

日本の猫および豚における *Tritrichomonas suis* 分子疫学調査

山口大学大学院連合獣医学研究科

土井 純子

2013年3月

## 目次

略 語	…1
緒 言	…2
第 I 章 猫の <i>Tritrichomonas suis</i> 検出法の検討	…4
序	…5
材 料 お よ び 方 法	…7
1. 2 種類 of 培養液を用いた猫糞便からの <i>T. suis</i> 検出および継代法	…7
1-1. 実験に用いた <i>T. suis</i>	…7
1-2. Trichomonas medium <sup>®</sup> を用いた <i>T. suis</i> 検出法	…7
1-2-1. 改良 Trichomonas medium <sup>®</sup> の <i>T. suis</i> 検出感度	…10
1-2-2. 改良 Trichomonas medium <sup>®</sup> を用いた継代と培養容器の検討	…12
1-3. InPouch <sup>™</sup> TF Feline を用いた <i>T. suis</i> 検出法	…12
2. <i>T. suis</i> の冷凍保存法の検討	…15
3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法	…16
3-1. 糞便培養後の沈渣からの DNA 抽出および精製法	…16
3-2. <i>T. suis</i> 特異的プライマーを用いた nested PCR 法	…18
3-2-1. プライマー配列	…18

3-2-2. ポジティブコントロール	…18
3-2-3. nested PCR 反応液の組成および反応条件	…20
3-2-4. アガロースゲル電気泳動法	…20
結果	…23
1. 2 種類の培養液を用いた猫糞便からの <i>T. suis</i> 検出および継代法	…23
1-1. Trichomonas medium <sup>®</sup> を用いた <i>T. suis</i> 検出法	…23
1-1-1. 改良 Trichomonas medium <sup>®</sup> の <i>T. suis</i> 検出感度	…23
1-1-2. 改良 Trichomonas medium <sup>®</sup> を用いた継代と培養容器の検討	…23
1-2. InPouch <sup>™</sup> TF Feline を用いた <i>T. suis</i> 検出法	…23
2. <i>T. suis</i> 冷凍保存法の検討	…25
3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法	…25
考察	…27
1. 2 種類の培養液を用いた猫糞便からの <i>T. suis</i> 検出および継代法	…27
2. <i>T. suis</i> 冷凍保存法	…28
3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法	…28
小 括	…29
第 II 章 日本の猫における <i>T. suis</i> 感染状況調査	…30
序	…31

材 料 お よ び 方 法	…32
1. 検体および調査方法	…32
1-1. 調査 I: 北海道札幌市 A 動物病院(冷凍保存糞便の PCR 法による調査)	…32
1-2. 調査 II: 北海道札幌市 B 動物病院(新鮮便の培養法および PCR 法による調査)	…32
1-3. 調査 III: 埼玉県鴻巣市 C 動物病院(新鮮便の直接法および糞便培養輸送検体を用いた調査)	…39
2. ギムザ染色法	…39
3. 凍結保存糞便および糞便培養後の沈渣からの DNA 抽出および精製	…39
4. <i>T. suis</i> 特異的プライマーを用いた nested PCR 法	…46
5. PCR 産物のクローニング	…46
5-1. PCR 産物の精製	…46
5-2. クローニングとトランスフォーメーション	…46
5-3. コロニーPCR	…47
5-4. プラスミド DNA 抽出	…47
6. 塩基配列解読	…49
7. アライメント解析	…49
結 果	…51
1. 疫学調査の結果	…51
1-1. 調査 I: 北海道札幌市 A 動物病院	…51

1-2. 調査 II: 北海道札幌市 B 動物病院	…51
1-3. 調査 III: 埼玉県鴻巣市 C 動物病院	…51
2. 猫の <i>T. suis</i> 感染状況 (前述 1-1 から 3 のまとめ)	…56
3. アライメント解析	…56
考 察	…60
1. 国内の猫より <i>T. suis</i> 感染を初報告	…60
2. <i>T. suis</i> の検査法について	…60
3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA の PCR 法の有効性	…60
4. 猫の慢性下痢と <i>T. suis</i> 感染の関係	…61
5. 猫の品種と <i>T. suis</i> 感染の関係	…61
6. 多頭飼育施設の猫における <i>T. suis</i> 調査の必要性	…62
7. 猫、牛および豚の <i>T. suis</i> の関係	…62
小 括	…64
第 III 章 日本豚における <i>T. suis</i> 感染状況調査	…65
序	…66
材 料 お よ び 方 法	…67
1. 検体および検査法	…67
1-1. 西日本(2府5県)の豚糞便由来 DNA	…67

1-2. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便	…67
1-2-1. 直接法	…67
1-2-2. 蔗糖遠心浮遊法	…71
1-2-3. 改良 Trichomonas Medium <sup>®</sup> を用いた <i>T. suis</i> 培養法	…71
1-2-4. ギムザ染色法	…71
1-2-5. 豚糞便からの DNA 抽出法	…71
2. <i>T. suis</i> 特異的プライマーを用いた nested PCR 法	…72
3. ダイレクトシーケンス法による塩基配列解読	…72
4. アライメント解析	…75
結 果	…76
1. 西日本(2府5県)の豚糞便由来 DNA の nested PCR 法	…76
2. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便の検査	…76
3. nested PCR法で陽性を示した豚検体のまとめ	…84
4. アライメント解析	…84
考 察	…86
1. 分子生物学的手法を用いた豚における <i>T. suis</i> 感染状況の初の調査	…86
2. 国内の豚における <i>T. suis</i> 感染状況	…86
3. <i>T. suis</i> 以外のトリコモナス様原虫の存在を示唆	…86
4. 豚と牛の <i>T. suis</i> の関係について	…87

小 括	…88
第 IV 章  日本の猫、豚および牛の <i>T. suis</i> 遺伝子解析	…89
序	…90
材 料 お よ び 方 法	…92
1. 国内の猫、豚および牛の <i>T. suis</i> 陽性糞便もしくは虫体由来 DNA	…92
2. ダイレクトシーケンス法による <i>T. suis</i> の ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域の塩基配列解読	…94
3. ダイレクトシーケンス法による <i>T. suis</i> の CP8 遺伝子配列解読	…94
4. アライメント解析	…97
4-1. <i>T. suis</i> の ITS 1-5.8S rRNA-ITS2 領域	…97
4-2. <i>T. suis</i> の CP8 遺伝子およびアミノ酸配列	…97
結 果	…98
1. 国内の猫、豚および牛 <i>T. suis</i> における ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域の比較	…98
2. 国内の猫、豚および牛 <i>T. suis</i> 分離株の CP8 遺伝子およびアミノ酸配列の比較	…98
考 察	…107
1. 国内の猫、豚および牛の <i>T. suis</i> における遺伝子解析を初めて実施	…107
2. 国内の猫、豚および牛の <i>T. suis</i> の ITS 2 領域に認められた SNP について	…107

3. 国内の猫、豚および牛の <i>T. suis</i> の CP8 の塩基配列およびアミノ酸配列に認められた変異	
について	…108
小 括	…109
総 括	…110
謝 辞	…112
参 考 文 献	…113



## 略語

DDW: distilled deionized water

dNTP: deoxynucleoside triphosphate

ELISA 法: enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ITS 1: internal transcribed spacer region 1

ITS 2: internal transcribed spacer region 2

ISH: *in situ* hybridization analysis

PCR 法: polymerase chain reaction analysis

RAPD 法: randomly amplified polymorphic DNA analysis

RFLP 法: restriction-fragment length polymorphic DNA analysis

rRNA: ribosomal RNA

SNP: single nucleotide polymorphism

## 緒言

*Tritrichomonas suis* (Gruby and Delafond, 1843)は、パラバサリア綱 Parabasalia、トリトリコモナス目 Tritrichomonadeaに属することが、最近再分類された鞭毛虫である(Adl *et al.*, 2012)。当初、*T. suis* は豚の鼻腔、食道、胃、盲腸および大腸、まれに小腸に寄生する原虫として記載された(Gruby and Delafond, 1843; Davaine, 1875; Switzer, 1951; Levine, 1985)。なお、Gruby and Delafond(1843)の報告では命名していなかったため、学名としては *T. suis* (Davine, 1875)が正しいとする説もある(Šlapeta *et al.*, 2012)。

*T. suis* は豚に対して病原性が低い原虫であるため、獣医学領域では重要視されてこなかった。しかしながら、微細構造の形態学的特徴、交差感染実験および遺伝子解析の進展により、*T. suis* が胎仔トリコモナス *T. foetus* (Riedmüller, 1928)と同一種であることが明らかとなった(Felleisen, 1997; Tachezy *et al.*, 2002; Lun *et al.*, 2005)。

牛の *T. foetus* (= *T. suis*)感染によるトリコモナス症は、古くから知られ、母牛において流産・不妊などの繁殖障害を引き起す疾病であり(Rae and Crews, 2006)、国内では家畜伝染病予防法における届出伝染病として監視されている重要な疾病である(動物衛生研究所ホームページ、家畜の監視伝染病 [http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease\\_fact/kansi.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/kansi.html))。

一方、2000年代になって、*T. suis* が関与する猫の難治性慢性下痢症の存在が報告され(Levy *et al.*, 2003)、猫の糞便の培養法およびPCR法による疫学調査において、*T. suis* 保有率が10~31 %と高値を示すことが報告されている(Gookin *et al.*, 1999; Gookin *et al.*, 2004; Gunn-Moore *et al.*, 2007; Bissett *et al.*, 2009; Frey *et al.*, 2009; Stockdale *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010)。これらの事実から、近年、*T. suis* は猫に難治性の下痢症をもたらす病原体として、獣医小動物臨床領域においてもその重要性が認識されつつある。また、数例ではあるが、犬の下痢症においても *T. suis* が糞便の直接塗抹の染色標本もしくはPCR法によって検出されたとする報告がある(Gookin *et al.*, 2005; Tolbert *et al.*, 2012)。

前述したように、*T. suis* は、牛の繁殖障害に加えて、猫の慢性下痢症も引き起こすなど、複数の動物種に感染し、場合により深刻な症状を引き起こすことが近年明らかになってきた。しかしながら、国内の猫および豚における *T. suis* 感染状況に関する情報や、動物種を越えた *T. suis* の感染に関する知見はなく、これらの解明が急務である。そこで本研究では、国内の *T. suis* 流行状況を明らかにすることを目的として、国内の猫および豚を対象とする疫学調査に着手した。また、異なる動物種間における伝播の可能性を検討するために、国内の牛、猫および豚の *T. suis* の遺伝子の塩基配列を調べ、その比較解析を試みた。

*T. suis* (Gruby and Delafond, 1843)と *T. foetus* (Riedmüller, 1928)が同種であるという説は、数十年前から公表され、学名の先取権から *T. suis* を使用すべきだと提唱する研究者もいるが (Jensen and Hammond, 1964; Levine, 1985; Lun *et al.*, 2005)、多くの論文では *T. foetus* の学名が使用されているのが現状である。Tackezy *et al.* (2002)は国際命名規約第4版 条23.9.3 (Ride *et al.*, 1999)に基づき、正式な学名である "*T. suis*" を使用すると、安定性や普遍性を損ねたり、混乱を引き起こすかもしれないと考え、そのため若い方の異名である "*T. foetus*" を維持すべきだと提案している。しかし、"*T. foetus*" を採用するためには、国際動物命名学会審議会に裁定を委ねる必要がある。以上を踏まえた上で、本論文では "*T. suis*" を採用し、以後は *T. suis* と統一して表記した。

## 第 I 章 猫の *Tritrichomonas suis* 検出法の検討

## 序

1996年から2000年にかけて、慢性の大腸性下痢を引き起こす猫の腸トリコモナス症が多数報告された(Romatowski, 1996; Gookin *et al.*, 1999; Romatowski, 2000)。このとき、猫、犬および人を含む多くの哺乳類の腸管に寄生している鞭毛虫として広く知られている *Pentatrichomonas hominis* が原因であると誤って同定された(Romatowski, 1996; Romatowski, 2000)。本症の原因原虫が *P. hominis* ではなく *T. suis* であることが明らかになったのは、18S rRNA-ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域の塩基配列解析によってのことであった(Levy *et al.*, 2003)。ちなみに、この事実を明らかにしたLevyを含むGookin *et al.* (1999)も、猫の腸トリコモナス症を発表した当初は、光学顕微鏡で観察した形態学的特徴により、暫定的に *P. hominis* と同定したが、その後、*P. hominis* と同定したことが間違いであったと訂正している(Levy *et al.*, 2001)。

下痢のネコから分離した *T. suis* を猫へ胃カテーテルを用い経口的に感染させ、下痢が発症することが確認されたことから(Gookin *et al.*, 2001)、*T. suis* が猫に下痢を引き起こすトリコモナス症の原因原虫と結論された。その後のヨーロッパ、アメリカ、オーストラリアおよび韓国などで実施された培養法もしくは猫の糞便由来DNAを用いたPCR法による疫学調査で、猫の *T. suis* 保有率が10~31 %と高値を示すことが報告された(Gookin *et al.*, 1999; Gookin *et al.*, 2004; Gunn-Moore *et al.*, 2007; Bissett *et al.*, 2009; Frey *et al.*, 2009; Stockdale *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010)。

このように、*T. suis* は猫に難治性の下痢症をもたらす病原体として、獣医小動物臨床領域においてもその重要性が認識されつつある。しかしながら、日本の猫の *T. suis* 感染は未報告である。

そこで本研究では、国内における猫の *T. suis* の感染状況を把握するために、本原虫の培養検査法と保存法について検討した。トリコモナス類の培養液として種々の培養液が利用されているが、通常、(1)Feinberg and Whittington のトリコモナス培養液(Feinberg and Whittington, 1957)、(2)Diamond のトリコモナス培養液(Diamond, 1957)、(3)Kupferberg のトリコモナス培養液(Kupferberg, 1955)が用いられている。今回は、国内の臨床現場における培養検査の実施のために、

国内で販売されていて入手・調整が容易な *Trichomonas medium*<sup>®</sup> (Oxoid Ltd., Cambridge, UK)、および国内未販売であるが、アメリカなど世界の臨床現場で最も使用されている InPouch<sup>™</sup> TF-Feline (BioMed Diagnostics Inc., Oregon, USA) を用いて、猫糞便からの *T. suis* 検出法としての有効性を検討した。さらに糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法についても検討した。

## 材 料 お よ び 方 法

### 1. 2 種類 の 培 養 液 を 用 いた 猫 糞 便 から の *T. suis* 検 出 お よ び 継 代 法

#### 1-1. 実 験 に 用 いた *T. suis*

国内の猫(個体番号1)の新鮮便から、後述の Trichomonas medium<sup>®</sup>を用いた改良培養法で分離した虫体を用いた。分離したトリコモナス虫体は、後述のギムザ染色法による培養液塗抹標本の観察において *T. suis* の特徴を有した(図1)。さらに、後述の虫体由来 DNA を用いた nested PCR 法産物をダイレクトシーケンス法によって解読した塩基配列からも *T. suis* と同定された。

#### 1-2. Trichomonas medium<sup>®</sup>を用いた *T. suis* 検出法

Trichomonas medium<sup>®</sup>は Feinberg and Whittington(1957)が報告した処方に基づいて作られた、人の膣に寄生する膣トリコモナス *Trichomonas vaginalis* および *Candida* 属検出用の培養液である。本培養液は国内で販売され簡単に入手可能であり、また調整も簡便である。組成は表1に示した。

本培養液は人の膣からの *T. vaginalis* 検出を目的としているため、培養液に添付されていた調整法通りに調整すると、やや酸性環境かつ微生物が少ない人の膣の環境を再現した培養液となる。すなわち、培養液に添付されていた調整方法通りに馬血清を pH 6.0 に調整してから添加すると、*T. suis* の寄生部位である猫の大腸環境に比べ酸性に傾いていることが予想される。さらに、猫の糞便中の微生物量を考慮すると、培養液 1 L に対して、ペニシリン 10<sup>3</sup> U、ストレプトマイシン 500 µg という抗生物質量は少ないことが予想される。そこで、猫糞便から *T. suis* の分離効率を上げるために、馬血清の pH 調整をせずに添加することで、培養液の最終 pH を約 pH 7.0 に保ち、さらに抗生物質を増量することにした。以下、改変した Trichomonas medium<sup>®</sup> の調整法を示す。37.5 g を 1 L の蒸留水に懸濁し、沸騰するまで加熱して溶解した。121°C、15 分間オートクレーブにかけ、約 40°C に冷却した溶液に、80 ml の 56°C、30 分で非働化処理した馬血清(Life Technologies Co., California, USA)を添加した。さら



図 1. 猫個体番号 1 の糞便から培養法で分離した *Tritrichomonas suis* 虫体(ギムザ染色)

3 本の前鞭毛、1 本の後鞭毛、波動膜および軸索が認められた



表 1. *Trichomonas medium*<sup>®</sup>の組成(培地 1Lあたり)

成分	量(g)
肝消化物	25.0
ブドウ糖	5.0
塩化ナトリウム	6.5
寒天	1.0

pH 6.4 ± 0.2

に、培養液 1 L に対し、ペニシリン  $10^6$  U、ストレプトマイシン 15 g、およびアムホテリシン B 2 mg を添加した。また、使用直前に培養液は 37°C に温めた。

#### 1-2-1. 改良 Trichomonas medium<sup>®</sup> の *T. suis* 検出感度

改良 Trichomonas medium<sup>®</sup> における *T. suis* の検出限界は、1 ml 培養液を入れた 1.5 ml チューブを用いて以下のように調べた。虫体は継代培養から 2 日目のものを用いた。改良型ノイバウエル血球計算盤 (Henneberg-Sander GmbH, Gießen, Germany) で虫体数を数え、培養液中の虫体数を算出した。1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$  虫体/ml になるよう、改良 Trichomonas medium<sup>®</sup> で希釈した。各希釈虫体溶液 1 ml と後述の nested PCR 法で *T. suis* 陰性と診断された猫の新鮮便 50 mg、すなわち直腸便から採便棒 (富士平工業株式会社、東京) (図 2) を用いて通常採材できる予想糞便量を 1.5 ml チューブに入れた。培養液への糞便の添加は、通常の検査を想定し、糞便に含まれる多種の夾雑物および微生物が検出感度に与える影響を評価するためである。いずれの希釈系列も 3 本分作製した。37°C で培養し 2 日目から、チューブの底から溶液を 10  $\mu$ l とり、100 倍および 400 倍の光学顕微鏡 (BH-2) で虫体が検出されるまで観察した。

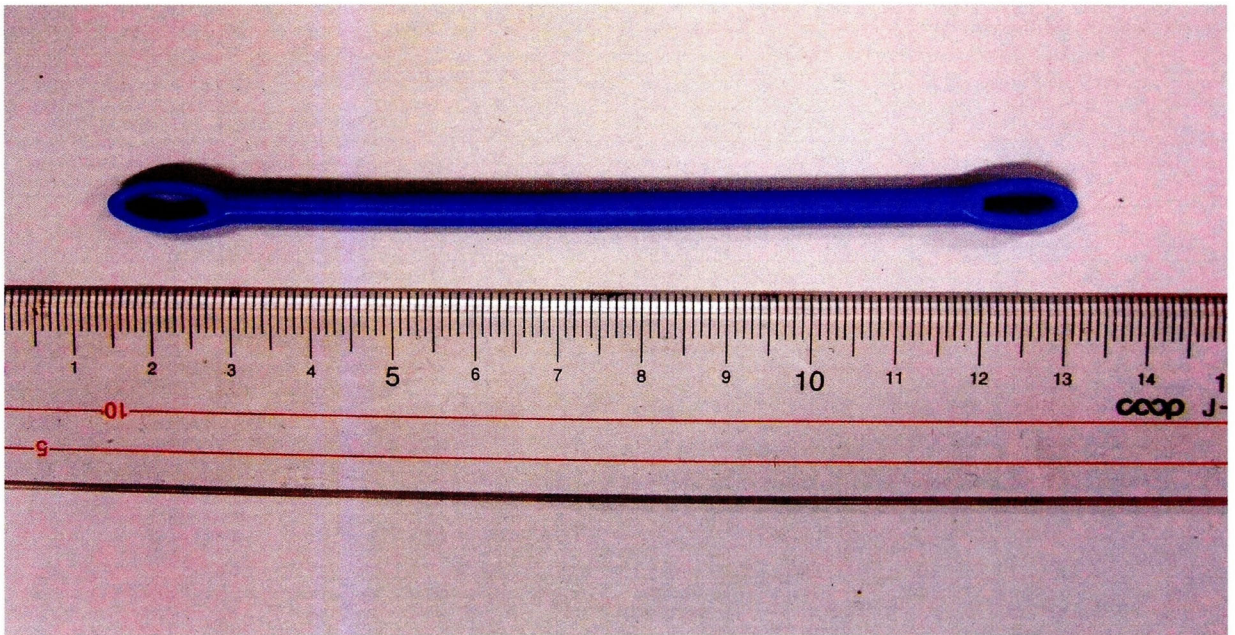


図 2. 猫の直腸便からの採材に用いた採便棒(富士平工業株式会社、東京)

採便部(ループ状)の4分の1量採材すると、50 mg の糞便が取れる

(長さ:113 mm、ループ状の採便部:外径 5 x 9 mm、内径 3 x 7 mm、高さ 3.5 mm)

## 1-2-2. 改良 Trichomonas medium<sup>®</sup>を用いた継代と培養容器の検討

猫の糞便より検出した *T. suis* の最適な継代用容器と継代間隔を把握するために、以下のように調べた。15 ml チューブ(旭硝子株式会社、東京)3 本と、25 cm<sup>2</sup> BD Falcon<sup>™</sup> スラントネックセルカルチャーフラスコ(Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)6 本を用意した。各容器に最終虫体数が 1、10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup> 虫体なるように調整した *T. suis* 添加改良 Trichomonas medium<sup>®</sup>を 10 ml ずつ入れた。*T. suis* は嫌気性の原虫であるため、培養液が空気に接する割合が培養に影響する可能性を考慮し、フラスコについては 3 本ずつ、縦に立てて培養するものと、横に寝かせて培養するものにわけた。いずれの容器も 37°C で培養した。虫体数は、改良型ノイバウエル血球計算盤(Henneberg-Sander GmbH)を用いて計算した。培養開始から 1 日～8 日まで、毎日 100 倍および 400 倍の光学顕微鏡で観察した。

## 1-3. InPouch<sup>™</sup> TF Feline を用いた *T. suis* 検出法

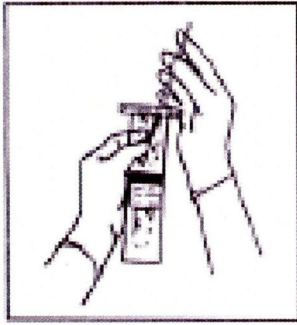
InPouch<sup>™</sup> TF Feline(図 3)は、Diamond が報告した処方(Diamond, 1957)に基づいて、牛の膾からの *T. suis* 検出用に作られた培養キット InPouch<sup>™</sup> TF Bovine(BioMed Diagnostics)を、猫糞便中の *T. suis* 検出用に改良されたものである(Gookin *et al.*, 2003)。国内未販売であり入手に時間がかかるが、培養容器の準備および培養液の調整が不要のパウチタイプの培養キットである。本製品の他の利点としては、*Giardia intestinalis*、酵母、真菌および細菌の増殖が抑制され、*T. suis* を選択的に培養可能な点と、顕微鏡観察時にパウチのまま観察ができるため、虫体の喪失が全くない点が挙げられる。さらに未使用培養液の保存は室温(18～25°C)で可能で、有効期間も 1 年間と長く、管理がしやすい。また、チューブと比べ嵩が小さく、多量の検体輸送が可能であり、臨床現場で検体採材そして研究機関での調査に適した培養液といえる。InPouch<sup>™</sup> TF-Feline の使用方法および観察手順は添付の説明書にしたがった(図 4)。製品の検出感度は 1～10 虫体であると記載されている。そこで、直腸便から採便棒で採材できる通常の糞便量 50 mg を添加した場合、1 および 10 虫体でも本培養液で増殖し、検出可能であることを確認した。虫体は継代培養から 2 日目ものを用いた。改良型ノイバウ



