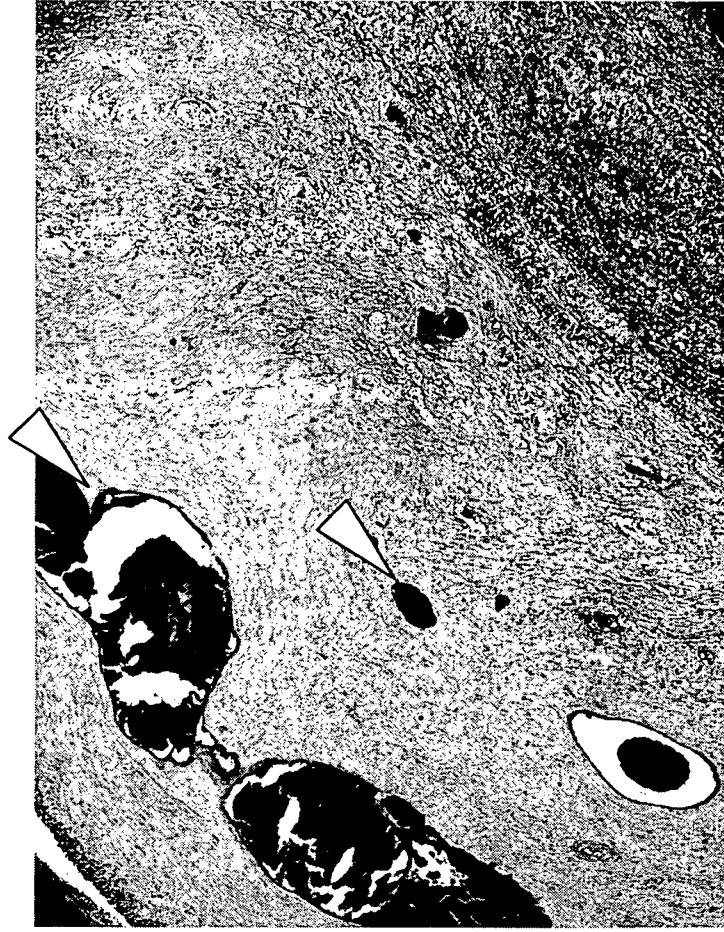
No. 135 カンムリワシ

No. 132 カンムリワシ

図4 外傷

敗血症; 12例(6%)

- ・全身臓器に細菌塊とそれに対する炎症反応がみられたもの
→敗血症(9例)
- ・細菌感染を示唆する病変が全身でみられたもの
→敗血症の疑い(3例)



No. 26 クマタカ 心臓(左) 肺(右)

図5 敗血症

③趾瘤症・・・2例(1%)

- ・2例とも長期保護飼育個体
- ・両後肢に発生



図6 趾瘤症

No. 113 ハヤブサ 後肢

⑤肝臓における壊死や肉芽腫の形成; 64例(32%)

