

日本国内の繁殖施設で飼育されている猫における  
クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) と  
ジアルジア (*Giardia* spp.) 感染の疫学に関する研究

伊藤 洋一

平成 29 年度

Study on epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and  
*Giardia* spp. infections among breeding cattery cats in Japan

Yoichi ITO

2017

## 目 次

緒 論	1
第 1 章 日本国内の繁殖施設で飼育されている猫におけるクリプトスポ リジウム、ジアルジアおよびその他の消化管内寄生虫感染の疫学調査	
1. はじめに	5
2. 材料および方法	6
3. 成 績	9
4. 考 察	11
5. 小 括	18
第 2 章 日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したクリプト スポリジウムの種の同定	
1. はじめに	20
2. 材料および方法	21
3. 成 績	21
4. 考 察	22
5. 小 括	23
第 3 章 日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したジアルジ アの multilocus genotyping	
1. はじめに	25
2. 材料および方法	26
3. 成 績	27

4. 考 察	29
5. 小 括	31
総 括	32
謝 辞	36
文 献	37
付 表	

## 緒 論

猫は人の心に安らぎと潤いを与えるコンパニオン・アニマルとしての地位を確立し、以前にも増して人との関係が親密なものとなっている。さらにここ数年、犬の飼育頭数が減少しているのに対し、猫の飼育頭数（推計で 984 万 7 千頭）は、横ばいで推移していることが一般社団法人ペットフード協会によって実施された 2016 年全国犬猫飼育実態調査の成績から明らかにされている [28]。実際に、日常の診療で、猫の来院頭数が増加していることを体感していることから、近い将来、猫の飼育頭数が犬の飼育頭数を上回ることが予想される。このような状況から、今後、小動物臨床における診療件数に占める猫の割合は益々増加し、また、猫と人の絆もさらに深まると推測される。一方で最近、猫が保有する病原体は、猫の健康に影響を及ぼす可能性があるのみならず、その一部は人へ伝播する（猫がレゼルボアの役割を果たす）人獣共通感染性であることが危惧されている [10, 16, 29, 53]。したがって、猫の健康に影響を及ぼす可能性がある病原体は、臨床上重要な意味を持つと同時に、それが人へ伝播するものであれば、人の健康にも影響をおよぼす可能性がある。猫回虫（*Toxocara cati*）に代表されるように、猫の消化管内寄生虫にもそのような病原体が含まれている [4, 13, 54, 55]。このような背景から、猫における消化管内寄生虫の感染状況を明らかにすることは、猫と人の健康を維持するために重要な基礎資料を提供するものである。そして、近年の都市化の進行にともなう人の生活様式の変化や情報社会の発展により、猫の飼育環境も変化を遂げていることから、人獣共通感染性の寄生虫を人へ伝播することが

懸念される人との接触が頻繁な飼育猫における消化管内寄生虫について、感染状況に関する最近の知見が必要とされている。

猫における消化管内寄生虫の感染は、不顕性感染であることや慢性経過をとることが多く[4, 13, 54, 55]、ウイルス感染や細菌感染に比較して軽視されがちである。さらに、近年では動物の飼育環境や衛生環境の改善と有効な広域駆虫薬の開発により、日本国内の猫における消化管内寄生虫の感染は、もはや過去のことであるかのような印象を与えている。しかしながら、人獣共通感染性であることが古くから広く知られ、また、市販の駆虫薬が普及している猫回虫について、消化管内寄生虫に対してハイリスクであることが知られている。6カ月齢以下の飼育猫を対象とした日本国内で実施された2000年以降の調査をみると、いずれも動物病院に来院した一般家庭で飼育されている猫からランダムに糞便材料を採取し、直接塗抹法とホルマリン・酢酸エチル沈澱法の併用で検査を実施した成績であるが、2000年 25.6% (44/172) [23]、2005年 23.0% (28/122) [25]、2010年 15.2% (17/112) [27] および 2012年 15.4% (35/228) [21] の検出率であり、確かに2010年以降は減少したが、依然として高いレベルで推移しているのが実情で、決して無視できる状況ではないことが明らかである。このように、日本国内の一般家庭で飼育されている猫における消化管内寄生虫の感染状況は、その実態が少しずつ解明されている。一方で、ペットショップを介して販売され、あるいは直接販売されることによって、一般家庭で飼育されることになる子猫の重要な供給源である繁殖施設の飼育猫における消化管内寄生虫全体の感染状況については、著者の知る限り2003年にオーストラリアでの報告があるだけで[43]、しかも、4カ所の繁殖施

設の 95 頭（一部の寄生虫についてはわずか 14 頭）を対象とした調査であり、国の内外を問わずほとんど解明されていないのが現状である。

最近、猫における人獣共通感染性の消化管内寄生虫の中でも、特に、糞便中に排泄されるオーシスト（oocyst）やシスト（cyst）のサイズが小さいために検出が容易でないこと、実用的な消毒方法がないこと、さらには治療薬が限定的であることなどから、コントロールに苦慮する原虫であるクリプトスポリジウム（*Cryptosporidium* spp.）とジアルジア（*Giardia* spp.）に関する対策が重要な課題となっている[3, 13, 60, 66]。また、クリプトスポリジウムとジアルジアは、日本国内の人における感染が「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（いわゆる“感染症法”）によって、いずれも 5 類感染症に指定されている重要な寄生虫である[30]。人のクリプトスポリジウム感染やジアルジア感染の主要な感染経路は、オーシスト（クリプトスポリジウム）やシスト（ジアルジア）に汚染された水を摂取することによる水系感染であるが[12, 50, 56]、近年の分子生物学的解析手法の開発と発展によって種や遺伝子型の鑑別が可能となり、その結果、人と動物から同じ種や遺伝子型が分離されていることから、少なくともクリプトスポリジウムとジアルジアの一部は、人獣共通感染性であることが解明され、コンパニオン・アニマルが伝播に重要な役割を果たしている可能性が指摘されている[3, 47, 60, 62, 74, 76]。実際に、猫からの伝播が疑われる人のクリプトスポリジウム症が報告されている[5]。一方で、子猫の供給源である繁殖施設で飼育されている猫におけるこれら原虫の感染状況に関する有用な報告は、きわめて限定的

であり、分離されたクリプトスポリジウムの種やジアルジアの遺伝子型に関する十分な情報は、提供されていない。

以上の背景から、猫に対する日常の診療に役立てることや猫が保有する人獣共通感染性の消化管内寄生虫が人へ伝播することを防ぐための対策に必要とされる基礎データを得ることを目的として、本研究では、第1章で日本国内の繁殖施設で飼育されている猫におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアおよびその他の消化管内寄生虫感染の疫学調査を実施し、第2章では日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したクリプトスポリジウムの種の同定を行った。さらに、第3章では日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したジアルジアの *multilocus genotyping* を実施することにより、繁殖施設で飼育されている猫の消化管内寄生虫感染状況を明らかにするとともに、それらの猫から人への伝播リスクについて検討した。



## 第 1 章

# 日本国内の繁殖施設で飼育されている猫におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアおよびその他の消化管内寄生虫感染の疫学調査

### 1. はじめに

猫の消化管内寄生虫は、消化器障害を引き起こす一般的な病原体の一つであり、さらにその一部は、人獣共通感染性であることが知られている [54, 55, 67]。特に、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) とジアルジア (*Giardia* spp.) は、日本国内の人における感染が、いずれも 5 類感染症に指定されている原虫であり [30]、最近、人への伝播にコンパニオン・アニマルが重要な役割を果たしている可能性が指摘されている [3, 47, 60, 62, 74, 76]。さらに近年、猫と人との関係が密接さを増していることや猫を室内で飼育することが多くなったことを考慮すれば、飼育猫におけるクリプトスポリジウムとジアルジアを含む消化管内寄生虫の感染状況を明らかにすることは、猫と人の健康にとって重要であると考えられ、しかも、最新の情報が必要とされる。しかしながら過去 10 年間、日本国内では人との接触頻度が高いと推測される飼育猫を対象とした消化管内寄生虫の調査が十分には実施されてこなかった。ようやく最近、2010 年と 2012 年の伊藤ら [26, 27] による調査および 2012 年と 2013 年の Itoh et al. [21, 22] による調査によって、一般家庭で飼育されている猫とペットショップで飼育されている子猫における消化管内寄生虫の感染実態が限定的（クリプトスポリジウムが含まれていない）ではあるが明らかにされ、ジアルジアを含む消化管内寄生虫全体の検出率は、一般家庭で飼育されている 6 カ月

