

学位論文要旨

氏名 一二三 達郎

題 目：日本産およびカナダから輸入された食用馬の多包虫症に関する疫学的研究

論文要旨：

多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) は北アメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの北半球に広く分布しており、幼虫である多包虫寄生による多包虫症は人獣共通感染症である。多包条虫は終宿主である犬、キツネ、コヨーテと中間宿主である野ネズミとの間に生活環が形成されている。馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり、終宿主動物から糞便内に排泄された多包条虫の虫卵の経口摂取により感染し、幼虫である多包虫が肝臓に寄生して病変を形成する。山形県のと畜場に搬入された日本産のサラブレッド種にみられた肝臓の灰白色硬結節から多包虫感染が高率に認められているが、と畜場に搬入されるサラブレッド種以外の品種の馬や日本国外からの輸入馬における多包虫感染の実態は明らかにされていない。また、馬の多包虫症の診断は病理組織学的検査および PCR により行われているが、診断に時間を要する点と双方の診断結果に相違があることが難点であり、簡便かつ迅速な新しい診断方法の開発が必要である。

本研究では、と畜場に搬入された馬を対象として多包虫の感染状況を明らかにするために、第1章では軽種馬に加え、これまでに報告がない日本産のポニー種、日本輓系種、北海道和種などの様々な品種の馬、第2章ではカナダから輸入された馬において調査した。さらに、第3章では簡便かつ迅速な遺伝子診断方法として有用である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法により、馬の肝臓結節を用いた多包虫症の新しい診断方法の開発を行い、従来の病理組織学的検査および PCR の結果と比較し、その有用性を評価した。

第1章 日本産の馬の多包虫症に関する疫学的研究

福岡県のと畜場に搬入された日本産の様々な馬に認められた肝臓の灰白色硬結節を用い、病理組織学的検査および遺伝子検査により多包虫の感染状況を調査した。その結果、610頭中39頭の馬を多包虫症と診断し、感染率は6.4% (39/610)であった。また、軽種馬のみならず、これまでに報告がないポニー種、日本輓系種、北海道和種などの品種に多包虫感染が認められ、飼養歴などから北海道で多包虫に感染した可能性が考えられた。

第2章 カナダから輸入された馬の多包虫症に関する疫学的研究

熊本県のと畜場に搬入されたカナダからの輸入馬に認められた肝臓の灰白色硬結節を用い、病理組織学的検査および遺伝子検査により多包虫の感染状況を調査した。その結果、結節を有する

(別紙様式第3号)

馬 150 頭中 10 頭を多包虫症と診断した (6.7%)。また、多包条虫の mitochondrial cytochrome b (*cob*) 遺伝子を標的とする PCR 増幅産物の塩基配列は、オーストリアで分離されたヨーロッパ型の多包条虫遺伝子との相同性が 99~100%であった。多包条虫の遺伝子型から、感染地は日本よりカナダである可能性が高いと考えられた。

第3章 馬の肝臓結節を用いた LAMP 法による多包条虫の *cob* 遺伝子の簡便かつ迅速な検出方法の開発

馬の食肉検査での簡便かつ迅速な多包虫症の検出を目的とし、多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法の確立を行った。多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いて最適な LAMP 法の条件検討を行ったところ、64°C30 分での増幅が最適な条件であった。さらに、第2章で用いた 41 頭の馬の肝臓結節から抽出した DNA を用いて LAMP 法を実施した結果、従来の病理組織学的検査およびコンベンショナル PCR の結果と完全に一致した。また、段階希釈したプラスミド検体を用いて LAMP 法を実施した結果、検出限界遺伝子のコピー数は 135 コピー/ μ l であった。本研究で確立した LAMP 法は従来の病理組織学的検査および PCR とほぼ同等の精度を有し、かつ 30 分で遺伝子診断が可能であり、多包虫症の流行地での馬の食肉検査において PCR に代わる簡便かつ迅速で有用な診断方法となり得る。