図 3. InPouch™ TF Feline

黒枠：培養液がはいっている袋内部の形状

上部と下部に分かれその間を細い管がつながれており、計 4ml の培養液が入っている

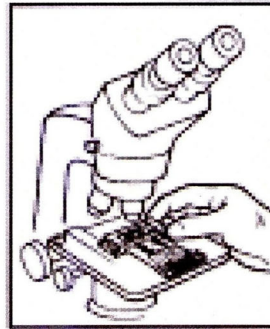
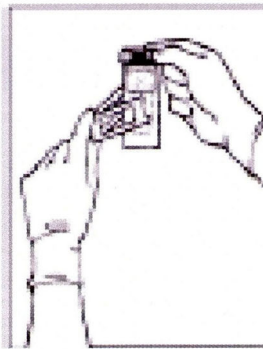


培養液の入った袋の口を開放し、糞便を採材した採便棒を入れる。  
培養液に浸かった採便棒を袋で挟むようにして、糞便をこそぎ落とす。



培養液が漏れないようにするため、糞便を入れた後、口を折り曲げ  
袋の口に着いたワイヤーで止める。  
すぐに観察する場合は袋の上部に、添付されているクリップをつけて  
光学顕微鏡で観察する。

\* 輸送する場合は、袋下部まで培養液を移動させ、口を2回ほど折り曲げ  
袋の口に着いたワイヤーで止める。さらに、テープをワイヤーの上に巻いた  
状態にする。



35～37℃で18～24時間培養した後、添付されている  
クリップをつけて観察する。

図 4. InPouch™ TF Feline の使用方法および観察手順

エル血球計算盤で虫体をカウントし、培養液中の虫体数を算出した。1 および 10 虫体/10 $\mu$ l になるように生理食塩水で希釈した後、10  $\mu$ l の希釈液を InPouch™ TF Feline に添加した。その後、*T. suis* 陰性と診断された猫の新鮮便 50 mg を InPouch™ TF Feline に添加した。培養液は 37°C で培養した。一晚培養後、100 倍および 400 倍の光学顕微鏡 (BH-2) で 4 日間観察した。

## 2. *T. suis* の冷凍保存法の検討

分離した虫体の冷凍保存法を以下の通り検討した。

虫体は継代培養 2 日目のものを用いた。10 ml の *Trichomonas medium*® を 15 ml チューブで継代したものを、1,600 xg、3 分間、室温で遠心し、底 2 ml を残して上清を捨てた。その 2 ml の沈渣に以下の 4 種類の凍結保存液を添加し、沈渣と凍結保存液と混和した。

(1) セルバンカー (三菱化学メディエンス株式会社、東京)：沈渣と等量添加した。

(2) 10 % グリセリン-HRS 保存液 (90 % 非働化馬血清、10 % グリセリン (試薬特級、和光純薬株式会社、大阪))：沈渣の 4 倍量添加した (グリセリンの最終濃度 8 %)。

(3) 20 % グリセリン-HRS 保存液 (80 % 非働化馬血清、20 % グリセリン)：沈渣の 4 倍量添加した (グリセリンの最終濃度 16 %)。

(4) 10 % グリセリン：最終濃度が 10 % になるようグリセリンを沈渣に添加した。

500  $\mu$ l ずつアウターキャップの 1.0 ml SYSTEM 100™ クライオバイアル (Nalgene, New York, USA) に分注し、保存液につき各 6 本作製した。

緩慢に冷凍するために、キムタオルでチューブを巻いて包み、-80°C の冷凍庫に保存した。一晚冷凍保存後、各保存液につき 2 本のチューブは 37°C のウォーターバスに置いて解凍し、400 倍の光学顕微鏡で動いている虫体がいるか観察した (チェックポイント 1)。残りの 4 本は液体窒素に移した。一晚冷凍保存後、液体窒素に入れたチューブを 37°C のウォーターバスに置いて解凍し、2 本のチューブは 400 倍の光学顕微鏡下で虫体の運動性を観察した (チェックポイント 2)。残りの 2 本は虫体の増殖能力を調べるために、37°C に温めた 10 ml の *Trichomonas medium*® が入った 15 ml チューブに入れた。そ

の後、1,600 xg、3 分間、室温で遠心し、底 1 ml を残して上清を捨てた。そのチューブに新たな 37°C に温めた 10 ml の *Trichomonas medium*<sup>®</sup>を入れて、37°Cで培養した。培養開始から 2 日後および 4 日後に、チューブの底から溶液を 10  $\mu$ l とり、100 倍および 400 倍の光学顕微鏡で虫体の運動性を観察した(チェックポイント 3)(図 5)。

### 3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法

猫糞便中の *T. suis* 検出法として、ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域を標的とした *T. suis* 特異的プライマーを用いた PCR 法がすでに報告されている(Gookin *et al.*, 2002)。本法は Single-tube nested PCR 法であり、ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子を含んだ 208 bp の塩基配列が増幅される方法である。200mg 糞便中に 10 虫体以上存在していた場合、90 %の確率で陽性となり、また、*G. intestinalis*、*P. hominis* および猫のゲノム DNA は増幅されないと報告されている(Gookin *et al.*, 2002)。冷凍糞便検体や培養液に入れ輸送し虫体が死滅した検体に対し、本 PCR 法は *T. suis* 検出法として非常に有効である。しかし、冷凍猫糞便に対する本 PCR 法の有効性は確認されているが、糞便培養後の沈渣に対する有効性は確認されていない。そこで、糞便培養後の沈渣に対し、本法が有効であるかを以下の通り調べた。

#### 3-1. 糞便培養後の沈渣からの DNA 抽出および精製法

虫体は継代 2 日目のものを用いた。培養液中の虫体数を 1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  虫体/ml になるよう改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>で希釈した。糞便による培養の影響を考慮に入れて、PCR 法で *T. suis* が陰性と診断された猫の新鮮便を培養液に添加用の糞便として用いた。各希釈虫体溶液 1 ml と糞便 50 mg を 1.5 ml チューブに入れ、37°Cで培養した。1、10、 $10^2$  虫体の培養液は 3 本、 $10^3$ 、 $10^4$  虫体の培養液は 2 本作製した。培養開始から 2 日および 3 日後に、チューブの底から溶液を 10  $\mu$ l とり、100 倍および 400 倍の光学顕微鏡(BH-2)で虫体の有無を観察した。培養開始から 3 日に顕微鏡で観察した後、22,000 xg、3 分、室温で遠心し、上清を捨て沈渣を得た。沈渣は-30°Cで一日冷凍保存



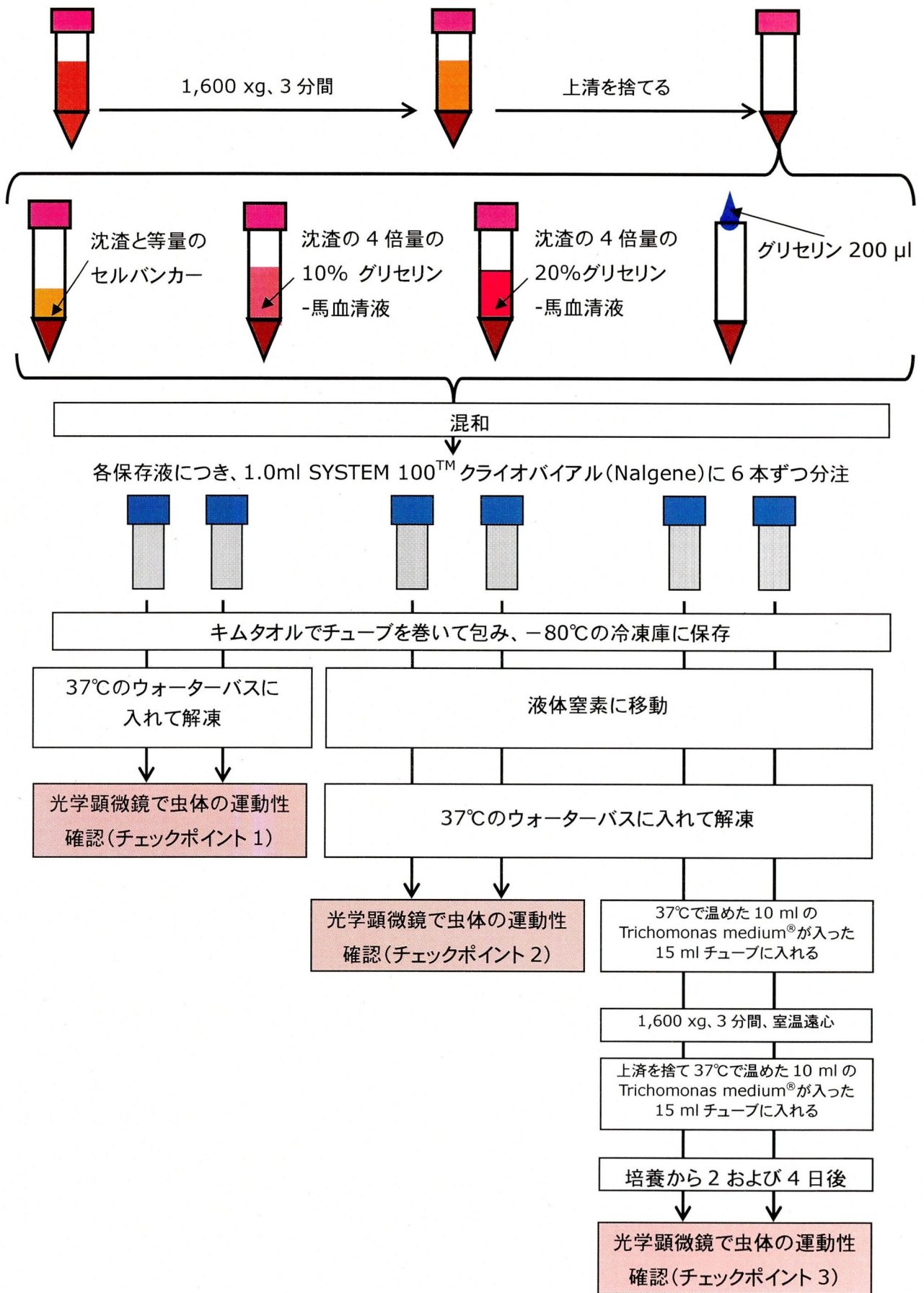


図 5. *Tritrichomonas suis* の冷凍保存法の検討

し、DNA 抽出に用いた。

DNA 抽出および精製には QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い、添付の説明書に従って行った。DNA 抽出および精製の成否を確認するために、DNA 濃度は NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)を用いて測定した。

### 3-2. *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法

#### 3-2-1. プライマー配列

*T. suis* の標的遺伝子は牛より分離された *T. suis* UT-1 株(ATCC No. 30233)の 18S rRNA -ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2-28S rRNA 遺伝子領域(GenBank accession No. M81842) (Chakrabarti *et al.*, 1992)を参考にし、設計されたプライマーを用いた。1<sup>st</sup>プライマーは Felleisen *et al.*(1998)によって *T. suis* 特異的プライマーとして設計された、TFR4(5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTAA-3')および TFR3(5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3')、2<sup>nd</sup>プライマーは Gookin *et al.*(2002)によって設計された TFITS-F(5'-CTGCCGTTGGATCAGTTTCG-3')および TFITS-R(5'-GCAATGTGCATTCAAAGATCG-3')を用いた。参考配列に対するプライマーの位置は 図 6 に示した。

#### 3-2-2. ポジティブコントロール

ポジティブコントロールは猫個体番号 1 の *T. suis* から抽出した DNA を用いた。10<sup>7</sup> 虫体になるよう 0.85 % 生理食塩水 1.5 ml で希釈した溶液を 2 ml チューブに入れた。22,000 xg、5 分間、室温で遠心し、虫体を沈殿させた。上清を捨て、沈殿した虫体に DNA 抽出溶液(150 mM 塩化ナトリウム、10 mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA(いずれも試薬特級、和光純薬))1 ml を加えた。その後、10 % SDS を 15  $\mu$ l 添加し、プロテナーゼ K(タカラバイオ)を最終濃度が 100  $\mu$ g/ml になるように加えた。時々混和しながら 55°C で 1 時間インキュベートした後、振盪させながら 37°C で 16 時間インキュベートした。

18S: 1,571 bp (61-1631) | ITS 1:80 bp (1632-1711) | 5.8S: 159bp (1712-1870) | ITS 2:63bp (1871-1933) | 28S: (1934-2046)

>Tritrichomonas suis\_cattle\_M81842

TACTTGGTTGATCCTGCCAAGGAAGCACACTTCGGTCATAGATTAAGCCATGCAAGTGTAGTTCAGGCAACGAAACTGCGAACA  
 GCTCATTAAACACGCTCAGAATCTACTTGGTGGCGACCTTTCAGGTCTTATTTGGATAGCAGCAGTAATTCTGGTGCTAATACATGC  
 GATTGTTTCACTGAGTTGAGAAACAGTGGAAAAGTTGACCCTCCGGGCACACCAATCGATTGAGCGACCTATCATGCTAGTACTTA  
 GGGTCTTTACCTAGGTAGGCTATCACGGGTAACGGGCGGTTACCGTCCGACTGCCGGAGAAGGCGCCTGAGAGATAGCGACTAT  
 ATCCACGGGTAGCAGCAGGCGCGAAACTTACCCACTCGAGACTTTCGGAGGTGGTAATGACCAGTTACATGTCAACCTTTTTGGT  
 TGTTTGATAGGATTGCACTTTTCCAGTGCAGTGAACCTAGCAGAGGGCCAGTCTGGTGCCAGCAGCTGCGGTAATTCCAGCTC  
 TCGAGTTTGCTCCCATATTGTTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTCAGAACTGCCTGCAAAGGCGTACGAACATCTGTTCTGTTCACTG  
 TGAACAAATCAGGACGCTTAGTGTATGGTTTTAGGAATGACTTAGCGCAGTATGATATCTTTACCTTTGGTAAGATCAATGAGAGC  
 CACCGGGGTAGATCTATTTTCATGGCGAACGGTGGAAATGTTTTGACCCATGAGAGAGAAACGAAGGCGAAAGCATCTACCTAGA  
 GGGTTTCTGTCGATCAAGGGCGAGAGTAGGAGTATCCAACGGATCAGAGACCCGGGTAGTTCCTACCTAAACGATGCCGACA  
 GGGGCTTGCTTTTTATGAGGGCAGGACCTTAGGAGAAATCATAGTTCTTGGGCTCTGGGGAACTACGACCGCAAGGCTGAAA  
 CTTGAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGGGTGGAGCTTGTGGCTTAATTTGAATCAACACGGGGAACTTACCAGGACCAG  
 ATGTTTTAATGACTGACAGGCTTCGGGCTTTTCAGGATATGACTTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGGTGGTGCCTGGGTTGACCT  
 GTCAAGCGTTGATCAGATAACGAGCGAGATTATCGCCAATTAATACTCGTTTCTGTTTACAGAGATAGAGTTCTAATTGGGACT  
 CCCTGCGTATCAAGCAGGAGGAAGAGGGTAGCAATAACAGGTCCGTGATGTCCTTTAGATGCTCTGGGCTGCACGCGCGCTACA  
 ATGTTAGGATCAAAGAGATGCTGTCCTGAAAAGGCTACAGCTACTCTCGCAATACCTAACGTAGTTGGGATTGAGGATTGTAATCA  
 TTCTCATGAACCAGGAATCCCTTGTAATGCGTGTCAACAGCGCGGTTGAATACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTTCG  
 TCCTACCGATTGGATGACTCGGTGAAATTATCGGACCTTGGCAGGAAAGGTAATTAATCACGTTATCTAGAGGAAGGAGAAGT  
 CGTAACAAGGTAACGGTA



図 6. ウシより分離された *Tritrichomonas suis* UT-1 株 (ATCC No. 30233) の 18S rRNA-ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2-28S rRNA 遺伝子領域の配列 (M81842) における 1<sup>st</sup> プライマー (TFR4/3) および 2<sup>nd</sup> プライマー (TFITS-F/R) の位置

インキュベート後、チューブを取り出し、Tris で平衡化した中性フェノール(試薬特級、和光純薬)を 1ml 加えた。穏やかに 20 分間混合した。その後、22,000 xg、5 分間、室温で遠心し、上層(水層)を口径の太いチップをつけたマイクロピペッターでゆっくり吸って回収し、新しいチューブに移した。等量の PCI(フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール=25 : 24 : 1(いずれも試薬特級、和光純薬))を加え、室温でボルテックスミキサー(VORTEX-GENIE2、エムエス株式会社、大阪)をかけた後、22,000 xg、5 分間、室温で遠心した。上層(水層)を新しいチューブに移し、等量のクロロホルム(試薬特級、和光純薬)を加え、ボルテックスミキサー(VORTEX-GENIE2)をかけた後、22,000 xg、5 分間、室温で遠心した。この操作を再度行った。上層を新しいチューブに移して、3 M 酢酸ナトリウム溶液(試薬特級、和光純薬)を 1/10 量加え、ボルテックスミキサー(VORTEX-GENIE2)をかけた後、卓上型小型遠心機(チビタン-II、Merk KGaA,)を用いスピンドウンした。等量のイソプロパノール(試薬特級、和光純薬)を加え、泡が見えるまで転倒混和し、22,000 xg、10 分、4°Cで遠心した。上清を捨て、70 % エタノール(試薬特級、和光純薬)を 1 ml 加え、軽く混ぜて、22,000 xg、10 分、4°Cで遠心することを 2 回繰り返した。上清を捨てた後、風乾させた。100  $\mu$ l の Tris-EDTA(TE)(10 mM Tris 塩酸バッファー(pH8.0)、1 mM EDTA(いずれも試薬特級、和光純薬))溶液を入れて、4°Cで一晩放置して DNA を溶かし、翌日 NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific Inc.)で DNA 濃度を測定した。

### 3-2-3. nested PCR 反応液の組成および反応条件

nested PCR 反応液の組成および反応条件をは表 2、3 に示した。Taq polymerase は HotStarTaq<sup>®</sup> Master Mix(Qiagen)を用い、反応液量は 20  $\mu$ l とした。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, USA)を用いた。

### 3-2-4. アガロースゲル電気泳動法

TAE(Tris-acetate EDTA)溶液は 50 倍ストック溶液(2 M Tris、2M 酢酸、0.05 M EDTA(いずれも試薬特級、和光純薬))を作製して常温保存し、適宜 50 倍希釈して使用した。アガロースゲルは

表 2. *Tritrichomonas suis* 検出のための nested PCR 反応液組成

試薬	容量(μl)	終濃度
HotStarTaq® Master Mix	10	2.5 unit HotStarTaq DNA polymerase, 1 x PCR Buffer(1.5mM MgCl <sub>2</sub> を含む), 200 μM of each dNTP
TFR4 および TFR3 (各 1 μM)	0.25	12.5 nM
TFITS-F および TFITS-R (各 5 μM)	1	0.25 μM
DDW	6.5	
Template DNA	1	
計	20	

表 3. *Tritrichomonas suis* 検出のための nested PCR 反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
前反応	95°C	15 分	
熱変性	95°C	30 秒	} 30 サイクル
アニーリングおよび伸長反応	72°C	1 分	
熱変性	95°C	30 秒	} 50 サイクル
アニーリング	57°C	30 秒	
伸長反応	72°C	30 秒	
終反応	72°C	5 分	
	4°C		

Agarose L03(タカラバイオ株式会社、滋賀)が 2 %になるように TAE 溶液に入れ、電子レンジ (MD-667、マルマン株式会社、東京)を用いて加熱溶解し、2 % アガロースゲルを作製した。電気泳動装置 (Mupid<sup>®</sup>-2plus、株式会社アドバンス、東京)を用いて、PCR 産物 5 $\mu$ l と 6 x Loading buffer(タカラバイオ)1 $\mu$ l を混合し、35 分間電気泳動を行った。ラダーマーカーには 100 bp DNA ladder(タカラバイオ)を用いた。電気泳動後、アガロースゲルを遮光した容器中で 0.5  $\mu$ g/ml 臭化エチジウム溶液 (試薬特級、和光純薬)に浸し、30 分間静置して染色した。染色したアガロースゲルは、蒸留水で余計な染色液を落とした後、ゲル撮影・解析装置 (GDS-7900 system, UVP Inc., California, USA)内で紫外線照射し、バンドの確認および写真撮影を行った。

## 結果

### 1. 2種類の培養液を用いた猫糞便からの *T. suis* 検出および継代法

#### 1-1. Trichomonas medium<sup>®</sup>を用いた *T. suis* 検出法

##### 1-1-1. 改良 Trichomonas medium<sup>®</sup>の *T. suis* 検出感度

*T. suis* 検出感度を検討するために、糞便 1/20 倍希釈(糞便 50 mg/1 ml)に 1 虫体を添加した培養液は 37°C 培養開始から 4 日目まで全て陰性だった。しかし、10 虫体を添加した培養液は 3 本中 1 本が 4 日目に陽転し、 $10^2 \sim 10^5$  虫体を添加した培養液では 3 本ともに培養 2 日から陽転した(表 4)。

##### 1-1-2. 改良 Trichomonas medium<sup>®</sup>を用いた継代と培養容器の検討

1~ $10^2$  虫体を添加した培養液を入れた 15 ml チューブおよびフラスコの場合、または、 $10^3$  虫体を添加した培養液を横に寝かせたフラスコで培養した場合は、観察期間中、虫体が確認できなかった。一方、 $10^4 \sim 10^5$  虫体を添加した培養液を横に寝かせたフラスコで培養した場合、および  $10^3 \sim 10^5$  虫体に添加した培養液を 15 ml チューブおよび縦に立てたフラスコで培養した場合は虫体が確認され、図 7 のような検出曲線を示した。虫体数のピークは、 $10^3$  虫体/10 ml を入れた 15 ml チューブでは培養後 3 日、 $10^4 \sim 10^5$  虫体/10 ml を入れた 15 ml チューブでは培養後 2 日であった。一方、 $10^3$  虫体/10 ml を入れた縦に立てたフラスコでは、虫体数のピークは培養後 4 日、 $10^4 \sim 10^5$  虫体/10 ml を入れた縦に立てたフラスコでは培養後 3 日であった。このことから、15 ml チューブで培養した方が、縦に立てたフラスコで培養した場合と比較して虫体の増殖速度が速いことが明らかになった。

#### 1-2. InPouch<sup>™</sup> TF Feline を用いた *T. suis* 検出法

InPouch<sup>™</sup> TF Feline の検出感度を 50 mg 糞便添加培養液(約 4 ml)に 1 および 10 虫体の *T. suis* を添加し比較したところ、10 虫体添加培養液では、37°C で培養開始から 1 日目に、すでに虫体が検出されることを確認した。1 虫体添加培養液は培養開始から 4 日間観察しても虫体は検出されなかつ

表 4. 改良 Trichomonas medium® の *Tritrichomonas suis* 検出感度\*

	培養 2 日目	培養 3 日目	培養 4 日目
1 虫体	0/3	0/3	0/3
10 虫体	0/3	0/3	1/3
10 <sup>2</sup> 虫体	3/3	3/3	3/3
10 <sup>3</sup> 虫体	3/3	3/3	3/3
10 <sup>4</sup> 虫体	3/3	3/3	3/3
10 <sup>5</sup> 虫体	3/3	3/3	3/3