齢以下の猫で 22.3%と 22.4% [21, 27]、ペットショップで飼育されている 3 カ月齢以下の子猫で 19.4%と 27.2%であり [22, 26]、いずれも高い値であることが示されている。また、クリプトスポリジウムについては、Ito et al.[20]が一般家庭飼育の 1 歳齢未満の猫で 4.6%の検出率を、ペットショップ飼育の 3 カ月齢以下の子猫で 0.3%の検出率を報告している。一方、猫の繁殖施設は一般家庭の飼育者にとって、ペットショップを介して、あるいは直接の購入によって入手する子猫の重要な供給源である。しかしながら著者の知る限り、繁殖施設で飼育されている猫における消化管内寄生虫の感染状況に関する調査は、2003 年にオーストラリアで実施された McGlade et al.[43]によるクリプトスポリジウムとジアルジアを含む消化管内寄生虫全体の調査と、クリプトスポリジウムとジアルジアだけを検出対象とした 2015 年の Yang et al.[77]による小規模な調査、および 2016 年の Tysnes et al.[70]による下痢の発生がみられた 16 頭の繁殖施設で飼育されている猫を対象としたジアルジア検出の報告が存在するだけで、日本国内の状況は解明されていない。

以上のことから、本章では日本国内の繁殖施設で飼育されている猫におけるクリプトスポリジウム、ジアルジアおよびその他の消化管内寄生虫について、感染状況を明らかにした。

## 2. 材料および方法

### 1) 糞便材料

2013 年 3 月から 2014 年 2 月までの 1 年間に、日本国内の 7 カ所の繁殖施設 (No.1-7) で飼育されている猫 342 頭 (1 カ月～12 歳

齢) から新鮮便を無作為に 1 頭につき 1 回採取した。繁殖施設の詳細は、長野県が 2 カ所 (No.1, 3)、埼玉県が 1 カ所 (No.2)、愛知県が 2 カ所 (No.4, 6)、岐阜県が 1 カ所 (No.5) および宮城県が 1 カ所 (No.7) である。すべてのサンプルは、調査への協力を了解した繁殖施設のオーナーから提供されたものである。糞便は、自然排便されたものを直ちに採取し、使用まで 4℃で保存した(2 日以内)。

#### 2) クリプトスポリジウムとジアルジア以外の消化管内寄生虫の検出

繁殖施設で飼育されている猫 342 頭から採取した糞便を用い、肉眼的に性状(正常便、軟便、下痢便)と条虫片節の有無を観察した後、クリプトスポリジウムとジアルジア以外の消化管内寄生虫は、直接塗抹法とホルマリン・酢酸エチル沈澱法を併用し[79]、鏡検によって虫卵やオーシストを検出した。

#### 3) ジアルジアの検出

ジアルジアの検出は、糞便 342 サンプルを対象として、市販の ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) キット(スナップ・ジアルジア、アイデックスラボラトリーズ株式会社、東京)を用いた糞便中のジアルジア特異抗原検出によって実施した。

#### 4) クリプトスポリジウムの検出

クリプトスポリジウムの検出は、全 342 の糞便サンプル中、DNA (deoxyribonucleic acid) 抽出に十分な糞便量が確保できた 286 頭のサンプルについて、PCR (polymerase chain reaction) 法で行った。

はじめに、クリプトスポリジウムのオーシストを比重 1.26 のショ糖液を用いて浮遊法で回収した。分離したオーシストからの DNA

抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を使用して、製品の使用説明書にしたがって実施し、得られた DNA サンプルは解析まで -20℃ で保存した。

PCR は以前の報告に従い [75, 80]、small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA = 18S rRNA) 遺伝子をターゲットとした nested PCR で実施した。すなわち、1st PCR では、forward プライマー (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') と reverse プライマー (5'-CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA-3') を使用して約 1325 bp の DNA 断片を増幅した。2nd PCR では、forward プライマー (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') と reverse プライマー (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') を使用して約 826 bp の断片を増幅した。1st PCR の反応液は、Go Taq (Promega, USA) 1.25 U、5×Colorless Buffer (Promega; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM) 5μl、各 dNTP 0.2 mM、各プライマー 0.25 μM、テンプレートが DNA 抽出物 3 μl であり、MQ 水を加えて最終容量が 25 μl となるように調整した。2nd PCR の反応液は、PCR 混合物は 1st PCR のものと同様であるが、テンプレートとして 1st PCR の増幅産物を使用した。1st PCR は、95℃・3 分の初期変性後、変性 95℃・45 秒、アニーリング 59℃・45 秒、伸長反応 72℃・1 分を 1 セットとして 35 サイクル実施し、72℃・5 分での最終伸長を行った。2nd PCR は、95℃・3 分の初期変性後、変性 95℃・30 秒、アニーリング 58℃・1 分、伸長反応 72℃・1 分を 1 セットとして 35 サイクル実施し、72℃・5 分での最終伸長を行った。

すべての 2nd PCR 産物は、1.5%アガロースゲルで電気泳動した。臭化エチジウムで染色した後、DNA 断片は UV トランスイルミネー

ターを用いて確認し、目的とする約 826 bp の位置にバンドが検出されたサンプルをクリプトスポリジウム陽性と判定した。

#### 5) データの解析

データは、年齢（1 歳齢未満、1 歳齢以上）、糞便性状（正常便、軟便、下痢便）および繁殖施設別のカテゴリーにしたがって集計し、フィッシャーの直接確率計算法で  $P < 0.05$  の場合に有意と判定した。なお、残念ながら駆虫薬投与に関しては、繁殖施設のオーナーの拒否や記録がないことから、詳細なデータは得られなかった。

### 3. 成績

#### 1) クリプトスポリジウム以外のジアルジアを含む消化管内寄生虫の検出状況

繁殖施設の飼育猫 342 頭において、20.8% (71/342) から少なくとも 1 種以上の消化管内寄生虫が検出された (Table 1)。

検出された寄生虫は、原虫に属するジアルジアとイソスポラ (*Isospora* spp.) だけであり、蠕虫類（線虫、吸虫、条虫）は検出されなかった。ジアルジアの検出率は 18.7% (64/342) であり、イソスポラの検出率は 5.0% (17/342) だった。ジアルジアとイソスポラの重複寄生は、2.9% (10/342) で検出された。

年齢と消化管内寄生虫検出との関係では、消化管内寄生虫全体の検出率は 1 歳齢未満の猫で 48.0% (24/50) であり、1 歳齢以上の 16.1% (47/292) に比較して有意に ( $P < 0.001$ ) 高かった。また、ジアルジアの検出率も、1 歳齢未満が 42.0% (21/50) で、1 歳齢以上の 14.7% (43/292) より有意に ( $P < 0.001$ ) 高かった。イソスポ

ラおよびジアルジアとイソスポラの重複においても同様で、1歳齢未満の検出率がそれぞれ24.0% (12/50) と18.0% (9/50)、1歳齢以上では1.7% (5/292) と0.3% (1/292) であり、いずれも1歳齢未満の値は、1歳齢以上に比較して有意に (すべて  $P < 0.001$ ) 高かった。