- ・細菌や真菌などの病原体は検出されず

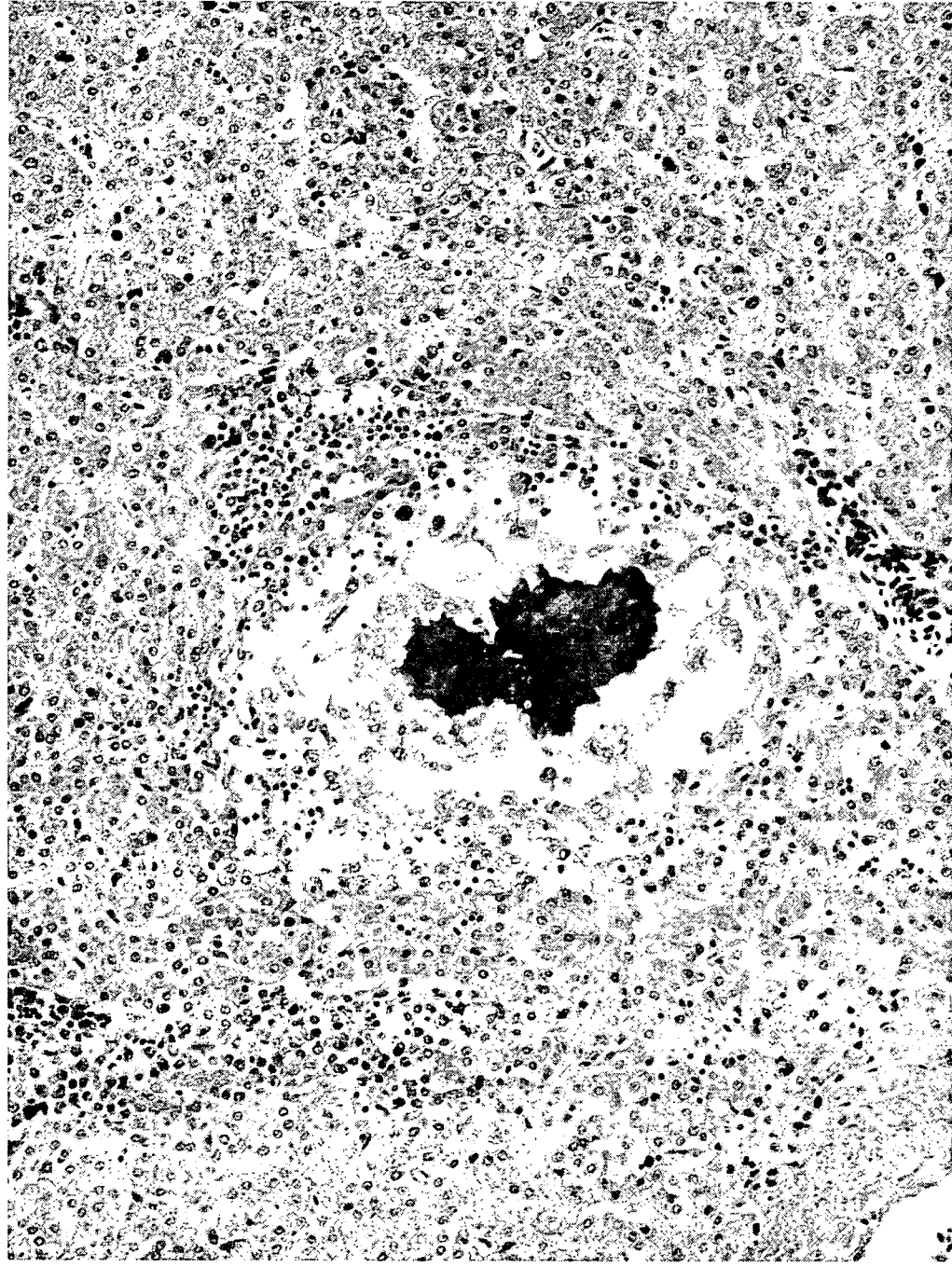
