

の希釈系列を作製した。感度決定 Universal canine Babesia PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 1 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 55 $^{\circ}$ C 2 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 2 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

②全サンプル Universal canine Babesia PCR

全サンプル DNA 濃度を、抽出された DNA 濃度の内最も薄い 0.02 μ g/ μ l に統一するために各々ミリ Q により希釈を実施した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 2.5 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 55 $^{\circ}$ C 2 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 2 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返した。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

③感度決定 B. gibsoni PCR

ポジティブコントロールと分子病態学教室実習犬抽出 DNA から、感染率 2.5%, 1.25%, 0.25%, 0.125%, 0.025% および 0.0125% の希釈系列を作製した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート (ポジコンについても 0.02 μ g/ μ l に希釈したものを使用) 2.5 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 54 $^{\circ}$ C 1 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30

回繰り返す, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

④Universal canine Babesia PCR 陽性サンプル B. gibsoni PCR

Universal canine Babesia PCR (②) 陽性サンプルについて、B. gibsoni PCR を実施した。PCR は、ミリ Q 中に、テンプレート 2.5 μ l, 各々プライマー 1 μ l, dNTP 5 μ l, Ex-Taq 0.25 μ l, $\times 10$ バッファー 5 μ l を入れ、全 50 μ l で実施された。PCR は、94 $^{\circ}$ C 30 秒間変性, 54 $^{\circ}$ C 1 分間アニーリング, そして 72 $^{\circ}$ C で 1 分間伸展の 1 サイクルを 30 回繰り返す, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間伸展させた。PCR 生成物の内、10 μ l を 1.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンブロマイドにより染色した。

⑤血液塗抹標本の観察

採取した全血の一部から、血液塗抹標本作製し、定法に従いライト・ギムザ染色を実施し、光学顕微鏡で観察し虫体検出を行った。感染率 1% を、5% 危険率の可能性で検出するために、各標本 300 個以上の赤血球観察を実施した。

(2) 犬フィラリア症

市販キット (ソロステップ CH, HESA, 米国) を用いて、血清 3 滴 (約 115 μ l) を検査デバイスのサンプル注入口に滴下し、5 分静置後に表示窓中の検査結果 (赤色ラインの出現) を読み取った。

C. 研究結果

1) ジフテリア症

検索した 196 頭中 13 頭 (6.6%) でジフ

テリア抗毒素陽性例が認められた。これらの地域的な分布の内訳は、大隅半島：5/25 (20.0%)、沖縄本島：1/6 (16.7%)、石垣島：3/29 (10.3%)、奄美大島群：3/37 (8.1%)、佐渡島：1/17 (5.9%)、渥美半島：0/14 (0%)、対馬：0/20 (0%)、種子島：0/20 (0%) および屋久島：0/28 (0%) であった。No.26-28 (奄美大島群) と No.143, 144, 150 および 151 (大隅半島)、No.187-189 (石垣島) はそれぞれ同じ飼い主によって飼育されていた。

2) レプトスピラ症

検索した 196 検体中 42 例 (21.4%) で陽性が認められた。陽性例の検出された地域の内訳は、大隅半島：8/15 (53.3%)、石垣島：13/29 (44.8%)、渥美半島：4/14 (28.6%)、種子島：5/20 (25.0%)、対馬：4/20 (20.0%)、沖縄本島：1/6 (16.7%)、奄美大島群：4/37 (10.8%)、佐渡島：1/17 (5.9%)、屋久島：2/28 (7.1%) であった。ワクチンの接種率は 87/196 (44.4%) であり、地域ごとには渥美半島：13/14 (92.9%)、佐渡島 12/17 (70.6%)、沖縄本島：4/6 (66.7%)、石垣島：17/29 (58.6%)、大隅半島：13/25 (52.0%)、奄美大島群：18/37 (48.6%)、種子島：8/20 (40.0%)、対馬：2/20 (10.0%)、屋久島：28/28 (0.0%) であった。また、ワクチンの摂取歴がなく、抗レプトスピラ抗体が陽性であったのは、対馬：4/20 (20.0%)、種子島：4/20 (20.0%)、石垣島：5/29 (17.2%)、沖縄本島：1/6 (16.7%)、大隅半島：2/25 (8.0%)、屋久島：2/28 (7.1%)、佐渡島：1/17 (5.9%)、奄美大島群：1/37 (2.7%)、渥美半島：0/14 (0%) であった。また、No.1, 2 (渥美半

島) は過去にレプトスピラへの感染歴があったが、この 2 頭以外の同居犬は感染歴がなかった。

3) ライム病ボレリア

検索した 196 頭中 31 頭 (15.8%) で陽性 (ELISA/Western Blotting の両方が陽性のものを陽性とした) が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、屋久島：5/28 (17.8%)、沖縄本島：0/6 (0.0%)、対馬：1/20 (5.0%)、石垣島：6/29 (20.6%)、奄美大島群：1/36 (2.7%)、大隅半島：11/25 (44.0%)、種子島：4/20 (20.0%)、渥美半島：2/14 (14.2%) および佐渡島：1/17 (5.8%) であった。

4) ブルセラ症

196 検体中に、*B. abortus* に陽性を示すものはなかった。また、*B. canis* に陽性を示すものは 6/196 (3.0%) であった。それぞれの地域における *B. canis* の検出率は、沖縄本島：1/6 (16.7%)、佐渡島：2/17 (11.8%)、種子島：1/20 (5.0%)、石垣島：1/29 (3.4%)、奄美大島群：1/37 (2.7%)、渥美半島：0/14 (0%)、対馬：0/20 (0%)、屋久島：0/28 (0%)、大隅半島：0/25 (0%) であった。

5) 野兎病

196 検体中に、野兎病菌 Yama 株に陽性を示すものはなかった。

6) 破傷風

採血した全 196 サンプルにおいて、血清中破傷風抗毒素価が測定レベル以下 (< 0.0025U/ml) であったため、検索した全例

とも陰性と判断した。

7) トキソプラズマ

検索した 196 頭中 71 頭 (36.2%) で *Toxioplasma (T.) gondii* 陽性が認められた。陽性例が検出された地域の内訳は、屋久島:17/28 (60.7%), 沖縄本島:3/6 (50.0%), 対馬:8/20 (40.0%), 石垣島:11/29 (37.9%), 奄美大島群:12/37 (32.4%), 大隅半島:8/25 (32.0%), 種子島:6/20 (30.0%) 渥美半島:3/14 (21.4%) および佐渡島:3/17 (17.6%) であった。

8) 犬由来感染症

(1) バベシア症およびヘパトゾーン症

血液塗抹標本の観察および PCR による検出結果以下に示す。

1) 血液塗抹標本の観察

検索した 196 検体中、血液塗抹が厚くて観察に適さなかった 5 例を除外した 191 件を検索したところ、3 サンプル (3/191: 1.6%) で赤血球内に涙型の *Babesia (B.) gibsoni* 虫体と類似する物体が認められた。また、45 サンプル (45/191: 23.6%) で単球もしくは好中球内に *H. canis* のガメトサイトと類似するカプセル様の構造物が認められた。

