

*Encephalitozoon* の感染経路に関する研究

塚田 竜介

平成 26 年度

ZOONOTIC POTENTIAL OF  
*ENCEPHALITOOZON* SPECIES

Ryusuke TSUKADA

2014

*Encephalitozoon* の感染経路に関する研究

塚田 竜介

審査委員

主査 伊藤 直之

副査 宝達 勉

岡村 雅史

## 目 次

序 論	1
第 I 章	
ネコにおける <i>Encephalitozoon cuniculi</i> 感染の血清学的調査	
1. 緒 論	6
2. 研究材料および方法	9
(1) 血液サンプル	
(2) GST 融合 Polar Tube Protein-2 組換えタンパク質の作製	
(3) <i>E. cuniculi</i> 血清抗体の検出	
(4) <i>Toxoplasma gondii</i> 血清抗体の検出	
(5) FIV 血清抗体および FeLV 血清抗原の検出	
(6) 猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) 血清抗体の検出	
(7) FCoV 血清抗体の検出	
(8) 検定	
3. 研究成績	14
4. 考 察	16

## 第Ⅱ章

### 野ネズミ類における *Encephalitozoon* の分子疫学調査

1. 緒論	20
2. 研究材料および方法	23
(1) サンプル	
(2) DNA 抽出	
(3) Nested PCR	
(4) 塩基配列の決定	
3. 研究成績	26
4. 考察	28
総括	31
参考文献	38
謝辞	56

### 付表および付図

## 序論

*Encephalitozoon* spp. が属する偏性細胞内寄生性の微孢子虫類は、144 属 1,200 種以上存在し、その地理的分布は世界各地に及んでいる [41, 44, 70]。

*Encephalitozoon* 症は、ヒトにおける動物由来感染症としても重要視されており、近年 Human Immunodeficiency Virus (HIV) 感染による免疫不全患者のみならず、臓器移植患者、若齢者、高齢者等で日和見感染症として増加傾向にある [16, 17, 23, 41]。ヒトへの感染として、*Encephalitozoon hellem*、*E. intestinalis* および *E. cuniculi* が報告されており [18, 25, 75]、WHO は *E. hellem* および *E. cuniculi* を新興感染症として紹介している [26]。主な宿主として *E. hellem* はヒトや鳥類など、*E. intestinalis* はヒト、イヌ、ブタなどの家畜類、*E. cuniculi* はウサギ、イヌ、ヒト、齧歯類などの哺乳動物に幅広く感染することが知られている [18, 19, 86]。

臨床症状として、ヒトにおいて小腸、肝臓、肺、腎臓、鼻腔、すい臓に感染がみられることから、下痢、発熱、腎不全、肺炎などを引き起こす [41, 55, 56, 59, 80]。一方、愛玩動物においては、特に飼うウサギで *E. cuniculi* の感染報告が多く、腎臓、肝臓、脳、肺、眼に感染することから、神経症状、ブドウ膜炎、腎炎などの臨床症状がみられる [18, 46, 48, 56]。

*Encephalitozoon* 症の診断は、間接蛍光抗体法 (IFAT) や enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) などの血清学的検査および polymerase chain reaction (PCR) 法などの分子学的

手法が用いられている[5, 18, 39, 47]。また、組織学的検査において、quick-hot Gram-chromotrope 染色により、哺乳動物および鳥類の糞便から spore が検出されている[6]。

*Encephalitozoon* 症の治療として、ウサギにおいてステロイドおよびエンロフロキサシン、テトラサイクリン系抗生物質またはフェンベンダゾールの混合使用が有効であったとの報告がある[47, 49]。さらに、ヒトにおいてはアルベンダゾールが最も治療効果が高かったと報告されているが[18, 47]、未だ *Encephalitozoon* 症の効果的な治療法は確立されていない。

*Encephalitozoon* spp. の生活環は、宿主体内に感染した spore から微孢子虫類が持つ特異的器官である polar tube を宿主細胞膜に挿入し、spore の内容物 (sporoplasm) を細胞質内へ注入する。その後、増殖期であるメロゴニー期、spore 形成期であるスポロゴニー期を経て、感染性を有する spore へと成熟する[24, 43, 53, 87]。この spore は宿主動物が生活する環境中に存在し、経口または経鼻摂取することにより、ヒトや動物に感染する[18, 88]。その後、腎臓、脳、肺などの臓器に播種性に広がり、感染臓器の細胞内でシストが崩壊すると、中から spore が放出され、その一部は糞便、尿中から環境中へと放出される[41, 52, 71]。Spore は  $1.0\text{-}3.0\mu\text{m} \times 1.5\text{-}4.0\mu\text{m}$  で卵形の孢子であり、温度や水などに抵抗性を示し、次の宿主に感染するまでの数か月間、環境中で生存する [18, 19, 27, 52, 56, 86]。

*Encephalitozoon* spp. の自然界における宿主への感染経路は未だ不明な点が多いが、チェコやアイスランドのハツカネズミやスイスのドブネズミから *Encephalitozoon* spp. が検出されてい

る[61]。また、スペインでは浄水場などの水で *Encephalitozoon* spp. を含む微孢子虫類の spore が検出され[37]、アイスランドでは、最終的に飲用水となる地表水やその流出する湿地帯が、*Encephalitozoon* spp. に感染した齧歯類により汚染されていると報告されている[31]。また、野ネズミ類を捕食する食肉類、猛禽類で *E. cuniculi* の感染報告があることから[52, 61]、野ネズミ類は野生動物の *Encephalitozoon* 感染にレゼルボアとして重要な役割を果たす可能性があると考えられたが、我が国での、野ネズミ類における *Encephalitozoon* spp. に関する調査は行われていない。

さらに、愛玩動物においては、*Encephalitozoon* spp. に感染したウサギについてアメリカ、オーストラリア、ヨーロッパ等の国々で疫学調査報告があり[11, 12, 72, 82]、イヌについてもアメリカ、ヨーロッパ等で報告されている[13, 20, 38, 77]。アジアにおいては、台湾のウサギ、韓国のモルモットおよびウサギで *Encephalitozoon* 症の感染報告があり[50, 65, 81]、我が国においても、飼いウサギ[35]、飼いイヌ[74]、リスザル[1]で *E. cuniculi* 感染の報告がされている。イヌと同じく愛玩動物として飼育頭数が多いネコでは、アメリカやヨーロッパ等で感染報告があり[2, 32, 34, 48, 67]、その疫学調査は、アメリカ、スロバキア、オーストリア、イギリスで報告されている[2, 32, 34, 58]。しかし、その他の地域では、ネコにおける *Encephalitozoon* spp. の疫学調査は行われておらず、我が国においても調査報告はない。

このように、*Encephalitozoon* spp. は幅広い宿主に感染することが知られており、その感染経路として感染宿主から環境中に放



出された *spore* を経口または経鼻摂取することで感染する水平感染が考えられている [58]。また、これまでヒトへの感染経路として、飼育するイヌおよびウサギがレゼルボアと考えられていたが [58]、近年、飼いネコの便中から放出された *spore* により、HIV 患者である飼育者への *Encephalitozoon* 感染が疑われた事例が初めて報告された [85]。

しかし、愛玩動物への感染経路や、ヒトや愛玩動物への感染経路に他の動物が関与する可能性など、*Encephalitozoon* spp. の感染経路には未だ不明な点が多く、予防対策は確立していない。感染症の予防は、感染源、感染経路、感受性宿主の 3 要因に対して実施され [40, 90]、感染源となり得る動物種およびそれらの動物における感染状況の把握は、感染症予防対策を講ずるために不可欠である。さらに、感染経路の解明、感受性宿主の把握は感染拡大防止の観点からも重要となる。

我が国における *Encephalitozoon* 感染の報告は、ウサギ、イヌ、リスザルにおいて *E. cuniculi* 血清学的調査 [1, 26, 35, 74] が行われている。さらに、動物園のふれあい施設のウサギにおいて *E. cuniculi* の発生が報告されている [26]。これらのことから、*E. cuniculi* は既に我が国に広く浸潤し、ヒトへの感染の危険性も高いと考えられたが、その他の宿主における調査報告はない。特に、ヒトと接触する機会が多く飼育頭数の多いネコや、野生動物の *Encephalitozoon* 感染にレゼルボアとして重要な役割を果たすと考えられる野ネズミ類における調査報告はなく、詳細な感染状況は不明である。ヒトにおいては、我が国で *E. cuniculi* 感染の報告はあるが [29, 57]、*E. hellem* および *E. intestinalis* はこれ

まで確認されていない。近年、我が国の愛玩動物の飼育頭数は増加傾向を示し、学校飼育動物や動物介在療法等への動物の関与により愛玩動物、特にイヌ、ネコ、ウサギとヒトとの関係は距離、時間共に緊密なものとなってきている[10, 90]。以上のことから、我が国における *Encephalitozoon* 感染の未報告宿主であるネコおよび野ネズミ類について疫学調査を行う事は、それらの動物の感染状況や感染経路の推測を可能にし、*Encephalitozoon* 症の予防対策を構築するために重要である。

本研究の第 I 章では、*Encephalitozoon* 属の中で、最も幅広い宿主をもつ *E. cuniculi* について、我が国のネコにおける血清学的調査を行い、感染状況の把握と、性別ならびに飼育環境の違いが感染率に与える影響について比較検討を行なった。

次に、ネコ同士のケンカ等による咬傷感染や接触感染の可能性について検討するため、感染経路がある程度明らかになっている Feline immunodeficiency virus (FIV)、Feline leukemia virus (FeLV) および Feline coronavirus (FCoV) の血清学的調査を行った。さらに、ネズミ類の捕食によって経口感染する経路の可能性を推察するため、*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) の血清学的調査を行った。

第 II 章では、野ネズミ類における *Encephalitozoon* 感染の分子疫学調査を実施し、野ネズミ類が自然界において *Encephalitozoon* spp. のレゼルボアとなる可能性について検討した。

## 第 I 章

### ネコにおける *Encephalitozoon cuniculi* 感染の血清学的調査

#### 1. 緒論

*E. cuniculi* は偏性細胞内寄生性の微孢子虫類で、ヒトにおける動物由来感染症の病原体としても注目されており、免疫不全患者や臓器移植患者などで感染が報告されている[4, 6, 17, 20, 43, 47, 51, 52, 55, 56, 59, 60, 61, 64, 67, 68, 69, 70, 71, 74, 78, 83]。動物では、*E. cuniculi* の主な宿主はウサギやイヌ、齧歯類とされているが[18, 47, 74]、ネコ等の哺乳動物、鳥類等にも感染し、*E. cuniculi* は *Encephalitozoon* 属の中で最も幅広い宿主に感染することが知られている[41, 47, 70]。