糞便性状と消化管内寄生虫検出との関係では、消化管内寄生虫全体の検出率が正常便18.8% (51/271)、軟便30.2% (19/63)、下痢便12.5% (1/8) であり、糞便性状の違いによる消化管内寄生虫の検出率に有意差は認められなかった。また、糞便性状と各寄生虫の検出率との関係でも、ジアルジアは正常便17.0% (46/271)、軟便27.0% (17/63)、下痢便12.5% (1/8) であり、糞便性状の違いによる検出率に差はなかった。イソスポラの検出率も正常便5.2% (14/271)、軟便3.2% (2/63)、下痢便12.5% (1/8) で有意差は認められず、さらに、ジアルジアとイソスポラの重複も正常便3.3% (9/271)、軟便0% (0/63)、下痢便12.5% (1/8) で有意差がみられなかった。

繁殖施設別では、1カ所 (No.6) を除くすべての施設から少なくとも1種以上の消化管内寄生虫が検出された (Table 2)。

各繁殖施設における消化管内寄生虫全体の検出率は0~84.6%、ジアルジアは0~69.2%、イソスポラは0~76.9%、ジアルジアとイソスポラの重複は0~61.5%であり、施設間で大きなばらつきが認められた。ジアルジアは、1カ所 (No.6) を除くすべての繁殖施設から検出され、イソスポラは4カ所の施設 (No.1, 3, 5, 7) で、また、ジアルジアとイソスポラの重複は2カ所 (No.3, 5) でそれぞれ確認された。

## 2) クリプトスポリジウムの検出状況

クリプトスポリジウムは、繁殖施設で飼育されている猫の糞便 286 サンプルの 1.4% (4/286) が陽性だった (Table 1)。

年齢と検出率の関係では、1 歳齢未満の猫の 2.9% (1/34) と 1 歳齢以上の 1.2% (3/252) でクリプトスポリジウムの検出率に有意な差はみられなかった。

糞便性状とクリプトスポリジウム検出率の関係は、正常便 0.9% (2/229)、軟便 4.1% (2/49)、下痢便 0% (0/8) で有意差はなかった。

繁殖施設別では、クリプトスポリジウムは 2 カ所の施設で検出され、各施設での検出率は No.5 が 10.0% (1/10)、No.7 が 6.4% (3/47) だった (Table 2)。

## 4. 考 察

はじめに、本研究は日本国内の繁殖施設で飼育されている猫における消化管内寄生虫の感染状況を明らかにした初めての報告である。本研究では、ジアルジアとクリプトスポリジウム以外の消化管内寄生虫検出にホルマリン・酢酸エチル沈澱法を用いた。消化管内寄生虫の虫卵やオーシスト、シスト等の検出には、硫酸亜鉛等を用いた浮遊法が一般的に利用されているが、浮遊法は使用する浮遊液の組成によって虫卵の検出感度が異なることや静置時間によって一旦浮遊した虫卵が沈むために検出できないことがあるため [19, 46]、今回はこれらの影響がない沈澱法で実施した。ジアルジアは、糞便内への一般的な排泄形態であるシストが約  $9 \sim 13 \times 7 \sim 9 \mu\text{m}$  の大きさ

であり[1, 32, 66]、光学顕微鏡での検出に困難がともなうことや無染色では内部構造の観察が不可能で、類似する夾雑物との鑑別が難しいこと[32, 66]、さらに、まれではあるが沈澱法では検出できないトロフォゾイト (trophozoite) だけが排泄される例が存在することから[24]、犬・猫用に市販されている ELISA キットによる糞便内の特異抗原検出を利用した。なお、この ELISA キットの検出感度と特異度が優れていることは、Uehlinger et al.[71]によって示されている。クリプトスポリジウムの検出は、糞便中に排泄されるオーシストが直径約 5  $\mu\text{m}$  と極めて小さく[9, 44, 60]、また、光学顕微鏡での観察にはキニヨン染色等の抗酸染色が必要とされること[44, 60]、さらに、猫では糞便へ排泄されるクリプトスポリジウムのオーシスト数が少ないこと等から[60]、検出感度と特異度に優れた PCR 法により実施した[9, 59, 75, 80]。

この調査では、原虫であるジアルジア、イソスポラおよびクリプトスポリジウムは検出されたが、蠕虫類は検出されなかった。特に、1 歳齢未満の猫ではジアルジアとイソスポラの検出率が高いレベルであり、ともに 1 歳齢以上に比較して検出率が有意に高いことから、繁殖施設で飼育されている 1 歳齢未満の猫における主要な消化管内寄生虫は、ジアルジアとイソスポラであることが示唆された。日本国内のこれまでの調査で、ペットショップで飼育されている 3 カ月齢以下の子猫におけるジアルジアとイソスポラの重要性がすでに指摘されている[22, 26]。それらの調査で、ジアルジア抗原の検出率は 9.7% (18/186) および 10.1% (56/555) であったことが、イソスポラオーシストの検出率は 11.3% (21/186) および 19.6% (109/555) であったことが報告されている。今回の繁殖施設で飼



育されている 1 歳齢未満の猫における検出率であるジアルジアの 42.0% (21/50) やイソスポラの 24.0% (12/50) は、いずれもペットショップの調査で得られた値より明らかに高く、繁殖施設がペットショップに対する子猫の最大の供給源であることから、当然の結果と考えられ、繁殖施設の猫におけるジアルジアの高い検出率は、海外でも報告されている[43]。さらに、ジアルジアは 1カ所の施設を除いてすべての施設で検出されたことから、日本国内の繁殖施設で感染が蔓延していると推測される。しかも、確かに 1 歳齢未満の猫に比べて有意に低い値ではあるが、1 歳齢以上の繁殖用の猫でも 14.7% の検出率であり、以前に日本国内のペットショップで飼育されている 3 カ月齢以下の子猫で報告されている検出率よりも高く、繁殖施設では年齢と関係なく成猫でもジアルジアに感染している個体が多いことが明らかとなった。一方で、イソスポラの検出率は 1 歳齢以上の猫で著しく低下し、一般家庭の飼育猫で報告されている従来知見と一致していた[21, 27, 33]。また、イソスポラは、調査した 7カ所の繁殖施設のうち、4カ所からの検出であったことから、日本国内の猫の繁殖施設における蔓延率は、ジアルジアより低いと推測される。繁殖施設やペットショップのような猫の密度が高い場合、ジアルジアとイソスポラの感染は一般的だと考えられている。なぜなら、これらの原虫は、限られた空間で生活する動物の間で容易に伝播することが知られているからである[7, 32, 34, 43]。また、ジアルジアのシストとイソスポラのオーシストは、環境中で安定であることや消毒薬に対する耐性があることから、汚染された猫の繁殖施設からそれらを排除することは困難であると考えられている[1, 36, 66]。

本研究では、1歳齢未満の猫でジアルジアとイソスポラの高い検出率が記録された。従来の研究では、免疫機構の未熟さのために、若齢の動物においてはしばしば寄生虫の感染率が高いことが示されている[15, 40, 48]。1歳齢以上の猫におけるジアルジアとイソスポラ検出率の有意な減少は、免疫系の発達および／または、本研究では治療に関する有用な情報はないが、治療歴に関連したものと推測される。1歳齢以上の猫におけるイソスポラの極めて低い検出率とは対照的に、ジアルジアは高い検出率を維持していた。猫を含む動物において、コクシジウム型の寄生虫では強く持続する免疫が誘導されることが示唆されている[34, 40]。一方でジアルジアは、自ら抗原性を変化させることで宿主免疫から逃れることが明らかにされている[8, 51]。そのため、ジアルジアの再感染があらゆる年齢で頻繁に生じると考えられている[8, 51]。したがって、繁殖用の成猫における感染は、繁殖施設のジアルジアによる環境汚染を継続的に維持する重要な役割を果たしていると推察される。また、ジアルジア感染とイソスポラ感染の違いの一部は、それらの生物学的特性に起因すると考えられる。これらの原虫は、いずれも単純な糞便一口感染であるが[1, 36, 40, 66, 67]、猫に感染するイソスポラのオーシストは、環境中に未熟な非感染性のステージで排泄され、感染力を持つために成熟したステージまで発育する必要がある、それには適度な湿度と温度で数日を要する[34, 40]。一方、ジアルジアのシストは、環境中へ排泄された時点ですでに感染力を有している[1, 32]。以上のことから、ジアルジアの伝播は、イソスポラに比較して容易に生じると推察され、さらに、猫に特徴的な行動であるグルーミングもジアルジアの伝播に貢献していると考えられる。