\*虫体が検出されたチューブの本数/試験したチューブの本数

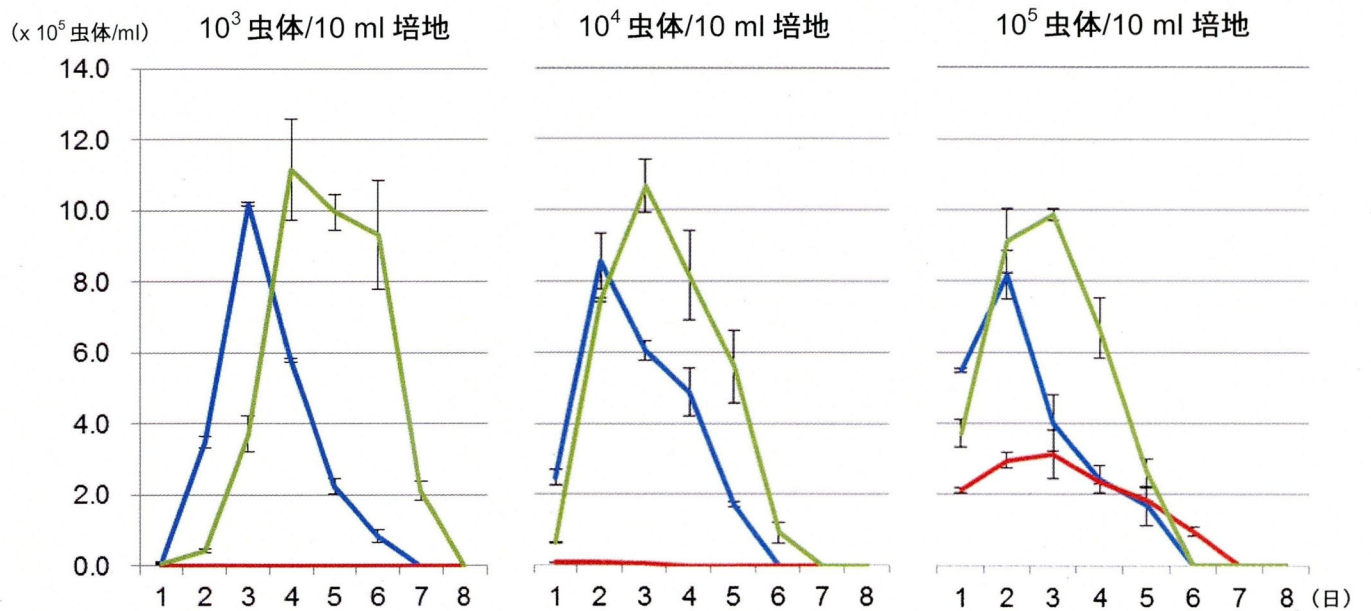


図 7. 改良 Trichomonas medium® による *T. suis* の検出曲線(±SD)

青:15 ml チューブ、緑:25 cm<sup>2</sup> フラスコ(縦)、赤:25 cm<sup>2</sup> フラスコ(横)



た。さらに、本培養液から前述の改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>を用いて、虫体の継代が可能であることも確認した。

## 2. *T. suis* 冷凍保存法の検討

セルバンカーおよび 20 % グリセリン-HRS 保存液添加培養液では、チェックポイント 1~3(図 5 参照)のいずれでも虫体の運動性は認められず、虫体は死滅したものと考えられた。一方で、10 % グリセリン-HRS 保存液添加培養液および 10 % グリセリン添加培養液では、チェックポイント 1~3 のいずれでも虫体の運動性が観察された。以上から、10%グリセリン-HRS 保存液もしくは 10 % グリセリンを培養液に添加することによって、*T. suis* 虫体の保存が可能であることが示された。

## 3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法

1 または 10 虫体を添加した改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>は、培養後 2 および 3 日後の検査では全て陰性であった。10<sup>2</sup>虫体を添加した培養液は培養後 2 日の顕微鏡観察で陰性であったが、3 日目には 3 本中 1 本が陽転した。10<sup>3</sup>または 10<sup>4</sup> 虫体を添加した培養液は培養後 2 および 3 日の顕微鏡観察で陽性であった(表 5)。

1 虫体を添加し 3 日間培養後の沈渣由来 DNA を用いた場合は全てバンドが認められなかったが、10 虫体を添加した培養後沈渣由来 DNA を用いた場合は 3 検体中 1 検体でバンドが検出された。10<sup>2</sup>虫体を添加した培養後沈渣 3 検体中 2 検体でバンドが検出され、このうち 1 検体は顕微鏡観察結果と同じであった。10<sup>3</sup>または 10<sup>4</sup> 虫体を添加した培養後沈渣はそれぞれ 2 検体共にバンドが認められた(表 5)。以上の結果から、培養後の顕微鏡観察よりも、糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた PCR 法の結果の方が、若干感度が高かった。

表 5. 改良 Trichomonas medium<sup>®</sup>を用いた糞便培養液の顕微鏡観察法および  
糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法の陽性数\*

培養液に添加した虫体数		1	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
培養 2 日	顕微鏡観察	0/3	0/3	0/3	2/2	2/2
培養 3 日	顕微鏡観察	0/3	0/3	1/3	2/2	2/2
	PCR 法	0/3	1/3	2/3	2/2	2/2

\*陽性数／試験した数

## 考 察

### 1. 2 種類の培養液を用いた猫糞便からの *T. suis* 検出および継代法

これまで、*Trichomonas medium*<sup>®</sup>を猫の糞便からの *T. suis* 検出に応用したという報告はなかった。本実験により、改良した *Trichomonas medium*<sup>®</sup>が猫の新鮮便もしくは直腸採材便から *T. suis* 検出に応用可能な培養液であることが明らかとなった。1.5 ml チューブに入れた 1 ml の改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>においては、糞便 50 mg において 10 虫体が検出限界であった。また本研究において、InPouch<sup>™</sup> TF Feline を用いた培養法では、検出限界が 10 虫体であり、1 虫体の添加では虫体の増殖が認められなかった。このことから、糞便中に 1 虫体しかいなかった場合では InPouch<sup>™</sup> TF Feline による *T. suis* 検出は困難であると推察される。本研究において、改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>は InPouch<sup>™</sup> TF Feline と同等の検出感度であったことから、改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>は InPouch<sup>™</sup> TF Feline の代替法として猫の新鮮便もしくは直腸採材便の培養法による *T. suis* 検出法に適している培養液であることが明らかになった。後述の調査において、チューブと比べ嵩が小さく多量の検体輸送が可能である InPouch<sup>™</sup> TF Feline は地理的に離れた動物病院から空輸する検体にのみ使用し、空輸する必要のない検体については改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>を用いることとした。

分離した *T. suis* を改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>によって継代すると、培養から 2~4 日目に虫体数のがピークに達するため、培養間隔は培養から 2~4 日目が適していることが明らかになった。この結果は、*T. suis* の継代に一般的に用いられている Diamond 培地を用いて、牛の膈より分離した複数の *T. suis* を 10<sup>4</sup> 虫体/ml になるように継代した場合と同じ間隔であった(Lun *et al.*, 2000)。培養容器には 15 ml チューブもしくは縦においたフラスコが有効であった。また、改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>による継代は、InPouch<sup>™</sup> TF Feline で糞便から直接 *T. suis* を分離した場合にも、同様の方法で可能であることから、*T. suis* 継代用培地として改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup>が有用であることがわかった。

## 2. *T. suis* 冷凍保存法

改良Trichomonas medium<sup>®</sup>内の *T. suis* の冷凍保存には、4倍量の10 % グリセリン-HRS保存液(最終濃度は8 % グリセリン)、および最終濃度が10 %のグリセリンが適することが明らかになった。また、改良Trichomonas medium<sup>®</sup>内の *T. suis* の保存には馬血清が必要ではないことが示された。過去の文献ではDMSOとグリセリンを比較し、グリセリンを添加し-95℃で保存した場合、*T. suis* を最も長期保存できたと報告している(Levine and Andersen, 1966; Raether and Seidenath, 1972)。これらの報告からも *T. suis* の冷凍保存には、8~10 % グリセリンが適していることが示唆される。今後は、簡便性から、*T. suis* の冷凍保存法には、改良Trichomonas medium<sup>®</sup>に終濃度が10 % になるようにグリセリン添加することとした。

## 3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法

Gookin *et al.* (2002)によって報告された *T. suis* 特異的プライマーを用いた Single tube nested PCR 法は、猫糞便中の *T. suis* 検出法として報告されている唯一の PCR 法である(Gookin *et al.*, 2002)。糞便培養後沈渣から QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen)を用いDNAを抽出・精製し、この DNA の *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法では、培養法との併用で 50 mg 糞便中に 10~100 虫体あれば検出可能であることが明らかとなった。これは、Gookin *et al.* (2002)の報告で必要であった糞便量 200 mg よりも少ない量でも、同等の検出感度を示した。このことから、少ない糞便量であっても、培養法を併用することで虫体数の増殖が期待でき、糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法での *T. suis* 陽性判定が有効であることが示唆された。猫の直腸便採材時には、200 mg 未満の糞便量しか採材できない場合が多いので、培養法との併用は有効な方法であると考えられる。さらに、培養液に入れて輸送した糞便検体において、輸送中に虫体死滅した検体に対する *T. suis* 検出法としても、本 PCR 法は使用可能であることが推測された。なお、*T. suis* 感染の検出法の評価において、同一糞便検体を用いた培養法による検出、糞便由来 DNA および培養後の沈渣由来 DNA を用いた検査が必要であるが、これは第 II 章(表 16)において述べる。

## 小 括

国内における猫の *T. suis* の感染状況を把握するための検査法として、国内の猫の糞便検体を用いた培養法および糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域を標的とした nested PCR 法を検討した。国内で入手可能な培養液である *Trichomonas medium*<sup>®</sup> を改良して、猫糞便からの *T. suis* 検出・継代法を確立し、8~10 % のグリセリン添加により虫体の冷凍保存が可能であることを示した。さらに、改良 *Trichomonas medium*<sup>®</sup> による培養法と、猫糞便からの *T. suis* 培養のためにアメリカなどでの臨床現場で一般的に用いられている InPouch<sup>™</sup> TF Feline による培養法を比較し、検出用だけでなく、継代用の培養液として *Trichomonas medium*<sup>®</sup> も使用できることを示した。また、糞便培養後の沈渣由来 DNA も nested PCR 法に適応可能であることを明らかにした。

## 第 II 章 日本の猫における *T. suis* 感染状況調査

## 序

第 I 章の序において述べた通り、近年、*T. suis* は猫に難治性の下痢症をもたらす病原体として、獣医小動物臨床領域においてもその重要性が認識されつつあるが、日本の猫の *T. suis* 感染は未報告である。そこで本研究では、国内における猫の *T. suis* の感染状況を把握するために、北海道札幌市および埼玉県鴻巣市の動物病院で集めた猫糞便検体を用いて、培養法もしくはPCR法によって検査した。

## 材 料 お よ び 方 法

### 1. 検体および調査方法

本調査では、北海道札幌市および埼玉県鴻巣市の飼い猫の糞便、合計 147 検体を検査した。感染リスク要因の分析と考察を試みるため、オーナーに対しアンケート調査を実施し、検体採取個体の年齢、品種、飼育環境、下痢の有無などの情報を得た。用いたアンケート用紙は図 8 に示した。

#### 1-1. 調査 I: 北海道札幌市 A 動物病院(冷凍保存糞便の PCR 法による調査)

49検体は北海道札幌市のA動物病院で2009年に採材され、-80℃で保存していた糞便を用いた。猫とその検体情報は表6に示した。全49糞便検体はnested PCR法に供した。

#### 1-2. 調査 II: 北海道札幌市 B 動物病院(新鮮便の培養法および PCR 法による調査)

40 検体は北海道札幌市の B 動物病院で 2009～2010 年に採材した。猫とその検体情報は表 7 に示した。糞便 50 mg は改良 Trichomonas Medium<sup>®</sup>を用いた培養法に供し(方法は第 I 章-1-2 参照)、さらに 50 mg 以上採材できた場合は糞便から DNA を抽出し、nested PCR 法に供した。すなわち、全 40 糞便検体は培養法に供し、11 糞便検体はさらに nested PCR 法に供した。一部の検体については、糞便の直接塗抹標本の光学顕微鏡による観察(直接法)を実施した。培養液にいれた新鮮便は、すぐに光学顕微鏡検査(BH-2)によって観察した。観察は第 I 章-1-2 の通り行った。観察後、37℃で培養し、2 日毎に 10 日間観察を行った。培養後、原虫が増殖した例では原虫の形態観察のために培養陽性塗抹標本を作製し、後述のギムザ染色を実施した。



名前	採取日	年齢	性別	品種
			♂ ・ ♀ ・ cast 済 ・ spay 済	
飼育場所				下痢の発症年齢
室内 ・ 野外 ・ 野外に出ることがある				
備考（糞便検査、投薬の有無など）				

図 8. オーナーに対するアンケート記録用紙

表 6. 【調査 I】北海道 札幌市 A 動物病院の猫およびその検体情報(F01~F31)

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無
F01	cat_Sapporo_A_01	2009/2/5	4才	雑種	室内	無
F02	cat_Sapporo_A_02	2009/2/10	2才	雑種	室内	無
F03	cat_Sapporo_A_03	2009/2/10	16才	雑種	室内	無
F04	cat_Sapporo_A_04	2009/2/13	17才	アメリカンショートヘア	室内	無
F05	cat_Sapporo_A_05	2009/2/15	2才	アメリカンショートヘア	室内	無
F06	cat_Sapporo_A_06	2009/2/16	4才	チンチラ	室内	無
F07	cat_Sapporo_A_07	2009/2/20	20才半	日本猫	室内	無
F08	cat_Sapporo_A_08	2009/2/20	11才	アメリカンショートヘア	室内	無
F09	cat_Sapporo_A_09	2009/2/21	15才	雑種	室内	無
F10	cat_Sapporo_A_10	2009/2/21	6ヶ月	アビシニアン	室内	無
F11	cat_Sapporo_A_11	2009/2/24	4才	雑種	室内	無
F12	cat_Sapporo_A_12	2009/2/24	6ヶ月	雑種	室内	無
F13	cat_Sapporo_A_13	2009/3/9	5才	雑種	室内	無
F14	cat_Sapporo_A_14	2009/2/24	3才半	雑種	室内	無
F15	cat_Sapporo_A_15	2009/2/26	1才	スコティッシュフォールド	室内	無
F16	cat_Sapporo_A_16	2009/2/26	8ヶ月	雑種	室内	無
F17	cat_Sapporo_A_17	2009/2/26	5才半	雑種	時々室外	無
F18	cat_Sapporo_A_18	2009/2/27	7ヶ月	ラグドール	室内	無
F19	cat_Sapporo_A_19	2009/2/27	3才	雑種	室内	無
F20	cat_Sapporo_A_20	2009/2/28	7ヶ月	ロシアンブルー	室内	無
F21	cat_Sapporo_A_21	2009/2/28	10ヶ月	雑種	室内	無
F22	cat_Sapporo_A_22	2009/2/28	6才半	スコティッシュフォールド	室内	無
F23	cat_Sapporo_A_23	2009/2/28	12才半	雑種	室内	無
F24	cat_Sapporo_A_24	2009/3/3	7ヶ月	不明	室内	無
F25	cat_Sapporo_A_25	2009/3/1	1才	不明	室内	無
F26	cat_Sapporo_A_26	2009/3/1	10ヶ月	不明	室内	無
F27	cat_Sapporo_A_27	2009/3/1	7ヶ月	不明	室内	無
F28	cat_Sapporo_A_28	2009/3/5	1才半	雑種	室内	無
F29	cat_Sapporo_A_29	2009/3/5	7才	雑種	室内	無
F30	cat_Sapporo_A_30	2009/3/5	7才	キジトラ	室内	無
F31	cat_Sapporo_A_31	2009/3/5	7才	茶トラ	室内	無

表 6. 【調査 I】北海道 札幌市 A 動物病院の猫およびその検体情報(F32～F49)

続き

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢 の有無
F32	cat_Sapporo_A_32	2009/3/5	9才	キジトラ	室内	無
F33	cat_Sapporo_A_33	2009/2/5	4才	雑種	室内	無
F34	cat_Sapporo_A_34	2009/3/6	8才	雑種	時々室外	無
F35	cat_Sapporo_A_35	2009/3/5	3才	アビシニアン	室内	無
F36	cat_Sapporo_A_36	2009/3/6	5才	雑種	室内	無
F37	cat_Sapporo_A_37	2009/2/5	6才	雑種	室内	無
F38	cat_Sapporo_A_38	2009/2/5	5才	雑種	室内	無
F39	cat_Sapporo_A_39	2009/3/9	1才	雑種	室内	無
F40	cat_Sapporo_A_40	2009/2/5	8才	雑種	室内	無
F41	cat_Sapporo_A_41	2009/2/5	4才	雑種	室内	無
F42	cat_Sapporo_A_42	2009/2/5	5才	雑種	室内	無
F43	cat_Sapporo_A_43	2009/2/5	10才	雑種	室内	無
F44	cat_Sapporo_A_44	2009/2/5	11才	雑種	室内	無
F45	cat_Sapporo_A_45	2009/3/9	9ヶ月	雑種	時々室外	無
F46	cat_Sapporo_A_46	2009/3/14	12才	茶トラ	室内	無
F47	cat_Sapporo_A_47	2009/3/14	12才	不明	室内	無
F48	cat_Sapporo_A_48	2009/3/16	8才	キジトラ	室内	無
F49	cat_Sapporo_A_49	2009/3/17	14才	雑種	時々室外	無

\*いずれの検体も蔗糖遠心浮遊法で陰性、駆虫薬投与歴は無し

表 7. 【調査 II】北海道 札幌市 B 動物病院の猫およびその検体情報 (F50～F60)

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無	臨床症状	備考
F50	cat_Sapporo_B_01	2009/5/19	2才	アビニアン	室内	有	慢性下痢 直接法:トリコモナス原虫+	特になし
F51	cat_Sapporo_B_02	2009/9/8	14才半	雑種	室内	有	下痢(回虫症)	特になし
F52	cat_Sapporo_B_03	2009/9/8	15才	雑種	室内	無	糖尿病	特になし
F53	cat_Sapporo_B_04	2009/9/16	9才半	アビニアン	室内	有	慢性下痢 (ステロイド反応性)	特になし
F54	cat_Sapporo_B_05	2009/9/16	不明(幼猫)	雑種	室外	無	猫ウイルス性鼻気管炎	特になし
F55	cat_Sapporo_B_06	2009/9/16	1才半	雑種	室内	無	腎不全	特になし
F56	cat_Sapporo_B_07	2009/9/30	14才	雑種	室内	無	腎疾患	特になし
F57	cat_Sapporo_B_08	2009/9/30	不明(成猫)	雑種	室内	無	咬傷、膀胱炎	特になし
F58	cat_Sapporo_B_09	2009/9/30	13才	雑種	室内	無	好酸球性皮膚炎	特になし
F59	cat_Sapporo_B_10	2009/9/30	9才	スコティッシュフォールド	室内	有	数ヶ月令より下痢発症 間欠的慢性下痢 直接法:下痢便からのみ トリコモナス原虫+	特になし
F60	cat_Sapporo_B_11	2009/10/4	4才	雑種	室内	無	健康	F59の親戚 F59とはトイレ一緒

表7.【調査II】北海道札幌市B動物病院の猫およびその検体情報(F61～F77)

一連番号	検体番号	採年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢 の有無	臨床症状	備考
F61	cat_Sapporo_B_12	2009/10/4	7才	スコティッシュフォールド	室内	無	健康	F59の同腹 F59とトイレ居住場所別
F62	cat_Sapporo_B_13	2009/10/4	4才	雑種	室内	無	健康	F59とトイレ居住別
F63	cat_Sapporo_B_14	2009/10/5	17才	雑種	室内	無	便秘、腎疾患	特になし
F64	cat_Sapporo_B_15	2009/10/9	14才	雑種	室内	無	両後肢全麻痺	特になし
F65	cat_Sapporo_B_16	2009/10/23	15才	雑種	室内	無	右後肢全麻痺	特になし
F66	cat_Sapporo_B_17	2009/10/26	不明(成猫)	雑種	室内	無	健康	輸血猫
F67	cat_Sapporo_B_18	2009/10/26	不明(成猫)	雑種	室内	無	健康	輸血猫
F68	cat_Sapporo_B_19	2009/10/29	1才半	雑種	室内	無	免疫介在性溶血性貧血	特になし
F69	cat_Sapporo_B_20	2009/10/29	5才半	雑種	室内	無	てんかん?	特になし
F70	cat_Sapporo_B_21	2009/10/29	19才	雑種	室内	無	慢性腎不全	特になし
F71	cat_Sapporo_B_22	2009/10/29	16才半	雑種	室内	無	甲状腺機能亢進症	特になし
F72	cat_Sapporo_B_23	2009/10/29	16才半	雑種	室内	無	甲状腺機能亢進症	特になし
F73	cat_Sapporo_B_24	2009/10/29	4才	ロシアンブルー	室内	無	慢性嘔吐	特になし
F74	cat_Sapporo_B_25	2009/10/29	不明(成猫)	雑種	室外	無	口内炎	特になし
F75	cat_Sapporo_B_26	2009/10/29	10才	雑種	室内	無	嘔吐、鼓腸症(原因不明)	特になし
F76	cat_Sapporo_B_27	2009/11/2	8才	雑種	室内	無	声帯の水溶性変化	特になし
F77	cat_Sapporo_B_28	2009/11/24	14才	雑種	室内	無	心・腎不全	特になし

続き

表 7. 【調査 II】北海道 札幌市 B 動物病院の猫およびその検体情報 (F78~F89)

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無	臨床症状	備考
F78	cat_Sapporo_B_29	2009/12/8	8ヶ月	メインクーン	室内	無	心室中隔欠損	特になし
F79	cat_Sapporo_B_30	2009/12/8	18才	雑種	室内	無	甲状腺機能亢進症	特になし
F80	cat_Sapporo_B_31	2009/12/11	17才	雑種	室内	無	腎不全、リンパ腫	特になし
F81	cat_Sapporo_B_32	2009/12/17	14才	雑種	室内	無	乳腫	特になし
F82	cat_Sapporo_B_33	2009/12/24	不明(成猫)	雑種	室内	無	不明	特になし
F83	cat_Sapporo_B_34	2010/1/14	6才	雑種	室内	無	歯疾患	特になし
F84	cat_Sapporo_B_35	2010/1/22	13才	雑種	室内	無	アレルギー性皮膚炎	特になし
F85	cat_Sapporo_B_36	2010/1/25	不明(成猫)	雑種	室内	無	不明	特になし
F86	cat_Sapporo_B_37	2010/2/4	5才半	アビシニアン	室内	有	リンパ球性腸炎	特になし
F87	cat_Sapporo_B_38	2010	不明(成猫)	雑種	室内	無	健康	特になし
F88	cat_Sapporo_B_39	2010	不明(成猫)	雑種	室内	無	健康	特になし
F89	cat_Sapporo_B_40	2010	不明(成猫)	雑種	室内	有	間欠的な慢性下痢	特になし

続き

### 1-3. 調査 III: 埼玉県鴻巣市 C 動物病院(新鮮便の直接法および糞便培養輸送検体を用いた調査)

58 検体は埼玉県 鴻巣市 C 動物病院で 2010 年に採材された猫の直腸便である。猫とその検体情報ならびに直接法の結果は表 8 に示した。採材について図 9 の説明書を添付した。採材時の動物病院にて、40 検体が直接法に供された。培養法に供した糞便量は約 50 mg で、さらに 50 mg 以上採材できた場合は、糞便由来 DNA の nested PCR 法に供するために 2 ml チューブに入れた。結果、58 検体は InPouch™ TF Feline による培養法に供し、58 検体中 16 検体は糞便由来 DNA の nested PCR 法に供した。2 日間かけて室温で輸送された。輸送直後に、光学顕微鏡(BH-2)による虫体観察を行った(図 3 参照)。観察後、37°C で培養し、2 日毎に 10 日間観察した。培養から 10 日後、22,000 xg、3 分間、室温で遠心し、沈渣を得た。沈渣は-80°C で保存し、その後、DNA 抽出・精製し、PCR 法に供した。培養後、原虫が増殖した例では原虫の形態観察のために培養陽性塗抹標本を作製し、後述のギムザ染色を実施した。

## 2. ギムザ染色法

トリコモナス虫体観察のため、培養陽性検体の塗抹標本を作製し、ギムザ染色を行った。塗抹標本の上に 10%ギムザ溶液(Merk KGaA, Darmstadt, Germany)-りん酸 pH 標準液(pH 7.41, 25°C)(和光純薬)を 4 ml のせて 8 分間染色した後、水道水で染色液を洗い流し、風乾した。形態観察は 1,000 倍(油浸レンズ)の光学顕微鏡(BH-2)で観察した。