2) PCR による *Babesia*, *Hepatozoon* の検出

① 196 検体中、84 例で 1665bp 付近に陽性バンドが認められた。また、濃い陽性バンドが認められたサンプル以外の陰性・陽性のサンプルには、総じて 1665bp よりもやや大きいバンドが認められた。1665bp 付近に陽性バンドを示した例数は、屋久島:

26/28 (92.9%), 大隅半島:15/25 (60.0%), 対馬:11/20 (55.0%), 種子島:10/20 (50.0%), 沖縄本島:3/6 (50.0%), 奄美大島群:16/37 (43.2%), 石垣島:4/29 (13.8%), 渥美半島:0/15 (0%) および佐渡島:0/17 (0%) であった。

②PCR による *B. gibsoni* の同定

上記の 84 例中、8 例で 2363bp 付近にバンドが認められた。それぞれの地域別の内訳は、沖縄本島:2/6 (33.3%), 奄美大島群:2/37 (5.4%), 対馬:1/20 (5.0%), 大隅半島:1/25 (4.0%), 屋久島:1/28 (3.6%), 石垣島:1/29 (3.4%), 渥美半島:0/15 (0%), 佐渡島:0/17 (0%) および種子島:0/20 (0%) であった。

③PCR による *Hepatozoon* の同定

84 例中、81 例で 660bp 付近にバンドが認められた。この中には、②で 2363bp 付近にバンドが認められた 8 例を含んでいた。これらの地域の内訳は、屋久島:26/28 (92.9%), 大隅半島:15/25 (60.0%), 対馬:11/20 (55.0%), 奄美大島群:16/37 (43.2%), 種子島:8/20 (40.0%), 沖縄本島:2/6 (33.3%), 石垣島:4/29 (13.8%), 渥美半島:0/15 (0%) および佐渡島:0/17 (0%) であった。

(2) 犬フィラリア症

ミクロフィラリアおよび *Dirofilaria immitis* (Di) 抗原陽性個体を示す。血液塗抹標本では、196 頭中 40 頭 (20.7%) でミクロフィラリアが観察された。その内訳は、沖縄本島:3/6 (50.0%), 対馬:9/20 (45.0%), 屋久島:12/28 (42.9%) 奄美大島:8/37

(21.6%), 鹿児島県大隅半島:3/25 (12%), 石垣島:3/29 (10.3%) 佐渡島:1/17 (5.9%), 種子島:1/20 (5%) および渥美半島 0/14 (0%) であった。また, 192 頭中 75 頭 (39.1%) で Di 抗原が検出された。その内訳は, 沖縄本島:6/6 (100%), 屋久島:15/27 (55.6%), 対馬:9/19 (47.4%), 大隅半島:10/25 (40%) 奄美大島:14/36 (38.9%), 石垣島:10/28 (35.7%), 種子島:6/20 (30.0%), 佐渡島:5/17 (29.4%) および渥美半島 0/14 (0%) であった。マイクロフィラリアと Di 抗原の両方が検出されたものは 38 例であった。また, ミクロフィラリアは検出されなかったものの, Di 抗原が検出されたものは 37 例であった。一方, Di 抗原が検出されなかったものの, ミクロフィラリアが検出されたものは 2 例であった。

各地域でフィラリア予防を行っている飼い主の数は, 石垣島:8/12 (66.7%), 渥美半島:1/2 (50%), 沖縄本島:2/5 (40%), 種子島:3/9 (33.3%), 大隅半島:2/6 (33.3%), 屋久島:2/9 (22.2%), 対馬:1/6 (16.7%), 佐渡島:2/14 (14.3%) および奄美大島:0/13 (0%) であり, 全体で 28/196 (14.3%) であった。この内, フィラリアの予防薬を投与しているにも関わらず, ミクロフィラリアもしくは Di 抗原が検出されたものは 10/28 (35.7%) 例で, 同一の飼い主に飼育されていたものは 2 頭のみであった。

D. 考察

今回の島嶼部および半島部における調査研究では, 高い感染率を示したトキソプラズマ感染 (71/196 : 36.2%), ヘパトゾーン感染 (45/191 : 23.6%) および犬フィラリ

ア症 (75/192 : 39.1%) 以外に, *Corinebacterium (C.) ulcerans* 感染 (13/196 : 6.6%), ボレリア感染 (31/196 : 15.8%), ブルセラ感染 (6/196 : 3.0%) が認められた。野兎病および破傷風は, 検索した島嶼部および半島部に由来する猟犬には認められなかった。

1) ジフテリア

島嶼部の猟犬 196 頭について *C. ulcerans* の保有状況を調べたところ, 奄美大島群, 佐渡島, 鹿児島大隅半島, 石垣島および沖縄本島において高い血清抗毒素価を示す個体が確認された。動物において抗毒素価が高い場合には *C. ulcerans* への感染歴を最も疑うべきである。しかし, *C. diphtheriae* への感染の可能性が完全に排除できない以上, 最終的には *C. ulcerans* の分離を行うことが必要である。

今回, 血清抗毒素価の高かった個体は, 同一の飼い主に飼育されていることが多かった。したがって, 各地域での血清陽性率の違いが, そのまま汚染率を表していると判断するべきではないと考える。現在, *C. ulcerans* の感染には, 家畜やペットとの接触や, 未殺菌牛乳の摂取が関与していると考えられている。そのため, 同一飼い主に飼育されており, 生活環境が同一かつ, 互いに接触の機会が多い犬でそれぞれ血清抗毒素価が高いということは, 同居犬同士が互いの感染原となっている可能性を残している。

今後は, 血清抗毒素価が陽性であった犬を含め, その同居犬や飼い主についても *C. ulcerans* の分離を試み, 対象とされる犬の周囲における感染状況を明らかにする必

要がある。

2) レプトスピラ

今回調査を行ったいずれの地域においても、抗レプトスピラ抗体の陽性例が高頻度に認められた。渥美半島における陽性例は全てワクチン接種歴があるため、自然感染ではなくワクチン接種による抗体価の上昇が検出されたという可能性が高いとして除外した。渥美半島以外の調査地においては、ワクチン接種歴がなく、かつ抗体価が陽性を示す個体がしばしば認められた。これらは自然感染による抗体価の上昇である可能性が高いため、*Leptospira spp.*の分布の評価に使用可能と考えられる。今回、大隅半島における陽性率は8.0%であったが、過去の調査では鹿児島県は2通りの検出方法のいずれにおいても抗レプトスピラ抗体は陰性であった。ただし、同地域では2003～2005年の期間にヒトの感染報告例があることから、この地域に*Leptospira spp.*が新たに侵入したという可能性は低く、以前からの分布域であったと考える方が妥当である。また、沖縄本島・石垣島については、過去に鼠からのレプトスピラ分離例があり、今回も陽性例が検出されたことから、清浄地ではないと考えべきである。また、対馬では昭和25年に患者が報告されているものの、近年になってからの報告例や分布調査はない。しかし、今回検出された4例のうち、No.85, 86は同じ飼い主であったが、No.75, 79はそれぞれ飼い主も居住地も異なっていた。このように、同じ島内の離れた地域においても陽性例が検出されたことから、対馬にはレプトスピラが分布していると