ジアルジアが検出された猫の 28.1% (18/64) とイソスポラが検出された猫の 17.6% (3/17) で、糞便性状が軟便または下痢便だった。この事実は、これらの原虫が病原性を有する可能性を示唆していると同時に、不顕性感染が多く存在することを示している。実際に、糞便性状の違いによるジアルジアおよびイソスポラ検出率の相違は認められなかった。従来多くの報告が、原虫感染は必ずしも糞便性状に影響を及ぼさないことを示している [1, 32, 34, 36, 40]。逆に、これらの知見は、不顕性感染（糞便性状が正常便）のキャリアーが、繁殖施設の管理者によって気づかれない可能性があることを強く示唆している。そのため、キャリアーは持続的なシストおよび／またはオーシストの排泄によって、猫の繁殖施設の環境において、これらの病原体を蔓延させる原因になっていると考えられる。

繁殖施設の間で、ジアルジアとイソスポラの検出率に大きなばらつきがあった。残念ながら、今回の調査では衛生管理や駆虫歴に関する情報はないが、環境汚染が繁殖施設間における消化管内寄生虫の検出率に差をもたらす最も重要な要因であると推測される。

クリプトスポリジウムの繁殖施設で飼育されている猫における検出率については、以前にオーストラリアで **McGlade et al.[43]** と **Yang et al.[77]** が、それぞれ 7.1% および 0% であったことを報告している。これらの報告は、いずれも今回と同様に **PCR** でクリプトスポリジウムを検出しているが、サンプルのサイズが極めて小さく（それぞれ  $n=14$  と  $n=10$ ）、検出率を単純に比較することはできない。しかしながら、今回の成績が示す 1.4% (4/286) の検出率は、日本の繁殖施設で飼育されている猫におけるクリプトスポリジウムの感染率が低いことを強く示唆している。**Yoshiuchi et al.[78]** は、日本

国内で若齢猫を中心とした小規模な 55 頭の一般家庭で飼育されている猫を対象とした調査で、PCR により 12.7% の検出率を報告している。しかしながら、Ito et al.[20]は日本国内の一般家庭で飼育されている 1 カ月齢～23 歳齢の猫 357 頭とペットショップで飼育されている 3 カ月齢以下の子猫 329 頭を対象に PCR を用いて実施した調査で、検出率がそれぞれ 2.0% (7/357) と 0.3% (1/329) であったことを示している。このことから、繁殖施設に限らず、日本国内で飼育されている猫におけるクリプトスポリジウムの感染率は、低いものと考えられる。

本研究では、猫の年齢によるクリプトスポリジウム検出率の違いは認められなかった。重度のクリプトスポリジウム症は、一般的に若齢の猫でみられ、それは免疫学的な未熟さに起因すると考えられている[45]。類似して、免疫不全の成猫も重症化することが示されている[37]。自然免疫と適合免疫がクリプトスポリジウム感染の防御および／または回復に重要であることが知られているが[11, 42]、クリプトスポリジウム感染に対する免疫応答の詳細なメカニズムと、それがどのように年齢と関連しているのかは、猫では明らかにされていない。さらに、本研究では 1 歳齢未満の若齢猫は 34 頭でサンプルサイズが限られており、年齢との関連性に関する結論は、さらに大規模な調査で確認される必要があると考えられる。

従来 of 報告と同様に[2, 60, 77, 78]、本研究でもクリプトスポリジウムの検出と糞便性状との関連性は認められなかった。しかしながら、クリプトスポリジウム感染が確認された 4 頭中 2 頭の猫は、他の消化管内寄生虫の重複がない状況で軟便を示していたことから、今回は確かな要因の追求はなされていないが、単独の感染でも病原

性を示す可能性は否定できないと考えられる。

クリプトスポリジウムは、調査した 7 施設中 2 施設だけで検出された。前述のジアルジアやイソスポラと同様に、各施設における衛生管理の状態が、クリプトスポリジウム感染に影響を与える大きな要因であると考えられる。なぜなら、糞便中に排泄されるクリプトスポリジウムのオーシストは、分厚いオーシスト壁を有し、周囲環境や消毒薬に対して強い抵抗性を持ち、感染力を維持しているからである [6, 64]。

最後に、本研究では蠕虫類が検出されなかった。Itoh et al.[22] の報告でも、ペットショップの子猫において、蠕虫類の低い検出率が確認されている。蠕虫類が検出されなかった理由の一つは、繁殖施設の管理者が猫回虫に代表されるような蠕虫類に関する知識を十分に持っている可能性があり、さらに、日本国内では一部の蠕虫駆虫薬が獣医師の関わりなく容易に入手可能であることから、定期的に駆虫薬が投与されていると推測されることが挙げられる。また、繁殖施設の猫は、常に室内で飼育されていることから、保虫宿主や中間宿主を摂取する機会がないことも蠕虫類が検出されなかったことに関係していると推察される。

本研究は、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫におけるジアルジア感染とイソスポラ感染の重要性を明らかにし、また、低率ではあるがクリプトスポリジウムも検出した。猫のイソスポラは、人獣共通感染の可能性はないが [34, 40]、猫が保有するジアルジアとクリプトスポリジウムは、人獣共通感染の可能性がある [1, 41, 60, 62, 66, 68, 74]。したがって、人獣共通感染性を評価するために、分離されたジアルジアとクリプトスポリジウムの遺伝子型や種を決

定するための解析が必要である。

## 5. 小 括

本研究は、日本国内で初めて、繁殖施設で飼育されている猫における消化管内寄生虫の感染状況を明らかにした。日本国内の7カ所の繁殖施設で飼育されている猫342頭から採取した新鮮便を材料として、ジアルジアは、市販のELISAキットによる特異抗原検出を行い、その他の消化管内寄生虫は、ホルマリン・酢酸エチル沈澱法で検出した。同時に、286頭のサンプルについては、SSU rRNA遺伝子をターゲットとしたnested PCR法でクリプトスポリジウムの検出を実施した。

その結果、クリプトスポリジウム以外の消化管内寄生虫全体の検出率は20.8%であり、ジアルジア(18.7%)とイソスポラ(5.0%)の2種の原虫が検出された。消化管内寄生虫全体の検出率、ジアルジアの検出率、およびイソスポラの検出率は、いずれも1歳齢未満の猫で1歳齢以上に比較して有意に高かった。寄生虫感染の有無による糞便性状の違いは認められなかった。ジアルジアは、1施設を除くすべての繁殖施設から検出され、国内の猫の繁殖施設における感染の蔓延が示唆された。

クリプトスポリジウムは、2カ所の施設で4頭の猫(1.4%)から検出され、年齢および糞便の性状は、検出率と有意な関係がなかった。日本国内の繁殖施設で飼育されている猫のクリプトスポリジウムの感染率は、低いことが示唆された。

以上のことから、繁殖施設の猫において重要と考えられる消化管

内寄生虫は、特に1歳齢未満の猫で、ジアルジアとイソスポラであることが明らかになった。

消化管内寄生虫の検出率は、施設間で大きなばらつきが認められ、繁殖施設の環境汚染がジアルジアを中心とした消化管内寄生原虫の感染に影響する最も重要な因子であると推測された。