## 3. 凍結保存糞便および糞便培養後の沈渣からの DNA 抽出および精製

凍結保存糞便 200 mg からの DNA 抽出および精製は QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用い、添付の説明書に従って行った。DNA 抽出および精製の成否を確認するために、DNA 濃度は NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)を用いて測定した。糞便培養後の沈渣からの DNA 抽出および精製は、第 I 章の材料および方法の 3 に準じて行った。

表 8. 【調査 III】 埼玉県鴻巣市 C 動物病院の猫およびその検体情報(F90～F103)

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無 (発症時期)	備考
F90	cat_Kounosu_C_01	2010/2/13	7才5ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	無	特になし
F91	cat_Kounosu_C_02	2010/2/13	6ヶ月	雑種	時々室外	無	Toxocara cati 駆虫歴あり
F92	cat_Kounosu_C_03	2010/2/12	6ヶ月	雑種	室外	無	T. cati 駆虫歴あり
F93	cat_Kounosu_C_04	2010/2/16	4ヶ月	雑種	時々室外	無	直接法: -
F94	cat_Kounosu_C_05	2010/2/16	5ヶ月	雑種	室内	無	直接法: -
F95	cat_Kounosu_C_06	2010/2/16	5ヶ月	雑種	室内	無	直接法: -
F96	cat_Kounosu_C_07	2010/2/16	8才程度	雑種	室内	無	2010/2/14-15 軟便 直接法: -
F97	cat_Kounosu_C_08	2010/2/18	5ヶ月	雑種	時々室外	有(不明)	虚弱体質で全身状態悪い 採材日軟便
F98	cat_Kounosu_C_09	2010/2/19	1才10ヶ月	雑種	室外	無	採糞量少なめ
F99	cat_Kounosu_C_10	2010/2/19	2ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無	特になし
F100	cat_Kounosu_C_11	2010/2/20	3ヶ月	雑種	時々室外	無	直接法: T. cati +
F101	cat_Kounosu_C_12	2010/2/21	5ヶ月	雑種	時々室外	無	特になし
F102	cat_Kounosu_C_13	2010/2/22	5ヶ月	雑種	室外	無	直接法: T. cati +
F103	cat_Kounosu_C_14	2010/2/23	10ヶ月	雑種	室外	無	直接法: T. cati +



表 8. 【調査 III】 埼玉県鴻巣市 C 動物病院の猫およびその検体情報(F104~F115)

続き

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無 (発症時期)	備考
F104	cat_Kounosu_C_15	2010/2/27	5ヶ月	雑種	時々室外	有(2010/2/5より)	2010/2/5 血便、24-26 下痢、27 軟便 直接法：-
F105	cat_Kounosu_C_16	2010/2/27	2才4ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無	直接法：-
F106	cat_Kounosu_C_17	2010/2/27	2才4ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無	採糞量が少ない可能性あり(粘液が主?) 直接法：-
F107	cat_Kounosu_C_18	2010/2/27	7ヶ月	雑種	時々室外	無	2010/2/22 より軟〜下痢を繰り返す 採材日も軟便 直接法：-
F108	cat_Kounosu_C_19	2010/2/27	11ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無	直接法：-
F109	cat_Kounosu_C_20	2010/2/27	1才3ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無	直接法：-
F110	cat_Kounosu_C_21	2010/2/27	1才3ヶ月	アビシニアン	時々室外	無	直接法：-
F111	cat_Kounosu_C_22	2010/3/1	1才3ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無	直接法：-
F112	cat_Kounosu_C_23	2010/3/1	7ヶ月	雑種	時々室外	無	2010/1 に <i>T. cati</i> 駆虫 直接法：-
F113	cat_Kounosu_C_24	2010/3/1	2才7ヶ月	雑種	時々室外	有(1才7ヶ月より)	2009/3 より慢性下痢
F114	cat_Kounosu_C_25	2010/3/1	12才	雑種	室内	無	野良猫 直接法：-
F115	cat_Kounosu_C_26	2010/3/6	1才3ヶ月	ロシアンブルー	時々室外	無	2010/3/5 に初めて下痢 採材日も軟便 直接法：-

表 8. 【調査 III】 埼玉県鴻巣市 C 動物病院の猫およびその検体情報 (F116~F125)

続き

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無 (発症時期)	備考
F116	cat_Kounosu_C_27	2010/3/6	5ヶ月	雑種	時々室外	有 (2009/12より 下痢~軟便)	2010/3/5~3/6まで数回下痢 採糞時も軟便 直接法: -
F117	cat_Kounosu_C_28	2010/3/6	5ヶ月	雑種	時々室外	無	直接法: -
F118	cat_Kounosu_C_29	2010/3/8	5才 8ヶ月	雑種	室内	無	直接法: -
F119	cat_Kounosu_C_30	2010/3/8	17才	雑種	時々室外	無	特になし
F120	cat_Kounosu_C_31	2010/3/8	13才 10ヶ月	雑種	時々室外	無	長期便秘を繰り返す
F121	cat_Kounosu_C_32	2010/3/12	2ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	無	直接法: -
F122	cat_Kounosu_C_33	2010/3/12	12才 10ヶ月	アビシニアン	室内	無	便秘気味 直接法: -
F123	cat_Kounosu_C_34	2010/3/12	4才 2ヶ月	雑種	室外	無	下痢以外の疾患あり
F124	cat_Kounosu_C_35	2010/3/13	5ヶ月	雑種	室外	無	F125・126と同腹 直接法: -
F125	cat_Kounosu_C_36	2010/3/13	5ヶ月	雑種	室外	無	F124・126と同腹 直接法: -

表 8. 【調査 III】 埼玉県鴻巣市 C 動物病院の猫およびその検体情報 (F127~F135)

続き

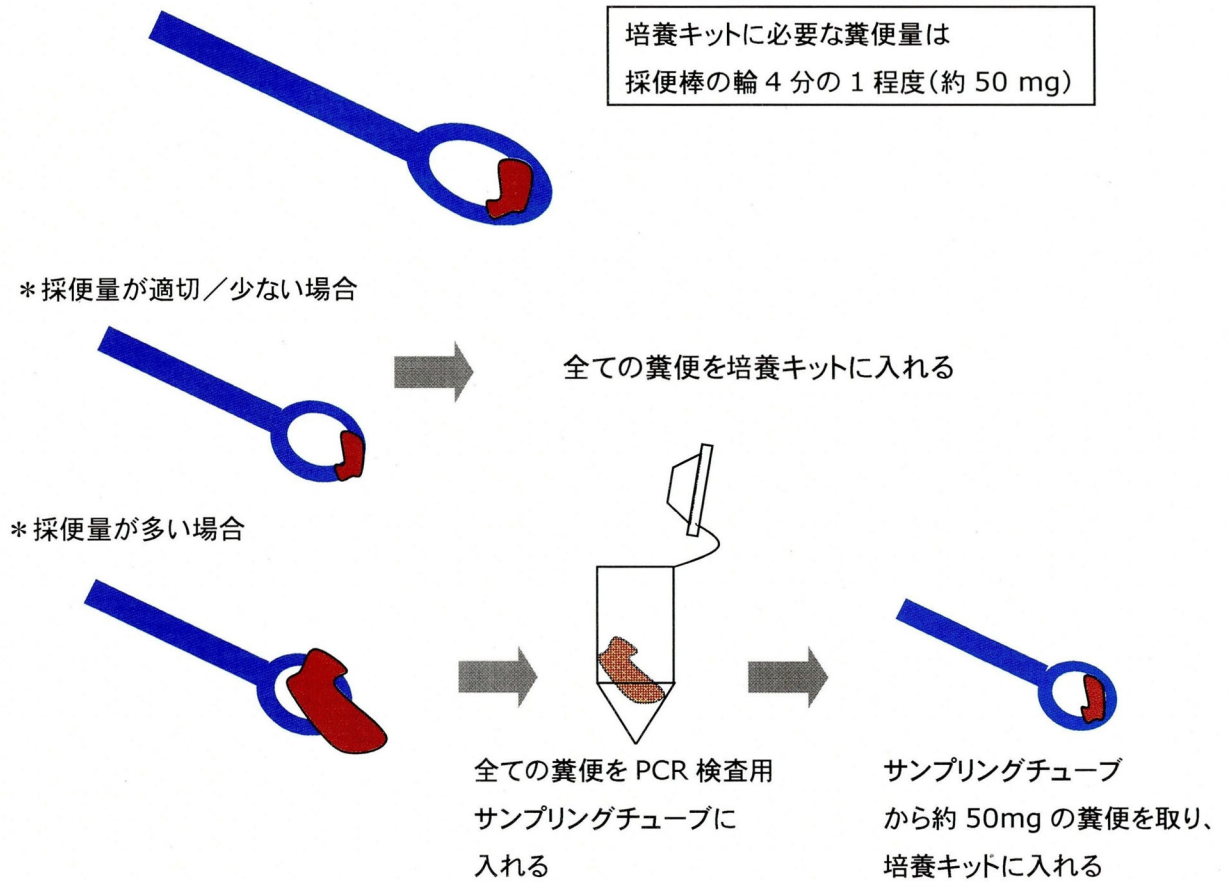
一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無 (発症時期)	備考
F126	cat_Kounosu_C_37	2010/3/13	5ヶ月	雑種	室外	無	F124・126と同腹 直接法: -
F127	cat_Kounosu_C_38	2010/3/15	10才9ヶ月	ベルシャ	室内	無	下痢以外の疾患あり 直接法: -
F128	cat_Kounosu_C_39	2010/3/15	2才	マンチカン	室内	有(2才より間欠的)	トリコモナス原虫検出歴有 採糞量微量
F129	cat_Kounosu_C_40	2010/3/21	1才4ヶ月	雑種	室内	無	症状なし
F130	cat_Kounosu_C_41	2010/3/21	2才	アメリカンショートヘア	室内	無	症状なし 排泄より2時間以内の自然排泄便を採材
F131	cat_Kounosu_C_42	2010/3/27	10才7ヶ月	雑種	室内	無	直接法: -
F132	cat_Kounosu_C_43	2010/3/27	6ヶ月	雑種	室内 (3ヶ月までは室外)	無	たまに下痢(最近糞便に血混入することも) 直接法: <i>Spirometra erinaceieuropaei</i> 虫卵+
F133	cat_Kounosu_C_44	2010/3/27	2才11ヶ月	雑種	時々室外	無	下痢以外の疾患あり 本日はじめて下痢 直接法: -
F134	cat_Kounosu_C_45	2010/3/28	1ヶ月	ソマリ	室内	無	直接法: -
F135	cat_Kounosu_C_46	2010/4/2	5才11ヶ月	雑種	室内	無	下痢以外の疾患あり 直接法: -

表 8. 【調査 III】 埼玉県鴻巣市 C 動物病院の猫およびその検体情報 (F136~F147)

続き

一連番号	検体番号	採材年月日	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無 (発症時期)	備考
F136	cat_Kounosu_C_47	2010/4/3	8ヶ月	雑種	室外	無	直接法: <i>Spirometra erinaceieuropaei</i> 虫卵+
F137	cat_Kounosu_C_48	2010/4/5	3ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	有(2ヶ月より)	直接法: コクシジウム +
F138	cat_Kounosu_C_49	2010/4/12	3ヶ月	雑種	室外	不明	直接法: -
F139	cat_Kounosu_C_50	2010/4/12	12才	雑種	室外	無	下痢以外の疾患あり、直接法: -
F140	cat_Kounosu_C_51	2010/4/15	3ヶ月	ソマリ	室内	無	特になし
F141	cat_Kounosu_C_52	2010/4/15	2ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	有	直接法: <i>Giardia intestinalis</i> +
F142	cat_Kounosu_C_53	2010/4/15	1ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	無	特になし
F143	cat_Kounosu_C_54	2010/4/15	4歳4ヶ月	雑種	室内	無	特になし
F144	cat_Kounosu_C_55	2010/4/30	1ヶ月	アビシニアン	室内	有	直接法: トリコモナス原虫+ コクシジウム感染歴あり (2010/4/29まで駆虫薬摂取)
F145	cat_Kounosu_C_56	2010/5/7	1才	雑種	時々室外	有(数ヶ月令より)	2週間水様性下痢持続 多頭飼育のため、あまり管理が行き届かず虚弱 直接法: -
F146	cat_Kounosu_C_57	2010/5/8	7ヶ月	雑種	時々室外	無	2010/3/8に <i>S. erinaceieuropaei</i> 駆虫 直接法: -
F147	cat_Kounosu_C_58	2010/5/23	7才3ヶ月	不明	室内	無	2008/3にトリコモナス原虫駆虫(この際、1ヶ月 下痢持続)駆虫後は症状なし、同居猫も症状なし 直接法: -

1. 採便棒を使用して糞便を採取する。



2. 培養キット(InPouch™ TF Feline)(保管は室温、暗い場所)に糞便を入れる

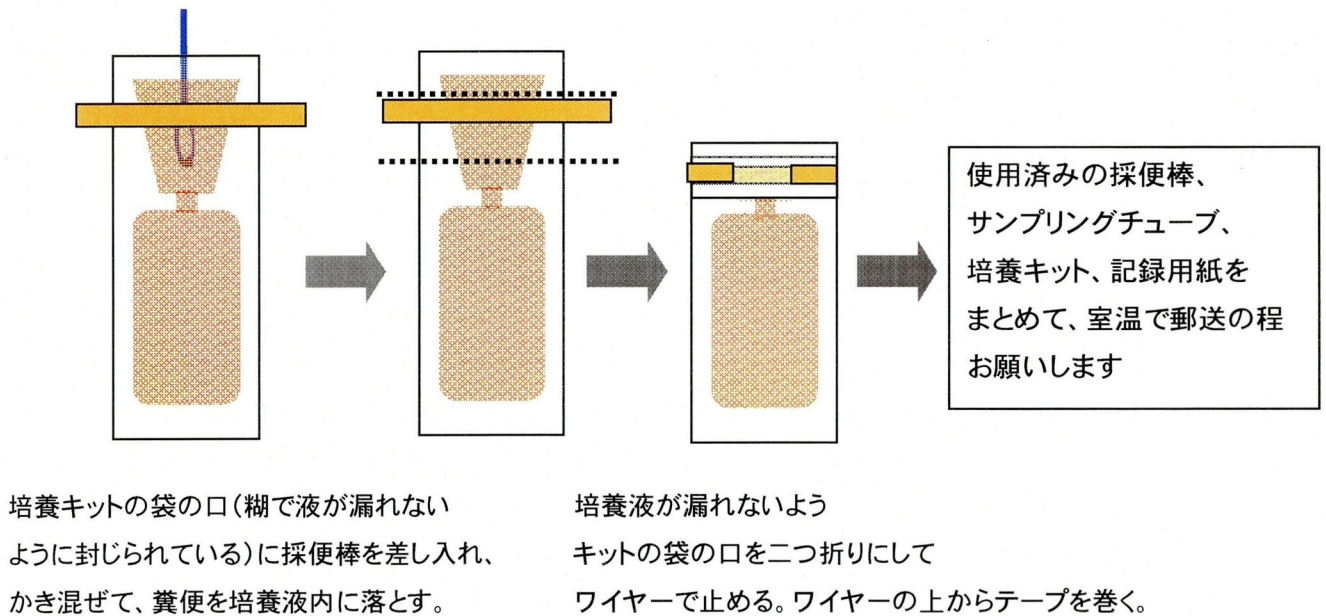


図 9. 採材を依頼した動物病院に送付した採材手順用紙

#### 4. *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法

全147検体中118検体(冷凍糞便由来DNA、もしくは糞便培養後の沈渣由来DNA)が *T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法に供された。冷凍糞便由来DNAは、49検体が調査Iの検体、11検体が調査II、16検体が調査IIIで得られた。糞便培養後の沈渣由来DNAは、58検体が調査IIIで得られた。nested PCR法およびアガロースゲル電気泳動法によるバンドの確認は、第 I 章の材料および方法の3-2-1・3・4に準じて行った。

#### 5. PCR 産物のクローニング

##### 5-1. PCR 産物の精製

nested PCR 法の PCR 産物はアガロースゲル電気泳動し、染色した後、トランスイルミネーター (TRANSILMINATER、フナコシ株式会社、東京) 上で可視化した。約 208 bp のバンドをメスで切り出した。切り出したバンドは、Wizard<sup>®</sup> SV Gel and a PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) を用いて、添付された説明書に従って精製した。

##### 5-2. クローニングとトランスフォーメーション

精製した PCR 産物のクローニングには pGEM-T Vector System (Promega) を用いた。PCR 産物とベクターは 1 : 6 の割合で混合し、室温で 2 時間ライゲーションした。ライゲーションしたベクターを、北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室で作製したコンピテントセル DH5a を用いて、以下の手順でトランスフォーメーションした。50 µl の DH5a が入った 1.5 ml チューブを氷の上に出し、ライゲーションしたベクター 10 µl を入れて、タッピングした。氷上で 30 分間静置した後、42°C で 50 秒インキュベートし、さらに氷上で 2 分間静置した。37°C に温めた 450 µl の SOC 培地 (Difco<sup>™</sup> SOB medium (Becton, Dickinson and Company) 5.6 g を滅菌蒸留水 200 ml に溶解し、オートクレーブした後、20 % 滅菌蔗糖液 4ml (試薬特級、和光純薬) を加えたもの) を加え、タッピングした。37°C、1 時間で振盪しつつインキュベートした。トランスフォーメーション後の大腸菌の入ったチューブを、1,600 xg、5

分間、室温で遠心した。上清を 300  $\mu$ l 捨てた後、下層 20  $\mu$ l と 200  $\mu$ l をコンラージ棒によって、培地に塗布した。培地は、100  $\mu$ l の 0.1 M IPTG(タカラバイオ)、50  $\mu$ l の 25  $\mu$ g/ml X-gal(タカラバイオ)の順番に塗布したアンピシリン添加 LB 培地(1 % Bacto™ trypton(Becton, Dickinson and Company)、0.5 % Bacto™ Yeast Extract(Becton, Dickinson and Company)、0.5 % 塩化ナトリウム(試薬特級、和光純薬)、1.5 % Bacto™ Agar(Becton, Dickinson and Company)、50 $\mu$ g/ml アンピシリン(Ampicillin sodium salt, MP Biomedicals, California, USA))である。トランスフォーメーションした大腸菌液をこれに塗布して 30 分乾燥後、37℃、16 時間培養した。

### 5-3. コロニーPCR

16 時間培養した大腸菌のコロニーのうち、白色のものを無作為に選別し、コロニーダイレクト PCR を実施した。プライマーは、T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')および SP6(5'-ATTCTATAGTGT CACCTAAAT-3')を用いた。コロニーダイレクト PCR の反応液と反応条件は表 9、10 に示した。

### 5-4. プラスミド DNA 抽出

PCR 産物の挿入が確認されたコロニーを無作為に 8 個選別し、アンピシリン添加 LB 液体培地(1 % Bacto™ trypton(Becton, Dickinson and Company)、0.5 % Bacto™ Yeast Extract(Becton, Dickinson and Company)、0.5 % 塩化ナトリウム(試薬特級、和光純薬)、50  $\mu$ g/ml アンピシリン(Ampicillin sodium salt, MP Biomedicals))5ml に植菌し、37℃で 15 時間振盪培養した。この中、2ml から大腸菌を回収し、Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit(BIO-RAD laboratories, Inc., California, USA)を用いてプラスミド DNA を抽出した。プラスミド DNA 抽出は添付の説明書通りに行った。

表 9. コロニーダイレクト PCR 反応液組成

試薬	容量(μl)	終濃度
Takara Ex taq	0.05	0.025 U/ml
10 x Ex Taq	1.0	1 x
dNTP mix (2.5 mM)	0.8	0.2 mM
SP6 および T7 primer (各 10μM)	1.0	1.0 μM
DDW	7.65	
計	10	

表 10. コロニーダイレクト PCR 反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
前反応	95°C	5 分	
熱変性	94°C	30 秒	} 40 サイクル
アニーリング	50°C	30 秒	
伸長反応	72°C	30 秒	
	4°C		



## 6. 塩基配列解読

Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて GeneAmp PCR System 9700 でサイクルシーケンスを行った。サイクルシーケンスの反応液、反応条件は表 11、12 に示した。反応終了後の反応液全量 20  $\mu$ l に対し、エタノール/EDTA/酢酸ナトリウムを用いて DNA 精製を行った。すなわち、反応終了後の反応液全量 20  $\mu$ l を、125 mM EDTA 2  $\mu$ l と 3 M 酢酸ナトリウム 2  $\mu$ l の入った 1.5 ml チューブに移しピペティングした。99.5 % エタノール(試薬特級、和光純薬)を 50  $\mu$ l を加え、チューブを 4 回転倒混和した後、15 分間、室温で静置した。チューブを 20,600 xg、30 分間、室温で遠心した、上清を捨てた後、70 % エタノール(試薬特級、和光純薬)を 70  $\mu$ l 加えた。20,600 xg、15 分間、室温で遠心した後、上清を除いた。蓋を開けて沈渣を 10~15 分間風乾した。その後の塩基解読は北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターに依頼した。

## 7. アライメント解析

得られた塩基配列の解析は BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) を用いて行った。得られた配列は GenBank に登録された猫 (GenBank accession No. AF466749, AF466750 および AF466751) (Levy *et al.*, 2003)、牛 (AF339736) (Walker *et al.*, 2003) および豚 (U85966) (Felleisen, 1997) の *T. suis* 分離株の ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子の塩基配列と比較した。さらに、*P. hominis* の ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子の塩基配列 (U86616) (Felleisen, 1997) とも比較した。

表 11. サイクルシーケンス反応液組成

試薬	容量(μl)	終濃度
BigDye <sup>®</sup> Terminator Ready Reaction Mix	0.5	
5 x Buffer	3.5	1 x
T7 or SP6 primer (1mM)	2	0.2 mM
Template	200 ng	200 ng
DDW	Up to 20 μl	
計	20	

表 12. サイクルシーケンス反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
前反応	96°C	1 分	
熱変性	96°C	10 秒	} 25 サイクル
アニーリング	50°C	5 秒	
伸長反応	60°C	4 分	
	4°C		

## 結 果

### 1. 疫学調査の結果

#### 1-1. 調査 I: 北海道札幌市 A 動物病院

糞便由来 DNA を用いた nested PCR 法の結果、49 検体中 2 検体(4 %)が陽性だった(表 13)。

#### 1-2. 調査 II: 北海道札幌市 B 動物病院

改良Trichomonas Medium<sup>®</sup>による培養法の結果、40検体中2検体(5 %)が陽性だった(表14)。

この2検体を含む3検体は200 mgの糞便由来DNAを用いたnested PCR法でも陽性だった。ギムザ染色した培養陽性検体の塗抹標本を観察したところ、3本の前鞭毛および1本の後鞭毛、波動膜と軸索を有する *T. suis* の特徴が認められた(図10)。

#### 1-3. 調査 III: 埼玉県鴻巣市 C 動物病院

糞便培養後の沈渣由来DNAを用いたnested PCR法の結果、58検体中8検体(13 %)が陽性だった(表15)。このうちInPouch<sup>™</sup> TF Felineによる培養法で陽性だったのは、1検体のみであった。この培養陽性検体の約50 mgの糞便由来DNAを用いたnested PCR法を行った結果は、陰性であった。ギムザ染色した培養陽性検体の塗抹標本を観察したところ、3本の前鞭毛および1本の後鞭毛、波動膜と軸索を有する *T. suis* の特徴が認められた。

表 13. 【調査 I】北海道札幌市 A 動物病院の *Tritrichomonas suis* 検査結果(F1~F49)