考えられる。奄美大島群・佐渡島・種子島・屋久島については、これまでに同地域を対象としたレプトスピラの分布調査は実施されておらず、これまでに患者も報告されていない。しかし、レプトスピラは動物の尿中に排出され、それに汚染された土壌や水を介して感染するため、陽性個体が1例であっても拡大範囲は広いと考えられる。したがって、4例検出された種子島だけでなく、1例のみであった佐渡島についても、今までこれらの地域にレプトスピラが分布していたか否かに関わらず、同地域においてレプトスピラが拡大する可能性に留意すべきである。

3) ライム病ボレリア

マダニ媒介性のライム病ボレリアの感染によって引き起こされるライム病はアメリカ東海岸やヨーロッパに発症例が多く、最近日本においても北海道や東北地方等の寒冷地で増加しつつある。日本では健常犬は発症しにくいのが老犬や幼犬など免疫力の低い犬では発症し、最も一般的に認められる症状としては多発性関節炎が挙げられる。ただし国内では関節炎が認められることは少なく、神経症状が主体である。媒介者であるマダニは草原や森林において生息しているため、山野に侵入する猟犬は感染する可能性が非常に高いといえる。前回の調査では患者の発生がない熊本および宮崎で抗体陽性例が高率に認められ、病原性の無いか、弱毒の菌株の存在が疑われていた。今回も、患者の発生が無い大隅半島、種子島および屋久島、石垣島で高い陽性率が認められたために、菌株の同定を試みたが分離には至らなかった。

4) ブルセラ症

今回、*Burucella (B.) abortus*に陽性を示すサンプルは認められなかったが、*B. canis*に陽性を示すものが 6/196 例認められた。今回 *B. canis* に対して陽性例が認められた地域の内、奄美大島群 (1/37 : 2.7%)、種子島 (1/20 : 5.0%) および石垣島 (1/29 : 3.4%) の陽性率は国内における陽性率の平均 (2~5%) と概ね一致していたため、地域による差はあまりないと考えられる。また、佐渡島の陽性率 (2/17 : 11.8%) は東日本における 2006 年度の調査結果 (12.9%) と大きな差はない。

2009 年の調査時には鹿児島県においてイノシシの *B. abortus* および *B. canis* 陽性例が確認されており、大隅半島の猟犬の多くがイノシシ対象としていたことから、この地域の猟犬にはイノシシを介した *B. abortus* および *B. canis* 感染のリスクが依然として存在すると考える。そのため、鹿児島県については今後継続的に猟犬の抗体調査を実施することがイノシシからの家畜やヒトへの *B. abortus* や *B. canis* の感染防止に役立つと考えられる。

また、対馬および屋久島については、今までにブルセラ症の疫学調査に関する報告はない。この 2 地域が *B. canis* および *B. abortus* に陰性であったことは、これらの地域がブルセラ菌に汚染されていないということを示唆する知見の一つと考える。

5) 野兔病

原因菌は *Francisella (F.) tularensis* (野兔病菌) であり、犬を始めとし、猫、羊、豚、牛、馬、兎、げっ歯類等多種の動物に認められる。人への感染は、汚染吸血性節

足動物の刺咬、犬猫などの保菌動物による咬傷、またペットに寄生している汚染ダニなどをつぶした際に飛び散る汚染液体などにより起こる。野兔病菌は健常人の皮膚、粘膜をも通過し、容易に感染が成立することから注意が必要である。日本における人の野兔病はこれまで主に東北地方の各県と千葉県、茨城県で発生が認められ、多くの県で散発的発生が存在する。今回の調査では、前回と同様に陽性例は認められず、これは患者の発生とよく一致していた。

6) 破傷風

破傷風菌 *Clostridium tetani* 産生外毒素が原因となって発症する。破傷風菌は広く自然界に分布し、土壌病の原因となり、犬の体表が土で汚れた際に傷口から侵入し、体内で毒素を産生する。今回、山野を駆け回り、土壌中の菌に汚染される可能性の高い猟犬において、菌保有調査を行うことで日本における破傷風菌の分布を知ることが出来ると考えたが、陽性個体は認められなかった。これは感染が発生した場合、猟犬は容易に淘汰されるため、活動している猟犬には陽性例を欠く可能性がある。

7) トキソプラズマ

今回のトキソプラズマ症の調査では、採血を行った全ての地域において陽性例が検出された。また、これらの地域を比較すると、屋久島の陽性率が 60.7% とやや高かった。近年ではあまりトキソプラズマ症の実態調査は大規模に行われていないが、往年の実態調査では、犬の抗体保有率は 10~30% であった。また、昨年岐阜、静岡、三重、長野、新潟の調査を行った際には、調

査地の平均は 19.7%であった。これらの結果と比較しても、屋久島の陽性率は高い。一方で、佐渡島（3/17：17.6%）や渥美半島（3/14：21.4%）の陽性率は、昨年度の中部地区にかんする調査結果とほぼ同等であった。

いずれの調査地域においても抗トキソプラズマ抗体陽性犬が認められたことから、これらの地域はいずれも野生下に *T. gondii* が分布しているということが示唆される。したがって、陽性率が高かった屋久島は勿論のこと、その他の地域においても狩猟肉の喫食には十分に注意しなければならない。また、犬がオーシストを摂取し、それがそのまま糞便に排泄される場合や、毛皮に付着したオーシストから感染が成立する場合もあり、子供が犬と触れ合うことがリスクになるとも言われている。そのため、特に妊婦は、狩猟肉に対する取り扱いの注意のみならず、狩猟犬に対しても不用意な接触をしないように心がける必要がある。

8) 犬由来の感染症

(1) バベシアおよびヘパトゾーン症

Babesia (B.) gibsoni および *Hepatozoon (H.) canis* の両方について、光学顕微鏡を用いた虫体検出および PCR による検出を試みたところ、いずれの原虫も PCR による検出の方が感度が高かった。したがって、症状が発現するような重度感染例を臨床的に検査する場合は血液塗抹標本上で虫体検出が可能であるが、本調査のように極めて軽度の感染例を含めて調査したい場合には、PCR を用いた検出がより有用であると考える。

今回、渥美半島と佐渡島を除く調査地

H. canis が検出され、同地域のうち種子島を除く場所で *B. gibsoni* が検出された。この様に、種子島以外の地域において 2 種の病原体が検出され、*B. gibsoni* に感染している個体の 89%が *H. canis* に混合感染しているということは、*B. gibsoni* を媒介するダニは、高い確率で *H. canis* も保有し、これらを同時に媒介するという可能性を示唆している。一般的に、*H. canis* のベクターはクリイロコイタマダニであるとされており、このダニは沖縄、石垣島および奄美地方の与論島以外にはほとんど分布していない。それにも関わらず、今回の調査では前述の地域以外で *H. canis* の分布が多くみられた。近年、他のチマダニ類やマダニ類がベクターとして働いている可能性が示唆されており、今回の結果はこの仮説を裏付けるものである。これらの中には *B. gibsoni* のベクターであるフタトゲチマダニやツリガネチマダニ、ヤマトマダニなども含まれる。