## 第 2 章

### 日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したクリプトスポリジウムの種の同定

#### 1. はじめに

動物に寄生するクリプトスポリジウムには、20 以上の種が存在し、さらに、種として独立に至っていない 40 以上の遺伝子型が知られている [31, 49, 58, 59]。それらには厳密ではないものの、ある程度の宿主適合性が認められている。人のクリプトスポリジウム症の原因として一般的な種は、*Cryptosporidium hominis* と *C. parvum* であり、猫に寄生する最も一般的な種は *C. felis* である [31, 49, 58, 59, 64]。一方、猫からまれに分離されるものとして *C. parvum*、*C. muris* および *C. canis* が報告されている [39, 41, 62]。*C. parvum* は、人や猫以外の動物からも分離され、人獣共通感染性であると考えられている [9, 62, 74]。また、免疫の低下した人を中心に、*C. hominis* や *C. parvum* 以外のクリプトスポリジウムが分離され [41, 59, 64, 74]、それらの中には、*C. felis* も含まれている。さらに最近、飼育者が自ら飼育している猫から感染したと推測される *C. felis* による下痢の発生が報告されている [5]。急速に進む高齢化社会による老人の増加や免疫抑制剤の投与を必要とする担癌患者の増加など、免疫低下が予測される人々が増加している日本国内の現状を考慮すれば、猫から人へのクリプトスポリジウム伝播の可能性を認識する必要があり、感染リスクの評価のため、猫におけるクリプトスポリジウムの感染状況を明らかにすると同時に、猫が保有するクリプトスポリジウムの種を明らかにしておくことも重要である。



以上のことから、本章では第 1 章でクリプトスポリジウムが検出されたサンプルについて、PCR 産物を用いたシーケンス解析によって種の同定を行った。

## 2. 材料および方法

### 1) 解析材料

第 1 章で、SSU rRNA 遺伝子をターゲットとした nested PCR によって得た 2nd PCR の産物が、目的とするサイズ（約 826 bp）であったことから、クリプトスポリジウム陽性と判断した岐阜県の繁殖施設（No.5）から分離した 1 サンプル、および宮城県の繁殖施設（No.7）から分離した 3 サンプルの計 4 サンプルを材料とした。

### 2) シーケンス解析

2nd PCR の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN GmbH, Hilden, Germany）で精製した後、2nd PCR の forward プライマーおよび reverse プライマーとともに、シーケンス解析を外部業者（タカラバイオ株式会社、滋賀）に依頼した。シーケンスデータは、MEGA Version 6.06（<http://www.megasoftware.net>）で DNA 配列のアラインメント処理と編集を行った。その後、サンプルの DNA 配列と GenBank に登録されているクリプトスポリジウムの DNA 配列を BLAST（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>）を利用して比較し、種の同定を行った。

## 3. 成 績

シーケンス解析では、4 サンプルすべてにおいて、塩基配列が GenBank データベース上の *C. felis* (accession number: KF287127、KM977642、AF112575) と 99~100% 一致した。繁殖施設 No.5 の 1 サンプルは KF287127 と 100% 一致し、繁殖施設 No.7 の 3 サンプルは 2 サンプルが KM977642 と 100% 一致し、残りの 1 サンプルは AF112575 と 99% 一致していた (Table 3)。

#### 4. 考 察

感染動物の糞便中に排泄されるクリプトスポリジウムのオーシストは、種によって形態学的特徴に差があり、猫からの分離が報告されているオーシストのサイズを比較しても、*C. felis* 4.5×5.0 μm、*C. parvum* 4.5×5.5 μm、*C. muris* 5.6×7.4 μm、*C. canis* 5.0×4.7 μm で微妙な差が存在する [9, 49, 64]。しかしながら、これらを光学顕微鏡による観察で形態学的に鑑別することは困難であることから、本研究では SSU rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR で得られた DNA 断片のシーケンス解析によって種を同定した。

その結果、本研究で繁殖施設の飼育猫から分離した 4 サンプルは、すべて猫に適合した種と考えられている [31, 49, 58, 59, 64] *C. felis* だった。これまでに、日本国内の飼育猫から分離されたクリプトスポリジウムの種については、Yoshiuchi et al. [78] が一般家庭の飼育猫から分離した 7 株すべてが *C. felis* であったことを、同様に Ito et al. [20] は、一般家庭の飼育猫から分離した 7 株とペットショップ飼育の子猫から分離した 1 株の計 8 株が、すべて *C. felis* であったことを報告している。これらの成績から、いずれも解析サンプルが少

ないため、今後さらなる調査が必要ではあるが、日本国内で飼育されている猫が保有するクリプトスポリジウムは、繁殖施設に限らず、そのほとんどが *C. felis* であると推測される。

一方、人におけるクリプトスポリジウム症の原因となるのは、*C. hominis* と *C. parvum* が一般的である [6, 49, 74]。したがって、第 1 章で明らかになったクリプトスポリジウムの低い検出率も併せて考慮すれば、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から人へクリプトスポリジウムが伝播する可能性は、低いと推察される。ただし、クリプトスポリジウムの宿主適合性は、厳密なものではないため、人は免疫不全の人を中心に *C. felis* の感染によって発症する可能性がある [5, 6, 41, 49, 74]。また、クリプトスポリジウムのオーシストは、糞便中に排泄された時点で感染力を有し、しかも厚いオーシスト壁によって消毒薬や周囲環境に抵抗性を示すこと [6, 64]、さらに、効果的な抗クリプトスポリジウム薬がないことから [59]、高齢者の増加や担癌患者の増加など免疫低下が予測される人口が増加している日本国内の現状を考慮すれば、見過ごすことのできない問題であり、今後、注意深い監視が必要であると考えられる。

## 5. 小 括

第 1 章でクリプトスポリジウムが検出された 4 サンプルについて、second PCR 産物を用いてシーケンス解析を実施した。

その結果、4 サンプルの塩基配列は、すべて *C. felis* と 99~100% 一致した。第 1 章で明らかになった低い検出率、さらに、人のクリプトスポリジウム症のほとんどが *C. hominis* と *C. parvum* による

ものあることを考慮すれば、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から人へのクリプトスポリジウム伝播のリスクは、低いものと考えられる。ただし、免疫不全の人では、*C. felis* に感染して発症する可能性があり、高齢者や担癌患者が増加している現状を考慮すれば、今後、注意深い監視が必要であると考えられる。

### 第 3 章

## 日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したジアルジアの multilocus genotyping

### 1. はじめに

猫や人を含む多くの哺乳動物の消化管内に寄生し、消化器障害の原因となるジアルジアは、*Giardia duodenalis* (= *G. intestinalis*, *G. lamblia*) であることが知られている [14, 66]。分子生物学的には、*G. duodenalis* は多種の複合体であり、宿主域が異なる assemblage A~H の 8 つの異なる遺伝子型で構成されている [17, 57]。assemblage A と B は、人獣共通感染性の遺伝子型であり、残りの assemblage C~H は宿主適合性の遺伝子型である [17, 69, 73]。猫から分離されるジアルジア株の多くは、猫に適合した遺伝子型の assemblage F であるが、人獣共通感染性の assemblage A と B も分離されている [3, 47, 76]。最近、*G. duodenalis* の遺伝子型解析には、複数の遺伝子をターゲットとして実施する multilocus genotyping が強く推奨されている [38, 47]。

第 1 章で、繁殖施設の飼育猫におけるジアルジアの高い検出率を明らかにした。繁殖施設は、多くの個人の飼育者がペットショップを介して、または直接、子猫を購入する際の最大の供給源である。しかしながら、繁殖施設の猫から分離されるジアルジアの遺伝子型については十分に解明されていない。本章では、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したジアルジア株について、small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)、glutamate dehydrogenase (gdh)、 $\beta$ -giardin (bg)、および triosephosphate isomerase (tpi)

の 4 つの遺伝子をターゲットとして multilocus genotyping を実施し、人獣共通感染性を評価した。

## 2. 材料および方法

### 1) ジアルジアの分離株

第 1 章でジアルジア特異抗原が検出された猫の糞便 64 サンプルの中から、DNA 抽出に十分な量が確保できた日本国内の 5 カ所の繁殖施設で飼育されている猫の糞便 41 サンプルを分離株の材料とした。各繁殖施設別の分離株数は、繁殖施設 No.1 が 4 株、繁殖施設 No.3 が 26 株、繁殖施設 No.4 が 3 株、繁殖施設 No.5 が 6 株、繁殖施設 No.7 が 2 株だった。