一連番号	PCR法(糞便DNA)
F1	-
F2	-
F3	-
F4	-
F5	-
F6	-
F7	-
F8	-
F9	-
F10	+
F11	-
F12	-
F13	-
F14	-
F15	-
F16	-
F17	-
F18	-
F19	-
F20	-
F21	-
F22	-
F23	-
F24	-
F25	-
F26	-
F27	-
F28	-
F29	-
F30	-
F31	-
F32	-
F33	-
F34	-
F35	-
F36	-
F37	-
F38	-
F39	-
F40	-
F41	+
F42	-
F43	-
F44	-
F45	-
F46	-
F47	-
F48	-
F49	-
計	2/49

表 14. 【調査 II】北海道札幌市 B 動物病院の *Tritrichomonas suis* 検査結果 (F50~F89)

一連番号	培養法 (Trichomonas medium®)	PCR法 (糞便DNA)
F50	+	+
F51	-	NE
F52	-	NE
F53	-	NE
F54	-	NE
F55	-	NE
F56	-	NE
F57	-	NE
F58	-	NE
F59	+	+
F60	-	-
F61	-	-
F62	-	-
F63	-	NE
F64	-	NE
F65	-	NE
F66	-	-
F67	-	-
F68	-	NE
F69	-	NE
F70	-	NE
F71	-	NE
F72	-	NE
F73	-	NE
F74	-	NE
F75	-	NE
F76	-	NE
F77	-	NE
F78	-	NE
F79	-	NE
F80	-	NE
F81	-	NE
F82	-	-
F83	-	NE
F84	-	NE
F85	-	NE
F86	-	NE
F87	-	-
F88	-	-
F89	-	+
計	2/40	3/11

NE: not examined

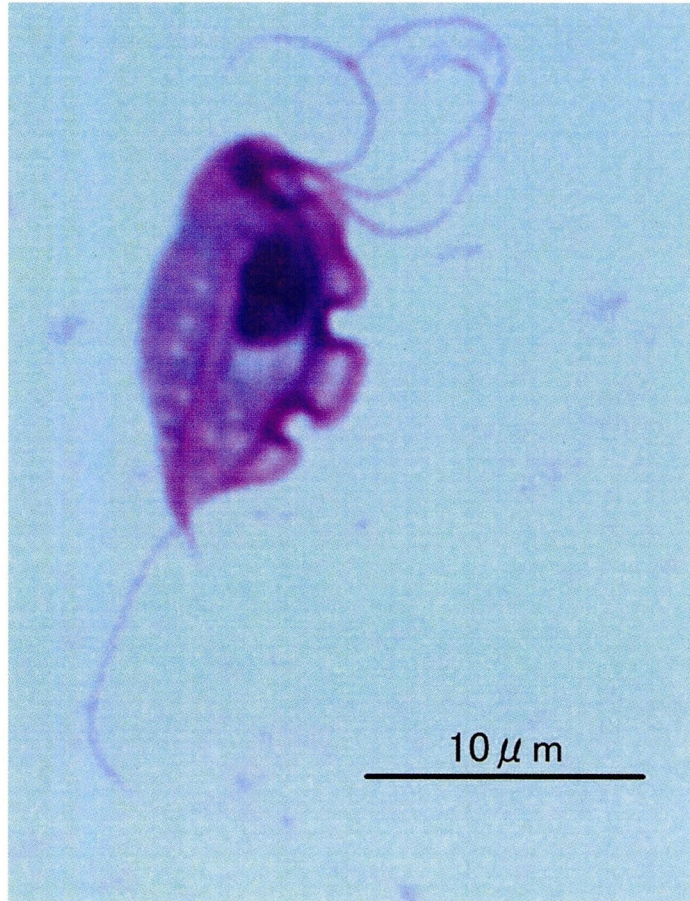


図 10. 培養分離された *Tritrichomonas suis* 虫体(ギムザ染色)

3 本の前鞭毛、1 本の後鞭毛、波動膜および 軸索が認められた

表 15. 【調査 III】 埼玉県鴻巣市 C 動物病院の *Tritrichomonas suis* 検査結果 (F90~F147)

一連番号	培養法 (InPouch™ TF Feline)	PCR法		直接法
		培養後沈渣DNA	糞便DNA	
F90	-	+	NE	NE
F91	-	+	NE	NE
F92	-	+	NE	NE
F93	-	-	-	-
F94	-	-	-	-
F95	-	-	-	-
F96	-	-	NE	-
F97	-	-	NE	NE
F98	-	-	NE	NE
F99	-	-	-	NE
F100	-	-	-	-
F101	-	-	NE	NE
F102	-	-	-	-
F103	-	-	-	-
F104	-	-	-	-
F105	-	+	-	-
F106	-	-	-	-
F107	-	-	-	-
F108	-	-	NE	-
F109	-	-	-	-
F110	-	-	NE	-
F111	-	-	NE	-
F112	-	-	NE	-
F113	-	-	NE	NE
F114	-	-	NE	-
F115	-	-	-	-
F116	-	-	NE	-
F117	-	-	-	-
F118	-	-	-	-
F119	-	-	NE	NE
F120	-	-	-	NE
F121	-	+	NE	-
F122	-	-	NE	-
F123	-	-	NE	-
F124	-	-	NE	-
F125	-	-	NE	-
F126	-	-	NE	-
F127	-	-	NE	-
F128	-	-	NE	NE
F129	-	+	NE	NE
F130	-	-	-	NE
F131	-	-	NE	-
F132	-	-	NE	-
F133	-	-	-	-
F134	-	-	NE	-
F135	-	-	NE	-
F136	-	-	NE	-
F137	-	-	NE	-
F138	-	-	NE	-
F139	-	-	NE	-
F140	-	-	NE	NE
F141	-	-	NE	-
F142	-	-	NE	NE
F143	-	-	NE	NE
F144	+	+	-	+
F145	-	+	NE	-
F146	-	-	NE	-
F147	-	-	NE	NE
計	1/58	8/58	0/16	1/40

NE: not examined

## 2. 猫の *T. suis* 感染状況(前述 1-1 から 1-3 のまとめ)

培養法もしくはnested PCR法の結果、147検体中13検体(8.8 %)が *T. suis* 陽性であった(表16)。 *T. suis* 陽性13検体中5検体が慢性下痢を呈しており、慢性下痢発症と *T. suis* 感染に統計学的に有意な相関が認められた ( $P= 0.0035$ , Fisher's exact test)。さらに、このうち4頭の猫において、数週齢もしくは数ヶ月齢の幼若期から慢性下痢の発症が認められていた(表17)。

*T. suis* 陽性猫は1ヶ月齢~9才齢と幅広い年齢層にわたっていた。純血種(36検体中7検体)の方が雑種(92検体中7検体)よりも *T. suis* 感染率が高い傾向が認められたが、有意差は認められなかった。*T. suis* 感染と年齢および飼育場所の相関は認められなかった(表18)。

## 3. アライメント解析

アライメント解析のための DNA 抽出は、*T. suis* 陽性全 13 検体で成功し、208 bp の PCR 産物の塩基配列が解読された。得られた塩基配列は、GenBank に登録された猫(AF466749, AF466750 および AF447651)、牛(AF339736)および豚(U85966)の *T. suis* 分離株の ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子と 98~100 %の相同性を示した。さらに、*P. hominis*(U86616)の ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子とは 63~64 %と低い相同性を示した。塩基配列とそのアライメント解析については、第 IV 章において、ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域のアライメント解析として記載する。



表 16. 培養法および nested PCR 法の陽性率\*

	調査地	培養法陽性数	PCR 法陽性数	計
調査 I	北海道 札幌市	NE	2/49	2/49
調査 II	北海道 札幌市	3/40	3/11	3/40
調査 III	埼玉県 鴻巣市	1/58	8/58	8/58
計		4/98	13/118	13/147

\* *Tritrichomonas suis* 陽性数/検体数

NE: not examined

表 17. *Tritrichomonas suis* 陽性猫の検体情報まとめ

	検体番号	年齢	品種	飼育場所	慢性下痢の有無(発症時期)
調査 I	F10	6ヶ月	アビシニアン	室内	無
	F41	4才	雑種	室内	無
調査 II	F50	2才	アビシニアン	室内	有 (9ヶ月令より)
	F59	9才	スコティッシュフォールド	室内	有 (数ヶ月令より)
	F89	不明(成猫)	雑種	室内	有(不明)
調査 III	F90	7才5ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	無
	F91	6ヶ月	雑種	時々室外	無
	F92	6ヶ月	雑種	室外	無
	F105	2才4ヶ月	スコティッシュフォールド	室内	無
	F121	2ヶ月	アメリカンショートヘア	室内	無
	F129	1才4ヶ月	雑種	室内	無
	F144	1ヶ月	アビシニアン	室内	有(数週令より)
	F145	1才	雑種	時々室外	有(数ヶ月令より)

表 18. *Tritrichomonas suis* 陽性猫および陰性猫の比較

	<i>T. suis</i> 陽性猫	<i>T. suis</i> 陰性猫
慢性下痢の有無*		
有	5	10
無	8	124
飼育場所		
室内	10	99
時々室外	3	23
室外	0	12
品種		
雑種	6	92
純血種	7	36
アビシニアン	3	5
アメリカンショートヘア	2	8
キジトラ	0	1
スコティッシュフォールド	2	8
ソマリ	0	2
茶トラ	0	3
チンチラ	0	1
日本猫	0	1
ペルシャ	0	1
マンチカン	0	1
メインクーン	0	1
ラグドール	0	1
ロシアンブルー	0	3
不明	0	6

\*慢性下痢の発症と *T. suis* 感染には有意な相関が認められた ( $P= 0.0035$ , Fisher's exact test)

## 考 察

### 1. 国内の猫より *T. suis* 感染を初報告

国内の猫に初めて *T. suis* 感染を確認した。また本調査によって、*T. suis* 感染例が北海道および埼玉県でも発見されたことから、猫の *T. suis* 感染症が日本に蔓延している可能性が示唆された。これまで、国内の猫の下痢の原因病原体としてトリコモナス症が報告されていなかった。この理由として、猫の下痢より検出されたトリコモナス原虫が、非病原性のトリコモナス原虫として知られている *P. hominis* だと誤診されていた可能性が高い。この理由として、国内の犬および猫において一般的に *P. hominis* 感染が知られていたことが挙げられる(山本ら、2009)。前鞭毛の数は *T. suis* において3本であり *P. hominis* では5本であることから、光学顕微鏡下で鑑別できるが、サイズや形状、動きが類似している。そのため、*T. suis* を *P. hominis* と誤同定し、トリコモナス原虫を伴う下痢はトリコモナス原虫以外の病因としてきたと推察される。

### 2. *T. suis* の検査法について

*T. suis* の診断法は(1)直接法、(2)糞便の培養法(例: Trichomonas Medium<sup>®</sup>や InPouch<sup>™</sup> TF Feline)、(3)糞便由来 DNA に対する *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法(Gookin *et al.*, 2002)の3つが報告されてきた。今回はさらに、糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法の有効性が示された。

Gookin *et al.*(2004)の、直接法の *T. suis* 検出感度は14%と低いという報告を参考に、本研究では新鮮便については直接法ではなく培養法を *T. suis* 検査法として選んだ。さらに凍結保存糞便については、糞便から抽出した DNA を用いた nested PCR 法も *T. suis* 検査法として選んだ。

### 3. 糞便培養後の沈渣由来 DNA の PCR 法の有効性

調査 III で 58 検体中、糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法では 8 検体が陽性だ

った。一方、直接法および培養法では1検体のみが陽性だった。この理由として、2日間の輸送中にトリコモナスが死滅した可能性が考えられる。また、1例のみであるが、約50 mgの糞便由来DNAを用いた nested PCR 法では陰性だったのに対し、糞便培養後の沈渣由来DNAを用いた nested PCR 法では陽性であった(表 15)。このことから、糞便培養後の沈渣由来DNAに対する nested PCR 法は、培養法および糞便由来DNAを用いた nested PCR 法の偽陰性を補完する点で有効であると考えられる。

#### 4. 猫の慢性下痢と *T.suis* 感染の関係

本調査において、*T.suis* 陽性猫13頭中5頭の猫が、間欠的に血や粘液を伴う慢性下痢を呈していた。*T. suis* と慢性下痢には有意な相関が認められたことから( $P= 0.0035$ , Fisher's exact test)、*T. suis* は国内の猫においても下痢の原因病原体となることが示唆された。Gookin *et al.* (2001)は、*T. suis* がコッホの3原則を満たす下痢の病原体であることを確認している。さらに、Yaeger and Gookin (2005)は3カ月以上の慢性下痢を呈した *T. suis* 自然感染猫7頭の腸管の組織標本観察において、全頭で中程度～重度の炎症が認められ、さらに7頭中2頭で *T. suis* の粘膜固有層への侵入を観察している。しかしながら、*T. suis* の粘膜固有層への侵入の機序および慢性下痢を引き起こす機序は不明である。なお、*T. suis* が単体で慢性下痢を引き起こすのか、それとも幼猫の免疫能が関係して慢性下痢が起きているのかは明らかになっていない(Stockdale *et al.*, 2009)。今後、*T. suis* による猫の慢性下痢症の病態を明らかにする必要がある。

#### 5. 猫の品種と *T. suis* 感染の関係

本調査により、純血種および雑種の両方に *T. suis* 感染が認められた。この結果は、国外の報告と同様であった(Gunn-Moore *et al.*, 2007. Stockdale *et al.*, 2009)。この結果から、猫の *T. suis* 感染症は品種に関係なく感染、発症する疾患であることが日本でも確認された。感染リスク要因として個体の飼育密度があげられており(Gookin *et al.*, 2004)、例えば、多頭飼育されることが多い純血種の

方が高い感染リスクをもつと考えられる。本調査でも、純血種36検体中7検体、雑種93検体6検体が *T. suis* 陽性であり、純血種の *T. suis* の感染率がやや高い傾向が認められた。

## 6. 多頭飼育施設の猫における *T. suis* 調査の必要性

本調査結果は、臨床現場において、猫の下痢症の原因として *T. suis* 感染も念頭に置く必要性を示した。現在、*T. suis* の有効な薬剤は5-ニトロイミダゾール製剤であるロニダゾールのみであり、一般的な抗原虫薬であるメロニダゾールは無効とされている(Gookin *et al.*, 2006)。しかしながら、ロニダゾール投薬後も、下痢が再発する例も報告されている(Gookin *et al.*, 2006)。このことから、*T. suis* 感染予防が重要と考えられる。

*T. suis* は糞口感染で伝播されると予想されており、グルーミングが主要な感染経路とされていることから、飼育密度がもっとも高い感染要因だとされている(Gookin *et al.*, 2004)。本研究において、*T. suis* に感染し慢性下痢を呈した猫の5頭中4頭が幼若齢より下痢を発症していることから、母猫のグルーミングにより幼若齢時に感染が生じると考えられる。さらに純血種の *T. suis* の感染率がやや高い傾向認められたことから、多頭飼育時に感染が起きている可能性も高い。また、不顕性感染の猫も存在することが明らかとなったことから、これらの猫が感染源となり得ることが予想される。

以上から、今後は、猫の多頭飼育施設を中心とした疫学調査を実施し、国内の猫における *T. suis* 感染経路を明らかにすると共に、予防策を講じる必要があると考えられる。

## 7. 猫、牛および豚の *T. suis* の関係

国内の *T. suis* 感染による牛の膣トリコモナス症は40年間以上発生がないが(動物衛生研究所ホームページ、家畜の監視伝染病 [http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease\\_fact/kansi.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/kansi.html))、本研究によって、猫において *T. suis* が広く分布していることが示唆された。過去に行われた猫と牛の交差感染実験により、猫より分離した株を未經産牛の膣内に感染させると膣に定着し *T. suis* の寄生は持続するが、病原性が低いことが明らかとなっている(Stockdale *et al.*, 2007)。反対に、牛

から分離した *T. suis* を胃カテーテルによって経口感染させた猫では、5頭中2頭のみで腸管内に原虫が定着し、特に病原性は示さないとされている(Stockdale *et al.*, 2008)。さらに、Šlapeta *et al.* (2010)は、猫と牛の *T. suis* 分離株についてTR7/TR8プライマーによるリピート配列を比較したところ、猫と牛・豚の2つの遺伝子型に分かれたと報告し、病原性の違いと遺伝子の違いから、猫の *T. suis* と牛の *T. suis* が遺伝的に離れているものではないかと考察している。

近年、国内の牛でのトリコモナス症の発生がないという事実と併せて考えると、本研究で明らかになった国内の猫の *T. suis* は猫の間のみで流行していると推察される。また、国内の豚のトリコモナス調査は間接蛍光抗体法による血清疫学調査に限られており(Kitano *et al.*, 1991)、遺伝子については調査されていない。このことから、国内の猫で流行している *T. suis* 株は豚から由来している可能性も考えられる。今後は、国内の猫および豚の *T. suis* のさらなる様々な遺伝子の比較や実験感染が必要である。

## 小 括

国内における猫の *T. suis* 感染状況を明らかにするため、北海道札幌市(89 検体)および埼玉県鴻巣市(58 検体)の動物病院から猫糞便検体を集め、培養法または糞便由来 DNA もしくは糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法に供した。その結果、nested PCR 法により、147 検体中 13 検体(8.8 %)が陽性を示し、これら全 13 検体の塩基配列解析では *T. suis* の ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子と 98~100 %一致し、さらに分離されたトリコモナス虫体が *T. suis* の形態学的特徴を有することを確認した。*T. suis* の感染は北海道札幌市、埼玉県鴻巣市の両方に認められ、猫の純血種および雑種、年齢に関わらず感染していることが示された。さらに、慢性下痢と *T. suis* の感染に有意な相関性が認められたことから、国内の猫の下痢症の一要因として *T. suis* も念頭に置くべきことが示唆された。



### 第 III 章 日本の豚における *T. suis* 感染状況調査

## 序

諸言で述べた通り、*T. suis* は1843年に豚の鼻腔および消化管に寄生する寄生虫として記載され、その後、1928年に牛においては流産・不妊症、2003年に猫の難治性慢性下痢症をもたらす病原体として同定されてきた寄生虫である(Gruby and Delafond, 1843; Davaine, 1875; Switzer, 1951; Levine, 1985; Levy *et al.*, 2003; Rae and Crews, 2006)。

第 II 章では、国内の猫において *T. suis* が存在し、感染率が少なくないことを示した。一方、わが国の豚のトリコモナスについては、Kitano *et al.* (1991) によって、間接蛍光抗体法による血清疫学調査と走査型電子顕微鏡による形態学的観察により、*T. suis* 流行の報告がされている。しかし、上記の調査で用いられた間接蛍光抗体法の *T. suis* の血清学的検査法としての特異性・感度については全く不明であり、これらの結果だけでは *T. suis* と確認できない。また、走査型電子顕微鏡による観察では、トリコモナス原虫であることは同定できるが、*T. suis* とは結論できない。さらに、豚のトリコモナス原虫として、*Tetratrichomonas buttrei*、*Trichomitus rotunda* や *Hypotrichomonadidae* gen. sp. など、多種存在することが報告されており(Hibler *et al.*, 1960; Rivera *et al.*, 2008; Mostegl *et al.*, 2012)、Kitano *et al.* (1991) の調査においてはこれらの可能性を除外できない。また、遺伝子検査を含めた豚の *T. suis* の感染状況調査は、日本のみならず海外においても未だなされていない。そこで、本調査では *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR法を用いて、豚の *T. suis* の分子疫学調査を実施した。

## 材 料 お よ び 方 法

### 1. 検体および検査法

西日本の豚34検体および鳥取県内の豚30検体、合計64検体の豚糞便由来DNAもしくは豚の新鮮便を用いて調査した(表19)。

#### 1-1. 西日本(2府5県)の豚糞便由来 DNA

34検体は西日本の2府5県から大阪の食肉衛生検査所に搬入された豚の直腸便で、2002年もしくは2008年に採材された。30検体は4~7ヶ月齢の肥育豚で、残り4検体の年齢は不明である。検体のデータは表20に示した。この糞便由来DNAの34検体は、阿部仁一郎先生(大阪市立環境科学研究所)から分与されたものである(Abe *et al.*, 2009, 2010)。すなわち、糞便内夾雑物をParasep<sup>®</sup>(Diasys, Berkshire, England)で取り除いた後、沈渣から、QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit(Qiagen)を用いて抽出したDNAである。これらの糞便由来DNAはPCR法に供するまで-30℃で保存した。

#### 1-2. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便

30検体は鳥取県内の某養豚場で2012年に採材した糞便材料である。検体情報は表21に示した。このうち22検体は4ヶ月齢未満の幼豚で、8検体が4ヶ月以上の肥育豚である。豚の消化管内寄生虫相を調査するために、採材を行った当日に、全30検体について、直接法、蔗糖遠心浮遊法、改良 Trichomonas Medium<sup>®</sup>を用いた *T. suis* 培養法を実施した。さらに、DNA抽出用に寄生虫を集めるため糞便の蔗糖遠心浮遊法を実施した。後日、DNA抽出およびnested PCR法を実施した。

##### 1-2-1. 直接法

糞便 0.1 g を 1ml の 0.85 % 生理食塩水に溶かし、そのうち約 10  $\mu$ l を光学顕微鏡(BH-2)で100倍および400倍で観察した。

表 19. 西日本(2府5県)の豚 64 検体の飼育地域および検体採集年

飼育ステージ	飼育地域(県)	検体採集年(年)	検体数
不明	岐阜	2002	4
幼豚	鳥取	2012	22
肥育	三重	2008	5
肥育	京都	2008	5
肥育	大阪	2008	5
肥育	兵庫	2008	5
肥育	岡山	2008	5
肥育	鳥取	2008	5
肥育	鳥取	2012	8
計			64

表 20. 西日本(2府5県)の豚の糞便由来 DNA の検体情報

一連番号	検体番号	飼育地域(県)	検体採材年(年)
S01	pig_Gifu_01	岐阜	2002
S02	pig_Gifu_02	岐阜	2002
S03	pig_Gifu_03	岐阜	2002
S04	pig_Gifu_04	岐阜	2002
S05	pig_Tottori_01	鳥取	2008
S06	pig_Tottori_02	鳥取	2008
S07	pig_Tottori_03	鳥取	2008
S08	pig_Tottori_04	鳥取	2008
S09	pig_Tottori_05	鳥取	2008
S10	pig_Kyoto_01	京都	2008
S11	pig_Kyoto_02	京都	2008
S12	pig_Kyoto_03	京都	2008
S13	pig_Kyoto_04	京都	2008
S14	pig_Ookayama_01	岡山	2008
S15	pig_Ookayama_02	岡山	2008
S16	pig_Hyogo_01	兵庫	2008
S17	pig_Hyogo_02	兵庫	2008
S18	pig_Osaka_01	大阪	2008
S19	pig_Osaka_02	大阪	2008
S20	pig_Mie_01	三重	2008
S21	pig_Mie_02	三重	2008
S22	pig_Kyoto_05	京都	2008
S23	pig_Ookayama_03	岡山	2008
S24	pig_Ookayama_04	岡山	2008
S25	pig_Ookayama_05	岡山	2008
S26	pig_Hyogo_03	兵庫	2008
S27	pig_Hyogo_04	兵庫	2008
S28	pig_Hyogo_05	兵庫	2008
S29	pig_Osaka_03	大阪	2008
S30	pig_Osaka_04	大阪	2008
S31	pig_Osaka_05	大阪	2008
S32	pig_Mie_03	三重	2008
S33	pig_Mie_04	三重	2008
S34	pig_Mie_05	三重	2008

表 22. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便の検体情報(2012 年採材)