一方で、フタトゲチマダニやヤマトマダニは日本の広い地域で確認されているが、佐渡島や渥美半島のサンプルからは *B. gibsoni* および *H. canis* の陽性個体は検出されなかった。以前から近畿以西では *B. gibsoni* の感染が流行しているとされており、昨年の中部地方近辺の調査時には三重県のみで *B. gibsoni* が確認されている。また、過去の報告でも、岐阜県、富山県などの中部地方では *H. canis* の発生は認められていない。このことは、*H. canis* や *B. gibsoni* が依然として西日本のみ集中して分布しているということを示している。しかし、これらのベクターとなりうるダニが東日本にも広く分布しているということ

は、今後 *H. canis* および *B. gibsoni* の分布域がより北上していくという可能性を示唆している。

今回、特に屋久島では *H. canis* の陽性率が 92.9% と高く、きわめて多くの猟犬がダニ類に頻回暴露されていることが示唆された。このことは屋久島の猟犬はフタトゲチマダニなどによって媒介される他の疾病（人獣共通感染症を含め）に暴露されている可能性が高いということを示唆しているが、同時にこの地域において野外活動を行うヒトの暴露リスクも示している。屋久島においては猟犬を介して飼い主にこれらの疾病が伝播される可能性だけでなく、野外でこれらの疾病に直接感染しうる可能性があることから、ダニ媒介性の人獣共通感染症（*Borrelia* 他）についての調査を実施し、これらの疾病の分布がある場合には注意を喚起する必要がある。

（2）フィラリア症

今回、マイクロフィラリアの検出率と *Dirofilaria immitis* (Di) 抗原の検出率を比較すると、どの地域においても Di 抗原の検出率のほうが高かった。Di 抗原の検出率のほうが総じて高かったことと、一般的に、Di 抗原の検出のほうが感度・特異性ともに高いと言われているため、地域別の比較には Di 抗原による検出率を用いたほうが適切であると考えられる。Di 抗原が検出されたにも関わらず、マイクロフィラリアが検出されなかった個体が 37 例あった。これは、いわゆる“オカルト感染”であると考えられる。日本で広く確認されているフィラリアの種は *D. immitis* であるが、沖縄では *Dirofilaria repens* や *Dipetalonema*

reconditum などの他の糸状虫の検出例がある。しかし、今回確認された 2 例は、それぞれ奄美大島群および屋久島で検出されたものであるため、*D. immitis* 以外のフィラリアという可能性は低いのではないかと考えられる。また、この 2 例は成虫の駆除に関する既往歴がなく、フィラリアの臨床兆候も認められなかった。そのため、ごく少数の成虫が感染しており、それが死んだ場合と、抗原が抗体との複合体を形成している場合のいずれかである可能性が高い。今回の調査結果を考慮すると、*D. immitis* の分布調査には Di 抗原の検出と共に末梢血中のマイクロフィラリア検出を実施するほうが、より正確な状況が把握できると考えられる。

渥美半島以外の調査地においては、犬糸状虫がほぼ 30% 以上の陽性率で認められた。犬における犬糸状虫の寄生率が高い場所では、ヒトのフィラリア症の発生率が高いという報告があることを考慮すると、これらの地域では野生動物およびヒトに感染するリスクがあると考えられる。

E. 結論

- 1) 南西諸島を中心とした島嶼部および半島部（渥美および大隅半島）の猟犬につき、ジフテリア症、レプトスピラ症、ライム病、トキソプラズマ症など重要人獣共通感染症についての抗体調査を実施したところ、それぞれの感染症に対する高い抗体陽性例がしばしば検出された。島嶼部においては、島ごとに各感染症の陽性率に変動が認められた。
- 2) 屋久島など南西諸島の一部では、トキソプラズマ、ヘパトゾーンなどの感染症で

極めて高い陽性率が認められたことから、実際の患者の発生を含め、その原因とヒトに対する影響について再調査する必要がある。

3) 以上のことからヒトでの感染リスクを予想するうえで、前回の報告と同様に猟犬がこれらの感染症の疫学情報の収集に有用と思われる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表等

(1) 佐藤静香, 大井誠明, 側嶋絵里菜, 松本淳, 柳井徳磨, 村井厚子, 野中成晃, 堀井洋一, 野上貞雄. 猟犬のトキソプラズマ抗体保有状況. 第17回日本野生動物医学学会(東京), 2011年9月, 要旨集 p108

H.知的財産権の出願登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新登録 なし

3. その他 なし

• Fig. 1 材料および方法

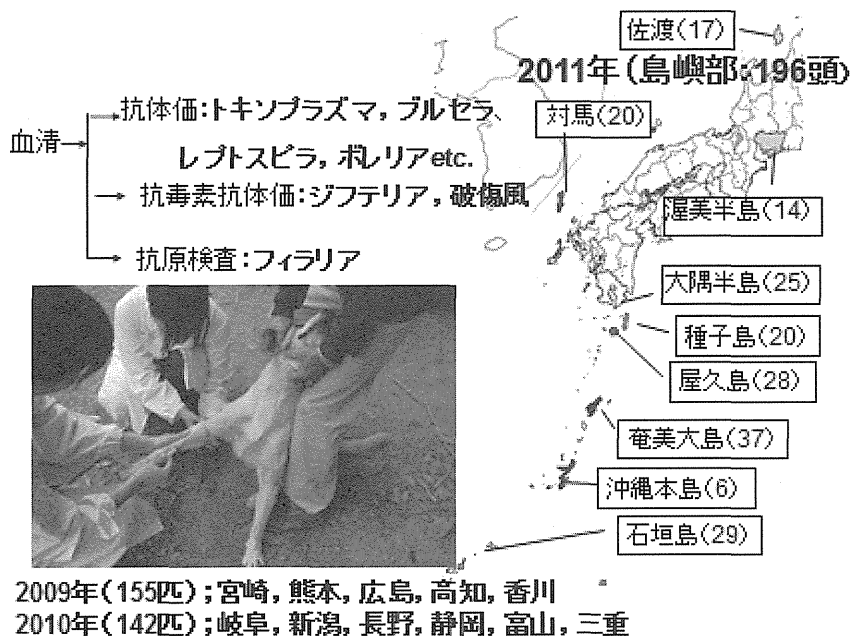


Table 1. 主要野外病原体の陽性率

2011年	抗トキソプラズマ 抗体	抗レプトスピラ 抗体	フィラリア 抗原	ジフテリア 抗毒素抗体	ボレリア ELISA/Western
佐渡(17)	17.6	5.9	29.4	5.9	5.8
渥美(14)	21.4	—	—	—	14.2
対馬(20)	40.0	20.0	47.4	—	5.0
大隅(25)	32.0	8.0	40.0	20.0	44.0
種子(20)	30.0	20.0	30.0	—	20.0
屋久(28)	60.7	7.1	55.6	—	17.8
奄美(37)	32.4	2.7	38.9	8.1	2.7
沖縄(6)	50.0	16.7	100	16.7	0
石垣(29)	37.9	17.2	35.7	10.3	20.6
2010(142)	19.7	ND	26.0	7.7	44.3
2009(155)	ND	7.8	ND	8.4	19.4