### 2) シストの回収と DNA の抽出

ジアルジアのシストは、比重 1.26 のショ糖液を用いて浮遊法で回収した。分離したシストからの DNA 抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を使用して、製品の使用説明書にしたがって実施し、得られた DNA サンプルは解析まで -20℃ で保存した。

### 3) PCR とシーケンス解析

SSU rRNA、gdh、bg、および tpi の 4 つの遺伝子をターゲットとした PCR は (いずれも nested PCR)、それぞれ以前に報告されている方法に従って実施し [18, 35, 52, 63]、使用したプライマーとアニーリング温度 (annealing temperature) は、Table 4 に示した (Table 4)。

各ターゲット遺伝子の nested PCR における 2nd PCR 産物を

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) で精製した後、2nd PCR の forward プライマーおよび reverse プライマーとともに、シーケンス解析を外部業者（株式会社 FASMAC、神奈川）に依頼した。シーケンスデータは、ソフトウェア MEGA Version 6.06 を用いて DNA 配列のアライメント処理と編集を実施した。得られた DNA 配列は、遺伝子型を決定するため、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて GenBank に登録されている *G. duodenalis* の配列と比較し、*assemblage* を決定した。さらに、*assemblage* A に関しては、*gdh*、*bg*、*tpi* の 3 つの遺伝子を使用して *sub-assemblage* を解析した。

### 3. 成 績

遺伝子型の解析に使用したジアルジアの 41 株すべては、ターゲットとした 4 つの遺伝子の中で、少なくとも 1 つの遺伝子について PCR による増幅が確認された。各遺伝子別の増幅率は、SSU rRNA が 80.5% (33/41)、*gdh* が 70.7% (29/41)、*bg* が 46.3% (19/41)、*tpi* が 26.8% (11/41) だった。

1 つの遺伝子でだけ増幅がみられた分離株は、そのシーケンス解析に基づいて *assemblage* を決定した。一方、複数の遺伝子で増幅が認められた分離株は、それぞれの遺伝子におけるシーケンス解析によって、すべての遺伝子で *assemblage* が一致したものは、単一の *assemblage* と判断し、各遺伝子で *assemblage* が異なるものは、複数の *assemblage* が混合している混合型と判断した。その結果、単一の *assemblage* と判断した分離株は 82.9% (34/41) であり、残

り 17.1% (7/41) の分離株は混合型だった。最も一般的な単一の assemblage は、F が 68.3% (28/41) であり、次いで A が 12.2% (5/41)、C が 2.4% (1/41) だった。混合型の assemblage は、F+A が 9.8% (4/41)、F+C が 4.9% (2/41)、C+D が 2.4% (1/41) だった。assemblage F は 5 施設すべての分離株から検出され、assemblage C は 3 カ所の施設 (No.1, 3, 7) で、assemblage A は 2 カ所の繁殖施設 (No.3, 5) で、assemblage D は 1 カ所の施設 (No.1) でそれぞれ検出された (Table 5)。

使用したターゲット遺伝子別に決定した分離株の assemblage は、Table 6 にまとめた (Table 6)。すべての分離株が GenBank に登録された *G. duodenalis* の参照配列と 99~100%一致していた。

SSU rRNA 遺伝子でシーケンス解析が可能だった 33 の分離株中、26 株は assemblage F であり、5 株は assemblage A、2 株は assemblage C だった。

gdh 遺伝子で増幅した 29 の分離株は、18 株が assemblage F であり、7 株は assemblage A (sub-assemblage AI) だった。そして残りの 4 株は、assemblage C だった。

bg 遺伝子でシーケンス解析が可能だった 19 の分離株は、13 株が assemblage F であり、5 株は assemblage A (sub-assemblage AI) だった。そして 1 株だけが assemblage D だった。

tpi 遺伝子では 11 の分離株で解析が可能であり、7 株が assemblage A (sub-assemblage AII)、2 株が assemblage F だった。残りの 2 株は、assemblage C と assemblage D がそれぞれ 1 株だった。



#### 4. 考 察

本研究は、複数の猫の繁殖施設から分離した多数の *G. duodenalis* 分離株（41株）について multilocus genotyping を用いて遺伝子型を解析し、人獣共通感染性を評価した日本国内で最初の報告である。*G. duodenalis* の正確な遺伝子型の同定や複数の遺伝子型による混合感染の検出は、ターゲット遺伝子が単一では困難であり、複数の遺伝子をターゲットとした multilocus genotyping の有効性が示されている [38, 47]。その理由は、ターゲットとする遺伝子によって PCR の増幅率が異なることや検出しやすい assemblage に偏りがあるからとされている [14, 57]。これらのことは、今回の成績でも確認された。すなわち、ターゲットとする遺伝子により増幅率が異なり（SSU rRNA > gdh > bg > tpi）、また、同一の分離株でもターゲット遺伝子の違いによって異なる assemblage に同定され、混合型の感染であることが判明し、multilocus genotyping の重要性が確認できた。

従来 of multilocus genotyping によって実施された繁殖施設の飼育猫における遺伝子型解析の報告では、Tysnes et al.[70]が1カ所の繁殖施設から分離した16の *G. duodenalis* 株は、すべて assemblage F だったことを示している。今回の解析でも最も優勢な遺伝子型は、混合型を含めて assemblage F であり、すべての繁殖施設の分離株において最も高率に検出された。繁殖施設の飼育猫で、assemblage F が優位であることは、これが猫に適合した遺伝子型であることから [17, 69, 73]、当然のことと考えられる。

assemblage F に比較して少数ではあったが、assemblage A、C、D のような本来の宿主が猫ではない遺伝子型も、混合型を含めて確

認された。しかしながら、*assemblage A* が確認されたことは、驚きに値しない。なぜなら、*assemblage A* は人獣共通感染性の遺伝子型であり、過去にもしばしば猫から検出されているからである [3, 47, 76]。*sub-assemblage AI* は、日本国内の猫から分離された株でも報告されているが [65]、*sub-assemblage AII* は本研究が初めての報告である。*sub-assemblage AI* は、一般的に人獣共通感染性のサブタイプとして各種の哺乳動物から分離されている [14, 57]。対照的に、*sub-assemblage AII* は、ほとんどの分離株が人由来である [61, 73]。したがって、*sub-assemblage AII* は人に適合したサブタイプだと考えられてきた。しかし、最近の *multilocus genotyping* 解析では、*sub-assemblage AII* が人以外の動物からも日常的に同定されるようになってきたことから [72, 76]、*sub-assemblage AII* も *sub-assemblage AI* と同様に、人獣共通感染性である可能性が示唆される。すなわち、繁殖施設で飼育されている猫から人へのジアルジア伝播リスクは、無視できないものと考えられる。これらのことは、現在までに確かに猫から感染したと考えられる人のジアルジア症が報告されていないことから、直ちに猫から人へのジアルジア伝播を意味するものではないが、今後、注意深い監視が必要である。

一方、*assemblage C* と *D* は犬に適合した遺伝子型であると認識されているが [3, 66]、本研究はこれらを日本国内の猫から初めて分離した。今回、犬適合性の *assemblage* が繁殖施設の飼育猫から分離された理由は、各繁殖施設の詳細な情報が把握できていないため明確ではない。しかしながら、可能性として考えられることは、これらの施設で犬の繁殖も実施されていて、周囲環境が猫と犬のジアルジアシストで汚染されていることであり、しかも、*assemblage C*、

D が 5 施設中の 3 施設から分離されたことから、決してまれなことではないと推測された。海外の報告でも、猫の糞便から *assemblage* C、D が分離されている [47, 76]。さらに、*assemblage* F 以外の遺伝子型が猫の糞便サンプルでしばしば検出されていることから [14, 57]、猫は条件によって猫に優位な遺伝子型の *assemblage* F や人獣共通感染性の *assemblage* A のみならず、猫に非適合性の遺伝子型にも感染する可能性があるかと推察される。