一連番号	検体番号	飼育ステージ (頭数)	飼育形態	糞便性状
S35	pig_Tottori_06	幼豚	ストール飼育	灰・軟
S36	pig_Tottori_07	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S37	pig_Tottori_08	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S38	pig_Tottori_09	幼豚	ストール飼育	茶・水溶性下痢
S39	pig_Tottori_10	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S40	pig_Tottori_11	幼豚	ストール飼育	灰・水溶性下痢
S41	pig_Tottori_12	幼豚	ストール飼育	茶・軟
S42	pig_Tottori_13	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S43	pig_Tottori_14	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S44	pig_Tottori_15	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S45	pig_Tottori_16	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S46	pig_Tottori_17	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S47	pig_Tottori_18	幼豚	ストール飼育	灰・下痢
S48	pig_Tottori_19	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S49	pig_Tottori_20	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S50	pig_Tottori_21	幼豚	ストール飼育	黒・下痢(古い便も混入)
S51	pig_Tottori_22	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S52	pig_Tottori_23	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S53	pig_Tottori_24	幼豚	ストール飼育	茶・下痢
S54	pig_Tottori_25	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S55	pig_Tottori_26	幼豚	ストール飼育	茶・正常
S56	pig_Tottori_27	幼豚	ストール飼育	下痢
S57	pig_Tottori_28	肥育	オガクズ発酵床	茶・軟
S58	pig_Tottori_29	肥育	オガクズ発酵床	茶・正常
S59	pig_Tottori_30	肥育	オガクズ発酵床	茶・下痢
S60	pig_Tottori_31	肥育	オガクズ発酵床	茶・正常(1頭)
S61	pig_Tottori_32	肥育	オガクズ発酵床	茶・正常(1頭)
S62	pig_Tottori_33	肥育	オガクズ発酵床	茶・正常
S63	pig_Tottori_34	肥育	オガクズ発酵床	茶・正常
S64	pig_Tottori_35	肥育	オガクズ発酵床	新しい

### 1-2-2. 蔗糖遠心浮遊法

豚の消化管内寄生虫を検査するために、蔗糖遠心浮遊法を以下の通りに実施した。すなわち、各糞便 10 g を 20 ml の 0.85 % 生理食塩水に溶解し、この糞便液を 80 メッシュで濾過後、15 ml のチューブに移し、700 xg、10 分、室温で遠心した。沈渣に対し、蔗糖液(比重: 1.2)をチューブの 9 分目まで加えてよく混和し、700 xg、10 分、室温で遠心した。遠心後、さらに管口すれすれまでに蔗糖液を入れ、この管口に 18 x 18 mm のカバーガラスをかけて、1 時間放置後、カバーガラスに付着した寄生虫を光学顕微鏡(BH-2)で 100 倍および 400 倍で観察した。その後、カバーガラスを取った後のチューブに、さらに管口すれすれまでに再度蔗糖液を入れ、18 x 18 mm のカバーガラスをかけて一晩放置し、カバーガラスに付着した寄生虫を光学顕微鏡(BH-2)で 100 倍および 400 倍で観察した。

### 1-2-3. 改良 Trichomonas Medium<sup>®</sup>を用いた *T. suis* 培養法

全 30 検体は改良 Trichomonas Medium<sup>®</sup>による培養法に供した。改良 Trichomonas Medium<sup>®</sup>の調整および使用手順は第 I 章の材料および方法の 1-2 に示した通りに行った。0.1 g の糞便を 1 ml の滅菌生理食塩水に溶かし、300  $\mu$ l を 10ml の改良 Trichomonas Medium<sup>®</sup>が入ったチューブに添加した。観察は第 I 章の材料および方法の 1-2-1 に準じて行った。

### 1-2-4. ギムザ染色法

トリコモナス虫体観察のため、培養陽性検体の塗抹標本を作製し、ギムザ染色を行った。方法は第 II 章の材料および方法の 2 に準じて行った。

### 1-2-5. 豚糞便からの DNA 抽出法

糞便から寄生虫を集めるために、以下の通り、蔗糖遠心浮遊法を実施した。すなわち、各糞便 10 g を 20 ml の 0.85 % 生理食塩水に溶解し、この糞便液を 80 メッシュで濾過後、15 ml のチューブに移し、700 xg、10 分、室温で遠心した。沈渣に対し、蔗糖液(比重: 1.2)をチューブの 9 分目まで入れてよく

混和し、700 xg、10 分、室温で遠心した。遠心後すぐに、トリコモナス虫体が含まれると予想される、蔗糖液表面から 1 ml を吸い取り、15 ml チューブに移した。この上清を 0.85 % 生理食塩水で 2 回洗浄した後、沈渣を-30℃で保存した。この沈渣からの DNA 抽出および精製には、QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用い、添付の説明書に従って行った。抽出した DNA は-30℃で保存した。

## 2. *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法

nested PCR 法およびアガロースゲル電気泳動法によるバンドの確認は第 I 章の材料および方法の 3-2-1・3・4 に記載した。サーマルサイクラーは MiniCycler™ (PTC-150, MJ Research Inc., Massachusetts, USA) を用いた。

## 3. ダイレクトシーケンス法による塩基配列解読

塩基配列解読には、*T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法で陽性だった検体に対し、1<sup>st</sup>プライマーである TFR4 および TFR3 (Felleisen *et al.*, 1998) で増幅した PCR 産物を用いた。TFR4/3プライマーを用いた PCR 法の組成液および反応条件は表 22、23 に示した。

2 % アガロースゲル電気泳動で予想サイズである約 348 bp に 1 本のバンドが確認された PCR 産物から、Wizard® SV Gel and a PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) を用いて、添付された説明書に従って DNA を精製した。

DTCS Quick Start Kit (Eckman Coulter, California, USA) を用いて MiniCycler™ (PTC-150) でサイクルシーケンスを行った。サイクルシーケンスの反応液、反応条件は表 24、25 に示した。反応終了後の反応液全量 20 µl に対し、以下の手順で、エタノール/EDTA/酢酸ナトリウムを用いた精製を行った。すなわち、反応終了後の反応液全量 20 µl を、100 mM EDTA 2 µl、3 M 酢酸ナトリウム 2 µl および 20 mg/µl グリコーゲン 1 µl の入った 1.5 ml チューブに移し、混和した。99.5 % エタノール (試薬特級、和光純薬) を 60 µl を加え、チューブを 10 回転倒混和し、18,000 xg、15 分間、4℃で遠心した。上清を取り除いた後、70 % エタノール (試薬特級、和光純薬) を 200 µl 加え、18,000



表 22. TFR4/3 プライマーを用いた PCR 法の組成液

試薬	容量(μl)	終濃度
HotStarTaq <sup>®</sup> Master Mix	10	2.5 unit HotStarTaq DNA polymerase, 1 x PCR Buffer(1.5 mM MgCl <sub>2</sub> を含む), 200 μM of each dNTP
TFR4 および TFR3 (各 5μM)	2	0.5 μM
DDW	5	
Template DNA	1	
計	20	

表 23. TFR4/3 プライマーを用いた PCR 法の反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
前反応	95°C	15 分	} 40 サイクル
熱変性	95°C	30 秒	
アニーリング	57°C	30 秒	
伸長反応	72°C	1 分	
終反応	72°C	10 分	
	4°C		

表 24. サイクルシーケンス反応液組成

試薬	容量(μl)	終濃度
DTCS® Master Mix	8	
TFR4 または TFR3 (1.6 μM)	2	3.2 μM
Template (1.5 ng/μl)	10	50 fmol
計	20	

表 25. サイクルシーケンス反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
熱変性	96℃	20 秒	} 40 サイクル
アニーリング	50℃	20 秒	
伸長反応	60℃	4 分	
	4℃		

xg、2 分間、4℃で遠心した。再度、上清を取り除いた後、70 % エタノール(試薬特級、和光純薬)を 200 µl 加え、18,000 xg、2 分間、4℃で遠心した。上清を取り除き、蓋を開けて沈渣を 15 分間風乾した。これに、Sample Loading Solution(Beckman Coulter)を 40 µl 加えて室温で 10 分間放置した後、十分に混和した。その後、CEQ™ 8000 sequencer(Beckman Coulter)を用い、塩基配列解読を行った。

#### 4. アライメント解析

塩基配列の解析は BioEdit(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)を用いて行った。今回得られた配列は GenBank に登録された猫(AF466749, AF466750 および AF466751) (Levy *et al.*, 2003)、牛(M81842 および AF339736) (Chakrabarti *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2003) および豚(AY349190 および U85966) (Felleisen, 1997; Kleina *et al.*, 2004)の *T. suis* 分離株の ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域(348 bp)と比較した。

## 結 果

### 1. 西日本(2府5県)の豚糞便由来 DNA の nested PCR 法

2002年および2008年に採材した西日本(2府5県)の豚糞便由来DNA34検体中、27検体(79%)が *T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法で陽性を示した(表26)。陽性検体は調査した西日本(2府5県)のいずれの府県でも認められ、内訳は、岐阜県4検体中1検体、三重県5検体中5検体、京都府5検体中4検体、大阪府5検体中4検体、兵庫県5検体中4検体、岡山県5検体中4検体、鳥取県5検体中5検体が陽性であった。

### 2. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便の検査

2012年に鳥取県内の某養豚場で採材した、糞便30検体中9検体(30%)が、*T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法で陽性を示した(表27)。この9検体のうち2検体(pig\_Tottori\_27および31)が培養法でも陽性であった。このnested PCR法および培養法の2法で陽性を示した2検体をギムザ染色した培養陽性検体の塗抹標本を観察したところ、3本の前鞭毛および1本の後鞭毛、波動膜と軸索を有する *T. suis* の特徴が認められた(図11)。

直接法では6検体からトリコモナス様虫体が観察され、このうち3検体がnested PCR法で陰性を示し、また5検体は培養法で陰性を示した。その他、直接法では *Balantidium* sp. の栄養体もしくは嚢子およびコクシジウムのオーシスト、蔗糖遠心浮遊法ではコクシジウムのオーシストおよび *Strongyloides ransomi* の虫卵が検出された(図12~14)。

表26. 西日本(2府5県)の豚の糞便由来DNAのnested PCR法による調査結果

一連番号	飼育地域(県)	nested PCR 法
S01	岐阜	-
S02	岐阜	-
S03	岐阜	-
S04	岐阜	+
S05	鳥取	+
S06	鳥取	+
S07	鳥取	+
S08	鳥取	+
S09	鳥取	+
S10	京都	+
S11	京都	-
S12	京都	+
S13	京都	+
S14	岡山	+
S15	岡山	+
S16	兵庫	+
S17	兵庫	-
S18	大阪	+
S19	大阪	+
S20	三重	+
S21	三重	+
S22	京都	+
S23	岡山	+
S24	岡山	-
S25	岡山	+
S26	兵庫	+
S27	兵庫	+
S28	兵庫	+
S29	大阪	-
S30	大阪	+
S31	大阪	+
S32	三重	+
S33	三重	+
S34	三重	+
計		27/34

表28. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便の検査結果(S35-50)

一連番号	直接法	蔗糖液浮遊法	Trichomonas medium <sup>®</sup> 培養法	nested PCR 法
S35	-	-	-	-
S36	バランチジウム(栄養体・嚢子)	-	-	-
S37	バランチジウム(嚢子)	-	-	-
S38	トリコモナス様虫体 バランチジウム(栄養体・嚢子)	コクシジウム(スポロシスト未形成: 小型)	-	+
S39	バランチジウム(栄養体・嚢子)	-	-	-
S40	バランチジウム(栄養体)	-	-	+
S41	バランチジウム(栄養体)	コクシジウム(スポロシスト未形成: 小型)	-	+
S42	トリコモナス様虫体 バランチジウム(嚢子)	-	-	+
S43	バランチジウム(栄養体)	-	-	+
S44	-	-	-	-
S45	バランチジウム(嚢子)	-	-	+
S46	-	-	-	-
S47	バランチジウム(栄養体・嚢子)	Strongloides ransomi 虫卵	-	-
S48	トリコモナス様虫体 バランチジウム(嚢子)	-	-	-
S49	-	-	-	-
S50	トリコモナス様虫体 自由生活線虫(雄)	-	-	-

表 28. 鳥取県内の某養豚場の豚糞便の検査結果(S51-64)

一連番号	直接法	蔗糖遠心浮遊法	Trichomonas medium <sup>®</sup> 培養法	nested PCR 法	続き
S51	バランチジウム(嚢子)	-	-	-	
S52	-	-	-	-	
S53	-	-	-	-	
S54	-	-	-	-	
S55	バランチジウム(栄養体)	-	-	-	
S56	トリコモナス様虫体 バランチジウム(栄養体・嚢子)	コクシジウム(スポロシスト未形成: 小型)	+	+	
S57	トリコモナス様虫体 バランチジウム(栄養体)	-	-	-	
S58	-	-	-	-	
S59	コクシジウム ( <i>Eimeria</i> sp., スポロシスト未形成) バランチジウム(栄養体)	コクシジウム ( <i>Isospora suis</i> , <i>E. suis</i> スポロシスト未形成: 小~大型)	-	-	
S60	バランチジウム(嚢子)	-	-	+	
S61	-	-	-	-	
S62	コクシジウム(スポロシスト未形成)	コクシジウム(未: 小型~大型)	-	-	
S63	-	-	-	-	
S64	バランチジウム(嚢子)	コクシジウム ( <i>I. suis</i> , <i>E. suis</i> , スポロシスト未形成: 小型)	+	+	
計	トリコモナス様虫体陽性: 6/30 コクシジウム陽性: 2/30 バランチジウム陽性: 18/30	コクシジウム陽性: 6/30 <i>Strongiloides ransomi</i> 虫卵陽性: 1/30	2/30 (幼豚: 1/22、肥育: 1/8)	9/30 (幼豚: 7/22、肥育: 2/8)	

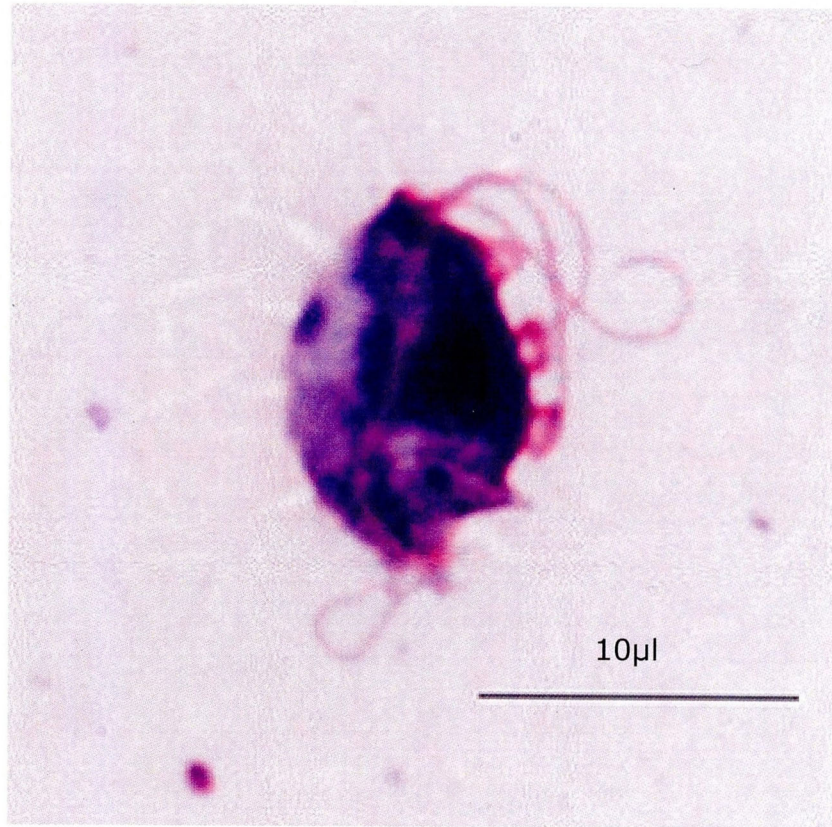


図 11. 培養分離された *Tritrichomonas suis* 虫体(ギムザ染色)  
3 本の前鞭毛、1 本の後鞭毛、波動膜および軸索が認められた





図 12. 直接法で検出された *Balantidium* sp. の嚢子  
表面には繊毛の縦列が認められる

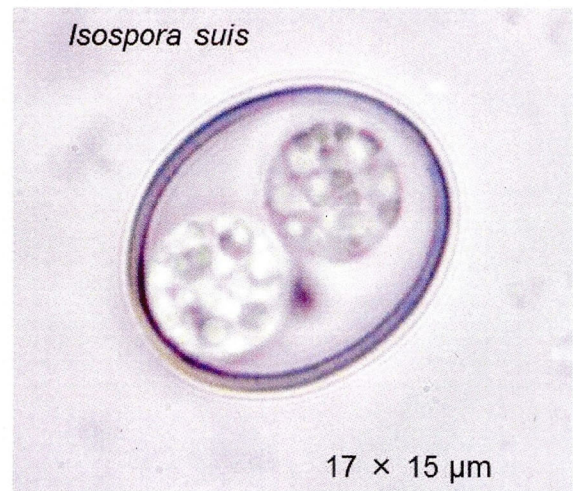
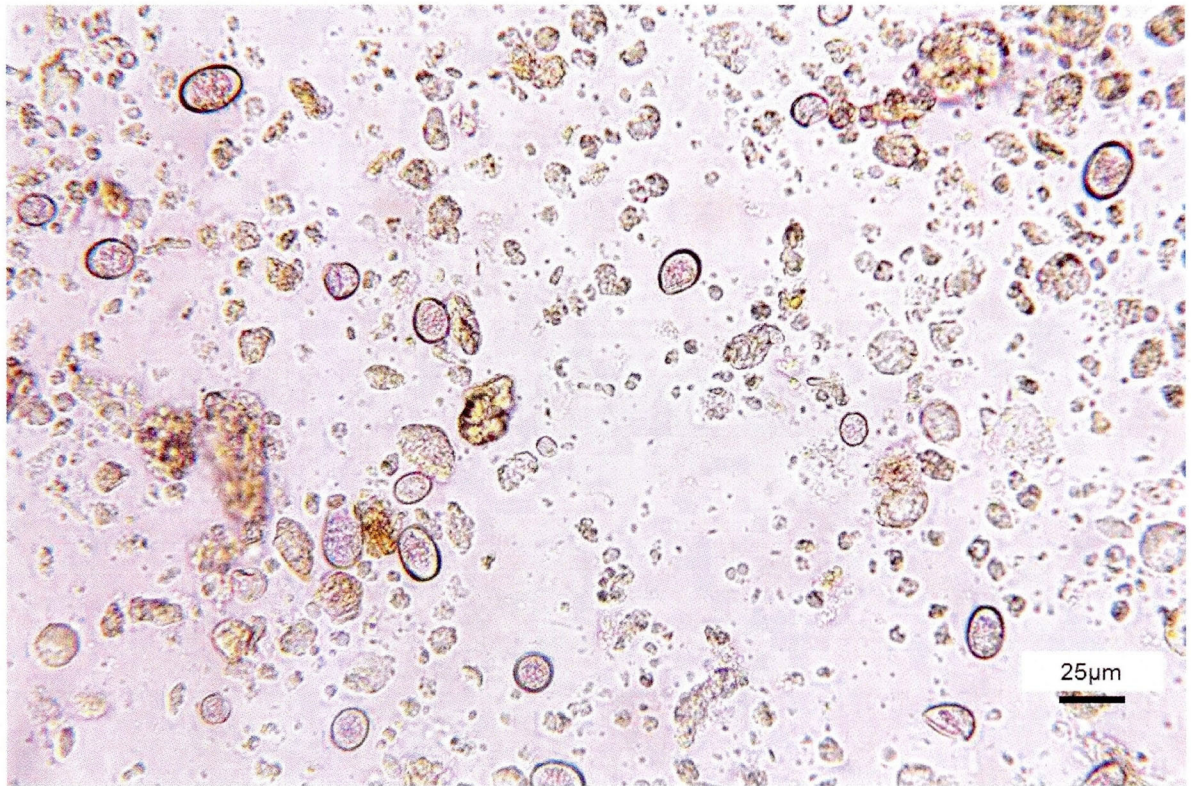


図 13. 蔗糖遠心浮遊法で検出されたコクシジウムのオーシスト



図 14. 蔗糖遠心浮遊法で検出された *Strongyloides ransomi* 虫卵

### 3. nested PCR法で陽性を示した豚検体のまとめ

全豚糞便由来DNA64検体中36検体(56 %)が *T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法で陽性を示した。陽性検体36検体中、7検体が幼豚、28検体が肥育豚、1検体が飼育ステージ不明であった(表28)。

### 4. アライメント解析

nested PCR法陽性の8検体を用いて、TFR4/3プライマーによるPCR法を行い、塩基配列を解読した。348 bpの塩基配列をアライメント解析したところ、得られた配列は、GenBankに登録された猫(AF466749, AF466750 およびAF447651)、牛(M81842およびAF339736)および豚(AY349190およびU85966)の *T. suis* 分離株のITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域と98~100 %の相同性を示し、*T. suis* であることが確認された。塩基配列とそのアライメント解析については、第 IV 章に記載した。

表 28. *Tritrichomonas suis* 陽性検体の情報

飼育地域 (県)	飼育ステージ	検体数	nested PCR 法 陽性検体数	ダイレクトシーケンス解析	
				供試検体数	検体番号
岐阜	不明	4	1	0	
鳥取	幼豚	22	7	3	pig_Tottori_09 pig_Tottori_13 pig_Tottori_27
三重	肥育豚	5	5	1	pig_Mie_05
京都	肥育豚	5	4	1	pig_Kyoto_05
大阪	肥育豚	5	4	1	pig_Osaka_04
兵庫	肥育豚	5	4	0	
岡山	肥育豚	5	4	1	pig Okayama_05
鳥取	肥育豚	5	5	0	
鳥取	肥育豚	8	2	1	pig_Tottori_35
計		64	36	8	

## 考 察

### 1. 分子生物学的手法を用いた豚における *T. suis* 感染状況の初の調査

前述したように、豚に寄生するトリコモナス原虫は *T. suis* だけでなく、*Tetratrichomonas buttreyi*、*Trichomitus rotunda* や Hypotrichomonadidae gen. sp. など多種存在することが、形態学的手法や ISH 法などを用いて、以前から数例報告されている(Hibler *et al.*, 1960; Rivera *et al.*, 2008; Mostegl *et al.*, 2012)。しかしながら、*T. suis* に関わらず、豚におけるトリコモナス原虫の感染状況は国内や海外においても未だ調査されていない。本研究は初めて豚における *T. suis* 感染状況を分子生物学的手法によって調査したものである。

### 2. 国内の豚における *T. suis* 感染状況

*T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法により、全64検体中36検体(56 %)と高い陽性率を示した。今回調査した西日本2府5県(岐阜県、三重県、京都府、大阪府、兵庫県、岡山県および鳥取県)の全ての県で陽性例が検出され、7検体が幼豚、28検体が肥育豚であったことから、豚の飼育地域や年齢に関わらず、*T. suis* 感染は国内、少なくとも西日本の豚に広く流行していることが示唆された。本種は世界に広く分布し、豚のトリコモナスとして普通種とされており(Levine, 1985)、アメリカでは60 %程度の感染率である(Levine, 1975)。

### 3. *T. suis* 以外のトリコモナス様原虫の存在を示唆

興味深いことに、直接法でトリコモナス様虫体が検出された6検体中5検体は培養法で陰性、3検体が *T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法でも陰性を示した。これらの結果は、国内の豚において、*T. suis* 以外のトリコモナス様原虫が存在することを示唆しているものと考えられる。今後は、国内の豚における *T. suis* 以外のトリコモナス様原虫について、形態学のおよび分子生物学的手法を用いて同定する必要がある。

#### 4. 豚と牛の *T. suis* の関係について

本研究において、日本において *T. suis* 感染は猫だけでなく豚にも広く分布していることが示唆された。

過去に行われた豚と牛の交差感染実験により、豚より分離された *T. suis* を未経産牛に経腔感染させると、牛分離株を感染させた場合と同等の臨床症状、膣炎および流産を呈することが確認されている (Fitzgerald *et al.*, 1958b)。さらに、牛より分離された *T. suis* 株を豚に経鼻感染させると、鼻腔、食道、胃、盲腸に定着することが確認されている (Fitzgerald *et al.*, 1958a)。分子生物学的手法においては、牛および豚の *T. suis* の 18S rRNA-ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2-28S rRNA 遺伝子領域の塩基配列に差が認められないだけでなく、RFLP法、RAPD法、さらに TR7/TR8 プライマーにより増幅されるリピート配列においても、差がないと報告されている (Felleisen, 1997; Tachezy *et al.*, 2002; Lun *et al.*, 2005)。また、ELISA法によって、豚と牛の *T. suis* 間では強い抗原交差性を示すことが報告されている (Cobo *et al.*, 2001)。このように、豚の *T. suis* は牛の *T. suis* と遺伝子レベルで区別できないと結論している (Tachezy *et al.*, 2002; Lun *et al.*, 2005; Šlapeta *et al.*, 2010)。