(検出率:%)

競合 ELISA 法による多様な動物種に適用可能な野兔病菌抗体測定法の開発

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
研究協力者 シャルマ ニークン*、堀田明豊、宇田晶彦、藤田修、山本美江
(国立感染症研究所獣医科学部、*岐阜大学大学院連合獣医研究科)
溝口俊夫(福島県鳥獣保護センター)、進藤順治、朴天鎬、小山田敏文、畑井仁、
工藤上(北里大学獣医学部)

研究要旨 野兔病の起因病原体である野兔病菌 (*Francisella tularensis*) は、非常に多くの動物種に感染することができ、野生動物等の血清疫学調査では、多様な動物種に適用可能な抗体測定法が必要となる。本研究では野兔病菌 LPS および抗 LPS モノクローナル抗体を抗原と標準抗体として各種動物由来血液検体に含まれる野兔病菌抗体による競合反応として測定する競合 ELISA (Ft-cELISA) を開発した。本方法で、既知の野兔病菌免疫ウサギ血清抗体や患者血清抗体等を効率よく測定することができた。また、国内の野生動物の血液検体について野兔病菌抗体の検出を試み、ツキノワグマ、ニホンザル、ホンダタヌキ、野鼠類で陽性反応を認めた。これらはいずれも微量凝集反応 (MA) 法でも陽性であった。Ft-cELISA は動物種特異的標識二次抗体等を用いることなく野兔病菌抗体を測定でき有用な方法と考えられるが、さらに多くの検体を測定し、MA やウェスタンブロット法等の他の手法との相関性を検証する必要がある。

A. 研究目的

野兔病菌は、代表的な動物由来感染症である野兔病の起因病原体である。本菌は、感染ノウサギやげっ歯類との直接接触、ダニや蚊等の吸血性節足動物の媒介、汚染食物や水、汚染塵芥の吸入等によりヒトに感染するとされている。日本での患者発生は近年まれであるが、これまでのヒトへの感染のほとんどがノウサギとの接触が原因となっている。しかしながら、本菌は非常に多数の動物種に感染が可能である事が知られており、各種動物での分布状況を調査解析し、本菌の生態系での維持様式やヒトへの感染リスクを評価するための基礎的情報を収集することは重要である。

各種動物、特に野生動物における感染状況の調査では血清中の野兔病菌に対する抗体を検出する血清疫学調査は有効な手法と考えられる。このための抗体測定法としては、微量凝集

反応 (MA) 法や ELISA 法などが用いられる。しかしながら、特に、野生動物から採取される検体においては、溶血していたり、少量しか採取できないなどの困難さがある。また、通常の ELISA 法では酵素標識された動物種特異的イムノグロブリン抗体などが利用されるが、市販されている動物種は限られている。

本研究では、多様な種の動物における野兔病菌抗体を測定するための方法として競合 ELISA (Ft-cELISA) 法の開発を行い、この方法で国内各種動物の血液検体での野兔病菌抗体検出に応用することを目的とした。

B. 研究方法

1. 野兔病菌抗体測定用 Ft-cELISA

(1) 抗原および標準抗体：ELISA 用 96 穴プレートに固相化する野兔病菌の抗原は、リポポリサッカライド(LPS)を用いることとし、LPS

の抽出は国内斃死ノウサギより分離した NVF1 株を chocolate agar II 培地 (Becton Dickinson 社) で培養後、LPS extraction kit (iNtRON Biotechnology 社) を用いて行った。

標準抗野兎病菌抗体は、LPS を認識するマウスモノクローナル抗体 (クローン M14B11) をビオチン標識 (T.K. Craft 社) して用いた。

(2) cELISA 反応: 抽出精製 LPS 抗原 (2.5µg/50µl/well) を 96 穴 ELISA プレートに加え 37°C で 16~18 時間保温し固相化した。PBST (0.1% Tween20 加 PBS) での洗浄後、3% スキムミルク加 PBST でブロッキングした。PBS で希釈した検体 50µl を加え 37°C、90 分間反応させ、PBST で洗浄後、ビオチン標識抗 LPS 抗体 (3.4mg/ml) 50µl を 37°C、60 分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンおよび SureBlue reserve TMB MicroWell Peroxidase Substrate (KPL 社) を反応させ、固相抗原と反応した標準 LPS 抗体を発色させた。1N 塩酸で反応停止後 450nm の吸光度を計測した。

(3) 反応阻止率の算出: 検体中の野兎病菌 LPS 抗体による標準抗 LPS 抗体の反応の阻止率(% inhibition)は、検体希釈液だけを事前に反応させた時の標準抗 LPS 抗体の吸光度を 100% とし、検体を反応させた場合の吸光度の割合を、以下の計算式により算出した。

$$1 - \left(\frac{\text{OD sample} - \text{OD Background}}{\text{OD standard} - \text{OD Background}} \right) \times 100$$

2. cELISA での既知血清の反応

不活化野兎病菌を免疫したウサギ血清 (2 検体) を 125 倍から 16,000 倍に希釈し、各希釈における反応阻止率を Ft-ELISA で測定した。陰性対照には非免疫ウサギ血清を用いた。同様に、不活化菌を免疫したマウス血清 (2 検体) および感染耐過したマウスの血清を測定した。さらに、不活化した野兎病菌の類似菌である *F. novicida* の免疫マウス血清についても測定した。また、野兎病と診断されたヒト血清および野兎病と確認されなかった血清各 3 検体も段階

希釈して測定した。ヒト血清の使用については国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会で承認されたものである。

3. 非特異反応の確認

Ft-cELISA の特異性を確認するために、不活化ブルセラ属菌 (*Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*) や *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* を免疫したウサギ血清を段階希釈し各希釈での反応阻止率を測定した。これらの血清は国立感染症研究所獣医科学部今岡浩一博士より分与された。

4. 各種野生動物由来血液検体の測定

収集または分与された国内野生動物由来血液のうち、主に、過去に野兎病の発生が多く報告されていた東北地方で捕獲された各種動物の検体 (表 1、ノウサギについては血清あるいは全血吸収ろ紙からの抽出液) 合計 510 検体の 100 倍希釈液について Ft-cELISA を行い、阻止率を算出し、30% 以上を陽性とした。なお、血清については MA 法でも抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. 野兎病菌免疫ウサギおよびマウス血清および既知の患者血清の Ft-cELISA での反応

不活化した野兎病菌を免疫したウサギ血清および非免疫血清を段階希釈して、標準抗 LPS 抗体の反応阻止率を算出した (図 1A)。2 検体の免疫ウサギ血清はそれぞれ 4,000 倍または 8,000 倍希釈まで 30% 以上の阻止率を示した。非免疫血清はほとんど反応を阻止しなかった。

野兎病菌感染後耐過したマウス血清および不活化菌免疫マウス血清はそれぞれ、1,000 倍以上、500 倍、250 倍で 30% 阻止を示し、非免疫マウス血清での阻止は見られなかった。野兎病菌の類似菌である *F. novicida* の免疫血清は低希釈で 20% 程度の阻止が見られた (図 1B)。