## 5. 小 括

日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したジアルジアの 41 株について、SSU rRNA、*gdh*、*bg*、および *tpi* の 4 つの遺伝子をターゲットとした *multilocus genotyping* によって遺伝子型を決定した。

その結果、人獣共通感染性の *sub-assemblage* AI と人適合型の *sub-assemblage* AII を確認した。さらに、本研究は、日本の猫から犬に適合した遺伝子型である *assemblage* C と D を初めて分離した。

以上のことから、繁殖施設で飼育されている猫から人へのジアルジア伝播リスクは、無視できないものと考えられる。同時に猫は、条件によって非適合性の遺伝子型にも感染する可能性があるかと推察される。

## 総 括

猫の消化管内寄生虫は、消化器障害を引き起こす可能性があり、さらに、その一部は人獣共通感染性であることが知られ、原虫のクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) とジアルジア (*Giardia* spp.) もそれらに含まれる。最近の猫と人との関係の親密さを考えれば、猫から人への消化管内寄生虫の感染リスクは、潜在的に重要なものとなりつつある。しかしながら、ペットショップを介して、あるいは直接の販売によって、将来的に一般家庭で飼育されることになる子猫の重要な供給源である繁殖施設で飼育されている猫における消化管内寄生虫の感染状況に関しては、クリプトスポリジウムとジアルジアを含め、日本国内での報告はなく、また、海外でもごく少数の小規模な調査がなされているに過ぎず、その実態は明らかにされていないのが現状である。

以上のことを背景に、本研究では、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアを含む消化管内寄生虫の感染状況を明らかにし、また、分離したクリプトスポリジウムおよびジアルジアについて、種の同定や遺伝子型の解析を行い、繁殖施設の猫から人へのこれら原虫の伝播リスクについて検討した。

第1章では、日本国内で初めて、繁殖施設で飼育されている猫における消化管内寄生虫の感染状況を明らかにした。日本国内の7カ所の繁殖施設で飼育されている猫342頭から採取した新鮮便を材料として、クリプトスポリジウムとジアルジア以外の消化管内寄生虫は、ホルマリン・酢酸エチル沈澱法を用いて検出した。ジアルジア

の検出は、市販のジアルジア特異抗原検出 ELISA キットを用いて実施した。同時に、286頭のサンプルについては、SSU rRNA 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法でクリプトスポリジウムの検出を実施した。その結果、クリプトスポリジウム以外の消化管内寄生虫全体の検出率は 20.8%であり、ジアルジア（18.7%）とイソスポラ（5.0%）の 2 種の原虫が検出された。消化管内寄生虫全体の検出率、ジアルジアの検出率、およびイソスポラの検出率は、いずれも 1 歳齢未満の猫で 1 歳齢以上に比較して有意に高かった。寄生虫感染の有無による糞便性状の違いは認められなかった。ジアルジアは、1 施設を除くすべての繁殖施設から検出され、国内の猫の繁殖施設における感染の蔓延が示唆された。クリプトスポリジウムは、2 カ所の施設で 4 頭の猫（1.4%）から検出され、年齢および糞便の性状は、検出率と有意な関係がなかった。以上のことから、繁殖施設の猫において重要と考えられる消化管内寄生虫は、特に 1 歳齢未満の猫で、ジアルジアとイソスポラであることが明らかになった。一方で、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫のクリプトスポリジウムの感染率は、低いことが示唆された。また、消化管内寄生虫の検出率は、施設間で大きなばらつきが認められ、繁殖施設の環境汚染がジアルジアを中心とした消化管内寄生の原虫感染に影響する最も重要な因子であると推測された。

第 2 章では、クリプトスポリジウムが検出された 4 サンプルについて、second PCR 産物を用いてシーケンス解析を実施した。その結果、4 サンプルの塩基配列は、すべて *C. felis* と 99~100%一致した。第 1 章で明らかになった低い検出率、さらに、人のクリプトスポリジウム症のほとんどが *C. hominis* と *C. parvum* によるものあ

ることを考慮すれば、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から人へのクリプトスポリジウム伝播のリスクは、低いものと考えられる。ただし、免疫不全の人では、*C. felis* に感染して発症する可能性があり、高齢者や担癌患者が増加している現状を考慮すれば、今後、注意深い監視が必要であると考えられる。

第3章では、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫から分離したジアルジアの41株について、SSU rRNA、gdh、bg、および tpi の4つの遺伝子をターゲットとした multilocus genotyping によって遺伝子型を決定した。その結果、人獣共通感染性の *G. duodenalis* sub-asmsemblage AI と人適合型の sub-asmsemblage AII が確認され、さらに、日本の猫から犬に適合した遺伝子型である assemblage C と D が初めて分離された。以上のことから、繁殖施設で飼育されている猫から人へのジアルジア伝播リスクは、無視できないものと考えられる。また、猫は条件によって猫に非適合性の遺伝子型にも感染する可能性があるかと推察された。

以上、本研究の成績から、日本国内の繁殖施設で飼育されている猫における消化管内寄生虫感染の実態が明らかとなり、これら施設での1歳齢未満の猫を中心に、ジアルジアとイソスポラ感染の重要性が示唆された。また、繁殖施設の環境汚染が消化管内寄生虫の感染に影響する最も重要な因子であると推測された。さらに、繁殖施設の飼育猫から人獣共通感染性の遺伝子型を持つジアルジアが分離され、今後、ジアルジアについての注意深い監視と対策が必要であることが示された。

本研究の成果は、繁殖施設で飼育されている猫における消化管内

寄生虫の人への感染を防御するために、臨床獣医師の立場から、猫の飼育者や繁殖施設の管理者に衛生管理の強化を促す必要があることを示したものであり、社会的貢献度が高いと考えられる。

## 謝 辞

本論文の稿を終えるにあたり、終始熱心なご指導、適切なお助言を賜った北里大学獣医学部の伊藤直之教授に謹んで感謝の意を表します。また、北里大学獣医学部の工藤 上教授、岡野昇三教授、胡東良教授、麻布大学獣医学部の山下 匡教授、並びにサエキベテリナリィサイエンスの佐伯英治博士にも懇切丁寧なお助言とご指導をいただきましたこと、心より感謝申し上げます。

調査の実施および分析などにあたり、ひとかたならぬご協力を頂いた北里大学獣医学部小動物第1内科学研究室の学生の皆様にも感謝の意を表します。さらに、本研究の趣旨をご理解いただき、調査にご協力下さった各繁殖施設の関係各位に御礼申し上げます。

最後に、長年に渡り私を精神的に支えてくれた家族や伊藤動物病院のスタッフの皆様には厚く御礼申し上げます。



## 文 献

1. Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 447-475.
2. Ballweber, L. R., Panuska, C., Huston, C. L., Vasilopoulos, R., Pharr, G. T. and Mackin, A. 2009. Prevalence of and risk factors associated with shedding of *Cryptosporidium felis* in domestic cats of Mississippi and Alabama. *Vet. Parasitol.* **160**: 306-310.
3. Ballweber, L. R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G. and Cama, V. A. 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* **26**: 180-189.
4. Baneth, G., Thamsborg, S. M., Otranto, D., Guillot, J., Blaga, R., Deplazes, P. and Solano-Gallego, L. 2016. Major parasitic zoonoses associated with dogs and cats in Europe. *J. Comp. Pathol.* **155**: S54-S74.
5. Beser, J., Toresson, L., Eitrem, R., Troell, K., Winiecka-Krusnell, J. and Lebbad, M. 2015. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. *Infect. Ecol. Epidemiol.* DOI: 10.3402/iee.v5.28463.
6. Bouzid, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M. and Tyler, K. M. 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**: 115-134.