一方、我が国の愛玩動物における *E. cuniculi* 感染は、飼いうサギ、飼いイヌで血清学的調査が行われており、その感染率はそれぞれ 29.7%および 21.8%と報告されている[35, 74]。我が国では、ネコもイヌやウサギと同様に愛玩動物として飼育頭数が多く、近年は動物介在活動等によりヒトと接触する機会も多い[10, 90]。さらに、その飼育形態は、室内飼育や屋外飼育など様々であり、特に屋外飼育のネコは屋外を自由に徘徊し、行動範囲も広く、時には野生動物を捕食することも考えられる。また、自然界とヒトが生活する圏内を行き来する飼育形態は、新たな思いもよらない動物由来感染症をヒトに感染させる危険性が考えられる。しかし、我が国のネコにおける血清学的手法を用いた *E. cuniculi* の疫学調査に関する報告ははなく、感染状況は不明である。海外のネコ

における報告では、アメリカ、オーストリア、スロバキアおよびイギリスで *E. cuniculi* 感染が確認されており [2, 32, 34, 58]、その陽性率は 6.5%、2.0%、23.6% および 0% であった。これまで *E. cuniculi* 感染経路として、感染宿主から放出された spore を介する水平感染が考えられていたが [32]、近年、垂直感染を指摘する報告もあり [2]、未だ感染経路は不明な点が多い。さらに、これまでの *E. cuniculi* に関する報告は、野生動物に比べ飼育動物や実験動物で調査報告が多く [35, 48, 58]、我が国においても宿主の性別や飼育環境の違いが *E. cuniculi* の感染に与える影響は不明である。

*E. cuniculi* が属する微孢子虫類は、spore の内容物 (sporoplasm) を細胞質内へ注入するために polar tube といわれる特異的な器官を持っている [3, 24, 28, 74, 89]。この Polar Tube Proteins (PTPs) は *Ameson michaelis*, *Encephalitozoon* spp., *Glugea americanus* および *Glugea atherinae* で確認されている [24, 74]。 *E. cuniculi* においては、PTP1、PTP2、PTP3 の 3 種類の PTPs が明らかにされており [15, 66, 74]、ELISA による *E. cuniculi* 特異的抗原として有用とされている [15, 66, 74]。また、佐々木ら [74] によって、PTP2 を抗原として用いた ELISA により我が国のイヌにおける *E. cuniculi* 血清学的調査が行われ、*E. cuniculi* 特異的抗原としての有用性が報告された。

本研究では、我が国において新たな宿主同定のため、イヌ、ウサギとともに愛玩動物として飼育頭数が多く、ヒトとの関係が深いネコにおける *E. cuniculi* 感染状況を、PTP2 組換えタンパク質を抗原とした ELISA を用いて血清学的な調査を行った。さら

に、性別や飼育環境の違いが *E. cuniculi* の感染に与える影響について比較検討を行なった。

次に、ネコ同士のケンカ等による咬傷感染や接触感染の可能性について検討するため、感染経路がある程度明らかになっている FIV、FeLV および FCoV の血清学的調査を行った。さらに、ネズミ類の捕食によって経口感染する経路の可能性を推察するため、*T. gondii* の血清学的調査を行った。

## 2. 研究材料および方法

### (1) 血液サンプル

2011 年 9 月から 2012 年 9 月までの間に長野県内の動物病院において血液採取したネコを対象に調査を行った。それぞれの試験に供した検体数、個体の性別および飼育環境は表 1 に示した。サンプル量が不足する検体は除外した。飼育環境は、飼い主がいないネコをノラネコと分類し、食事を与えられ屋内外を自由に出入りするネコを飼いネコと分類した。しかし、血液採取したネコの年齢や病歴、ワクチン歴などの詳細は不明であった。採取した全血から血清を分離し、ELISA を行うまで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### (2) GST 融合 Polar Tube Protein-2 組換えタンパク質の作製

佐々木ら [74] の方法に従い、Glutathione S-transferase (GST) 融合 Polar Tube Protein-2 組換えタンパク質 (GST-PTP2 組換えタンパク質) の作製を行った。

すなわち、PTP2 遺伝子を増幅するため、プライマーを設定し PCR を行った [表 2]。PCR 産物を pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, CA, USA) に PTP2 遺伝子を挿入し、クローニングを行った。クローニング後、大腸菌発現用ベクターである pGEX4T-1 発現用 vector (GE Healthcare UK Ltd., England) に遺伝子を挿入し、1 mM の Isopropyl- $\beta$ -Dthiogalactopyranoside で誘導後、*E. coli* JM109 で発現させた。GST 融合タンパクとし

て発現させた *E. cuniculi* PTP2 を MicroSpin GST Purification Module (GE Healthcare UK Ltd., England) を用いて精製し、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis (SDS-PAGE) により分子量の確認を行った。得られた GST-PTP2 組換えタンパク質を抗原として ELISA を行った [36, 74]。

### (3) *E. cuniculi* 血清抗体の検出

得られた血液サンプル 305 検体のうち検体量が確保できた 300 検体において、*E. cuniculi* 血清抗体の検出を実施した。

GST-PTP2 組換えタンパク質を抗原として、等量の吸着バッファー (100mM carbonate-bicarbonate buffer[pH9.6]) を加え、96 穴 ELISA プレート (Nunc, Denmark) に抗原量 1 $\mu$ g を 50 $\mu$ l/well 播種し、4 $^{\circ}$ C で一晩固相化した [72]。その後、0.05% Tween20 添加 TBS で 3 回洗浄し、3% skim milk 添加 PBS を 100 $\mu$ l/well を加え、37 $^{\circ}$ C 60 分間で静置しブロッキングを行った。ブロッキング後、洗浄し、1 次抗体として 3% skim milk 添加 PBS で 400 倍希釈した血清を 50 $\mu$ l/well 加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。反応後、洗浄し、2 次抗体として Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ネコ IgG ヤギ抗体 (Cappel, USA) を 3%skim milk 添加 PBS で 10,000 倍希釈したものを 50 $\mu$ l/well 加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。反応後、洗浄し、基質 (0.1 M citric acid、0.2 M sodium phosphate 、 0.003 %  $H_2O_2$  、 0.3 mg/ml 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ; Sigma, USA) を 100  $\mu$ l/well 加え、遮光条件下で 37  $^{\circ}$ C、60 分間反応させ、波長 405nm

で optical density (OD) を測定した。Cut off 値は、*Encephalitozoon* 非感染ネコを陰性検体とし、その血清における OD 値より AVE+2SD とした。

#### (4) FIV 血清抗体および FeLV 血清抗原の検出

得られた血液サンプル 305 検体のうち検体量が確保できた 297 検体において、FIV 血清抗体および FeLV 血清抗原の検出を実施した。

簡易 ELISA キット (スナップ FeLV /FIV コンボ, IDEXX Lab., USA) を用いて、FIV 血清抗体および FeLV 血清抗原の検出を使用方法に従って行った。

#### (5) 猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) 可溶化抗原の作製

FCoV 血清抗体の検出に使用するため FIPV 可溶化抗原の作製を行った [79]。すなわち、FIPV79-1146 株感染猫胎児株化細胞 (fcwf-4 細胞) の培養上清を 30% ショ糖溶液の上に重層し、77,000 ×g (RPS 28 roter, HITACHI Co., Ltd., Japan) で 2 時間遠心分離した。ウイルスを含むペレットに 1/500 量の NTE buffer (0.1M NaCl, Tris-HCl, 0.001M EDTA, pH4) を加え、浮遊させた。この材料を 0.1% TritonX-100 で 4℃、30 分間処理したものを FIPV 抗原として ELISA に使用し、FCoV 血清抗体の検出を行った。

#### (6) FCoV 血清抗体の検出



得られた血液サンプル 305 検体のうち検体量が確保できた 303 検体において、FCoV 血清抗体の検出を実施した。

ELISA 用プレートに炭酸 buffer ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5.3g/ml、 $\text{NaHCO}_3$  4.2mg/ml、pH 9.6)で希釈した FIPV79-1146 株可溶化抗原を 100 $\mu\text{l}$ /well 分注し 4℃で一晩固相化した[79]。洗浄液 (0.02% Tween20 添加 PBS) で 3 回洗浄後、血清希釈液 (0.05% Tween20 添加 10%FBS 添加 PBS) で 100 倍希釈した血清を 100 $\mu\text{l}$ /well 加え、37℃で 60 分間反応させた。反応後、洗浄液で 3 回洗浄し peroxidase 標識抗ネコ IgG ヤギ血清 (MP Biomedicals., USA) 100 $\mu\text{l}$ /well 加え、37℃で 30 分間反応させた。その後、洗浄液にて 3 回洗浄し基質液 (0.2M リン酸 buffer25ml、0.1M クエン酸 buffer25ml、o-phenylenediamin 20mg、30% $\text{H}_2\text{O}_2$  10 $\mu\text{l}$ )を 100 $\mu\text{l}$  加え、暗所にて 25℃で 20 分間反応させた。反応終了後、停止液 (3N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 100 $\mu\text{l}$  加え、波長 495nm で OD 値を測定した。OD > 0.1 を陽性とした。

#### (7) *Toxoplasma gondii* 血清抗体の検出

得られた血液サンプル 305 検体において、*T. gondii* 血清抗体の検出を実施した。

ラテックス凝集キット (トキシテスト-MT, Eiken Chemical Co.,Ltd., Japan) を用いて、*T. gondii* 血清抗体の検出を使用手法に従って行った。

#### (8) 検定

各陽性検体における性別および飼育環境の違いによる有意差の検討は $\chi^2$ 検定により行った。 $P<0.05$ で有意な差が見られるとした。

### 3. 研究成績

*E. cuniculi* 血清抗体について 300 検体で ELISA を実施したところ 19 検体 (6.3%) において抗体陽性であった[表 3]。性別および飼育環境で比較検討したところ、オスで 6.2% (6/97)、メスで 6.4% (13/203) の陽性率を示し[図 1]、ノラネコで 9.0% (12/134)、飼いネコで 4.2% (7/166) の陽性率を示した[図 2]。性別および飼育環境による陽性率に有意な差はなかったが ( $P=0.94$ ,  $P=0.09$ )、飼いネコに比べノラネコで陽性率が高い傾向がみられた。また、FIV 血清抗体および FeLV 血清抗原を 297 検体において調査したところ、それぞれ 10.4% (31/297) および 2.4% (7/297) の陽性率を示した[表 4]。性別で比較したところ FIV においてメス (7.9%、16/201) に比べてオス (15.6%、15/96) で有意に陽性率が高かった ( $P=0.04$ )[図 1]。FeLV においては、オス (4.2%、4/96) とメス (1.5%、3/201) に有意な差はなかった ( $P=0.16$ )[図 1]。飼育環境で比較したところ、FIV および FeLV はそれぞれノラネコで 16.7% (22/132) および 2.3% (3/132) の陽性率を示し、飼いネコで 5.5% (9/165) および 2.4% (4/165) の陽性率を示した[図 2]。FIV において、飼いネコ (5.5%) に比べてノラネコ (16.7%) で有意に陽性率が高かった ( $P=0.001$ )。また、FCoV 血清抗体について 303 検体で調査したところ、71 検体 (23.4%) で抗体陽性であった[表 4]。性別および飼育環境で比較検討したところ、オスで 22.4% (22/98) およびメスで 23.9% (49/205) の陽性率を示し[図 1]、ノラネコで 21.6% (29/134) および飼いネコで 24.9% (42/169) の陽性率を示した[図 2]。性