MA で野兎病菌抗体が確認されたヒト血清 3 検体はいずれも希釈に応じた反応阻止を示し、いずれも 2,000 倍希釈で 30% 以上の阻止率を示した。なお、これらの MA 抗体価は 40 または 160 であった。MA で 10 倍未満の非野兎病ヒト血清 3 検体では、いずれも反応阻止は認め

られなかった。(図2)

3. 非特異反応の確認

Ft-cELISAの特異反応性を確認するために、野兎病菌以外の細菌が免疫されたウサギ血清の反応を調べた。野兎病検査で非特異反応の可能性が指摘されているブルセラ属菌免疫血清のうち *B. abortus* と *B. canis* 血清や *Y. enterocolitica* 免疫血清は低希釈で 20%程度の反応阻止を示した。*B. melitensis*、*B. suis* や *Y. pestis* では弱い阻止が見られたが、*Y. pseudotuberculosis* を免疫したウサギ血清は阻止しなかった。(図3)

4. 各種野生動物由来血液検体の測定

国内の各種野生動物血液 510 検体について、その 100 倍希釈液を Ft-cELISA で測定し 30%以上を阻止した検体数および MA で 10 倍以上の抗体価を示した検体数を陽性として表1に検体数を示した。ツキノワグマで 4/28 (陽性数/供試検体数)、ニホンザル 1/26、ホンダタヌキ 3/21、野鼠類 2/120 が Ft-cELISA で陽性だった。また、MA では 7 検体が陽性であり、これら 7 検体は全て Ft-cELISA でも陽性の検体であった。

D. 考察

動物由来感染症のサーベイランスやモニタリングの結果は感染症対策立案のための重要な情報を提供できる。そのためには、的確な検査法での調査が必要である。特に、人獣共通感染症においては感染源動物における調査も重要となる。本研究では動物由来感染のうち野兎病の動物での調査に有用な抗体検査法の確立とその応用を試みた。

野兎病の抗体検査は通常 MA 法により実施され、簡易な方法である一方、非特異反応の可能性があること、検出感度が高くないこと、溶血が著しい検体では利用しにくい等の問題がある。また、ELISA 法は、多検体処理が可能で感度もよい方法であるが、利用できる標識二次抗体に制限がある。これらの問題を解決する抗体検出法として競合 ELISA を野兎病抗体測定に応用することとした。事前に、使用する菌

株の選定や全菌体抗原あるいは LPS 抗原を使用した cELISA を検討し、菌株は斃死野兎から分離され人工培地での継代が進んでいない NVF1 株を、標準抗体としては、当研究室で樹立した抗野兎病菌 LPS マウスモノクローナル抗体を用いることとし、ビオチン標識して用いた。

抗原や標準抗体の使用濃度や反応時間等の基礎条件を検討し、初めに不活化野兎病菌免疫ウサギ血清抗体を測定したところ検体の希釈倍率依存的に標準抗体の反応を阻害し、高希釈倍率まで有意な阻害反応を示し感度良くできることが示された。同様に免疫または感染耐過マウス血清でも測定できた。次に、既知のヒト血清においても血清濃度依存的な阻害率を示し、非特異な阻害は認められず本 Ft-ELISA が有用であることが示された。また、MA 法では 40 倍もしくは 160 倍の抗体価を示した血清は Ft-ELISA では 2,000 倍でも 30%阻害を示し、MA に比較して 50 倍以上感度がよい方法であることが示された。さらに、他の病原体免疫血清での阻害はなかった。これらの結果から、本 Ft-cELISA 法での抗体陽性判定は 30%阻害以上とすることとした。

ノウサギ、ツキノワグマ、野鼠等の野生動物の血液検体での野兎病菌抗体測定に応用できるかを検証するために、510 検体を Ft-ELISA で測定したところ、ツキノワグマ、ホンダタヌキ、ニホンザルで合計 10 検体が 30%以上の阻害を示した。MA 法で 10 倍以上の抗体価を示した全検体が Ft-cELISA でも陽性と判定できたことから高感度に検出できる方法であることがわかり、本法が多種類の動物血清の抗体測定に有用であると示唆された。しかしながら、野兎病菌抗体陽性の野生動物の検体数は少なく他の手法との相関性等を正確に検証するためにもさらに多数の検体の測定と MA をはじめウェスタンブロット法や蛍光抗体法等の他の測定方法との比較検証をする必要があると考えられる。

本研究に使用した動物検体の分与および収集に協力いただいた、岩手大学青木美樹子先生、

北海道大学荻和宏明先生、大日本猟友会および
猟友会会員の皆様に感謝いたします。

E. 結論

多様な動物種に適用可能な野兎病菌抗体測定法として競合 ELISA(Ft-cELISA)を開発した。実験用ウサギやマウス免疫または感染血清、および野兎病患者血清で明らかな抗野兎病菌 LPS モノクローナル抗体の反応阻害がみられ、野兎病菌以外の抗体は反応を阻害しなかった。Ft-cELISA で 510 検体の各種野生動物の血液検体を測定し 10 検体が陽性と判定され、微量凝集反応法での陽性検体は全て陽性だった。本 Ft-cELISA は多種類の野生動物の野兎病の血清疫学調査に有用と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. Zoonoses and Public Health (印刷中) A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, T. Mizoguchi and A. Yamada

2. 学会発表

Development of competitive ELISA for serosurvey of tularemia among various animal species. N Sharma, A Hotta, K Tanabayashi, Y Yamamoto, O Fujita, A Uda, T Mizoguchi, J Shindo, C-H Park, N Kudo, H Hatai, T Oyamada, A Yamada. 5th Asian Workshop on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation in Nepal 2011 (2011年10月 カトマンズ、ネパール)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