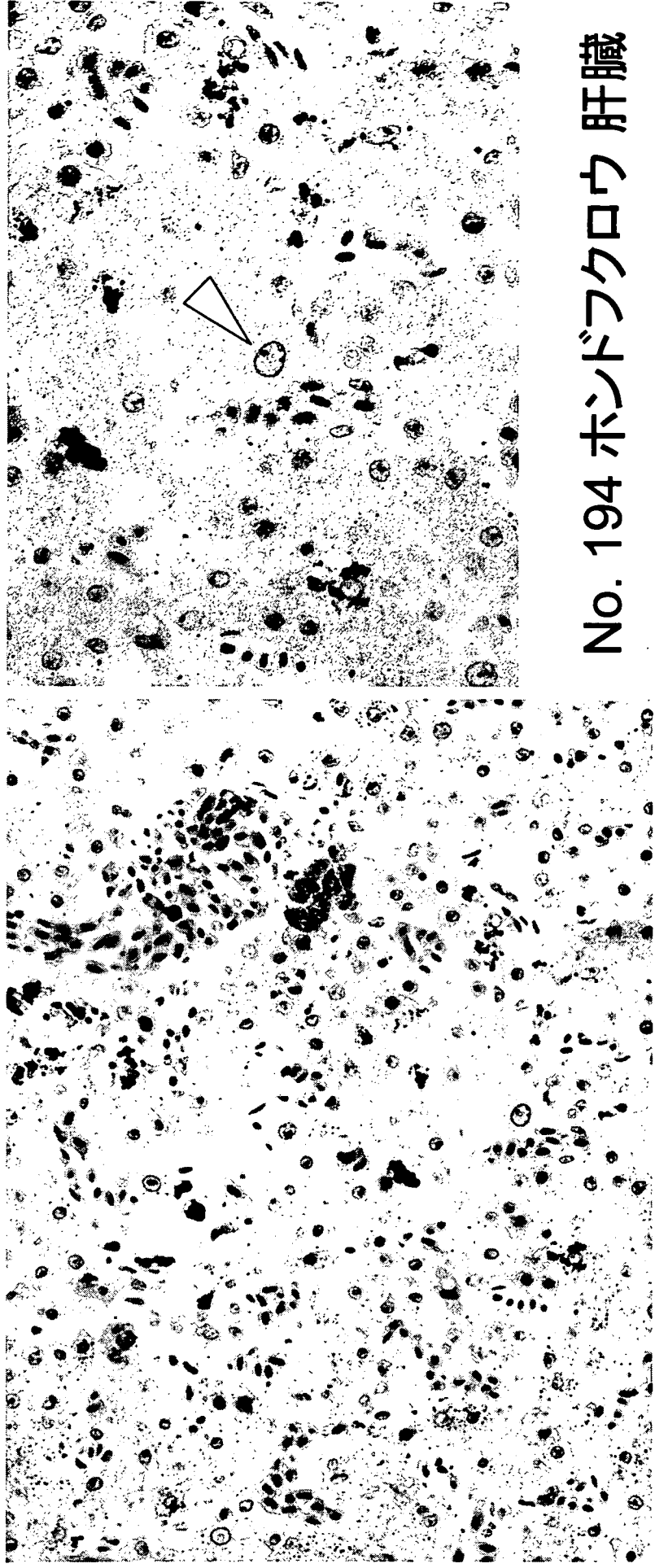