別および飼育環境の違いによる有意差はなかった ( $P=0.78$ ,  $P=0.51$ )。 *T. gondii* 血清抗体について 305 検体で調査したところ、61 検体 (20.0%) で抗体陽性であった [表 4]。性別および飼育環境で比較検討したところ、オスで 20.4% (20/98) およびメスで 19.8% (41/207) の陽性率を示し [図 1]、ノラネコで 32.8% (44/134) および飼いネコで 9.9% (17/171) の陽性率を示した [図 2]。性別の違いによる有意差はなかったが ( $P=0.90$ )、飼いネコに比べ、ノラネコで有意に陽性率が高かった ( $P=0.00000075$ )。次に、*E. cuniculi* 血清抗体に陽性を示した 19 検体について [表 5]、他の感染症と飼育環境における関連性を検討したところ、*E. cuniculi* のみに陽性を示した検体は 6 検体で、ノラネコ 3 検体、飼いネコ 3 検体であった [表 6]。FCoV と陽性を示した検体は 6 検体で、うち 4 検体が飼いネコであった。FIV および FeLV と陽性を示した検体は、それぞれ 3 検体および 0 検体で、FIV と陽性を示した 3 検体はノラネコであった [表 6]。

#### 4. 考察

ネコにおける *Encephalitozoon* 症は稀であると言われているが[7]、発症すると腎不全、白内障などの臨床症状を示す [2, 9, 51, 54, 67, 84]。 *Encephalitozoon* spp. の感染経路は、一般的に感染宿主から放出された spore を介する水平感染が考えられており、レゼルボアとして、ネズミ類の関与も指摘されているが[48]、未だ詳細は明らかになっていない。また、飼いネコから飼い主である HIV 患者が *Encephalitozoon* spp. に感染し、飼いネコの糞便から spore が検出されたことから、糞便を介する感染が疑われた報告もある[85]。

これまで、我が国での *Encephalitozoon* 感染の報告は、飼いうサギ 29.7% [35]、飼いイヌ 21.8% [74] の割合で *E. cuniculi* 陽性の報告がある。本研究から、ネコにおける *E. cuniculi* 抗体陽性率が 6.3% であったことから、我が国のネコにおいて *E. cuniculi* 抗体陽性が初めて確認された。海外においては、アメリカ、オーストリア、スロバキアおよびイギリスのネコにおいて *E. cuniculi* の陽性率はそれぞれ、6.5、2.0%、23.6% および 0% と報告されており [2, 32, 34, 58]、地域によりその分布に違いがあることが考えられた。また、スロバキアにおいて宿主による陽性率が比較されており、ヒト、ウサギ、ネズミ、イヌ、ネコおよびヒツジの *E. cuniculi* の陽性率がそれぞれ、5.7%、41.7%、16%、37.8%、23.6% および 13.6% と宿主によって陽性率に違いがあり、ウサギとイヌで陽性率が高いことが報告されている [32]。我が国においてもウサギ 29.7% [35]、イヌ 21.8% [74] と比較し、ネコで抗体陽性率が

6.3%と低い傾向にあった。

*E. cuniculi* は、rRNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS) 領域における 5'-GTTT-3' のリピート配列により 3 つの遺伝子型があることが知られている [55, 67]。5'-GTTT-3' の 3 回リピートを type I、2 回リピートを type II、4 回リピートを type III と分類されている [21]。それぞれの遺伝子型には宿主特異性があり type I は主にウサギやネズミから分離され、type II はネズミやキツネから分離され、type III はイヌから分離されている [18, 19, 52]。さらに、*E. cuniculi* type には地理的分布に違いがあるとされている [56]。これまで、ネコがどの遺伝子型に主に感染するかは不明であり、地理的分布も明らかにされていないが、レゼルボアとなる感染宿主の分布の違いによる影響も考えられた。今後、ネコにおける遺伝子型の分類について詳細に調べる必要がある。

次に、性別および飼育環境の違いが感染に与える影響について比較検討したところ、オスで 6.2% (6/97) およびメスで 6.4% (13/203) の陽性率を示し、ノラネコで 9.0% (12/134) および飼いネコで 4.2% (7/166) の陽性率を示した。*T. gondii* および FIV で飼いネコに比べノラネコで有意に陽性率が高かったが、*E. cuniculi* において飼育環境による陽性率に有意な差はなかった。*E. cuniculi* 感染宿主は spore を尿や糞便を介して環境中へ放出し [41, 52, 70]、spore は環境中で抵抗性を示すことから [18, 19, 27, 52, 56, 86]、飼いネコであっても感染宿主が飼育環境に入り込むことで感染の機会があると考えられた。さらに、飼い主や他の飼育動物へ感染する可能性も考えられた。また、飼育環境による陽性率に有意な差はなかったが、飼いネコに比べノラネコで陽性率

が高い傾向がみられたため、ノラネコへの感染は、自然界でのレゼルボアである野生動物の捕食が一つの可能性として考えられた。

そこで、感染経路を推定するため、*E. cuniculi* 血清抗体に陽性を示した 19 検体について、他の感染症と飼育環境における関連性を検討したところ、*E. cuniculi* のみに陽性を示したのは 6 検体で、ノラネコ 3 検体、飼いネコ 3 検体であった。FCoV と陽性を示した検体は 6 検体で、うち 4 検体が飼いネコであった。FCoV 感染は、ノラネコや単頭飼育ネコより多頭飼育ネコで感染が多い傾向がある [14]。*Encephalitozoon* 感染においても、飼いネコであっても単頭飼育や多頭飼育などの飼育形態の違いが感染のリスクファクターになり、グルーミングなどの接触感染の可能性が考えられた。また、FIV および FeLV との複合感染がそれぞれ 3 検体および 0 検体と少ないことから、ケンカ等による咬傷感染の可能性は低いと考えられた。ノラネコにおいて *E. cuniculi* と複合感染を示した 9 検体中 7 検体で *T. gondii* に陽性を示した。農場で飼育されるウサギにおいて、*E. cuniculi* 抗体陰性の検体と比較して *E. cuniculi* 抗体に陽性を示した検体で有意に *T. gondii* 抗体に陽性であったとの報告がある [63]。ウサギへの感染原因として、ネコから排泄されたオーシストおよび spore に汚染された食事の摂取が考えられている [63]。これらのことから、ネコにおける屋外での *E. cuniculi* 感染は *Toxoplasma* と類似した感染経路も持つことが考えられ、その媒介にネズミ類の捕食が関与していると推測された。しかし、陽性を示した検体が 19 検

体と少なく、またネコの年齢、病歴や詳細な飼育形態が不明であったため、さらなる検討が必要である。

以上のことから、本研究により、我が国のネコにおける *E. cuniculi* 抗体陽性が初めて確認された。また、性別および飼育環境の違いによる陽性率に有意な差はなかったが、飼いネコと比較してノラネコで陽性率が高い傾向を示した。ノラネコにおいて *E. cuniculi* と *T. gondii* に複合感染を示す割合が多かったことから、屋外で感染するネコは、*Toxoplasma* と類似した感染経路を持つことが考えられ、その媒介にネズミ類の捕食が関与している可能性が推測された。



## 第 II 章

### 野ネズミ類における *Encephalitozoon* の分子疫学調査

#### 1. 緒論

*Encephalitozoon* 属の中でヒトへの感染として、*E. hellem*、*E. intestinalis* および *E. cuniculi* が報告されている [18, 25, 75]。*E. cuniculi* および *E. intestinalis* の宿主はウサギやイヌ、ネコ等の愛玩動物および人を含めた霊長類や齧歯類と幅広く [56]、*E. hellem* は主にヒトと鳥などに感染する [18]。

I 章において、我が国のネコにおける *E. cuniculi* 血清学的調査を実施したところ、*E. cuniculi* 抗体陽性が初めて確認された。また、ノラネコにおいて *T. gondii* に抗体陽性を示す検体で *E. cuniculi* 抗体陽性を示す検体の割合が多かったことから、屋外で感染するネコは、*Toxoplasma* と類似した感染経路を持つことが考えられ、その媒介にネズミ類の捕食が関与している可能性が推測された。

これまでの報告で、野ネズミ類は、*Encephalitozoon* 感染のレゼルボアとして、その排泄物を介して環境中へ spore を放出し水や土壌を汚染することで *Encephalitozoon* spp. の感染を拡大させていると考えられている [31, 37, 61, 71]。しかし、我が国の野ネズミ類における疫学調査は行われていない。

また、野ネズミ類は、ペスト、*Toxoplasma*、エキノコックス、レプトスピラ、サルモネラなど様々な病原体を媒介することが知られており、その感染経路として、自然界においては肉食動物を

捕食する経口感染が一つの経路として考えられている[22, 45, 76]。また、公衆衛生上、ネズミ類は衛生害虫とされ、家屋へ浸入し排泄等により感染症を伝搬することが考えられている。野ネズミ類の分布として我が国には、主にアカネズミ、ハタネズミ、ヤチネズミ、ドブネズミ等が分布している[22, 45, 76]。

海外での *Encephalitozoon* spp. における野ネズミ類の分子疫学調査や血清学的調査は、チェコにおいて、ハツカネズミから *E. cuniculi* type I および type II、*E. hellem* が検出されている[71]。また、アイスランドのハツカネズミから *E. cuniculi* [33]、スイスのドブネズミからは *E. cuniculi* type II が検出されている[61]。しかし、野ネズミ類の *Encephalitozoon* 感染における病態は不明であり、無症候キャリアーの可能性も指摘されている[26]。I 章において、飼いネコと比較してノラネコで陽性率が高い傾向が見られ、ノラネコにおいて *E. cuniculi* と *T. gondii* に複合感染を示す割合が多かったことから、屋外で感染するネコは、*Toxoplasma* と類似した感染経路を持つことが考えられ、その媒介にネズミ類が重要な役割を果たしていると推測された。野ネズミ類の役割として、肉食動物等に捕食されることにより *Encephalitozoon* spp. の感染を拡大させる直接的なレゼルボアとなる他に、環境中に spore を放出することにより *Encephalitozoon* spp. の感染を拡大させる間接的なレゼルボアとなることが考えられる。