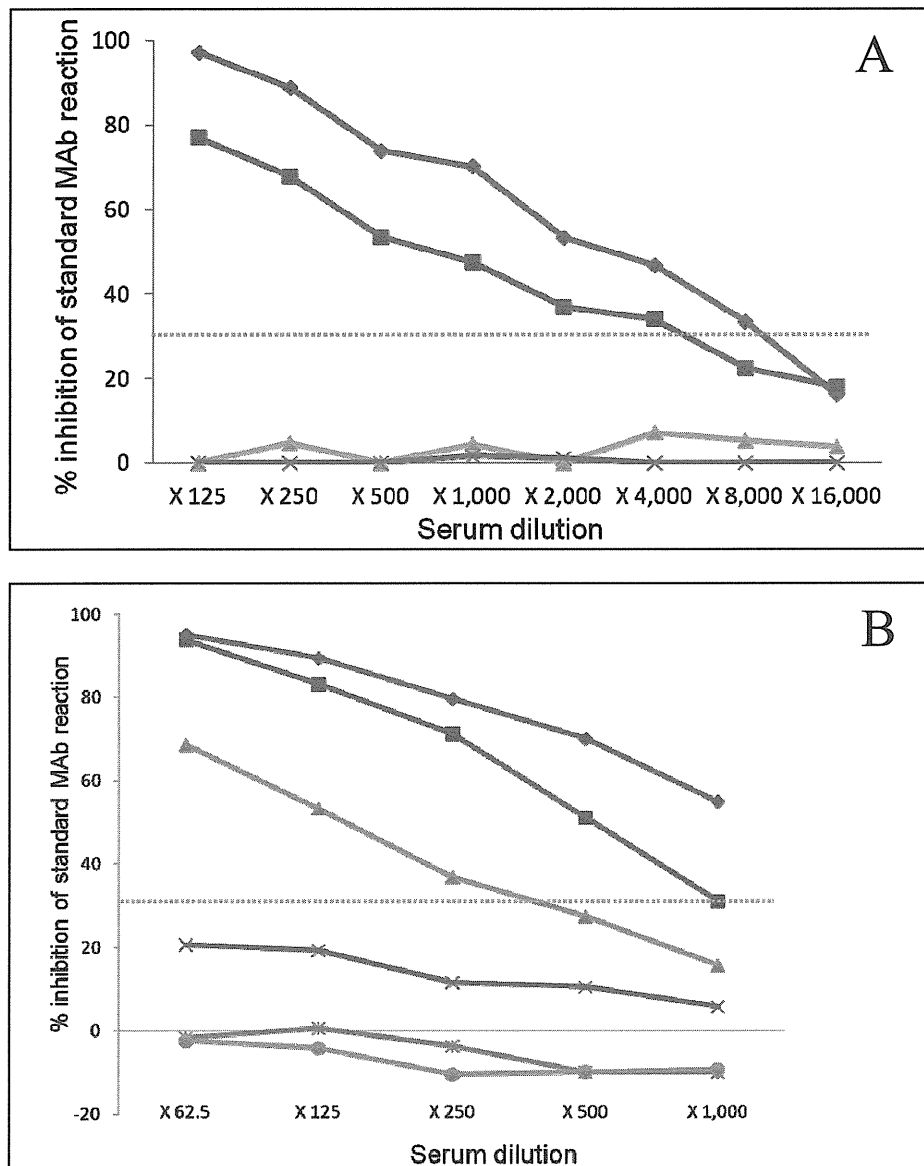


図 1. 野兎病菌免疫ウサギおよびマウス血清の Ft-cELISA での反応

(A) 不活化野兎病菌免疫ウサギ血清(◆、■)および非免疫ウサギ血清(▲、×)を125倍から16,000倍まで2倍段階希釈して Ft-cELISA で反応させ、各希釈での反応阻止率を算出した。(B) 不活化野兎病菌免疫マウス血清(■、▲)、感染耐過マウス血清(◆)、不活化 *Enovicida* 免疫マウス血清(×)および非免疫マウス血清(●、※)を62.5倍から1,000倍まで2倍段階希釈して Ft-cELISA で反応させ、各希釈での反応阻止率を算出した。

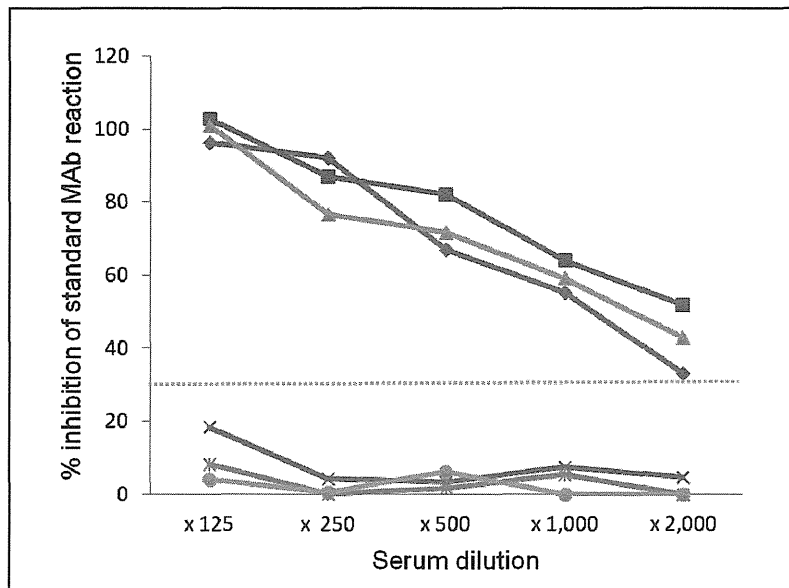


図 2. 野兎病菌抗体陽性および陰性ヒト血清の Ft-cELISA での反応
 陽性ヒト血清 (◆、■、▲ : MA 抗体価はそれぞれ 40 倍、160 倍、160 倍)
 および陰性ヒト血清 (×、※、● : MA 抗体価はいずれも 10 倍未満) を 125
 倍から 2,000 倍まで 2 倍段階希釈して Ft-cELISA で反応させ、各希釈での
 反応阻止率を算出した。

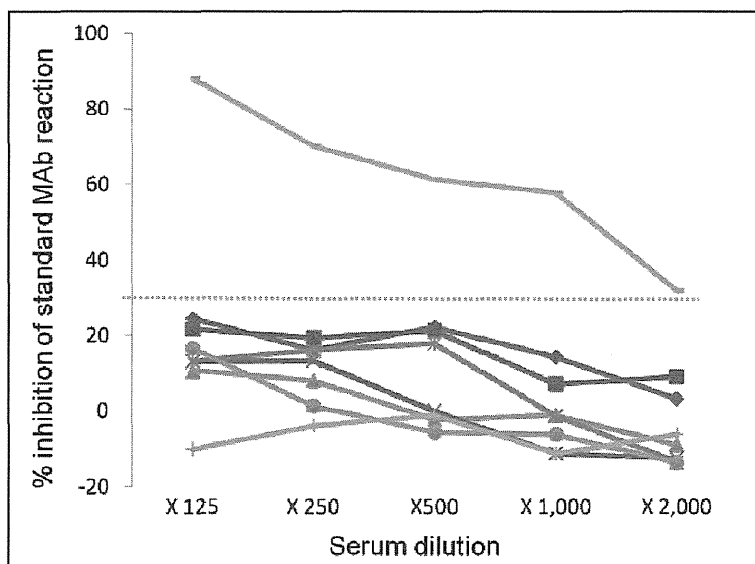


図 3. 各種細菌免疫ウサギ血清の Ft-cELISA での反応
 不活化 *Brucella abortus*(◆), *B. canis*(■), *B. melitensis*(▲), *B. suis*(×),
Y. enterocolitica (※), *Yersinia pestis* (●), *Y. pseudotuberculosis* (+)
F. tularensis(-)免疫ウサギ血清を 125 倍から 2,000 倍まで 2 倍段階希釈して
 Ft-cELISA で反応させ、各希釈での反応阻止率を算出した。

表 1. 各種野生動物由来血液検体の Ft-cELISA による陽性率

野生動物種等	No. of samples	No. of positive	
		cELISA	MA
ノウサギ	142	0	0
ツキノワグマ	28	4	4
ニホンザル	26	1	0
ホンドタヌキ	21	3	2
ハクビシン	20	0	0
ホンドキツネ	3	0	0
野ネズミ類 (アカネズミ、ハタネズミ、ヒメネズミ、トガリネズミ、ヒミズ)	120	2	1
ラット類 (クマネズミ、ドブネズミ)	97	0	0
猛禽類 (オジロワシ、ハヤブサ、トビ、ノスリ、サシバ、フクロウ、オオタカ)	53	0	0
Total	510	10	7