図7 肝臓肉芽腫

No. 125 カンムリワシ 肝臓

肝細胞内における封入体の形成; 5例(2.5%)

- ・肝細胞が腫大・変性を示し、核内には両染色性封入体
- ・5例ともに飼育個体であり、ブリーダー飼育の4例は同時期に死亡
→ウイルス感染が疑われた



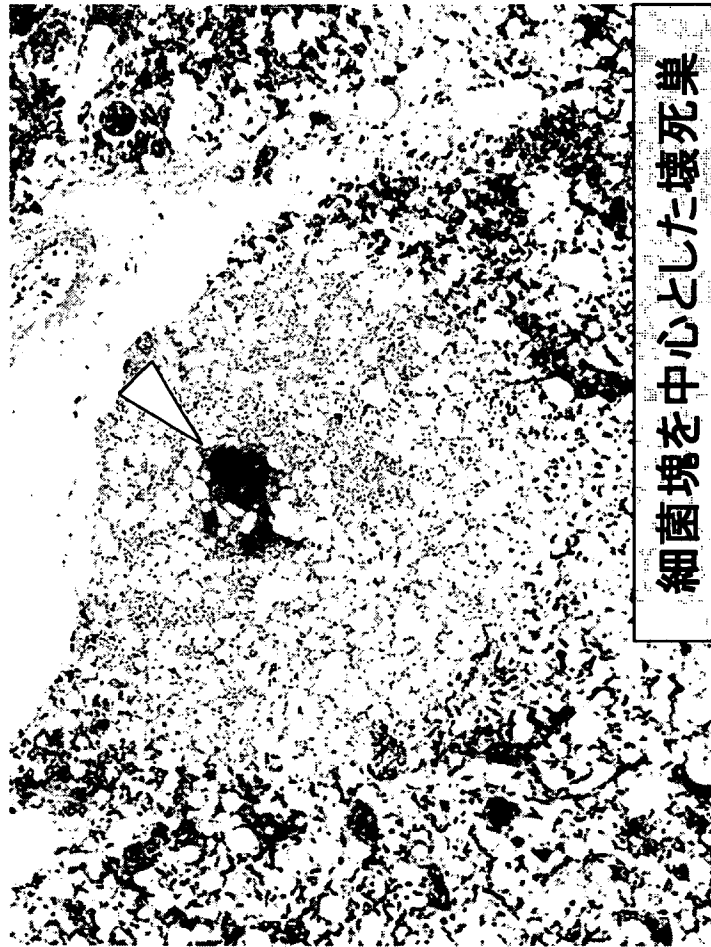
No. 194 ホンドフクロウ 肝臓

図8 肝炎

呼吸器における炎症や壊死・・・63例(31.5%)