本研究では、我が国における未報告宿主である野ネズミ類の *Encephalitozoon* 感染状況を *Encephalitozoon* spp. の 18S rRNA の ITS 領域に基づいたプライマーを用いた Nested PCR 法

により調査した。加えて、野ネズミ類の組織サンプルを用いて、*Encephalitozoon* 感染における好適寄生部位について検討した。

## 2. 研究材料および方法

### (1) サンプル

2010年に青森県で88検体の野ネズミ類を捕獲した。内訳として、齧歯目のアカネズミが52検体、ヒメネズミが14検体、ハタネズミが10検体、モグラ目のヒミズが11検体、ジネズミが1検体であった。捕獲した野ネズミ類の腎臓および脳組織それぞれ0.03gをDNA抽出のために使用した。性別は84検体で判明し、オス49検体、メス35検体であった。

さらに、2008年と2009年に同地域で捕獲した92検体の野ネズミ類の脳および内臓（心臓、肝臓、腎臓、脾臓、肺の混合）のパラフィン包埋材料をDNA抽出のために用いた。捕獲した野ネズミ類の内訳は、齧歯目のアカネズミ25検体、ヒメネズミ18検体、ハタネズミ43検体、モグラ目のヒミズ5検体、ジネズミ1検体であった。

### (2) DNA 抽出

2010年に捕獲した野ネズミ類88検体の腎臓および脳組織それぞれ0.03gから、Quick-gDNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) を用いてDNAを抽出した。さらに、2008年から2009年に捕獲した野ネズミ類の脳および内臓のパラフィン包埋材料（1×1cm, 5μm）各1枚ずつを2mlチューブに収集し、WaxFree™ DNA (Trim-Gen Co., Sparks, MD, USA) を用いて

DNAの抽出を行った。

### (3) Nested PCR

*E. cuniculi* type I (American Type Culture Collection number 50503 ; ATCC, VA, USA) 、 *E. hellem* (ATCC 50451) および *E. intestinalis* (ATCC 50651) から抽出したDNAをNested PCRの陽性コントロールおよび1 sporeで検出可能かどうか感度を分析するために使用した。

さらに、*Encephalitozoon* 非感染ネズミの組織サンプルから抽出したDNAを陰性コントロールとして使用した。

Nested PCRはITS領域を含む増幅部位として、プライマーを設計した[25, 41, 42] [表7]。Prime STAR HS (TAKARA BIO Co., Ltd., Japan) を用いて、1st PCRは、MSP-1 およびMSP-2A、2nd PCRはMSP-3 および MSP-4A をプライマーとして行った[41]。増幅条件は、初期変性94℃ 5分の後、94℃ 1分、55℃ 30秒、72℃ 1分を40サイクル、最終伸張は72℃ 7分とした。増幅産物は1.5 % TAEアガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromideで染色した。

### (4) 塩基配列の決定

Nested PCRにより増幅したDNAをDNA Clean & Concentration-25 Kit (Zymo Research, CA, USA) を用いて精製した。プライマーMSP-3 およびMSP-4Aを用いたダイレクトシーケンス法により、ABI 3730XL sequence Analyzer (Life

Techunologies, CA, USA) にて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は Genetyx<sup>®</sup> version 8 (Genetyx CO., Tokyo, Japan) により解析した。*E. cuniculi* 陽性検体については、ITS 領域の配列に基づいてタイプ分けを行った。5'-GTTT-3' が3回リピートする配列を type I、2回リピートを type II、4回リピートを type III と分類した [21, 42, 66]。

#### (5) 検定

陽性検体における性別の違いによる有意差の検討は  $\chi^2$  検定により行った。P<0.05 で有意な差が見られるとした。

### 3. 研究成績

陽性コントロールを用いて 1 spore で Nested PCR において *Encephalitozoon* 特異的 DNA を検出できることを確認した[図 3]。また、*Encephalitozoon* 3 種 (*E. hellem*、*E. intestinalis* および *E. cuniculi* type I) それぞれの虫体から抽出した DNA により約 300bp にバンドが得られることを確認した[図 4]。捕獲した野ネズミ類 180 検体のうち、Nested-PCR で *Encephalitozoon* に陽性を示したのは 43 検体 (23.9%) であった[表 8]。さらに陽性 43 検体中、20 検体が *E. cuniculi*、18 検体が *E. hellem*、6 検体が *E. intestinalis* に陽性となった[表 8]。アカネズミ 1 検体において、*E. cuniculi* type I および *E. hellem* の複合感染がみられた[表 8]。ITS 領域におけるリピート配列を検索したところ、14 検体が *E. cuniculi* type I、6 検体が *E. cuniculi* type III であった[表 8]。野ネズミの種類別においては、齧歯目のアカネズミ (32.5%)、ヒメネズミ (12.5%)、ハタネズミ (18.9%) およびモグラ目のヒミズ (25.0%)、ジネズミ (50.0%) から検出された[表 8]。

次に、2010 年に採取した野ネズミ類 88 検体の脳および腎臓を用いて、*Encephalitozoon* 感染における好適寄生部位の検討を行った。*E. cuniculi* type I に陽性を示した野ネズミ類 10 検体中 9 検体は、脳への感染が認められ、1 検体は腎臓への感染が認められた[表 9]。*E. cuniculi* type III に陽性を示した野ネズミ類 5 検体中 5 検体は、脳への感染が認められ、1 検体は腎臓への感染が認められた[表 9]。*E. hellem* に陽性を示した野ネズミ類 13 検体中

5 検体は、脳への感染が認められ、8 検体は腎臓への感染が認められた[表 9]。*E. intestinalis* に陽性を示した野ネズミ類 4 検体中 1 検体は、脳への感染が認められ、3 検体は腎臓への感染が認められた[表 9]。さらに、アカネズミ 1 検体において、*E. cuniculi* type I が脳から、*E. hellem* が腎臓から検出され、複合感染がみられた。また、ハタネズミの 1 検体において、脳と腎臓から *E. cuniculi* type III が検出された[表 9]。

2010 年に捕獲され性別が判明した野ネズミ類 84 検体のうち *Encephalitozoon* spp. に陽性を示した 31 検体について、性別が及ぼす影響を検討したところ、オスでは 19/49 (38.8%)、メスでは 12/35 (34.3%) が陽性を示したが、性別による有意差はなかった。



#### 4. 考察

第 I 章において、我が国のネコで *E. cuniculi* 抗体陽性が初めて確認された。また、ノラネコにおいて *T. gondii* に抗体陽性を示す検体で *E. cuniculi* 抗体陽性を示す検体の割合が多かったことから、屋外で感染するネコは、*Toxoplasma* と類似した感染経路を持つことが考えられ、その媒介にネズミ類の捕食の可能性が推測された。そこで本章では、我が国の野ネズミ類における *Encephalitozoon* 感染の疫学調査を目的に Nested PCR を用いた *Encephalitozoon* 特異的 DNA 検出を行った。その結果、我が国の野ネズミ類の感染率は 23.9%であり、野ネズミ類に分布していることが確認された。また、我が国ではこれまで飼いうサギ、飼いイヌ、リスザルの *E. cuniculi* 感染について報告されていたが [1, 33, 74]、本研究から *E. hellem*、*E. intestinalis* も分布することが確認された。

野ネズミ類は、環境中へ尿や便を介して spore を放出することで *Encephalitozoon* spp. の感染を拡大させていると報告されている [7]。そして spore は温度や水などの環境因子に対して抵抗性があり、環境中で数か月間生存する [52, 56]。海外では、浄水場において *Encephalitozoon* spp. を含む微胞子虫類の spore が検出されたことや [37]、最終的に飲用水となる地表水やその流出する湿地帯が、*Encephalitozoon* spp. に感染した齧歯類により汚染されていると報告されていることから水系感染による可能性も示唆されている [31]。他にも野ネズミ類は *Toxoplasma* や *Cryptosporidium* 感染の媒介者として、農場等様々な場所に生息

し、家畜へ感染症を伝搬している原因となっている[30, 62]。特に *Toxoplasma* は野ネズミ類を介して牛や豚などの家畜に伝搬し、その肉を加熱不十分で喫食することでヒトへ感染する可能性が考えられている[30, 73]。さらに、新鮮な野菜類は野ネズミの排泄物に汚染されている可能性も考えられる[88]。そのため、我が国の野ネズミ類において *Encephalitozoon* 感染が確認されたことは、野ネズミ類がレゼルボアとして、ヒトと動物の間または、動物の間で伝搬を容易にしている可能性が考えられる。また、本研究で調査した齧歯目とモグラ目は、国内の様々な地域で生息が確認されていることから[22, 45, 76]、*Encephalitozoon* spp. が我が国でも広く浸潤していることが考えられ、今後、野ネズミ類の調査地域の範囲を広げて、その分布状況を調べる必要がある。

*E. cuniculi* において遺伝子型を分類したところ type I は 14 検体、type III は 6 検体であった。Type II は主にマウスから分離されるが[18, 19, 52]、本調査では type II は検出されなかった。海外において、type I に感染したウサギはアメリカ、オーストラリア、ヨーロッパで報告があり、type III に感染したイヌはアメリカ、南アフリカで報告がある[8, 12, 72, 77, 82]。しかし、type II はヨーロッパでしか確認されておらず[17, 61]、これらの報告からも、*E. cuniculi* の遺伝子型には地理的分布に違いがあるとされている[56]。本調査においても、type II は確認されなかったことから、我が国において type II が浸潤している可能性は低いと考えられた。ヒトへの *E. cuniculi* 感染は、これまで type I および type III で報告されており[20, 25]、我が国の野ネズミ類において *E. cuniculi* type I および type III が分離されたことで、我が国の野ネ

ズミ類がレゼルボアとして、ヒトへの *E. cuniculi* の感染源となりうることが示された。

野ネズミ類において、脳および腎臓における *Encephalitozoon* 感染の好適寄生部位を検討したところ、*E. cuniculi* に感染したアカネズミ、ハタネズミおよびヒミズにおいて腎臓に比べ脳への寄生の割合が多くみられたことから、*E. cuniculi* における好適寄生部位は脳であると考えられた。野ネズミ類における *E. cuniculi* 感染の病態は不明であるが、脳に寄生し神経症状を呈することで、他の野生動物に捕食されやすくなる可能性が考えられた。さらに、*E. hellem* に感染したアカネズミ、ヒメネズミおよびハタネズミや *E. intestinalis* に感染したアカネズミ、ヒメネズミは、脳に比べて腎臓から多く検出された。しかし、臓器組織や検体数が少なく、今後さらに臓器の種類や検体数を増やして検討する必要がある。