本研究では以下のような知見が得られ、これらの知見は、今後、食肉検査などの公衆衛生行政に有用な知見となることが示唆された。

1. 病理組織学的検査および遺伝子検査の結果、日本産の様々な品種の馬における多包虫の感染状況が明らかとなった。
2. 病理組織学的検査および遺伝子検査の結果、カナダから輸入された馬における多包虫の感染状況が明らかとなった。また、PCR 増幅産物の塩基配列の解析により、ヨーロッパ型の多包条虫遺伝子と一致した。
3. 多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法を確立し、馬の食肉検査において PCR に代わる簡便かつ迅速で有用な診断方法となり得る。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	一二三 達郎
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 三好 宣彰
	副査：鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査：山口大学 教授 森本 将弘
	副査：鹿児島大学 准教授 畑井 仁
題目	日本産およびカナダから輸入された食用馬の多包虫症に関する疫学的研究
<p>審査結果の要旨：</p> <p>多包条虫 (<i>Echinococcus multilocularis</i>) は北アメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの北半球に広く分布しており、幼虫である多包虫寄生による多包虫症は人獣共通感染症である。多包条虫は終宿主である犬、キツネ、コヨーテと中間宿主である野ネズミとの間に生活環が形成されている。馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり、終宿主動物から糞便内に排泄された多包条虫の虫卵の経口摂取により感染し、幼虫である多包虫が肝臓に寄生して病変を形成する。山形県のと畜場に搬入された日本産のサラブレッド種にみられた肝臓の灰白色結節から多包虫感染が高率に認められているが、と畜場に搬入されるサラブレッド種以外の品種の馬や日本国外からの輸入馬における多包虫感染の実態は明らかにされていない。また、馬の多包虫症の診断は病理組織学的検査および PCR により行われているが、診断に時間を要する点と双方の診断結果に相違があることが難点であり、簡便かつ迅速な新しい診断方法の開発が必要である。</p> <p>申請者は、と畜場に搬入された馬を対象として、多包虫の感染状況を明らかにするために、第 1 章では軽種馬に加え、これまでに報告がない日本産のポニー種、日本輓系種、北海道和種などの様々な品種の馬において調査し、第 2 章ではカナダから輸入された馬において調査した。さらに、第 3 章では簡便かつ迅速な遺伝子診断方法として有用である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法により、馬の肝臓の結節を用いた多包虫症の新しい診断方法の開発を行い、従来の病理組織学的検査および PCR の結果と比較してその有用性を評価した。</p> <p>第 1 章では、日本産の馬の多包虫症に関する疫学的研究について、福岡県のと畜場に搬入さ</p>	

2,000 字以内

れた日本産の様々な馬に認められた肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査による多包虫の感染状況を調査した。その結果、610 頭中 39 頭の馬を多包虫症と診断し、感染率は 6.4% (39/610) であった。また、軽種馬のみならず、これまでに報告がないポニー種、日本輓系種、北海道和種などの品種に多包虫感染が認められ、飼養歴などから北海道で多包虫に感染した可能性が考えられた。

第 2 章として、カナダから輸入された馬の多包虫症に関する疫学的研究について、熊本県のと畜場に搬入されたカナダからの輸入馬に認められた肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査による多包虫の感染状況を調査した。その結果、結節を有する馬 150 頭中 10 頭を多包虫症と診断した (感染率: 6.7%)。また、多包条虫の mitochondrial cytochrome b (*cob*) 遺伝子を標的とする PCR 増幅産物の塩基配列は、オーストリアで分離されたヨーロッパ型の多包条虫の遺伝子との相同性が 99~100% であった。多包条虫の遺伝子型から、感染地は日本よりもカナダである可能性が高いと考えられた。

第 3 章として、馬の肝臓結節を用いた LAMP 法による多包条虫の *cob* 遺伝子の簡便かつ迅速な検出方法の開発について、多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法の確立を行った。多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いて最適な LAMP 法の条件検討を行ったところ、64°C 30 分間での増幅が最適な条件であった。さらに、第 2 章で用いた 41 頭の馬の肝臓結節から抽出した DNA を用いて LAMP 法を実施した結果、従来の病理組織学的検査およびコンベンショナル PCR の結果と完全に一致した。また、段階希釈したプラスミド検体を用いて LAMP 法を実施した結果、検出限界遺伝子のコピー数は 135 コピー/ μ l であった。本研究で確立した LAMP 法は従来の病理組織学的検査および PCR とほぼ同等の精度を有し、さらに 30 分間で遺伝子診断が可能であり、多包虫症の流行地での馬の食肉検査において PCR の代替となる簡便かつ迅速で有用な診断方法となった。

本研究では、以下のような成果が得られた。(1) 病理組織学的検査および遺伝子検査の結果、日本産の様々な品種の馬における多包虫の感染状況を明らかにした。(2) 病理組織学的検査および遺伝子検査の結果、カナダから輸入された馬における多包虫の感染状況を明らかにするとともに、PCR 増幅産物の塩基配列の解析により、ヨーロッパ型の多包条虫遺伝子との一致を証明した。(3) 多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法を確立し、馬の食肉検査において PCR の代替となる簡便かつ迅速で有用な診断方法を開発した。これらの成果は、今後、食肉検査などの公衆衛生行政への貢献に有用な知見となることが期待される。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の論文として妥当なものであると判断された。