・2例において、気管支周囲のリンパ濾胞の高度な活性化

→マイコプラズマ感染が疑われた



細菌塊を中心とした壊死巣



マイコプラズマ感染

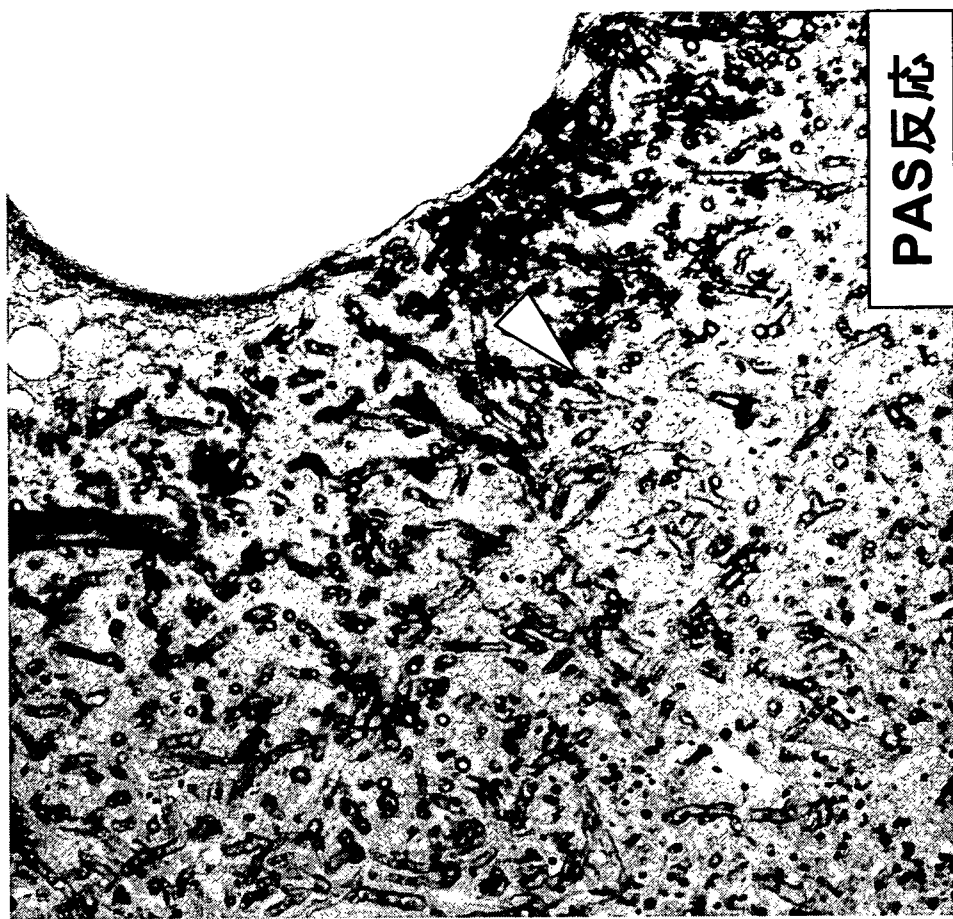
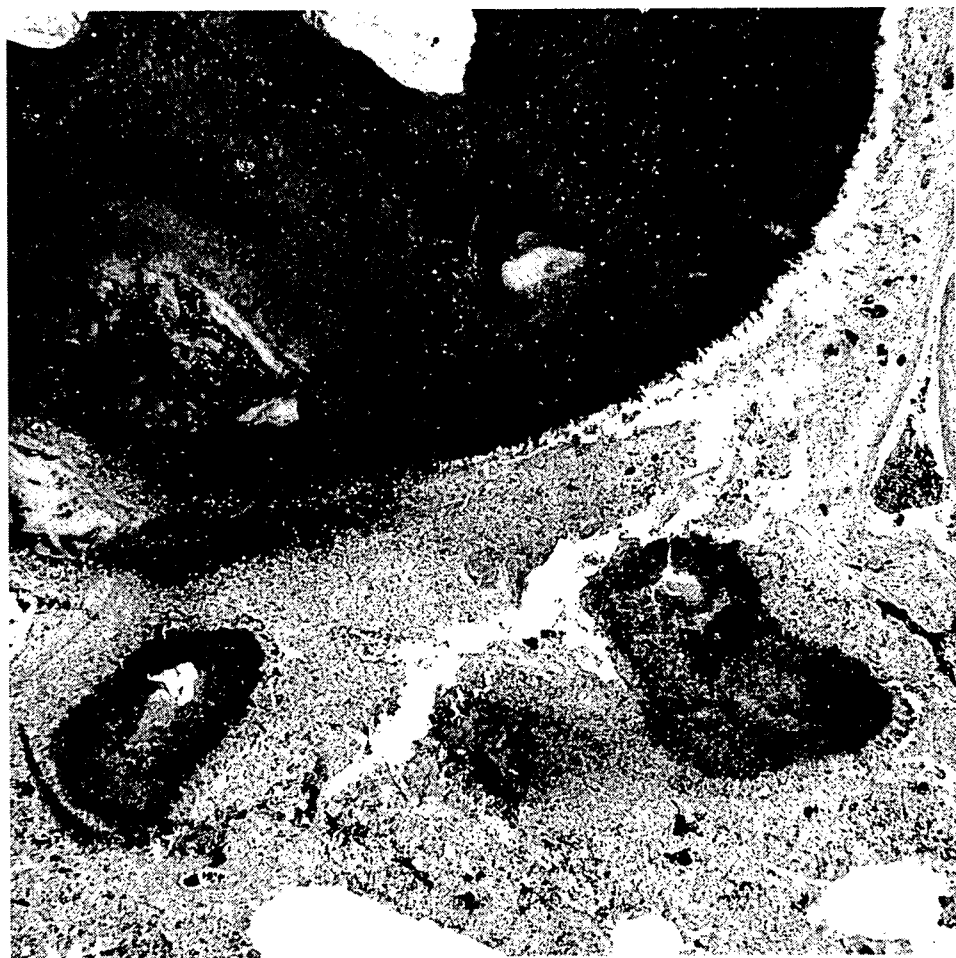
No. 136 カンムリワシ 肺

No. 165 ケープワシミミズク 肺

図9 肺病変

アスペルギルス症; 9例(4.5%)

- 9例中8例が飼育個体



PAS反応

図10 アスペルギルス症 No. 120 ミサゴ 肺

平成 19 年度

動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究

分担研究報告書

野生動物の感染症に関する研究

分担研究者：岐阜大学応用生物科学部 獣医病理／野生動物感染症センター
教授 柳井 徳磨

協力研究者：岐阜大学応用生物科学部 研究員 斉藤 勇太，辻 一
高知大学環境保健学部 教授 吾妻 健

II. 野生ツキノワグマ (*Selenarctos thibetanus*) におけるフィラリア症の病 理および分子生物学的研究

要約

ツキノワグマは、生息環境が著しく狭められ質的にも劣化したため、人里へ頻繁に出没して社会問題となっている。ツキノワグマと人の生活空間が重なるとクマ由来の感染性病原体が人および家畜に感染して人獣共通感染症が発症する可能性もある。人へのツキノワグマ由来糸状虫 *Dirofilaria ursi* の感染報告が北米でみられている。