国内の牛の膣トリコモナス症は 40 年間以上発生がない一方で、本調査において現在の国内の豚において *T. suis* が普通種であることが示唆された。国内の豚より分離された *T. suis* が牛に感染した場合、病原性を示す可能性は否定できない。このことから、国内の豚 *T. suis* 分離株の種々の遺伝子に対する調査、さらに牛に対する病原性を調べる必要がある。

## 小 括

国内における豚の *T. suis* の感染状況を明らかにするため、西日本(2府5県:岐阜県、三重県、京都府、大阪府、兵庫県、岡山県および鳥取県)の豚糞便由来DNAもしくは糞便計64検体を集め、*T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法で検査した。豚糞便をParasep<sup>®</sup>もしくは蔗糖遠心浮遊法によって集虫後抽出したDNAに対するnested PCR法では、全64検体中36検体(56%)が陽性率を示した。陽性検体の塩基配列解析では、*T. suis* のITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域(348 bp)と98~100%一致し、さらに分離されたトリコモナス原虫が *T. suis* の形態学的特徴を有することを確認した。今回調査した西日本2府5県の全ての地域から陽性例が検出され、幼豚および肥育豚共に認められたことから、豚の飼育地域や年齢に限らず、*T. suis* 感染は国内、少なくとも西日本の豚に広く流行していることが示唆された。



## 第 IV 章 国内の猫、豚および牛の *T. suis* 遺伝子解析

## 序

*T. suis* を用いた猫、豚および牛の交差感染実験と2010年になってから行われた遺伝子解析により、*T. suis* は宿主によって病原性と遺伝子に差があることがわかってきた。前述したように、豚および牛の*T. suis* 分離株の交差感染実験は1950年代を中心に行われ、豚分離株および牛分離株の、豚および牛に対する定着および病原性には差がないとされている(Fitzgerald *et al.*, 1958a, b)。猫および牛の*T. suis* 分離株の交差感染実験は近年行われた。すなわち、猫より分離された*T. suis* を未経産牛に経膈感染させると、子宮内膜炎および膈炎が生じるが、その病原性は牛分離株を感染させた場合と比較して低いと報告されている(Stockdale *et al.*, 2007)。牛より分離された*T. suis* を胃カテーテルによって経口的に感染させた猫において、5頭中2頭の腸管に定着するが、下痢症状は認められなかったと報告されている(Stockdale *et al.*, 2008)。このように、猫および豚の*T. suis* 分離株の牛に対する感染実験がなされた一方で、豚分離株の猫に対する感染実験および猫分離株の豚に対する感染実験は行われていない。

近年になって、ITS 2領域のSNP、TR7/TR8プライマーにより増幅されるリピート配列、伸長因子1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) およびシステインプロテアーゼ 8 (*CP8*)の塩基配列およびアミノ酸配列によって、*T. suis* が猫型と牛・豚型に二分されるという報告がなされた(Šlapeta *et al.*, 2010; Reinmann *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012)。

以上のことから、*T. suis* は宿主によって猫および牛・豚型に大別されることが一部示唆されている(Šlapeta *et al.*, 2010; Reinmann *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012)。そこで、本章では、多種の宿主と*T. suis* の関係を解明するために、国内の猫、豚および牛の*T. suis* を用い、ITS 2領域および*CP8*遺伝子配列でどのような遺伝子型に分けられるかを調べた。

*T. suis* はエネルギー代謝器官としてミトコンドリアを持つ代わりに独自のDNAを持たないハイドロゲノソームを有する。そのため、*T. suis* においてはコピー数の多いミトコンドリアDNA上の遺伝子を用いた解析は不可能である。そこで、コピー数の多い、ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域を対象として遺伝

子解析を行った。

また、CP8 は *T. suis* から分泌され牛の膣および子宮内膜細胞のアポトーシスを誘引することから、牛の膣トリコモナス症の病因の一つと考えられている分子である (Singh *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2005)。この CP8 遺伝子はコピー数の少ない遺伝子であるが、塩基配列がすでに報告されており、国内の猫、豚および牛の *T. suis* の病原性との関連についても予想することができるため、今回の遺伝子解析の対象とした。

## 材 料 お よ び 方 法

### 1. 国内の猫、豚および牛の *T. suis* 陽性糞便もしくは虫体由来 DNA

国内の *T. suis* 陽性猫糞便由来 DNA16 検体、*T. suis* 陽性豚糞便由来 DNA8 検体 (CP8 の塩基配列解析は pig\_Mie\_05 を除く 7 検体) および牛分離 *T. suis* 由来 DNA1 検体を用いた。検体番号、採材年および地域は表 29 に示した

国内の猫糞便由来 DNA: 第 II 章の実験で使用した、*T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法で陽性の猫糞便由来 DNA、合計 13 検体を用いた。さらに、滋賀県草津市の動物病院より譲渡された慢性下痢を呈する猫の糞便由来 DNA で *T. suis* 特異的プライマーを用いた nested PCR 法で陽性を示したものを、計 3 検体も用いた。

国内の豚由来 DNA: 第 III 章の実験で使用した、TFR4/3 プライマーを用いた PCR 法で陽性の豚糞便由来 DNA、合計 8 検体を用いた。

国内の牛 *T. suis* 由来 DNA: 国内の牛 *T. suis* として、藪貞夫先生 (名古屋市立大学医学研究科免疫学講座) より分与された Inui 株を用いた。5 x 10<sup>7</sup> 虫体から抽出した DNA を用いた。DNA 抽出方法は第 I 章の検体および方法の 3-2-2 に準じて行った。

表 29. 遺伝子解析に供した国内の猫、豚および牛検体情報

動物	一連番号	検体番号	採材地域	採材年	
猫	F10	cat_Sapporo_A_10	北海道札幌市	2009/2/21	
	F41	cat_Sapporo_A_41		2009/2/5	
	F50	cat_Sapporo_B_01		2009/5/19	
	F59	cat_Sapporo_B_10		2009/9/30	
	F89	cat_Sapporo_B_40		2010	
	F90	cat_Kounosu_C_01	埼玉県鴻巣市	2010/2/13	
	F91	cat_Kounosu_C_02		2010/2/13	
	F92	cat_Kounosu_C_03		2010/2/12	
	F105	cat_Kounosu_C_16		2010/2/27	
	F121	cat_Kounosu_C_32		2010/3/12	
	F129	cat_Kounosu_C_40		2010/3/21	
	F144	cat_Kounosu_C_55		2010/4/30	
	F145	cat_Kounosu_C_56		2010/5/7	
	F148	cat_Kusatsu_01		滋賀県草津市	2011
	F149	cat_Kusatsu_02			2011
	F150	cat_Kusatsu_03	2011		
	豚	S22	pig_Kyoto_05	京都府	2008
		S25	pig_Okayama_05	岡山県	2008
S30		pig_Osaka_04	大阪府	2008	
S34		pig_Mie_05	鳥取県	2008	
S38		pig_Tottori_09		2012	
S42		pig_Tottori_13		2012	
S56		pig_Tottori_27		2012	
S64		pig_Tottori_35		2012	
牛	Inui 株	cattle_Inui	不明	不明	

## 2. ダイレクトシーケンス法による *T. suis* の ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域の塩基配列解読

TFR4/3 プライマーによる PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスを行った。TFR4/3 プライマーを用いた PCR 法の条件、アガロース電気泳動法、PCR 産物の精製、シーケンス反応、反応後の処理および塩基配列解読は第 III 章の材料および方法 3 に準じて行った。

## 3. ダイレクトシーケンス法による *T. suis* の CP8 遺伝子解析

*T. suis* の CP8 標的遺伝子としたプライマーは牛より分離された *T. suis* の CP8 遺伝子(X87781) (Mallinson *et al.*, 1995) および mRNA(EF610628) (Lucas *et al.*, 2008)を参考として、Sun ら(2012)が設計し、牛および猫の *T. suis* 分離株の CP8 遺伝子で増幅可能なプライマー、CP8-1F (5'-GCCGTCAAATCCACAAAGAA-3')、CP8-1R(5'-GGTCGAGGGAGTAGGGAGAG-3')、CP8-2F(5'-ACAAACCAATTCTACACAGG-3')および CP8-2R(5'-GACTGGGCCGTATGTTTC-3')を用いた。参考配列に対するプライマーの位置は図 15 に示した。

ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域の塩基配列が解読できた、猫全 16 検体および pig\_Mie\_05 を除く豚 7 検体、牛 1 検体(表 29)について、CP8-1F/1R および CP8-2F/2R のプライマーを用いた PCR 法を実施した。CP8-1F/1R もしくは CP8-2F/2R プライマーを用いた PCR 法の組成液および反応条件は表 30、31 に示した。表 31 の PCR 条件で目的のバンドが検出できなかった検体については再度 PCR を行い、バンドが検出不可能であったものは遺伝子解析から除外した。

2 % アガロースゲル電気泳動で予想サイズのバンド(CP8-1F/1R では約 514bp、CP8-2F/2R では 612bp)を切り出し、Wizard<sup>®</sup> SV Gel and a PCR Clean-Up System(Promega, Wisconsin, USA)を用いて、添付された説明書に従って精製した。その後のサイクルシーケンス反応(プライマーは CP8-1F もしくは CP8-1R、CP8-2F もしくは CP8-2R を用いた)、反応後の処理および塩基配列解読は第 III 章の材料および方法の 3 に準じて行った。なお、forward、reverse のどちらか一方しか解読できなかった検体は、その配列を用いて塩基配列解析を行った。

> *Tritrichomonas suis* extracellular cysteine protease 8

```
ATGTTTGCAGTTCTTGCTTCCCTCGCATCCTGCGCTTATTATCTTCAACACGAAGAAAAATCCTTC
CTCTCATGGATGAGATCAACAAACCAATTCTACACAGGTGATGAATACCAAACACGTTTCGGTATC
TTCATGGCCAATGCCCGCCTTGTCAAGGAACACAACGCCGCTAAAGGAAAATTACAACAGGACT
TAACAAGTTCGCTGCTATGACCCCATCTGAATACAAAGCTCTCCTTGGTTTCCGTATGGACCTTGC
CCAACGTAAGGCCGTCAAATCCACAAAGAAAGGCTAGCGTTGAATCCCTCGACTGGCGTGAAAAG
GGCGTTGTTAACCCAATCAAAGATCAAGCTCAATGTGGTTCCTGCTGGGCATTCTCAGCTATCCA
AGCTGCCGAATCCGTTAACTGCATCAAATCCGGAAAGCTCGAACGTTACTCTGAACAAAACCTTG
TTGATTGCGTTACAGCTTGCTATGGCTGCAATGGTGGTCTTATGGATGCTTCATACGAATACATCA
TCGATAGCCAAAACGGACACTTGAACCTCGAAGCCGACTATCCATACACAGCCGTCGACGGAACA
TGCAAGTACGCCAATACACACCAGTTGCTTCAATCACAAAGTATGTCAACGTTAACCAAATGAT
GAAGACGATCTTGCTGCCAAGGTCGAAACATACGGCCAGTCTGCTGTTGCCATCGATGCTTCAA
CTGGTCATTCCAACCTCTACACAGGTGGTGTTTATGATGAACCATCATGCTCTCCCTACTCCCTCGA
CCACGGTGTTGGCTGCGTCGGTTTCGGTGCTGAAGGTTCAACCAAATACTGGATCGTCCGTAAC
CATGGGGCACATCATGGGGTGAAGCCGGTTACATCCGTATGATCTGGCAAGACAACCAATGCCG
TATCGCTTCAATGGCCTGCGTCCCAGTTGCCTAA
```

図 15. ウシより分離された *Tritrichomonas suis* の CP8 遺伝子配列 (X87781 および EF610628 の配列を合成し表記) における CP8-1F/1R および CP8-2F/2R プライマーの位置

表 30. *Tritrichomonas suis* の CP8 遺伝子を対象とした PCR 法の反応液組成

試薬	容量(μl)	終濃度
HotStarTaq <sup>®</sup> Master Mix	10	2.5 unit HotStarTaq DNA polymerase, 1 x PCR Buffer(1.5mM MgCl <sub>2</sub> を含む), 200 μM of each dNTP
CP8-1F および CP8-1R もしくは、CP8-2F および CP8-2R(各 5 μM)	2	0.5 μM
DDW	5	
Template DNA	1	
計	20	

表 31. *Tritrichomonas suis* の CP8 遺伝子を対象とした PCR 法の反応条件

反応	温度	時間	サイクル数
前反応	95°C	15 分	} 35 サイクル
熱変性	95°C	30 秒	
アニーリング	45°C	30 秒	
伸長反応	72°C	1 分	
終反応	72°C	10 分	
	4°C		



## 4. アライメント解析

### 4-1. *T. suis* の ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域

得られた塩基配列の解析は BioEdit(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)を用いて行った。その後、GenBank に登録された猫 (AF466749, AF466750 および AF466751) (Levy *et al.*, 2003)、牛 (M81842 および AF339736) (Chakrabarti *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2003) および豚 (AY349190 および U85966) (Felleisen, 1997; Kleina *et al.*, 2004) の *T. suis* 分離株の ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域と比較した。

### 4-2. *T. suis* の CP8 遺伝子およびアミノ酸配列

得られた塩基配列の解析は BioEdit(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)を用いて行った。その後、GenBank に登録された猫 (JN802514~17) および牛 (JN802518 および JN802519) (Sun *et al.*, 2012) の *T. suis* 分離株の CP8 遺伝子領域と比較した。

さらに、得られた塩基配列に対し、BLASTX 検索を実施し、アミノ酸配列に変換した後、猫 (JN802514~17) および牛 (JN802518 および JN802519) (Sun *et al.*, 2012) の *T. suis* 分離株の CP8 アミノ酸配列と比較した。

## 結 果

### 1. 国内の猫、豚および牛検体の ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域の比較

TFR3/4プライマーを用いたPCR産物のダイレクトシーケンスでは、国内の *T. suis* 陽性猫糞便由来DNA16検体、*T. suis* 陽性豚糞便由来DNA8検体および牛分離 *T. suis* 由来DNA1検体の全てから、ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域を含む348 bpの配列が解読された(図16~18)。この配列を、GenBank に登録された猫(AF466749, AF466750およびAF466751)(Levy *et al.*, 2003), 牛(M81842およびAF339736)(Chakrabarti *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2003) および豚(AY349190およびU85966)(Felleisen, 1997; Kleina *et al.*, 2004)の *T. suis* 分離株のITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域と比較した。ITS 1領域および5.8S rRNA遺伝子において、数塩基の差が認められたが(図16、17)、宿主種と塩基配列の差における関連性は認められなかった。一方、ITS 2領域においてはすでに報告されているSNP(チミンとシトシンの変異)が認められた(図18)。国内の猫全16検体(北海道札幌市5検体、埼玉県鴻巣市8検体および滋賀県草津市3検体)および豚1検体(鳥取県1検体)は“猫型(チミン)”であった。一方、国内の牛 *T. suis* Inui株および国内の豚7検体(京都府1検体、岡山県1検体、大阪府1検体および鳥取県1検体)は“牛型(シトシン)”を示した。以上のように、国内の猫16検体は全て“猫型(チミン)”を示し、牛(1検体のみ)は“牛型(シトシン)”を示したが、豚8検体からは“牛型(シトシン)”(7検体)と“猫型(チミン)”(1検体)の両型が検出された(表32)。

### 2. 国内の猫、豚および牛検体のCP8遺伝子およびアミノ酸配列の比較

CP8-1F/1Rプライマーを用いたPCR法にてバンドが検出された検体は猫5検体(cat\_Sapporo\_B\_01, cat\_Kounosu\_C\_32, cat\_Kounosu\_C\_55, cat\_Kusatsu\_03)、豚2検体(pig\_Tottori\_13, Pig\_Tottori\_35)および牛Inui株であった。CP8-2F/2Rプライマーを用いたPCR法でバンドが検出された検体は、猫4検体(cat\_Sapporo\_B\_01, cat\_Kounosu\_C\_32, cat\_Kounosu\_C\_55, cat\_kusatsu\_03)、豚2検体(pig\_Tottori\_13, Pig\_Tottori\_35)および牛Inui株であった。これら



```

      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      0          90          100         110         120         130         140         150
cat AF466749-51 ACCTTAGGCAATGGATGTCCTTGGCTTCTTACACGATGAAGAACGTTGCATAATGCGATAAGCGGCTGGATT
cat Sapporo A 10 .....
cat Sapporo A 41 .....
cat Sapporo B 01 .....
cat Sapporo B 10 ..C.....
cat Sapporo B 40 .....A.....
cat Kounosu C 01 .....
cat Kounosu C 02 .....
cat Kounosu C 03 .....
cat Kounosu C 16 .....
cat Kounosu C 32 .....
cat Kounosu C 40 .....
cat Kounosu C 55 .....
cat Kounosu C 56 .....
cat Kusatsu 01 .....
cat Kusatsu 02 .....
cat Kusatsu 03 .....
pig U85966 .....
pig Kyoto 05 .....
pig Okayama 05 .....
pig Osaka 04 .....
pig Mie 05 .....
pig Tottori 09 .....
pig Tottori 13 .....
pig Tottori 27 .....
pig Tottori 35 .....
cattle M81842 .....
cattle AF339736 .....
cattle Inuistrain .....

      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      160         170         180         190         200         210         220         230
cat AF466749-51 TAGCTTCTCTTGGCACAAGTTCGATCTTTGAATGCACATTGGCGCCGTTTTAGCTTGCTAGAACACGCATATATGTTACAGTAACCCA
cat Sapporo A 10 .....
cat Sapporo A 41 .....
cat Sapporo B 01 .....
cat Sapporo B 10 .....
cat Sapporo B 40 .....
cat Kounosu C 01 .....
cat Kounosu C 02 .....
cat Kounosu C 03 .....
cat Kounosu C 16 .....
cat Kounosu C 32 .....
cat Kounosu C 40 .....
cat Kounosu C 55 .....
cat Kounosu C 56 .....T.....
cat Kusatsu 01 .....A.....
cat Kusatsu 02 .....
cat Kusatsu 03 .....T.....
pig U85966 .....
pig Kyoto 05 .....
pig Okayama 05 .....
pig Osaka 04 .....
pig Mie 05 .....
pig Tottori 09 .....
pig Tottori 13 .....
pig Tottori 27 .....
pig Tottori 35 .....
cattle M81842 .....
cattle AF339736 .....
cattle Inuistrain .....

```

図 17. 国内の猫、豚および牛検体と Genbank 登録 *Tritrichomonas suis* の 5.8S rRNA 遺伝子の塩基配列比較

	240	250	255	270	290	300
cat AF466749-51	TATTAATTTAA	TACCAAAATCTCTTTT	TAAGCAAAAAGCG	AAAAAATAAA	TATATATST	TTAAACAA
cat Sapporo A 10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Sapporo A 41	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Sapporo B 01	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Sapporo B 10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Sapporo B 40	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 01	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 02	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 03	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 16	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 32	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 40	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 55	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kounosu C 56	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kusatsu 01	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kusatsu 02	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kusatsu 03	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cat Kusatsu 03	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig U85966	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Kyoto 05	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Okayama 05	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Osaka 04	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Mie 05	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Tottori 09	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Tottori 13	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Tottori 27	.....	.....	.....	.....	.....	.....
pig Tottori 35	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cattle M81842	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cattle AF339736	.....	.....	.....	.....	.....	.....
cattle Inuistrain	.....	.....	.....	.....	.....	.....

図 18. 国内の猫、豚および牛検体と Genbank 登録 *Tritrichomonas suis* の ITS 2 領域の塩基配列比較

黒枠：国内猫 16 検体は全てチミンであったが、牛 Inui 株はシトシンであった  
 国内豚検体では 7 株がシトシンであったが、1 株がチミンであった

表.32 国内の猫、豚および牛検体の ITS 2 領域の SNP および CP8 のアミノ酸配列の変異のまとめ

動物	検体番号	ITS 2 領域の SNP (チミン/シトシン)	CP8 アミノ酸配列 (141 番目:アルギニン/セリン)
猫	cat_Sapporo_A_10	チミン	NE
	cat_Sapporo_A_41	チミン	アルギニン
	cat_Sapporo_B_01	チミン	アルギニン
	cat_Sapporo_B_10	チミン	NE
	cat_Sapporo_B_40	チミン	NE
	cat_Kounosu_C_01	チミン	NE
	cat_Kounosu_C_02	チミン	NE
	cat_Kounosu_C_03	チミン	NE
	cat_Kounosu_C_16	チミン	NE
	cat_Kounosu_C_32	チミン	アルギニン
	cat_Kounosu_C_40	チミン	NE
	cat_Kounosu_C_55	チミン	アルギニン
	cat_Kounosu_C_56	チミン	NE
	cat_Kusatsu_01	チミン	NE
	cat_Kusatsu_02	チミン	NE
	cat_Kusatsu_03	チミン	アルギニン
	豚	pig_Kyoto_05	シトシン
pig_Ookayama_05		シトシン	NE
pig_Osaka_04		シトシン	NE
pig_Mie_05		シトシン	NE
pig_Tottori_09		チミン	NE
pig_Tottori_13		シトシン	セリン
pig_Tottori_27		シトシン	NE
pig_Tottori_35		シトシン	セリン
牛	cattle_Inui	シトシン	セリン

NE: not examined

のPCR産物をダイレクトシーケンス法による塩基配列解読に供した。なお、ITS 2領域で猫型を示した豚(pig\_Tottori\_09)はCP8-1F/1RおよびCP8-2F/2Rプライマーを用いた2度のPCR法でもバンドが検出できなかったため、塩基配列の解読は行わなかった。

塩基解読に成功した検体の内訳は、国内の猫5検体(北海道札幌市2検体、埼玉県鴻巣市2検体および滋賀県草津市1検体)および豚2検体(鳥取県2検体)、国内の牛の *T. suis* Inui株であった。(表32)。

国内の猫、豚および牛の *T. suis* のCP8遺伝子の塩基配列と、GenBankに登録された猫(JN802514~17)および牛(JN802518およびJN802519)(Sun *et al.*, 2012)の *T. suis* 分離株のCP8遺伝子領域と比較した結果を図19に示した。国内の猫および豚由来の *T. suis* のCP8遺伝子の塩基配列は、各動物宿主からそれぞれの検体の間で数塩基の差が認められた。日本の猫の *T. suis* とGenBank登録されているオーストラリアの猫の *T. suis* (JN802514~17)の間で差が認められた。しかし、アミノ酸配列の比較では、142番目のアミノ酸配列において、国内の猫の *T. suis* は全て“猫型(アルギニン)”、豚および牛の *T. suis* は“牛・豚型(セリン)”に二分された(図20)。

```

180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280
CGTCAAATCCACAAAGAGGCTAGCGTTGTATCCCTCCACTGGGGTGAAAAGGGGGTTGTTAACCCCAATCAAAGA TCTAGCTCGA TGTGGTCCCTGCTGGGCA TTTCTCAG
.....M.....
cat Sapporo A 41
cat Sapporo B 01
cat Kusatsu 03
cat Kounosu C 32
cat Kounosu C 55
cat TS CP8 JN802514
cat TS CP8 JN802515
cat TS CP8 JN802516
cat TS CP8 JN802517
cattle Inui
cattle TS CP8 JN802519
cattle TS CP8 JN802518
pig Tottori 35
pig Tottori 13

290 300 310 320 330 340 350 360 370 380
CYATCCAAAGCTGCCGTA TCCGTTAACTGCA TCAAATCCGGAAAGCTCGAAGCTTTACTCTGAACAAAACSTTTGTTGATGGCGWTTACAGMTTGTATGGCTG
M.....M.....R.....W.....S.....
cat Sapporo A 41
cat Sapporo B 01
cat Kusatsu 03
cat Kounosu C 32
cat Kounosu C 55
cat TS CP8 JN802514
cat TS CP8 JN802515
cat TS CP8 JN802516
cat TS CP8 JN802517
cattle Inui
cattle TS CP8 JN802519
cattle TS CP8 JN802518
pig Tottori 35
pig Tottori 13