以上、本研究において、我が国の野ネズミ類の齧歯目（アカネズミ、ヒメネズミ、ハタネズミ）およびモグラ目（ヒミズ、ジネズミ）から *E. cuniculi* type I および type III、*E. hellem*、*E. intestinalis* の感染が初めて確認された。また、モグラ目のヒミズ、ジネズミが新たな *Encephalitozoon* spp. の宿主である事が示された。さらに、*Encephalitozoon* 感染の好適寄生部位とされる脳および腎臓において、野ネズミ類の組織検体を用いて比較したところ、*E. cuniculi* は腎臓と比較して主に脳に寄生が多い一方で、*E. hellem*、*E. intestinalis* は脳と比較して主に腎臓に寄生が多いことが推測された。

## 総括

*Encephalitozoon* spp. は、偏性細胞内寄生性の微孢子虫類で、その宿主はウサギやイヌ、ネコ等の愛玩動物をはじめ、齧歯類、鳥類、霊長類と幅広い。特に飼いウサギで *E. cuniculi* 感染報告が多く、運動失調・旋回運動などの神経症状やブドウ膜炎、腎炎などの臨床症状を示す。ヒトにおいては、HIV 感染による免疫不全患者のみならず、臓器移植患者、若齢者、高齢者等で日和見感染症として増加傾向にある。臨床症状は、発熱、下痢、腎不全などで、ヒトにおける動物由来感染症の病原体としても注目されている。また、ネコの *Encephalitozoon* 症は稀であるが、発症すると腎不全、白内障などの臨床症状を示す。しかし、野ネズミ類における *Encephalitozoon* 症の病態は不明である。

我が国における *Encephalitozoon* 感染の報告は、飼いウサギ、飼いイヌ、リスザルで *E. cuniculi* 血清学的調査が行われている。また、ヒトにおいて、我が国では *E. cuniculi* 感染の報告はあるが、*E. hellem*、*E. intestinalis* はこれまで感染が確認されていない。

*Encephalitozoon* spp. の感染経路として感染宿主から環境中に放出された spore を経口または経鼻摂取することで感染する水平感染が考えられている。特に、*E. cuniculi* のヒトへの感染経路として、愛玩動物して飼育されるイヌおよびウサギがレゼルボアと考えられていたが、近年、飼いネコから HIV 患者である飼い主へ *Encephalitozoon* 感染が疑われた事例が報告された。ネコは我が国においても飼育頭数が多く、イヌやウサギとともにヒトと接

触する機会が多い。また、動物介在療法や動物介在活動などで、医療機関や社会福祉施設等を訪問し、免疫が低下した患者や高齢者と接触する機会も多い。さらに、ネコは愛玩動物として飼育される一方で、ノラネコとして自然界とヒトが生活する圏内を行き来するなど飼育形態も様々である。また、ネコに捕食される野ネズミ類において、海外では野生動物におけるレゼルボアとして重要な役割を果たしていると報告がある。しかし、我が国におけるネコや野ネズミ類の *Encephalitozoon* spp. に関する血清学的な調査はこれまで報告されていない。そこで、我が国における *Encephalitozoon* 感染の未報告宿主であるネコおよび野ネズミ類の疫学調査を行う事は、それら動物における感染状況や感染経路の推測を可能にし、*Encephalitozoon* 症の予防対策を構ずるために重要であると考えた。本研究は、我が国のネコにおける *Encephalitozoon* spp. による感染の血清学的調査を行い、感染状況の把握と、性別ならびに飼育環境の違いが感染率に与える影響について比較検討するとともに、野ネズミ類の分子疫学調査を行い、それらが自然界においてレゼルボアとなる可能性について評価することを目的とした。

第 I 章では、*Encephalitozoon* 属の中で最も幅広い宿主に感染することが知られている *E. cuniculi* において、我が国における新たな宿主同定のため、イヌやウサギとともに愛玩動物として飼育が多く、ヒトとの関係が深いネコにおける *E. cuniculi* による感染の血清学的調査を行い、感染状況の把握と、性別ならびに飼育環境との関連性について検討を行なった。さらに、ネコ同士の *E. cuniculi* 感染経路解明の一助とするため、感染経路が明らか

になっている他の感染症を併せて調査することで、*Encephalitozoon* 感染との関連性について比較検討した。

そこで、ネコ同士のケンカ等による咬傷感染や接触感染の可能性について比較検討するため、感染経路がある程度明らかになっている FIV、FeLV および FCoV の血清学的調査を行った。さらに、ネズミ類の捕食による経口感染の可能性について比較検討するため、*T. gondii* の血清学的調査を行った。ネコ 300 検体の血清を用いて、GST 融合 PTP2 組換えタンパク質を抗原として ELISA を実施したところ、19 検体（6.3%）において *E. cuniculi* 抗体に陽性を示し、我が国のネコにおいて初めて *E. cuniculi* 抗体陽性が確認された。海外の報告では、アメリカ、オーストリア、スロバキアおよびイギリスのネコにおいて *E. cuniculi* の陽性率はそれぞれ、6.5%、2.0%、23.6% および 0% と報告されており、地域により分布に差があることが考えられた。*E. cuniculi* は、18S rRNA 遺伝子の ITS 領域における 5'-GTTT-3' のリピート配列により type I、type II、type III に分類されている。*E. cuniculi* の type 分類には地理的分布に違いがあるとされているが、ネコがどの遺伝子型に主に感染するかは不明である。さらに、地域による陽性率の違いは、レゼルボアとなる感染宿主の分布の違いによる影響も考えられた。今後、ネコにおける遺伝子型の分類について詳細に調べる必要がある。性別による陽性率の違いについて比較したが、有意な差はなかった。飼育環境については、飼い主がいないネコをノラネコと分類し、食事は与えられるが、屋内外を自由に出入りするネコを飼いネコと分類して陽性率を比較検討した。飼育環境における陽性率に有意な差はなかったが、ノラネ

コにおいて飼いネコと比べ、陽性率が高い傾向にあった。このことから、ノラネコへの感染はレゼルボアである野生動物の捕食が一つの可能性として考えられた。さらに、*E. cuniculi* 陽性の 19 検体のうち、FIV との複合感染は 3 検体、FeLV とは 0 検体で陽性を示した。FIV および FeLV と複合感染を示す割合が少なかったことから、ケンカ等によるネコ同士の咬傷感染の可能性は低いことが考えられた。さらに、ノラネコにおいて *E. cuniculi* と複合感染を示した 9 検体中 7 検体で *T. gondii* に陽性を示した。ノラネコにおいて *E. cuniculi* と *T. gondii* に複合感染を示す割合が多かったことから、屋外で感染するネコは、*Toxoplasma* と類似した感染経路を持つことが考えられ、その媒介にネズミ類の捕食が関与していると推測された。

第 II 章では、我が国の野ネズミ類における *Encephalitozoon* spp. の分子疫学調査を実施し、自然界においてそれらがレゼルボアとなる可能性について検討した。捕獲した野ネズミ類 180 検体の脳や内臓から Nested-PCR を用いて *Encephalitozoon* 特異的 DNA を検出した。Nested-PCR で *Encephalitozoon* spp. に陽性を示したのは 23.9% (43 検体) であった。陽性を示した全ての検体について遺伝子配列を決定したところ、*E. cuniculi* が 20 検体 (type I が 14 検体および type III が 6 検体)、*E. hellem* が 18 検体、*E. intestinalis* が 6 検体であった。うち、1 検体で *E. cuniculi* type I と *E. hellem* の複合感染があった。野ネズミ類の種類別に見ると、齧歯目のアカネズミ (32.5%)、ヒメネズミ (12.5%)、ハタネズミ (18.9%) およびモグラ目のヒミズ (25.0%)、ジネズミ (50.0%) で感染が確認された。本結果により、我が国の野ネズ

ミ類で初めて *Encephalitozoon* 感染状況が明らかとなり、さらに、モグラ目のヒミズ、ジネズミは新たな *Encephalitozoon* spp. の宿主であることが示された。次に、*Encephalitozoon* spp. の好適寄生部位とされる脳および腎臓を用いた寄生部位の比較検討を行なったところ、*E. cuniculi* type I は脳で 9 検体、腎臓で 1 検体が検出された。*E. cuniculi* type III は脳で 5 検体、腎臓で 1 検体が検出され、うち 1 検体は脳と腎臓から検出された。このことから、野ネズミ類における *E. cuniculi* の好適寄生部位は脳であると考えられた。野ネズミ類における *E. cuniculi* 感染の病態は不明であるが、脳に感染し神経症状を起こすことで、野ネズミ類は他の野生動物に捕食されやすくなる可能性が考えられた。また、*E. hellem* は脳で 5 検体、腎臓で 8 検体、*E. intestinalis* は脳で 1 検体、腎臓で 3 検体が検出された。腎臓に感染し尿中へ spore を排泄する他、便中にも spore を排泄することが知られているため、今後、腸における組織学的検査を検討する必要がある。

我が国の野ネズミ類に感染が確認されたことは、我が国においても野ネズミ類が、その排泄物を介して環境中に spore を放出することにより *Encephalitozoon* spp. の感染を拡大させる間接的なレゼルボアとなる他に、肉食動物等に捕食されることにより *Encephalitozoon* spp. の感染を拡大させる直接的なレゼルボアとなる可能性が強く示唆され、ヒトやネコなどへの感染源となりうることを示された。

さらに、本研究で用いた齧歯目やモグラ目は、我が国でも広く生息しており、また、ネコ以外にも野ネズミ類を捕食する野生動物が多数存在していることから、他の宿主への感染やその分布領



域も広範囲に及んでいる可能性が考えられた。

イヌやネコに代表される愛玩動物は、飼い主と極めて密接な関係を築いている。また、近年では愛玩動物を飼育することによって癒し効果を求める一方で、動物介在療法や動物介在活動などにも積極的に利用されるようになり、伴侶動物として重要な役割を果たしている。さらに、多くの小学校や幼稚園では、動物を通した教育が実践され、ウサギをはじめ様々な動物が飼育されている。しかし、このような愛玩動物を飼育する効用は、飼育することによって動物から人間への健康被害が発生しないことを前提として得られるものであり、その予防を目的とした衛生管理を徹底することが重要であると、厚生労働省における愛玩動物の衛生管理の徹底に関するガイドラインにおいても示されている。さらに、近年、愛玩動物の飼育頭数が増加していること、屋内での飼育が増加していること、高齢者等の免疫低下者による飼育が増加していることで、愛玩動物と飼育者との関係は距離、時間共に緊密なものとなっており、ヒトにおける動物由来感染症が増加する可能性が指摘されている。

ヒトにおける動物由来感染症の感染機会を軽減し、蔓延を予防するために、動物、感染経路、飼育者の3要因に対して対策が必要とされる。動物対策として動物由来感染症の疫学調査等による感染源となり得る動物種および浸潤状況の把握、感染経路対策として感染経路の解明や衛生的な飼育管理、飼育者対策として動物由来感染症に関する知識の普及啓発が求められる。

本研究において、我が国における未報告宿主であるネコおよび野ネズミ類において *Encephalitozoon* 感染が確認されたことか

ら愛玩動物やヒトへの感染防止に向けた予防対策を講ずる必要があることがわかった。さらに、野ネズミ類がヒトやネコ、野生動物等への *Encephalitozoon* 感染拡大にレゼルボアとして重要な役割を果たしていることが考えられ、またネコ以外にも野ネズミ類を捕食する野生動物が多数存在していることから、*Encephalitozoon* spp. が我が国でも広く浸潤している可能性が考えられた。

そのため、*Encephalitozoon* 症に対する認識を高めるとともに、特に注意を必要とする免疫不全患者や、イヌやネコ、ウサギなどの愛玩動物の飼育者等に対して適切な知識を普及し、動物との接し方や適正飼育など普及啓発に役立つと考えられた。さらに、我が国の公衆衛生上重要な課題であるヒトにおける動物由来感染症予防対策に対し、大きく寄与することが期待された。

今後、さらに各種動物での発生状況や浸潤状況、ヒトや動物種間での感染の可能性を調査することで、我が国における *Encephalitozoon* 症の浸潤状況や病態のさらなる解明につなげることができると期待された。

## 参考文献

1. Asakura, T., Nakamura, S., Ohta, M., Une, Y. and Furuya, K. 2006. Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitol. Int.* 55: 159-162.
2. Benz, P., Maass, G., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Tichy, A. and Nell, B. 2011. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Vet Ophthalmol.* 1: 37-47.
3. Bigliardi, E. and L, Sacchi. 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection.* 3: 373-379.
4. Boldorini, R., Monga, G., Tosoni, A., Didier, E. S., Nebuloni, M., Costanzi, G., Mazzucco, G. and Orenstein, J. M. 1998. Renal *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS. Post-mortem identification by means of transmission electron microscopy and PCR. *Virchows Arch.* 432: 535-539.
5. Boot, R., Hansen, A. K., Hansen, C. K., Nozari, N. and Thuis, H. C. 2000. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab. Anim.* 34:

281-289.

6. Bornay-Llinares, F. J., da Silva, A. J., Moura, H., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Cruz-López, A., Hernández-Jaúregui, P., Guerrero, J. and Enriquez, F. J. 1998. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.* 178: 820-826.
7. Bryan, R. T. 1995. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. *Clin. Infect. Dis.* 21: 62-65.
8. Bürglin, T. R. 2003. The homeobox genes of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) reveal a putative mating-type locus. *Dev. Genes. Evol.* 213: 50-52.
9. Canning, E. U. and Lom, J. 1986. The Microsporidia of Vertebrates. *Academic Press, London*.
10. Cherniack, E. P. and Cherniack, A. R. 2014. The benefit of pets and animal-assisted therapy to the health of older individuals. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 623203.
11. Cox, J. C., Pye, D., Edmonds, J. W. and Shepherd, R. 1980.

- An investigation of *Encephalitozoon cuniculi* in the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia. *J. Hyg. (Lond)*. 84: 295-300.
12. Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S. A. and Arheart, K. L. 2009. Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 70: 478-482.
13. Cray, C. and Rivas, Y. 2013. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in dogs in the United States. *J. Parasitol.* 99: 153-154.
14. Daniels, M. J., Golder, M. C., Jarrett, O. and MacDonald, D. W. 1999. Feline viruses in wildcats from Scotland. *J. Wildl. Dis.* 35: 121-124.
15. Delbac, F., Peuvrel, I., Metenier, G., Peyretailade, E. and Vivares, C. P. 2001. Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of ptp1 and ptp2 genes in three *Encephalitozoon species*. *Infect. Immun.* 69: 1016-1024.
16. Didier, E. S. 2005. Microsporidiosis: an emerging and

- opportunistic infection in humans and animals. *Acta. Trop.* 94: 61-76.
17. Didier, E. S., Didier, P. J., Friedberg, D. N., Stenson, S. M., Orenstein, J. M., Yee, R. W., Tio, F. O., Davis, R. M., Vossbrinck, C., Millichamp, N. and Shadduck, J. A. 1991. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* 163: 617-621.
18. Didier, E. S., Didier, P. J., Snowden, K. F. and Shadduck, J. A. 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect.* 2: 709-720.
19. Didier, E. S., Snowden, K. F. and Shadduck, J. A. 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* 40: 283-320.
20. Didier, E. S., Visvesvara, G. S., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., De Groote, M. A. and Vossbrinck, C. R. 1996. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2835-2837.

21. Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C. and Shadduck, J. A. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*. 111: 411-421.
22. Egi, H., Yamada, M., Tokuda, N. and Yamamoto, M. 2011. Records and distribution of the mammals in Okayama Prefecture. *Bull. Okayama Pref. Nature Conservation Center*. 18 : 1-35.
23. Ferreira, F. M., Bezerra, L., Santos, M. B., Bernardes, R. M., Avelino, I. and Silva, M. L. 2001. Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microbes Infect.* 3: 1015-1019.
24. Franzen, C. 2004. Microsporidia : how can they invade other cells ? *Trends Parasitol.* 20: 275-279.
25. Franzen, C. and Müller, A. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 243-285.
26. Fukui, D., Bando, G., Furuya, K., Yamaguchi, M.,

- Nakaoka, Y., Kosuge, M. and Murata, K. 2012. Surveillance for an outbreak of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits housed at a zoo and biosecurity countermeasures. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 55-61.
27. Furuya, K. 2009. Spore-forming microsporidian *Encephalitozoon* : Current understanding of infection and prevention in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 413-422.
28. Furuya, K., Omura, M., Kudo, S., Sugiura, W. and Azuma, H. 2008. Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol.* 30: 13-21.
29. Furuya, K., Sato, C., Nagano, H., Sato, N. and Uchino, J. 1995. *Encephalitozoon*-like organisms in patients with alveolar hydatid disease: cell culture, ultrastructure, histoimmunochemical localization and seroprevalence. *J Eukaryot Microbiol.* 42: 518-525.
30. Gebremedhin, E. Z., Abdurahaman, M., Hadush, T. and Tessema, T. S. 2014. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats slaughtered for human consumption in Central Ethiopia.



31. Graczyk, T. K., Lucy, F. E., Tamang, L., Mashinski, Y., Broaders, M. A., Connolly, M. and Cheng, H. W. 2009. Propagation of human enteropathogens in constructed horizontal wetlands used for tertiary wastewater treatment. *Appl Environ Microbiol.* 75: 4531-4538.
32. Halánová, M., Cisláková, L., Valencáková, A., Bálent, P., Adam, J. and Trávnicek, M. 2003. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10: 117-120.
33. Hersteinsson, P., Gunnarsson, E., Hjartardóttir, S. and Skírnisson, K. 1993. Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *J. Wildl. Dis.* 29: 341-344.
34. Hsu, V., Grant, D. C., Zajac, A. M., Witonsky, S. G. and Lindsay, D. S. 2011. Prevalence of IgG antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in cats with and without chronic kidney disease from Virginia. *Vet. Parasitol.* 176: 23-26.

35. Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno, A., Kariya, T. and Furuya, K. 2008. High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 1301-1304.
36. Ikadai, H., Nagai, A., Xuan, X., Igarashi, I., Tsugihiko, K., Tsuji, N., Oyamada, T., Suzuki, N. and Fujisaki, K. 2002. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 325-328.
37. Izquierdo, F., Castro Hermida, J. A., Fenoy, S., Mezo, M., González-Warleta, M. and Aguila, C. D. 2011. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res.* 45: 4837-4843.
38. Jamshidi, S. h., Tabrizi, A. S., Bahrami, M. and Momtaz, H. 2012. Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. *Vet. Parasitol.* 185: 2-4
39. Jordan, C. N., Zajac, A. M., Snowden, K. S. and Lindsay, D. S. 2006. Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet. Parasitol.* 135: 235-240.
40. 神山恒夫, 鈴木道雄. 2005. 動物由来感染症対策の3原則. *IASR.* 26: 198-200.

41. Kasicková, D., Sak, B., Kvác, M. and Ditrich, O. 2009. Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet. Parasitol.* 165: 125-130.
42. Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T. and Rinder, H. 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health.* 1: 373-378.
43. Keeling, P. 2009. Five questions about microsporidia. *PLoS. Pathog.* 5: 1000489.
44. Keeling, P. J. and Fast, N. M. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 93-116.
45. Kimura, T., Nagasawa, T., Kunitomo, S., Iwai, M., Ishii, T., Sakaniwa, H. and Takei, I. 2008. Preliminary report on murid rodents in Shimonita-machi and Nanmoku-mura Gunma Prefecture, Japan. *Bull. Gunma Mus. Natu. Hist.* 12 : 87-91.

46. Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Schnik, M., Thalhammer, J. G. and Joachim, A. 2008. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* 151: 115-124.
47. Künzel, F. and Joachim, A. 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol. Res.* 106: 299-309.
48. Künzel, F., Peschke, R., Tichy, A. and Joachim, A. 2014. Comparison of an indirect fluorescent antibody test with Western blot for the detection of serum antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in cats. *Parasitol. Res.* 113: 4457-4462.
49. Lallo, M. A., da Costa, L. F. and de Castro, J. M. 2013. Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57: 3067-3071.
50. Lee, S. Y., Lee, S. S., Lyoo, Y. S. and Park, H. M. 2011. DNA detection and genotypic identification of potentially human-pathogenic microsporidia from asymptomatic pet parrots in South Korea as a risk factor for zoonotic

- emergence. *Appl Environ Microbiol.* 77: 8442-8444.
51. Lobo, M. L., Teles, A., da Cunha, M. B., Henriques, J. Lourenco, A. M., Antunes, F. and Matos, O. 2003. Microsporidia detection in stools from pets and animals from the zoo in Portugal: a preliminary study. *J. of Eukaryot. Microbiol.* 50: 581-582.
52. Malcekova, B., Valencakova, A., Luptakova, L., Molnar, L., Ravaszova, P. and Novotny, F. 2011. First detection and genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*). *Parasitol. Res.* 108: 1479-1482.
53. Mathews, A., Hotard, A. and Hale-Donze, H. 2009. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes. Infect.* 11: 905-911.
54. Mathis, A., Breitenmoser, A. C. and Deplazes, P. 1999. Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite.* 6: 189-93.
55. Mathis, A., Michel, M., Kuster, H., Müller, C., Weber, R. and Deplazes, P. 1997. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits.