岐阜県，富山県，兵庫県および京都府にて有害駆除されたツキノワグマ 23 例について，*D. ursi* の感染率を調べ，虫体から DNA を抽出してその PCR 産物についてダイレクトシーケンシング法により塩基配列を特定した。さらに他の線虫と比較して系統樹を作成した。*D. ursi* は皮下織に寄生し，その成虫は検索例の 73.3%，マイクロフィラリアは末梢血管で 87.0% に認められた。*D. ursi* の C01 領域と 28S 領域の塩基配列を同定した遺伝子解析では，系統樹において *D. immitis* が *D. ursi* と *D. repens* の上位に位置したことから，これらの共通の祖先となる *Dirofilaria* が *D. immitis* と *D. ursi* 及び *D. repens* に進化した可能性がある。

A. 研究目的

近年，ツキノワグマの人里への出没が頻繁に発生した農林水産業や観光産業への被害が発生し，人との軋轢が大きな問題となっている。特に 2004 年秋には主要な餌である堅果類や昆虫類が台風の影響で激減し

たため，例年に比べてツキノワグマによる被害が数倍に増加している。このようにツキノワグマと人や家畜との生活空間が重複してくると，ツキノワグマ由来の感染性病原体が家畜に感染して人獣共通感染症が発症する可能性も高くなる。ツキノワグマを

宿主とするフィラリアである *Dirofilaria ursi* (以下, *D. ursi*) がブユを介在してヒトに感染することが知られており, 北アメリカやカナダで今までに少なくとも 10 例の人体感染例が報告されている。

D. ursi は人獣共通感染症として注目されているにも関わらず, 遺伝子解析に関する研究はほとんどない。寄生虫の遺伝子を解析して得られた塩基配列は, 臨床における遺伝子診断の基礎的情報となるものであり, 様々な寄生虫疾患の診断に欠かせない情報である。北アメリカやカナダの人体症例に関して, 遺伝子情報の不足から有効な遺伝子診断は行われていない。

我が国に生息するツキノワグマについて, *D. ursi* の感染率を調べ, 虫体から DNA を抽出してその PCR 産物についてダイレクトシーケンシング法により塩基配列を特定し, ヒトに感染した場合の遺伝子診断法の開発を試みた。遺伝的系統樹により, *D. ursi* の起源についても考察した。

B. 研究方法

1) 出現頻度

岐阜県, 富山県, 兵庫県および京都府にて駆除された野生のツキノワグマ 23 例を用いて *D. ursi* の出現頻度を検索した。

2) 遺伝子診断

2004 年 9~11 月に岐阜県および富山県内で駆除されたツキノワグマ 4 頭から, 雄雌 2 隻ずつの線虫を採取した (計 14 隻)。得られた線虫 14 隻の全ての虫体は形態的に *D. ursi* と同定された。

① DNA 抽出

頭部と尾部を除いた虫体を 1cm 程度に切断し, Easy-DNA Kit (Invitrogen Corp.,

USA) を使用して, 同キットのプロトコールに従い各虫体ごとに DNA を抽出した。

② PCR 法

PCR 法に用いたサンプルは, 上記の抽出 DNA 1 μ l をテンプレートとして, 10 \times Ex Taq Buffer 2.5 μ l, DNTP Mixture 2.0 μ l, TaKaRa Ex Taq 1.25 μ l (以上, タカラバイオ株式会社, 大津), プライマー各 1.5 μ l, MQ 15.25 μ l を加え, 全量を 25 μ l とし, 滅菌 0.2ml PCR チューブ (Axygen Science, USA) に容れた。PCR は, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ株式会社, 大津) にて以下の反応条件で行った。ミトコンドリア DNA の CO1 領域の増幅には, denaturation 94 $^{\circ}$ C 3 分間の後, denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 分間, annealing 50 $^{\circ}$ C 2 分間, extension 72 $^{\circ}$ C 3 分間を 30 サイクル, final extension 72 $^{\circ}$ C 5 分間の反応条件を用いた。リボソーム DNA の 28S 領域の増幅には, denaturation 94 $^{\circ}$ C 3 分間の後, denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 秒間, annealing 50 $^{\circ}$ C 30 秒間, extension 72 $^{\circ}$ C 1 分間を 30 サイクル, final extension 72 $^{\circ}$ C 5 分間の反応条件を用いた。PCR に用いた各々のプライマーを表 1 に示した。