```

図 19. 国内の猫、豚および牛および牛検体と Genbank 登録 *Tritrichomonas suis* の CP8 遺伝子塩基配列比較

(M: A もしくは C, S: C もしくは G, W: A もしくは T, Y: C もしくは T)







## 考 察

### 1. 国内の猫、豚および牛の *T. suis* の遺伝子解析を初めて実施

2010年に入り、*T. suis* の複数の遺伝子に対する遺伝子解析研究が進んだことで、*T. suis* は分離された宿主によって、猫型および牛・豚型に二分されると示唆されている(Šlapeta *et al.*, 2010; Reinmann *et al.*, 2012)。しかしながら、国内の猫、豚および牛の *T. suis* における遺伝子解析は実施されていないのが現状である。本研究は国内で初めて猫、豚および牛のITS 2領域およびCP8遺伝子の塩基配列解析・アミノ酸配列解析を行った。

### 2. 国内の猫、豚および牛の *T. suis* の ITS 2 領域に認められた SNP について

過去の報告では、ITS 2領域のSNPによって、*T. suis* は二つの遺伝子型に分けられ、猫の *T. suis* は“猫型(チミン)”、牛と豚の *T. suis* は“牛型(シトシン)”を示している(Šlapeta *et al.*, 2010; Reinmann *et al.*, 2012)。国内の *T. suis* 分離株においては、猫全16検体(北海道札幌市5検体、埼玉県鴻巣市8検体および滋賀県草津市3検体)は全て“猫型(チミン)”を示し、牛Inui株は“牛型(シトシン)”を示した。国内の豚分離株7検体(京都府1検体、岡山県1検体、大阪府1検体および鳥取県4検体)は“牛型(シトシン)”を示した一方で、1検体(鳥取県1検体)は“猫型(チミン)”を示した。この結果は、豚が牛および猫に寄生する *T. suis* の宿主となる可能性を示唆している。

豚の *T. suis* 分離株からITS 2領域において、“猫型(チミン)”が報告されたのは世界でも初めてであるが、これは、GenBankに登録されている塩基配列が3配列のみで、豚由来の *T. suis* 分離株の遺伝子情報の報告自体が少ないことによるものかもしれない(Felleisen, 1997; Kleina *et al.*, 2004)。今後、世界各地の豚の *T. suis* 分離株について、ITS 2領域を中心としたさらなる遺伝子解析研究が必要であると考えられる。

### 3. 国内の猫、豚および牛の *T. suis* の CP8 の塩基配列およびアミノ酸配列に認められた変異について

*T. suis* の ITS1-5.8S rRNA-ITS2 領域が解読できた猫 8 検体および豚 6 検体において、すでに海外で報告されている CP8-1F/1R もしくは CP8-2F/2R プライマーを用いた PCR 法によって、バンドが検出されなかった。これは糞便由来 DNA であり元々の *T. suis* の虫体数が少なく、CP8 遺伝子を標的とした PCR 法で増幅できなかったのかもしれない。

国内の *T. suis* の CP8 の塩基配列は、検体毎に数塩基の差が認められた。また、塩基配列およびアミノ酸配列の解析において一致する領域が限られ、偽遺伝子の可能性も否定できないが、142 番目のアミノ酸配列において、国内の猫 5 検体は全て“猫型(アルギニン)”、豚 2 検体および牛 1 検体は“牛・豚型(セリン)”に二分され、この結果は Sun *et al.* (2012) および Šlapeta *et al.* (2012) の報告と同様であった。CP8 はカテプシン-L ファミリーのシステインプロテアーゼに属し、*T. suis* から分泌され牛の膣および子宮内膜細胞のアポトーシスを誘引することから、牛の膣トリコモナス症の病因の一つと考えられている分子である(Singh *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2005)。国内の豚および牛検体における CP8 のアミノ酸配列の一致によって、国内の豚に流行している *T. suis* が牛に定着し、病原性を示す可能性が予想される。

## 小 括

国内の牛、猫および豚の *T. suis* について ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域および CP8 遺伝子の比較解析を試みた。ITS 2 領域で SNP が認められ、猫 16 検体(北海道札幌市 5 検体、埼玉県鴻巣市 8 検体および滋賀県草津市 3 検体)は全て“猫型(チミン)”を示し、牛 Inui 株は“牛型(シトシン)”示した。国内の豚分離株 7 検体(京都府 1 検体、岡山県 1 検体、大阪府 1 検体、鳥取県 4 検体)は“牛型(シトシン)”を示した一方で、1 検体(鳥取県 1 検体)は“猫型(チミン)”を示した。ITS 2 領域において“猫型”を示す *T. suis* が豚から報告されたのは世界でも初めてである。国内の *T. suis* における CP8 の塩基配列の解析では、検体毎に数塩基の差が認められた。しかし、国内の猫および牛の *T. suis* の CP8 のアミノ酸配列解析では、過去の報告と同様、142 番目のアミノ酸配列において、国内の猫 5 検体は全て“猫型(アルギニン)”、豚 2 検体および牛 1 検体は“牛型(セリン)”に二分され、この結果は Sun *et al.* (2012) および Šlapeta *et al.* (2012) の報告と同様であった。CP8 はカテプシン-L ファミリーのシステインプロテアーゼに属し、*T. suis* から分泌され牛の膣および子宮内膜細胞のアポトーシスを誘引することから、牛の膣トリコモナス症の病因の一つと考えられている分子である(Singh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2008)。国内の豚および牛検体における CP8 のアミノ酸配列の一致によって、国内の豚に流行している *T. suis* が牛に定着し、病原性を示す可能性が予想される。

## 総 括

*Trichostrongylus axei* (= *T. foetus*)は、当初、豚の低病原性のトリコモナス原虫として報告されたが、牛の繁殖障害および猫の慢性下痢症も起こすなど、複数の動物種に感染し、場合により深刻な症状を引き起こす原虫である。重要な寄生虫であるにも関わらず、国内の猫および豚における *T. suis* 感染状況に関する情報や、動物種を越えた *T. suis* の感染に関する知見はなく、これらの解明が急務である。本研究では、わが国の *T. suis* 流行状況を明らかにすることを目的として、国内の猫および豚を対象とする疫学調査を行った。また、異なる動物種間における伝播の可能性を検討するために、国内の猫、豚および牛の *T. suis* について、ITS 1-5.8S rRNA-ITS 2 領域およびシステインプロテアーゼ 8 (CP8) 遺伝子の解析を試みた。

まず、国内における猫の *T. suis* の感染状況を把握するための検査法として、*T. suis* の培養法および糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR 法について検討した。国内で入手可能な培地である *Trichomonas medium*<sup>®</sup> を改良し、猫糞便からの *T. suis* の検出・継代法を確立し、8~10 % のグリセリン添加により虫体の冷凍保存が可能であることを示した。さらに、糞便培養後の沈渣由来 DNA も nested PCR 法に適用可能であることを明らかにした。

ついで、国内における猫の *T. suis* の感染状況を明らかにするため、北海道札幌市(89 検体)および埼玉県鴻巣市(58 検体)の動物病院から猫糞便検体を集め、培養法、糞便由来 DNA もしくは糞便培養後の沈渣由来 DNA を用いた nested PCR 法で検査した。その結果、nested PCR 法による検査で、147 検体中 13 検体(8.8 %)が陽性であった。この 13 検体の塩基配列は *T. suis* の ITS 1 領域および 5.8S rRNA 遺伝子(208 bp)と 98~100 % 一致し、さらに分離されたトリコモナス原虫が *T. suis* の形態学的特徴を有することを確認した。*T. suis* 陽性の猫は 5 検体が北海道札幌市、8 検体が埼玉県鴻巣市と、両方の地域において認められた。また、*T. suis* 陽性の猫は 1 ヶ月齢~9 才齢と幅広い年齢層にわたり、7 検体が純血種、6 検体が雑種であったことから、年齢および品種に関わらず *T. suis*

に感染していることが示された。さらに、陽性 13 検体中 5 検体が慢性下痢を呈し、慢性下痢と *T. suis* の感染に有意な相関が認められたことから ( $P= 0.0035$ )、国内の猫の下痢症の原因として *T. suis* 感染も念頭に置くべきことが示唆された。

次に、国内における豚の *T. suis* の感染状況を明らかにするため、西日本(2府5県:岐阜県、三重県、京都府、大阪府、兵庫県、岡山県および鳥取県)の豚糞便由来DNAもしくは豚糞便計64検体を集めて、*T. suis* 特異的プライマーを用いたnested PCR法で検査した。豚糞便からParasep<sup>®</sup>もしくは蔗糖遠心浮遊法によって集虫後抽出したDNAを用いたnested PCR法では、64検体中36検体(56 %)が陽性を示した。陽性検体の塩基配列解析では、*T. suis* のITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域(348 bp)と98~100 %一致し、さらに分離されたトリコモナス原虫が *T. suis* の形態学的特徴を有することを確認した。今回調査した西日本2府5県の全ての地域の豚において高い陽性率を示し、幼豚および肥育豚共に陽性例が多数認められたことから、豚の飼育地域や年齢に関わらず、*T. suis* 感染は国内、少なくとも西日本の豚に広く流行していることが示唆された。

最後に、国内の猫、豚および牛の *T. suis* についてITS 1-5.8S rRNA-ITS 2領域(348 bp)および CP8 遺伝子(663 bp)の比較解析を試みた。ITS 2領域で一塩基多型が認められ、猫16検体(北海道札幌市5検体、埼玉県鴻巣市8検体および滋賀県草津市3検体)は全て“猫型”を示し、牛Inui株は“牛型”示した。国内の豚7検体(京都府1検体、岡山県1検体、大阪府1検体、鳥取県4検体)は“牛型”を示したが、1検体(鳥取県1検体)は“猫型”を示した。ITS 2領域において“猫型”を示す *T. suis* が豚から発見されたのは世界でも初めてである。国内の *T. suis* における CP8 遺伝子の塩基配列の解析では、各動物宿主からそれぞれの検体の間で数塩基の差が認められた。しかし、国内の猫、豚および牛の *T. suis* のCP8のアミノ酸配列解析では、過去の報告と同様、142番目のアミノ酸配列により、“猫型” および “牛・豚型” に二分された。

以上から、国内の猫の下痢症の原因として *T. suis* を考慮すべきことと、国内の豚は猫および牛に病原性を示す *T. suis* の宿主となる可能性が示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御鞭撻をいただきました鳥取大学農学部獣医学科獣医寄生虫病学教育研究分野 奥 祐三郎教授に深謝いたします。また本研究に際し、適切な御指導、御鞭撻をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室 片倉 賢教授、桜井達也助教、本稿の御高閲賜りました山口大学共同獣医学部寄生虫病学教室 佐藤 宏教授、鳥取大学農学部獣医学科獣医画像診断学教育研究分野 今川智敬教授、鳥取大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学教育研究分野 伊藤啓史准教授、鳥取大学農学部獣医学科獣医臨床検査学教育研究分野 杉山 晶彦准教授に厚く御礼申し上げます。

検体の採材および提供の御協力をいただきました、大阪市立環境研究所 阿部 仁一郎先生、ノア動物病院 上條弘美先生、高橋動物病院 高橋 徹院長、こうのす動物病院 田中(福島)奏絵副院長、草津犬猫動物病院 福永尚輝先生、鳥取県鳥取家畜保健衛生所 前田佳奈先生、北海道大学大学院獣医学研究科附属動物病院 森田明彦先生、北海道大学大学院獣医学研究科内科学教室 山崎真大准教授、大田 寛助教に深謝いたします。

最後に、研究室の研究および生活において多大なる御指導をいただきました、富山大学理工学研究部 宮崎智史日本学術振興会特別研究員、岡山県農林水産総合センター畜産研究所 水上智秋先生、福岡市食品衛生検査所 廣田淳一先生、日本大学生物資源科学部獣医学科医動物学教室 松本 淳准教授、多方面に渡り暖かい援助をいただきました、鳥取大学農学部獣医学科寄生虫病学教育研究分野および北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室の室員の皆様、卒業生の皆様に心から感謝いたします。



## 参 考 文 献

- Abe, N. and Kimata, I. 2010. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in a Japanese porcine population. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10: 425-427.
- Abe, N., Kimata, I, and Iseki, M. 2009. Molecular evidence of *Enterocytozoon bieneusi* in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 217-219.
- Adl. S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F. W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59:429-514.
- Bissett, S. A., Stone, M. L., Malik, R., Norris, J. M., O'Brien, C., Mansfield, C. S., Nicholls, J. M., Griffin, A. and Gookin, J. L., 2009. Observed occurrence of *Tritrichomonas foetus* and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats. *Feline Med. Surg.* 11:803-807.
- Chakrabarti, D., Dame, J. B., Gutell, R. R. and Yowell, C. A. 1992. Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52:75-83.
- Cobo, E. R., Cano, D., Campero, C. M. 2001. Experimental infection with *Tritrichomonas suis* in heifers. *Vet. Parasitol.* 99:73-78.

- Davaine, C. J., 1875. Monadines. In: Dechambre, M.A. (Ed.), Dictionnaire 474  
Encyclopedique des Sciences Medicales (serie 2, tome 9, MOE – MOR). Place 475 de  
l'Ecole-de-Medecine, Paris, France, pp. 115–130.
- Diamond, L. S. 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in  
axenic cultures. *J. Parasitol.* 43:488-490.
- Feinberg, J. G. and Whittington, M. J. 1957. A culture medium for *Trichomonas vaginalis*  
donné and species of *Candida*. *J. Clin. Pathol.* 10:327-329.
- Felleisen, R. S. 1997. Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal  
transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *J. Parasitol.*  
115:111-119.
- Felleisen, R. S., Lambelet, N., Bachmann, P., Nicolet, J., Müller, N. and Gottstein, B.  
1998. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay  
based on rRNA gene unit sequences. *J. Clin. Microbil.* 36: 513-519.
- Fitzgerald, P. R., Johnson, A. E., Hammond, D. M., Thorne, J. L. and Hibler, C. P. 1958a.  
Experimental infection of young pigs following intranasal inoculation with nasal,  
gastric, or cecal trichomonads from swine or with *Trichomonas foetus*. *J. Parasitol.*  
44:597-602.
- Fitzgerald, P. R., Johnson, A. E., Thorne, J. L. and Hammond, D. M. 1958b. Experimental  
infections of the bovine genital system with trichomonads from the digestive tracts

of swine. *Am. J. Vet. Res.* 19:775-779.

- Foster, D. M., Gookin, J. L., Poore, M. F., Stebbins, M. E. and Levy, M. G. 2004. Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225:888-892.
- Frey, C. F., Schild, M., Hemphill, A., Stünzi, P., Müller, N., Gottstein, B. and Burgener, I. A. 2009. Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR. *Parasitol. Res.* 104:783-788.
- Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B. and Levy, M. G. 2002. Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J. Clin. Microbiol.* 40:4126-4130.
- Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., St John, V., Spector, M. and Levy, M. G. 2005. Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *J. Parasitol.* 91:939-943.
- Gookin, J. L., Breitschwerdt, E. B., Levy, M. G., Gager, R. B. and Benrud, J. G. 1999. Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215:1450-1454.
- Gookin, J. L., Copple, C. N., Papich, M. G., Poore, M. F., Stauffer, S. H., Birkenheuer, A. J., Twedt, D. C. and Levy, M. G. 2006. Efficacy of ronidazole for treatment of feline *Tritrichomonas foetus* infection. *J. Vet. Intern. Med.* 20:536-543.

- Gookin, J. L., Foster, D. M., Poore, M. F., Stebbins, M. E. and Levy, M. G. 2003. Use of a commercially available culture system for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:1376-1379.
- Gookin, J. L., Levy, M. G., Law, J. M., Papich, M. G., Poore, M. F. and Breitschwerdt, E. B. 2001. Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.* 62:1690-1697.
- Gookin, J. L., Stebbins, M. E., Hunt, E, Burlone, K., Fulton, M., Hochel, R., Talaat, M., Poore, M. and Levy, M. G. 2004. Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *J. Clin. Microbiol.* 42:2707-2710.
- Gruby, D. and Delafond, O. 1843. Recherches ser des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pedant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 17:1304–1308.
- Gunn-Moore, D. A., McCann, T. M., Reed, N., Simpson, K. E. and Tennant, B. 2007. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in the UK. *J. Feline Med. Surg.* 9:214-218.
- Hibler, C. P., Hammond, D. M., Caskey, F. H., Johnson, A. E. and Fitzgerald, P. R. 1960. The morphology and incidence of the trichomonads in swine, *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond), *Tritrichomonas rotunda*, n. sp. and *Trichomonas buttreysi*, n. sp. *J. Protozool.* 7:159–171.
- Jensen, E. A. and Hammond, D. M. 1964. A morphological study of trichomonads and

- related flagellates from bovine digestive tract. *J. Parasitol.* 11: 386-394.
- Kitano, Y., Makinoda, K., Furukawa, M., Toyomitsu, Y., Fukuyama, T., Higashinakagawa, M., Yonemaru, M. and Tobimatsu, M. 1991. Diarrhea in piglets associated with parasitism of trichomonads. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 44:473-477.
- Kleina, P., Bettim-Bandinelli, J., Bonatto, S. L., Benchimol, M. and Bogo, M. R. 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int. J. Parasitol.* 34:963-970.
- Kupferberg, A. B. 1955. *Trichomonas vaginalis*: nutritional requirements and diagnostic procedures. *Int. Rec. Med. Gen. Pract. Clin.* 168:709-717.
- Levine, N. D. 1975. 5. The trichomonas, Protozoan parasites of domestic animals and of man second edition, Burgess Publishing Company, Minnesota.
- Levine, N. D. 1985. 3. Flagellates: The Trichomonads, Veterinary Protozoology, The Iowa State University Press, Iowa.
- Levine, N. D. and Andersen, F. L. 1966. Frozen storage of *Tritrichomonas foetus* for 5.6 years. *J. Protozool.* 13:199-202.
- Levy, M. G., Gookin, J. L., Poore, M., Birkenheuer, A. J., Dykstra, M. J. and Litaker, R. W. 2003. *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. *J. Parasitol.* 89:99-104.

- Levy, M. G., Gookin, J. L., Poore, M., Litaker, R. W. and Dykstra, M. J. 2001. Information on parasitic gastrointestinal tract infections in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218:194-195.
- Lim, S., Park, SI., Ahn, KS., Oh, DS., Ryu, JS. and Shin, SS. 2010. First report of feline intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in Korea. *Korean J. Parasitol.* 48:247-251.
- Lucas, J. J., Hayes, G. R., Kalsi, H. K., Gilbert, R. O., Choe, Y., Craik, C. S. and Singh, B. N. 2008. Characterization of a cysteine protease from *Tritrichomonas foetus* that induces host-cell apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 477:239-243.
- Lun, ZR., Chen, XG., Zhu, XQ., Li, XR. and Xie, MQ. 2005. Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends Parasitol.* 21:122-125.
- Lun, ZR., Parker, S. and Gajadhar, A. A. 2000. Comparison of growth rates of *Tritrichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *Vet. Parasitol.* 89:199-208.
- Mallinson, D. J., Livingstone, J., Appleton, K. M., Lees, S. J., Coombs, G. H. and North, M. J. 1995. Multiple cysteine proteinases of the pathogenic protozoon *Tritrichomonas foetus*: identification of seven diverse and differentially expressed genes. *Microbiology* 141:3077-3085.

- Mostegl, M. M., Richter, B., Nedorost, N., Lang, C., Maderner, A., Dinhopf, N. and Weissenböck, H. 2012. First evidence of previously undescribed trichomonad species in the intestine of pigs? *Vet. Parasitol.* 185:86-90.
- Rae, D. O. and Crews, J. E. 2006. *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22:595-611.
- Raether, W. and Seidenath, H. 1972. Verhalten der Infektiosität verschiedener Protozoen Spezies nach längerer Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff. *Ztschr. Tropenmed. Parasit.* 23:428-431.
- Reinmann, K., Müller, N., Kuhnert, P., Campero, C. M., Leitsch, D., Hess, M., Henning, K., Fort, M., Müller, J., Gottstein, B. and Frey, C. F. 2012. *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1 $\alpha$ . *Vet. Parasitol.* 185:138-144.
- Ride, W. D. L., Cogger, H. G., Kraus, O., Minelli, A., Thompson, F. C. and Tubbs, P. K. (ed.), 1999. International Code of Zoological Nomenclature, 4th ed., International Trust for Zoological Nomenclature, London.
- Rivera, W. L., Lupisan, A. J. B. and Baking, J. M. P. 2008. Ultrastructural study of a tetratrachomonad isolated from pig fecal samples. *Parasitol. Res.* 103:1311-1316.
- Romatowski, J. 1996. An uncommon protozoan parasite (*Pentatrachomonas hominis*) associated with colitis in three cats. *Feline Pract.* 24:10-14.

- Romatowski, J. 2000. *Pentatrichomonas hominis* infection in four kittens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216:1270-1272.
- Singh, B. N., Hayes, G. R., Lucas, J. J., Beach, D. H. and Gilbert, R. O. 2005. In vitro cytopathic effects of a cysteine protease of *Tritrichomonas foetus* on cultured bovine uterine epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 66:1181-11816.
- Singh, B. N., Lucas, J. J., Hayes, G. R., Kumar, I., Beach, D. H., Frajblat, M., Gilbert, R. O., Sommer, U. and Costello, C. E.. 2004. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 72:4151-4158.
- Šlapeta, J., Craig, S., McDonell, D. and Emery, D. 2010. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. *Exp. Parasitol.* 126:209-213.
- Šlapeta, J., Müller, N., Stack, C. M., Walker, G., Lew-Tabor, A., Tachezy, J and Frey, C. F. 2012. Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int. J. Parasitol.* 42: 1143-1149.
- Stockdale, H.D., Dillon, A. R., Newton, J. C., Bird, R. C., Bondurant R. H., Deinnocentes, P., Barney. S., Bulter, J., Land, T., Spencer, J. A., Lindsay, D. S. and Blagburn, B.L. 2008. Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. *Vet. Parasitol.* 154:156-161.
- Stockdale, H. D., Givens, M. D., Dykstra, C. C. and Blagburn, B.L. 2009. *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Vet. Parasitol.* 160:13-17.



- Stockdale, H., Rodning, S., Givens, M., Carpenter, D., Lenz, S., Spencer, J., Dykstra, C., Lindsay, D. and Blagburn, B. 2007. Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.* 93:1429-1434.
- Sun, Z., Stack, C. and Šlapeta, J. 2012. Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Tritrichomonas foetus* parasites of cats and cattle. *Vet. Parasitol.* 186:445-449.
- Switzer, W. P. 1951. Atrophic rhinitis and trichomonads. *Vet. Med.* 46:478-481.
- Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Sedinová, M., Vanacová, S., Vrlík, M., Van Ranst, M., Flegr, J. and Kuldaa, J. 2002. Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J. Eukaryot.* 49:154-163.
- Tolbert, M. K., Leutenegger, C. M., Lobetti, R., Birrell, J. and Gookin, J. L. 2012. Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. *Vet. Parasitol.* 187:319-322.
- Walker, R. L., Hayes, D. C., Sawyer, S. J., Nordhausen, R. W., Van Hoosear, K. A. and BonDurant, R. H. 2003. Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:14-20.

Yaeger, M. J. and Gookin, J. L. 2005. Histologic features associated with *Tritrichomonas foetus*-induced colitis in domestic cats. *Vet. Pathol.* 42:797-804.

山本徳栄, 近真理奈, 斉藤利和, 前野直弘, 小山雅也, 砂押克彦, 山口正則, 森嶋康之, 川中正憲.  
2009. 埼玉県内のイヌおよびネコにおける腸管寄生虫類の保有状況. *感染症学雑誌*  
83:223-228.