(検体は PBS にて 100 倍希釈)

エキノコックスに関する研究

研究分担者 森嶋康之（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

研究協力者 杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）

山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部 第二室長）

要旨 ヒトの感染時における早期診断システムの確立ならびに感染源となる動物での寄生虫の発育を阻害する分子標的治療薬の開発を目的とし、エキノコックスの各発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定するため、マイクロアレイでの解析に至適化した *in vitro* の人工培養系を開発した。

A. 研究目的

エキノコックス症は、エキノコックス属条虫の幼虫寄生によって引き起こされる人獣共通寄生虫症で、ヒトをはじめとする中間宿主動物に致死的な転帰をもたらす。このような強い病原性は一般的な条虫幼虫感染症と異なるものであるが、その差異は本属条虫のみに特異的な幼虫形態である原頭節の無性生殖能にあると考えられている。すなわち、中間宿主体内において原頭節は無性的に増殖していく。ところが、原頭節はイヌをはじめとする終宿主動物に経口摂取された場合、同発育ステージである原頭節へと再分化するのではなく、次の発育ステージである成虫へと変化し、有性生殖を行って虫卵を産生する。本研究は、このエキノコックスの原頭節が持つ二方向性の分化能に焦点をあて、はじめにその方向決定に関わる遺伝子の発現および制御の機構の分子レベルでの解明を試みている。

エキノコックス原頭節の分化を網羅的に解析するにあたって、各発育期を経時的に取得

しなければならない。しかし、本来の宿主動物を用いる方法では、感染動物の維持・飼育を行う施設面からも、また動物倫理上からも多数のサンプリングポイントを設定することができない。そのため、人工培養を用いたサンプリング方法が必要となる。

エキノコックス原頭節の人工培養は古くから試みられてきた。他の寄生蠕虫同様、いまだ生活環の完結までは至っていないが、種々の化学処理によってある程度の段階まで発育を促すことが可能とされている。ところが、予備的にこれらのプロトコルに従って得られたサンプルの RNA 品質を調べてみると、たしかに発育を誘導することはできるものの、遺伝子発現プロファイリングにおいて要求される品質を満たすことができず、再現性の高い結果が得られないことが予想された。そこで本研究ではトランスクリプトーム解析に適用することが可能な損傷の少ない RNA を得ることを目的として、特に分化初期における人工培養法の至適化をはかった。

B. 研究方法

エキノコックス属原頭節の人工培養の基本的な考えは、終宿主に経口摂取されたあと、消化の過程で発生する事象をいかに再現するかであり、先行研究もこのことを常に意識している。本研究では、Smyth (1979) および Thompson et al. (1990) の方法を出発点として、より高品質の RNA を得られる条件について検討を進めた。

エキノコックスの原頭節は、二次包虫症によって感染させた実験動物（スナネズミ）から得た。原頭節は、定法にしたがって宿主組織から分離・精製後、以下の処理 I~III およびそれに付随する培養を行い、処理方法および時間の最適な組み合わせを探索した。

処理 I は胃環境を仮定したもので、1%ペプシン溶液あるいは 0.9%塩化ナトリウム溶液 (pH 2.0) に浸漬し、37°C で 15 分/30 分/1 時間処理、処理 II は腸環境を仮定したもので、1%パンクレアチンおよび 10%胆汁（タウロコール酸ナトリウムまたは再構成イヌ胆汁のいずれか）溶液 (pH 8.0) に浸漬し、37°C で 30 分/1 時間/2 時間処理、処理 III も腸環境の仮定で、0.3%トリプシン加・FBS 非添加培養液 (Thompson et al. 1990) 溶液に浸漬し、3 時間/12 時間/24 時間処理を行った。処理 III 終了後、FBS 加培養液に移し、38°C-5% CO₂ 条件下で本培養を行い、12 日後まで毎日サンプリングを行い、その際実体顕微鏡下で原頭節の翻転ならびに石灰小体の消失程度を主とした形態学的な変化を観察した。

得られたサンプルの評価は、形態学的な変化のほか、市販キット (PureLink RNA Mini Kit, インビトロジェン) を用いてトータル RNA を精製後、バイオアナライザ (Agilent 2100、アジレント) を用いて RIN 値を測定し、そ

れぞれの培養系で得られたサンプルの RNA の品質を比較した。

C. 結果

処理 I では処理溶液間で形態学的な差異は確認できなかったが、RIN 値を比べると、0.9%塩化ナトリウム溶液処理群でより高い値が示された。3 種の処理時間には有意な差は認められなかった。処理 II ではタウロコール酸ナトリウムと再構成イヌ胆汁とのあいだに有意な差は認められなかった。処理時間は 30 分~2 時間まで本培養時における形態学的な違いは認められなかったが、処理時間が延長するにつれ RIN 値が徐々に低下する傾向があった。処理 III は継続時間が長いほどその後の本培養時における翻転原頭節の出現率が高くなった。しかし一方で 24 時間処理では RIN 値が極端に低下し、本培養期間中の回復も遅かった。

以上、RIN 値ならびに形態学的変化にもとづいて分化初期における遺伝子発現を観察するのに最も優れた培養系として選別されたのは、処理 I : 0.9%塩化ナトリウム (pH 2.0) 15 分→処理 II : 1%パンクレアチン+タウロコール酸ナトリウム (pH 8.0) 30 分→処理 III : 実施しないで、処理から培養の全期間を通じた平均 RIN 値は 7.6 であった。

D. 考察

これまで検討がなされてきたエキノコックス原頭節の人工培養法は、生活環を完結させることに目標が置かれてきた。すなわち、成虫型への分化であれば性成熟 (中間宿主への感染能を持つ虫卵の有無) である。しかしながら、これらの方法では、従来の分化と発育の促進を強く誘導することに主眼が置かれ、そのような処理によって一時的にはあれ

生じている虫体そのものの損傷が顧みられることはなかった。

実際、今回予備的に検討したところ、先行研究のプロトコルは、分化・発育自体は促進されたものの、生体へのダメージが大きく、マイクロアレイで要求される品質を満たすことが困難であった。マイクロアレイに適用する場合、アジレントは RIN 値 7.0 以上を推奨しているが、従来プロトコルによって得られたサンプルでは RIN 値はしばしばこれを下回っていた。今回確立した方法では、虫体の損傷をできるだけ避けつつ、従来報告されてきた分化・発育程度とほぼ同等の効率を達成することができた。すでに本方法にもとづいて得たサンプルを用いてマイクロアレイデータを取得しており、現在解析を進めている。

また、今回検討を重ねた *in vitro* の人工培養法は、分化関連遺伝子の発現解析に有用であるのみならず、新規薬剤候補をスクリーニングする際の評価にも応用可能なものであり、作用機序の理解など、トランスクリプトーム解析と組み合わせての活用も期待される。

E. 結論

エキノコックスの発育ステージに特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定し、その制御機構を解析することを目的として、マイクロアレイを用いた解析に適用可能な品質の RNA サンプルを得るための人工培養法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし