

短報

イヌのジアルジア保有状況

稲田貴嗣¹, 古川一郎¹, 泉山信司²,
 外谷由紀³, 白井和彦^{3*}, 黒木俊郎¹

Prevalence of *Giardia* infection in dogs

Takatsugu INADA, Ichiro FURUKAWA,
 Shinji IZUMIYAMA, Yuki TOYA,
 Kazuhiko USUI and Toshiro KUROKI

はじめに

Giardia lamblia (syn. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) はジアルジア症(五類感染症)の原因となる消化管寄生原虫の一種で、ヒトでは無症状のこともあるが、多くの場合不定の下痢、腹痛を起し、その症状は一般に小児、特に低栄養乳幼児で著明で、脱水症の原因になることが知られている。日本で報告されている症例数は年間100例前後で、その60%以上は海外での感染と推測されている。日本での集団感染事例は知られていないが、先進諸国では水系感染による集団発生事例などが問題になっている。

Giardia 属の原虫の多くは、哺乳類、鳥類、八虫類などから検出されており、種による宿主特異性が強いと考えられてきた。しかし、ヒトに寄生する唯一の種として知られている *G. lamblia* は、イヌ、ネコ、有蹄類、齧歯類などからも検出されており、ヒトと同様の症状を示す人獣共通感染症の原因としても知られている。*G. lamblia* には7遺伝子型(assembly A-G)があることが明らかにされており¹⁾、それらのうち、ヒトが宿主となる遺伝子型は assembly A (ヒト、イヌ、ネコ、家畜類由来)、assembly A (ヒトのみ由来)および assembly B (ヒト、イヌ、ラットなど由来)であるとされてきた。そのためジアルジア症の原因として assembly A と B が注目されてきた

が、近年、ヒト検体の中からイヌに特異的とされる遺伝子型(assembly C, D)が検出された。イヌはペット、コンパニオンアニマルとしてヒトの生活と密接した動物であり、イヌのジアルジア保有状況とその遺伝子型を明らかにすることは、イヌからヒトへの感染を防御するための対策を考えるうえで重要である。さらに、日本国内の浄水場の水源からイヌ由来と推測される *G. lamblia* が検出されており²⁾、イヌを介する *G. lamblia* の水源汚染も考えられることから、神奈川県内のイヌの *G. lamblia* 保有状況とその遺伝子型の調査を行った。

材料および方法

2008年から2009年に、神奈川県動物保護センターに保護されたイヌ180匹(表1)の糞便から *G. lamblia* (シスト)の検出を行った。採取された糞便は検査に用いるまで冷蔵保存した。

表1 調査犬種の匹数と年齢

犬種	年齢(推定)					合計
	≤0.5	≤1	2	3	4≤	
雑種	10 ^{*1}	12	9	10	52	93
秋田犬					1	1
アフガンハウンド [†]					1	1
アメリカンコッカースパニエル				1	1	2
アラスカマラミュート					1	1
ウエルシュコーギー			1		1	2
紀州犬					1	1
ゴールデンレトリバー					2	2
シーズー					6	6
シェパード [†]					1	1
シェルティー					1	1
柴犬	1	1	2	1	12	17
セッター					1	1
チワワ			1 ^{*2}	1	2	4
トイプードル					2	2
日本スピッツ				1		1
パネーズ [†]					1	1
パグ					2	2
パセットハウンド [†]					1	1
パピヨン		1		2		3
ビーグル			1	1	7	9
ポインター			2	1		3
プラットハウンド [†]					1	1
ボーダーコリー			1		1	2
ボメラニアン					2	2
ミニチュアシュナウザー [†]			1		2	3
ミニチュアダックス		1	1	4	2	8
ミニチュアピンシャー			1		1	2
ヨークシャーテリア					2	2
ラブラドルレトリバー		1			4	5
合計	11	16	20	22	111	180
年齢構成(%)	6.1	8.9	11.1	12.2	61.7	

*1: *G. lamblia*陽性4例を含む

*2: *G. lamblia*陽性

1 神奈川県衛生研究所 微生物部
 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1
 2 国立感染症研究所 寄生動物部
 3 神奈川県動物保護センター 業務課
 * 現 食肉衛生検査所

適量の糞便を用いてホルマリン・酢酸エチル遠沈法によりシストを精製した。得られた沈渣をスライドガラスに適量塗抹して、恒温器(37℃)中で乾燥後にメタノールで固定し、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗 *Giardia* 抗体 (Aqua-Glo G/C, Waterborne) による蛍光染色30分と DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) 染色5分を暗箱内にて行った。PBSで洗浄後、2% DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) PBSで封入し作製した標本を、落射型蛍光顕微鏡を用いてB励起光下で観察した。*G. lamblia* (シスト:長径約10 μmの楕円形)が疑われるFITC陽性粒子は、UV励起光下でのDAPIで染色された核の確認を行った。

鏡検によって *G. lamblia* (シスト)が見つかった検体は、18S rRNAを標的としたnested polymerase chain reaction (nested-PCR)を行った。DNAの抽出は、沈渣からDynabeads GC-Combo (Invitrogen)を用いてシストを濃縮・精製し、凍結融解(-80℃~37℃)を5回繰り返した後、1×Proteinase K 20 μl添加、インキュベート60~30分、超音波処理2分、インキュベート75~10分、インキュベート95~5分、氷上冷却を行った。1st PCRでは抽出DNA溶液4 μlをtemplateとして使用した。PCR反応液の組成は、2mM MgCl₂, 0.2mM dGTP, 0.2mM dATP, 0.2mM dTTP, 0.2mM dCTP, 40pMの各プライマー (RH11/4³), 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), 5 unit HS EX Taq (TaKaRa EX Taq Hot Start Version: タカラバイオ)で、反応容量は50 μlとした。nested-PCRは、1st PCR産物1 μlをtemplate, GiarF/R⁴をプライマーとして、他の組成は1st PCRと同様とした。PCR条件は、96℃2分後に、96℃20秒, 55℃30秒, 72℃30秒を1サイクルとして40サイクル繰り返し、その後72℃7分とした。PCR産物をQiaquick PCR purification kit (QIAGEN)で精製後、BigDye Terminator v1.1 (ABI)を用いて、ABI 310 Prismにより塩基配列を決定し、GenBank (NCBI)を利用した相同性解析によって遺伝子型別を行った。

結果および考察

2008年から2009年に保護されたイヌ180匹のうち、2008年に保護された雑種で生後6ヶ月以下の4匹 (No. 2008-1~4)と2歳のチワワ1匹の糞便から *G. lamblia* が検出された。調査したイヌ全体における *G. lamblia* 感染率は2.8%で、生後6ヶ月以下のイヌでは36.4% (4/11匹)、生後7ヶ月以上のイヌでは0.6% (1/169匹)であった。

Itoh et al⁵⁾は、生後6ヶ月以下のイヌの *G. lamblia* 感染率 (21.7%)が、7ヶ月以上のイヌの感染率 (7ヶ月~1歳:7.5%, 2~5歳:4.5%, 6歳以上:2.4%)よりも明らかに高いことを報告している。また、荒島ら⁶⁾も生後1年以下のイヌの感染率 (6ヶ月以下:22.0%, 7ヶ月~1歳:22.2%)が1歳以上のイヌの感染率 (1歳~3歳:12.6%, 3~5歳:1.8%, 5歳以上:1.7%)よりも高いことを報告している。本調査においても生後6ヶ月以下のイヌの感染率が高く、Itoh et al⁵⁾や荒島ら⁶⁾と同様に幼犬の *G. lamblia* 感染率が高いことが示された。

Itoh et al⁵⁾は青森・秋田で調査したイヌ全体に対する *G. lamblia* 感染率が14.6%であったと報告しており、荒島ら⁶⁾は日本全国を対象に調査したイヌ全体に対する感染率が10.8%であったと報告しているが、本調査において神奈川県内のイヌの感染率は2.8%と低い値を示した。Itoh et al⁵⁾が調査したイヌは感染率の高かった生後6ヶ月以下のイヌの占める割合が57.1%、荒島ら⁶⁾が調査したイヌは感染率の高い1歳以下の子犬の占める割合が33.4%であるのに対して、本調査では生後6ヶ月以下のイヌの占める割合が6.1%であった (表1)。イヌの年齢によって *G. lamblia* 感染率が大きく異なることが明らかであり、調査したイヌの年齢構成が、全調査個体あたりの感染率の評価に影響を与えた可能性がある。イヌの *G. lamblia* 感染率を明らかにする場合、年齢を考慮した調査が必要であると考えられる。

下痢をしているイヌは正常便を排出しているイヌよりも *G. lamblia* 保有率が高いと報告されている⁶⁾が、本調査で *G. lamblia* の感染が確認されたイヌはすべて正常便を排出しており、下痢をしているイヌからは確認されなかった。このことはイヌが *G. lamblia* に感染していることに気づかず、感染を広めている可能性があることを示すものと考えられる。ブリーダー由来のイヌの *G. lamblia* 感染率が約20%であったことが報告されており^{5,6)}、売買などにより感染したイヌが広範囲に分散する可能性があることから、下痢などの症状を示していないイヌでも *G. lamblia* が感染していないか確認する必要があると考えられる。

本調査において鏡検により *G. lamblia* が確認されたイヌの検体のうち、雑種2匹 (2008-1,2)の検体から nested-PCR で増幅産物が得られた。それらの遺伝子解析の結果、遺伝子型はともに *G. lamblia* の assemblage D と100%一致した (図1)。Assemblage D はイヌ特異的な遺伝子型とされているが、ヒトから検出された *G. lamblia* の遺伝子型が assemblage D に

D*	1	ACAAGCCATGCATGCCCCGACACCCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCAC	60
2008-1	1	ACAAGCCATGCATGCCCCGACACCCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCAC	60
2008-2	1	ACAAGCCATGCATGCCCCGACACCCGGGAAGCGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCAC	60
D	61	CCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCG	120
2008-1	61	CCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCG	120
2008-2	61	CCCCCGCGGCGGTCCCTGCTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCG	120
D	121	CAAGTGCGGACGCCCCGCGGG	140
2008-1	121	CAAGTGCGGACGCCCCGCGGG	140
2008-2	121	CAAGTGCGGACGCCCCGCGGG	140

図1 *Giardia lamblia* 遺伝子型解析結果

* : assemblage D

分類された例が報告され，assemblage D のイヌからヒトへの感染の可能性が示唆されている⁷⁾。

日本で飼育されているイヌにおいて遺伝子型解析まで行った *G. lamblia* 感染状況の調査例は少なく，イヌにおける遺伝子型別 *G. lamblia* 感染状況は明らかになっていない。これまでは，イヌからヒトへの感染についてヒト，イヌともに宿主となることが明らかにされている assemblage A と B が問題にされてきたが，イヌに由来する assemblage D など他の遺伝子型もヒトに感染する可能性があること，また，日本国内の浄水場の水源からイヌ由来と推測される assemblage C が見つかっており²⁾，イヌ由来の *G. lamblia* が水系を介した集団感染の原因になる可能性もあることから，今後さらにイヌの *G. lamblia* 保有状況調査と遺伝子型解析を行い，イヌからヒトへの *G. lamblia* 感染の危険性を明らかにする必要があると考えられる。

まとめ

神奈川県内で保護されたイヌの *G. lamblia* 保有状況と，その遺伝子型の調査を行った。イヌ 180 匹のうち 5 匹 (2.8%) から *G. lamblia* が確認された。これら 5 匹のうち 4 匹は生後 6 ヶ月以下の幼犬であり，幼犬の感染率が高いことが明らかになった。

感染が確認された雑種 2 匹の遺伝子型は，ともに assemblage D であった。Assemblage D はイヌ特異的な遺伝子型とされているが，ヒト検体から見つかったとする報告もあることから，イヌの *G. lamblia* 保有状況と遺伝子型を調査し，イヌからヒトへの感染の危険性を明らかにすることが重要であると考えられた。そして身近な動物であるイヌが，人獣共通感染症の病原体である *G. lamblia* を保有していることを飼育者などに啓発する必要がある。

(平成 22 年 8 月 20 日受理)

参考文献

- 1) Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. and Ey, P. L.: Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin, *Infect. Genet. Evol.*, 3, 29-38 (2003)
- 2) 肥塚利江：環境水の原虫汚染とヒトへの感染性に関する調査研究，第 14 回「地域保健福祉研究助成」報告集，205-209 (2009)
- 3) Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. and Thompson, R. C. A.: Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality, *J. Parasitol.*, 83 (1), 44-51 (1997)
- 4) Read, C., Walters, J., Robertson, I. D. and Thompson, R. C. A.: Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhea, *Int. J. Parasitol.*, 32, 229-231 (2002)
- 5) Itoh, N., N. Muraoka, M. Aoki and T. Itagaki: Prevalence of *Giardia lamblia* infection in household dogs, *J. J. A. Inf. D.*, 75 (8), 671-677 (2001)
- 6) 荒島康友，熊坂一成，河野均也，浅野隆司，保刈成男，村杉栄治ほか：Zoonosis としてのジアルジア症に関する研究。本邦におけるイヌおよび飼育者のジアルジア保有状況，*感染症学雑誌*，66 (8)，1062-1066 (1992)
- 7) 所正治，Amjad, I. A. H.，春木宏介，木村憲司，Din, S.，Tudor, R. O. ほか：多地域由来のジアルジアの遺伝子型解析：複数遺伝子座による系統樹解析，*Trop. Med. Health*，(Suppl.)，109 (2006)