- Parasitology*. 114: 29-35.
56. Mathis, A., Weber, R. and Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 423-445.
57. Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H. and Hagiwara, S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *AMA Arch Pathol.* 67: 181-187.
58. Meredith, A. L., Cleaveland, S. C. , Brown, J., Mahajan, A. and Shaw, D. J. 2013. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Wild Rodents, Foxes and Domestic Cats in Three Sites in the United Kingdom. *Transbound Emerg Dis.* 10: 1111-12091.
59. Mertens, R. B., Didier, E. S., Fishbein, M. C., Bertucci, D. C., Rogers, L. B. and Orenstein, J. M. 1997. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis : infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod. Pathol.* 10: 68-77.
60. Millership, J. J., Chappell, C., Okhuysen, P. C. and Snowden, K. F. 2002. Characterization of aminopeptidase

- activity from three species of microsporidia: *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Vittaforma corneae*. *J. Parasitol.* 88: 843-848.
61. Müller-Doblies, U. U., Herzog, K., Tanner, I., Mathis, A. and Deplazes, P. 2002. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet. Parasitol.* 107: 279-285.
62. Murakoshi, F., Fukuda, Y., Matsubara, R., Kato, Y., Sato, R., Sasaki, T., Tada, C. and Nakai, Y. 2013. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Vet. Parasitol.* 196: 184-188.
63. Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovařík, K., Jánová, E. and Koudela, B. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Vet. Parasitol.* 204: 1841-1890.
64. Norton, J. H. and Prior, H. C. 1994. Microsporidiosis in a peach-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*). *Aust. Vet. J.* 71: 23-24.
65. Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., Lee, H. Y., Kim D. J.,

- Cho, J. S., Kim, C. K., Hwang, D. Y. and Park, J. H. 2006. Microbiological monitoring of guinea pigs reared conventionally at two breeding facilities in Korea. *Exp Anim.* 55: 427-432.
66. Pauvel, I., Peyret, P., Metenier, G., Vivares, C. P. and Delbac, F. 2002. The microsporidian polar tube: Evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. Molecular and Biochemical. *Parasitology.* 122: 69-80.
67. Rebel-Bauder, B., Leschnik, M., Maderner, A. and Url, A. 2011. Generalized encephalitozoonosis in a young kitten with cerebellar hypoplasia. *J. Comp. Pathol.* 145: 126-131.
68. Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S., Thomschke, A. and Löscher, T. 1998. Strain differentiation in microsporidia. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23: 433-437.
69. Rossi, P., La Rosa, G., Ludovisi, A., Tamburrini, A., Gomez Morales, M. A. and Pozio, E. 1998. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int. J. Parasitol.* 28: 1361-1366.
70. Sak, B., Kasicková, D., Kvác, M., Kvetonová, D. and



- Ditrich, O. 2010. Microsporidia in exotic birds : Intermittent spore excretion of *Encephalitozoon* spp. in naturally infected budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Parasitol.* 168: 199-200.
71. Sak, B., Kváč, M., Květoňová, D., Albrecht, T. and Piálek, J. 2011. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Vet. Parasitol.* 178: 246-250.
72. Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, LF., Cringoli, G. and Fioretti, A.. 2009. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Res. Vet. Sci.* 87: 67-69.
73. Sarkari, B., Asgari, Q., Bagherian, N., Ashkani Esfahani, S., Kalantari, M., Mohammadpour, I., Ashrafmansori, M., Amerinia, M. and Sabet Sarvestani, F. 2014. Molecular and Serological Evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in Reared Turkeys in Fars Province, Iran. *Jundishapur. J. Microbiol.* 7: e11598.

74. Sasaki, M., Yamazaki, A., Haraguchi, A., Tatsumi, M., Ishida, K. and Ikadai, H. 2011. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in Japanese dogs. *J. Parasitol.* 97: 167-169.
75. Shadduck, JA. and Orenstein, JM. 1993. Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117: 1215-1219.
76. Shida, T. 1983. Notes on the small mammal fauna in the northern slope of Mt. Hakusan. 石川県白山自然保護センター研究報告. 9:57-65.
77. Snowden, K. F., Lewis, B. C., Hoffman, J. and Mansell, J. 2009. *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 45:225-45231.
78. Szabo, J. R. and Shadduck, J. A. 1987. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. *Vet. Pathol.* 24: 99-108.
79. Takano, T., Kawakami, C., Yamada, S., Satoh, R. and Hohdatsu, T. 2008. Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection. *J. Vet. Med.*

- Sci.* 2008 70: 1315-1321.
80. Teachey, D. T., Russo, P., Orenstein, J. M., Didier, E. S., Bowers, C. and Bunin, N. 2004. Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 33: 299-302.
81. Tee, K. Y., Kao, J. P., Chiu, H. Y., Chang, M. H., Wang, J. H., Tung, K. C., Cheng, F. P. and Wu, J. T. 2011. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. *Vet Parasitol.* 183: 68-71.
82. Thomas, C., Finn, M., Twigg, L., Deplazes, P. and Thompson, R. C. 1997. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Aust. Vet. J.* 75: 808-810.
83. Van Heerden, J., Bainbridge, N., Burroughs, R. E. and Kriek, N. P. 1989. Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon pictus*). *J. Wildl. Dis.* 25: 70-75.
84. Van Rensburg, I. B. and Du Plessis, J. L. 1971. Nosematosis in a cat: a case report. *Journal of the South African Veterinary Association.* 42: 327-331.

85. Velásquez, J. N., Chertcoff, A. V., Etchart, C., di Risio, C., Sodré, F. C., Cucher, M. A. and Carnevale, S. 2012. First case report of infection caused by *Encephalitozoon intestinalis* in a domestic cat and a patient with AIDS. *Vet Parasitol.* 190: 583-586.
86. Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A. and Owen, R. L. 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 426-461.
87. Williams, B. A. 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell. Microbiol.* 11: 1551-1560.
88. Wilson, J. M. 1979. The biology of *Encephalitozoon cuniculi*. *Med. Biol.* 57: 84-101.
89. Xu, Y. and Weiss, L. M. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int. J. Parasitol.* 35: 941-953.
90. 吉川 泰弘 . 2005. 動物由来感染症予防体制強化の必要性 . *IASR.* 26: 195-196.

## 謝 辞

本論文に関し、ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました北里大学大学院獣医学系研究科獣医寄生虫学研究室 工藤上准教授、筏井宏実准教授に謹んで深厚なる感謝の意を表します。

本論文に関し、有益なご助言と校閲を賜りました小動物第1内科学研究室 伊藤直之教授ならびに獣医伝染病学研究室 宝達勉教授、人獣共通感染症学研究室 岡村雅史准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究完成に至るまで、多くの貴重なご助言ならびにご協力を賜りました獣医伝染病学研究室 高野友美講師ならびに獣医病理学研究室 朴天鎬准教授、長野県健康福祉部食品・生活衛生課 吉田徹也氏に深く感謝いたします。また、検体採取に際し、多大なご協力を賜りましたNPO法人ながの動物福祉協会 猪瀬充啓先生に深く感謝いたします。

これまでの研究活動において、北里大学獣医学部獣医学科獣医寄生虫学研究室の皆様をはじめ、職場の皆様等多くの方々に様々なご協力とご支援をいただきました。お世話になりながらもここにお名前を言上することができなかった多くの方々に心から厚くお礼申し上げます。

最後に、社会人入学後の忙しい日々を支えて下さいました家族と両親に心から感謝申し上げます。

2015年3月

塚田 竜介

表 1 試験に供した検体

	samples	living environment			
		feral		domesticated	
		male	female	male	female
<i>E. cuniculi</i>	300	47	87	50	116
FIV	297	47	85	49	116
FeLV	297	47	85	49	116
FCoV	303	47	87	51	118
<i>T. gondii</i>	305	47	87	51	120

表 2 PCR に用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')
Forward	CGAATTCACGATGGTCCAT
Reverse	CTCGAGTTACTCTAGACC

表 3 *E. cuniculi* における陽性検体数および陽性率

		living environment			
		feral		domesticated	
		male	female	male	female
samples	300	47	87	50	116
positive samples	19	3	9	3	4
positive rate	6.3%	6.4%	10.3%	6.0%	3.4%



表 4 FIV, FeLV, FCoV および *T. gondii* における陽性検体数および陽性率

	samples	positive samples (positive rate)	living environment			
			feral		domesticated	
			male	female	male	female
FIV	297	31 (10.4%)	12	10	3	6
FeLV	297	7 (2.4%)	2	1	2	2
FCoV	303	71 (23.4%)	9	20	13	29
<i>T. gondii</i>	305	61 (20.0%)	14	30	6	11

表5 *E. cuniculi* 血清抗体に陽性を示した検体

	living environment	sex	<i>E. cuniculi</i>	FIV	FeLV	FCoV	<i>T. gondii</i>
1	feral	female	+	—	—	—	—
2	feral	female	+	—	—	—	—
3	feral	female	+	—	—	—	—
4	domesticated	male	+	—	—	—	—
5	domesticated	female	+	—	—	—	—
6	domesticated	female	+	—	—	—	—
7	feral	male	+	—	—	+	—
8	domesticated	male	+	—	—	+	—
9	domesticated	male	+	—	—	+	—
10	domesticated	female	+	—	—	+	—
11	domesticated	female	+	—	—	+	—
12	feral	male	+	—	—	—	+
13	feral	male	+	—	—	—	+
14	feral	female	+	—	—	—	+
15	feral	female	+	ND*	ND*	—	+
16	feral	female	+	—	—	—	+
17	feral	female	+	+	—	—	—
18	feral	female	+	+	—	—	+
19	feral	female	+	+	—	+	+
	* ND: Not data.						

表6 *E. cuniculi* 感染経路における検討

	positive samples	living environment				
		feral			domesticated	
		male	female		male	female
<i>E. cuniculi</i>	6	0	3		1	2
<i>E. cuniculi</i> + FCoV	5	1	0		2	2
<i>E. cuniculi</i> + <i>T. gondii</i>	5	2	3		0	0
<i>E. cuniculi</i> + FIV	1	0	1		0	0
<i>E. cuniculi</i> + <i>T. gondii</i> + FIV	1	0	1		0	0
<i>E. cuniculi</i> + <i>T. gondii</i> + FCoV + FIV	1	0	1		0	0
Total	19	3	9		3	4

表7 Nested PCRに用いたプライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')
MSP-1	TGAATG(G/T)GTCCTGT
MSP-2A	TCACTCGCCGCTACT
MSP-3	GGAATTCACACCGCCCGTC(A/G)(C/T)TAT
MSP-4A	CCAAGCTTATGCTTAAGT(C/T)(A/C)AA(A/G)GGGT
* Kasicková et al., 2009. を参考にプライマーを設計した	

表8 野ネズミの種類別 *Encephalitozoon* 種およびtypeの検出

	齧歯目			モグラ目		合計
	アカネズミ	ヒメネズミ	ハタネズミ	ヒミズ	ジネズミ	
<i>E. cuniculi</i> type I	6*	2	3	3	0	14
type II	0	0	0	0	0	0
type III	3	0	3	0	0	6
<i>E. hellem</i>	13*	2	2	0	1	18
<i>E. intestinalis</i>	3	0	2	1	0	6
合計	25/77 (32.5%)	4/32 (12.5%)	10/53 (18.9%)	4/16 (25.0%)	1/2 (50.0%)	

\* 1 検体から *E. cuniculi* type I および *E. hellem* を検出

表9 腎臓および脳における野ネズミの種類別 <i>Encephalitozoon</i> 種およびtypeの検出											
		腎臓					脳				
		<i>E. cuniculi</i> type I	<i>E. cuniculi</i> type II	<i>E. cuniculi</i> type III	<i>E. hellem</i>	<i>E. intestinalis</i>	<i>E. cuniculi</i> type I	<i>E. cuniculi</i> type II	<i>E. cuniculi</i> type III	<i>E. hellem</i>	<i>E. intestinalis</i>
齧歯目	アカネズミ				6**	2	5**		3	5	1
	ヒメネズミ	1			1	1					
	ハタネズミ			1*	1		1		2*		
モグラ目	ヒミズ						3				
	ジネズミ										
合計		1	0	1	8	3	9	0	5	5	1
* ハタネズミの1検体において、腎臓と脳で <i>E. cuniculi</i> typeⅢ を検出											
** アカネズミ1検体において、脳から <i>E. cuniculi</i> type I 、腎臓から <i>E. hellem</i> を検出											

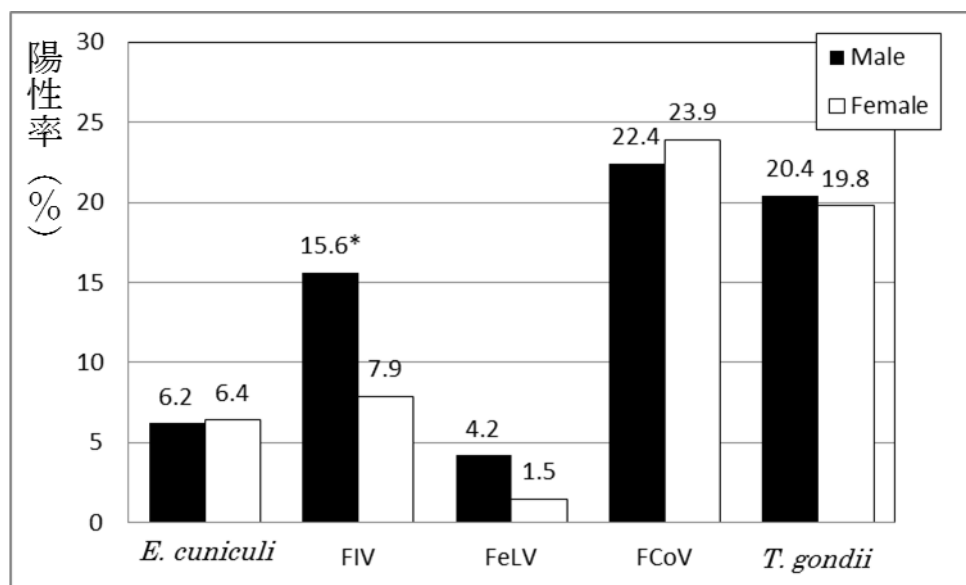


図 1 性別による比較

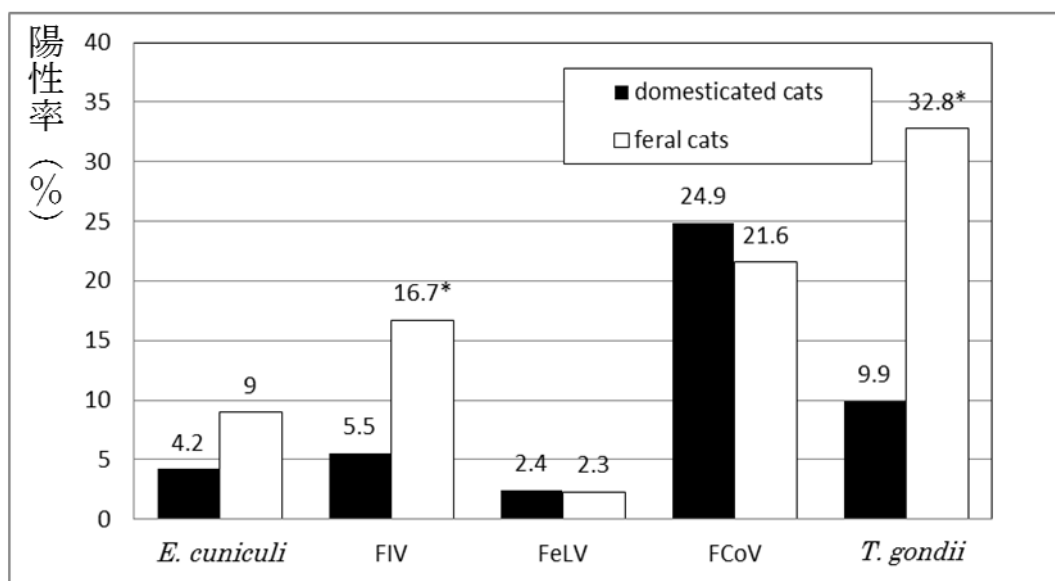


図 2 飼育環境による比較



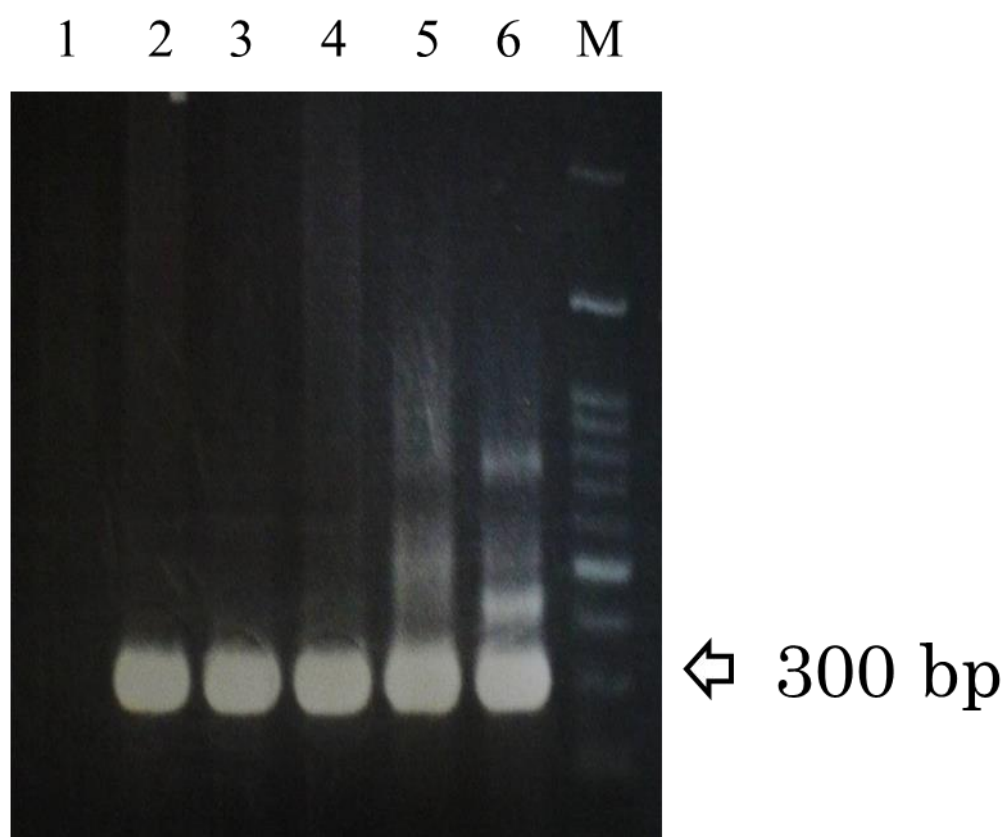


図 3 Nested PCR における *Encephalitozoon* 特異的 DNA 検出感度

1. < 1 spore    2. 1 spore    3. 10 spore  
 4.  $10^2$  spore    5.  $10^3$  spore    6.  $10^3$  spore>

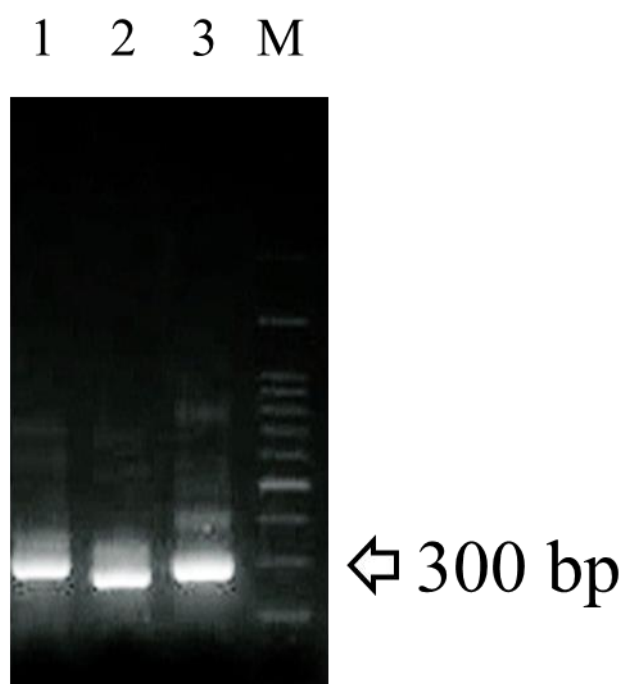


図 4 Nested PCR 陽性コントロール

1. *E. hellem*
2. *E. intestinalis*
3. *E. cuniculi* type I
- M. マーカー