③ DNA 分離および回収

PCR プロダクト 25 μ l と 6 倍希釈したプロモフェノールブルー (以下 BPB) 5 μ l の混合液を, 0.8% SeaKem GTG agarose / 0.002% エチジウムブロマイド / 0.5 \times Tris-acetate EDTA (以下 TAE) にて, 0.5 \times TAE を泳動バッファーとして 100V で 20 分間電気泳動を行った。電気泳動後, 紫外線照射下で観察し, DS-300 CAMERA (フナコシ株式会社, 東京) を用い ISO3200 インスタント白黒フィルム FP-3000B SUPERSPEEDY

(富士写真フイルム株式会社, 東京) にて撮影した。紫外線照射下で目的の DNA バンドを切り出してエッペンチューブに容れた。QIAEX II (株式会社キアゲン, 東京) を利用して同キットのプロトコールに従い DNA を回収した。

④ ダイレクトシーケンシング

回収した PCR プロダクト 4.0 μ l をテンプレートとして, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) の Cycle Sequencing Mix 4.0 μ l, 5 \times Sequencing Buffer 4.0 μ l, 0.8 μ M プライマー 4.0 μ l, MQ 4.0 μ l を加え, 全量を 20 μ l とした。調整した試薬について TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ株式会社, 大津) にて以下の条件でサイクルシーケンス反応を行った。反応条件は, denaturation 96 $^{\circ}$ C 1 分間の後, denaturation 96 $^{\circ}$ C 10 秒間, annealing 50 $^{\circ}$ C 5 秒間, extension 60 $^{\circ}$ C 1 分間を 25 サイクル, final extension 60 $^{\circ}$ C 4 分間とした。反応後, エタノール/酢酸ナトリウム沈殿を行い, プロダクトの精製を行った。乾燥後, プロダクトをホルムアミド 10 μ l とよく混和し, 専用の 96 穴プレートに移した。電気泳動およびシーケンスデータの解析は岐阜大学 生命科学総合研究支援センター ゲノム研究分野の ABI PRISM 3100 DNA Sequencing System (Applied Biosystems, USA) にて行った。

⑤ ミトコンドリア DNA の CO1 領域については, 得られた塩基配列に基づきアミノ酸配列を特定し, Neighbor-Joining (以下 NJ) 法により樹形図を作成した。

⑥ リボソーム DNA の 28S 領域については, *D. ursi* に近縁する線虫類ではほとんど塩

基配列が同定されていないため, *D. immitis* で一部 (280bp) だけ同定されている部分について比較するに留めた。

C. 結果

野生ツキノワグマを肉眼および病理組織学的に検索し, 90% 近くの個体に *D. ursi* 感染が認められた。岐阜県, 富山県, 兵庫県および京都府にて有害駆除されたツキノワグマ 23 例について検索したところ, その成虫 (図 1) は検索例の 73.3%, ミクロフィラリアは末梢血管で 87.0% に認められた。

また, 腎臓では犬糸状虫症の病態の一つとして報告されている膜性糸球体腎炎に類似した, 糸球体における基底膜肥厚が陽性例でしばしば認められた。これはミクロフィラリアあるいは成虫の抗原により, 糸球体毛細血管に免疫複合体が沈着して形成されると考えられており, 糸球体における基底膜肥厚を組織学的な特徴とする。本研究では, 90% 近くの陽性症例に基底膜肥厚, メサンギウム細胞の増加, メサンギウム基質の増生などの変化がみられた。

2) *D. ursi* の遺伝学的検討

岐阜県および富山県内で駆除されたツキノワグマ 4 頭から, 雄雌 2 隻ずつの線虫を採取し (計 14 隻), 形態的に *D. ursi* と同定された虫体を用いて遺伝子解析を行った。

(1) ミトコンドリア DNA の CO1 領域の解析

D. ursi のミトコンドリア DNA の CO1 領域の塩基配列およびアミノ酸配列を同定した。その塩基配列を図 2, アミノ酸配列を図 3 に示す。検索した *D. ursi* の 14 隻の全てで塩基配列が得られた。

(2) 遠隔地ごとの *D. ursi* の塩基配列の比較

ミトコンドリア DNA の C01 領域およびリボソーム DNA の 28S 領域のいずれについても 14 例の塩基配列は全て一致した。本研究では個体差が比較的現れ易い 28S 領域の中央部 (TSD2~D4AR) も詳細に検索したが、個体差はみられなかった。

(3) 系統樹

ミトコンドリア DNA の C01 領域でのアミノ酸配列に基づいて NJ 法により作成した系統樹を図 4 に示す。*D. ursi* のアミノ酸配列は *D. immitis* よりも沖縄の犬猫にみられる *D. repens* のものに近似していた。また、*D. immitis* が *D. ursi* および *D. repens* の上位に位置していた。

D. 考察

我が国に生息する野生ツキノワグマには、90%近くの個体に *D. ursi* 感染が認められることが確かめられた。*D. ursi* の感染環としては、ブユの体内で感染幼虫に成長し、それがツキノワグマに侵入、ツキノワグマ体内に侵入した感染幼虫は組織間を移行し、全身の筋膜下、脂肪組織および結合組織などにおいて発育すると推測された。また、これらの幼虫はリンパ管に入り成熟し、雌はマイクロフィラリアを産出する。そのマイクロフィラリアはリンパ系を介して大循環に入ると推測された。マイクロフィラリアはリンパ節や毛細血管の集中する肺で高率にみられた。ブユはしばしば里山に発生しヒトを刺すことがあるので、当然、人体への寄生が成立する可能性が、我が国でも考えられる。恐らく、*D. ursi* の人体感染の可能性が認識されていないので、人体例の報告

が無いとも考えられる。

D. ursi のミトコンドリア DNA の C01 領域およびリボソーム DNA の 28S 領域の塩基配列を同定した。特に後者の領域については他の線虫類ではほとんど解析が行われておらず、実際、これら線虫類では初の同定であった。これら *D. ursi* の遺伝子解析情報は、ヒトにおける *D. ursi* 寄生の遺伝子診断にきわめて有用であると考えられる。

約 60~150km 離れて生息していた複数のツキノワグマに由来する *D. ursi* の C01 領域および 28S 領域はそれぞれ全個体とも塩基配列が一致した。本研究では個体差が比較的現れ易い 28S 領域の中央部 (TSD2~D4AR) も詳細に検索したが、個体差はみられなかった。このことから、岐阜県内およびその周辺に生息する野生ツキノワグマに寄生する *D. ursi* には遺伝子的違いがほとんどないことが明らかとなった。

岐阜県での野生ツキノワグマの行動範囲は、半径約 3~5km 程度とされている。本研究で検索した *D. ursi* が寄生する 4 頭のツキノワグマは、それぞれ別の個体群に属していたと考えられる。また、*D. ursi* はブユを介在して感染するが、ブユの行動範囲は長くとも数 km の範囲であることから、本研究に供試した 4 箇所採取された *D. ursi* には、交流が無いと考えられる。それにも関わらず C01 領域および 28S 領域で塩基配列が一致したということは、当該領域が *D. ursi* にとって個体差の無い基幹的な部分である可能性が高い。

C01 領域のアミノ酸配列から求めた系統樹によると、*D. ursi* のアミノ酸配列は *D. immitis* よりも沖縄の犬猫にみられる *D. repens* のものに近似していた。系統樹を参