7. Capári, B., Hamel, D., Visser, M., Winter, R., Pfister, K. and Rehbein, S. 2013. Parasitic infections of domestic cats, *Felis catus*, in western Hungary. *Vet. Parasitol.* **192**: 33-42.
8. Carranza, P. G. and Lujan, H. D. 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microb. Infect.* **12**: 71-80.
9. Chalmers, R. M. and Katzer, F. 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.* **29**: 237-251.
10. Chomel, B. B. 2014. Emerging and re-emerging zoonoses of dogs and cats. *Animals* **4**: 434-445.
11. Clark, D. P. 1999. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 554-563.
12. Efstratiou, A., Ongerth, J. E. and Karanis, P. 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2011-2016. *Water Res.* **114**: 14-22.
13. Esch, K. J. and Petersen, C. A. 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**: 58-85.
14. Feng, Y. and Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 110-140.

15. Gates, M. C. and Nolan, T. J. 2009. Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Vet. Parasitol.* **166**: 153–158.
16. Goldstein, E. J. and Abrahamian, F. M. 2015. Diseases transmitted by cats. *Microbiol. Spectr.* DOI: 0.1128/microbiolspec.IOL5-0013-2015.
17. Heyworth, M. F. 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and host. *Parasite* DOI: 10.1051/parasite/2016013.
18. Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. and Thompson, R. C. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.* **83**: 44-51.
19. 板垣 博, 宮本健司, 深瀬 徹, 長堀正行. 2005. 内部寄生虫検査のための材料採取とその処理法. pp.22-27. *In*: 臨床寄生虫病, 板垣 博監修, 学窓社, 東京.
20. Ito, Y., Itoh, N., Iijima, Y. and Kimura, Y. 2017. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. among household cats and pet shop kittens in Japan. *JFMS Open Rep.* DOI: 10.1177/2055116917730719.
21. Itoh, N., Ikegami, H., Takagi, M., Ito, Y., Kanai, K., Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F. and Higuchi S. 2012. Prevalence of intestinal parasites in private-household cats in Japan. *J. Feline Med. Surg.* **14**: 436-439.

22. Itoh, N., Ito, Y., Kato, A., Kanai, K., Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F. and Higuchi, S. 2013. Prevalence of intestinal parasites in pet shop kittens in Japan. *J. Feline Med. Surg.* **15**: 908-910.
23. 伊藤直之. 2000. 飼育猫における猫回虫の寄生状況. *感染症誌*. **74**: 824-827.
24. 伊藤直之. 2013. 犬のジアルジア感染. *日獣会誌*. **66**: 701-708.
25. 伊藤直之, 青木美樹子, 板垣 匡. 2005. 青森県八戸地域の飼育猫における消化管内寄生虫の検出状況. *日獣会誌*. **58**: 683-686.
26. 伊藤直之, 金井一享, 近澤征史朗, 堀 泰智, 星 史雄, 樋口 誠一. 2011. 東北・関東の4ペットショップで飼育されている子猫における消化管内寄生虫の検出状況. *動物臨床医学*. **20**: 121-124.
27. 伊藤直之, 兼島 孝, 佐伯英治, 金井一享, 近澤征史朗, 堀 泰智, 星 史雄, 樋口 誠一. 2010. 日本全国の一般家庭で飼育されている犬および猫における消化管内寄生虫の調査. *動物臨床医学*. **19**: 41-49.
28. 一般社団法人ペットフード協会. 2017. 平成28年(2016年)全国犬猫飼育実態調査結果.  
<http://www.petfood.or.jp/data/chart2016/2.pdf>
29. 神山恒夫. 2003. 動物由来感染症の宿主. pp.16-30. *In*: 動物由来感染症, 第1版, 真興交易医書出版部, 東京.

30. 感染症法研究会. 2004. 法令. pp.221-352. *In*: 詳解 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律, 改訂版, (感染症法研究会編集), 中央法規出版, 東京.
31. Khan, A., Shaik, J. S. and Grigg, M. E. 2017. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.10.023.
32. Kirkpatrick, C. E. 1987. Giardiasis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **17**: 1377-1387.
33. Kirkpatrick, C. E. 1998. Epizootiology of endoparasitic infections in pet dogs and cats presented to a veterinary teaching hospital. *Vet. Parasitol.* **30** : 113-124.
34. Kirkpatrick, C. E. and Dubey, J. P. 1987. Enteric coccidial infections. *Isospora, Sarcocystis, Cryptosporidium, Besnoitia, and Hammondia.* *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **17**: 1405-1420.
35. Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D. and Cacciò, S. M. 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* **35**: 207-213.
36. Lappin, M. R. 2010. Update on the diagnosis and management of *Isospora* spp infections in dogs and cats. *Topics Companion Anim. Med.* **25**: 133-135.

37. Lappin, M. R., Dowers, K., Taton-Allen, G. and Cheney, J. 1997. Cryptosporidiosis and inflammatory bowel disease in a cat. *Feline Pract.* **25**: 10-13.
38. Lebbad, M., Mattsson, J. G., Christensson, B., Ljungström, B., Backhans, A., Andersson, J. O. and Svärd, S. G. 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet. Parasitol.* **168**: 231-239.
39. Li, W., Li, Y., Song, M., Lu, Y., Yang, J., Tao, W., Jiang, Y., Wan, Q., Zhang, S. and Xiao, L. 2015. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. *Vet. Parasitol.* **208**: 125-134.
40. Lindsay, D. S., Dubey, J. P. and Blagburn, B. L. 1997. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 19-34.
41. Lucio-Foster, A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., Browman, D. D. 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol.* **26**: 174-179.
42. McDonald, V. 2011. Cryptosporidiosis: host immune responses and the prospects for effective immunotherapies. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **9**: 1077-1086.

43. McGlade, T. R., Robertson, I. D., Elliot, A. D., Read, C. and Thompson, R. C. A. 2003. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. *Vet. Parasitol.* **117**: 251-262.
44. McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R. and Humphries, R. M. 2014. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 712-720.
45. Mtambo, M. M., Nash, A. S., Blewett, D. A., Smith, H. V. and Wright, S. 1991. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Vet. Rec.* **129**: 502-504.
46. 及川 弘, 塩田恒三. 1992. 糞便による寄生虫検査. pp.41-62. *In*: イヌ・ネコの寄生虫学実践入門, 第1版, 山水書房, 東京.
47. Pallant, L., Baruzki, D., Schaper, R. and Thompson, R. C. A. 2015. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasites Vectors* DOI: 10.1186/s13071-014-0615-2.
48. Palmer, C. S., Thompson, R. C. A., Traub, R. J., Rees, R. and Robertson, I. D. 2008. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Vet. Parasitol.* **151**: 181-190.
49. Plutzer, J. and Karanis, P. 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet. Parasitol.* **165**: 187-199.

50. Plutzer, J., Ongerth, J. and Karanis, P. 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **213**: 321-33.
51. Prucca, C. G. and Lujan, H. D. 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiol.* **11**: 1706-1715.
52. Read, C. M., Monis, P. T. and Thompson, R. C. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.* **4**: 125-130.
53. Rijiks, J. M., Cito, F., Cunningham, A. A., Rantsis, A. T. and Giovannini, A. 2016. Disease risk assessments involving companion animals: an overview for 15 selected pathogens taking a European prospective. *J. Comp. Pathol.* **155**: S75-S97.
54. Robertson, I. D., Irwin, P. J., Lymbery, A. J. and Thompson, R. C. A. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1369-1377.
55. Robertson, I. D. and Thompson, R. C. A. 2002. Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes Infect.* **4**: 867-873.
56. Rosado-Gracia, F. M., Guerrero-Flórez M., Karanis, G., Hinojosa, M. D. C. and Karanis, P. 2017. Water-borne protozoa parasites: the Latin American perspective. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **220**: 783-798.



57. Ryan, U. and Cacciò, S. M. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* **43**: 943-956.
58. Ryan, U. and Hijjawi N. 2015. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int. J. Parasitol.* **45**: 367-373.
59. Ryan, U., Zahedi, A. and Paparini, A. 2016. *Cryptosporidium* in humans and animals – a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunol.* **38**: 535-547.
60. Scorza, V. and Tangtrongsup, S. 2010. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Topics Companion Anim. Med.* **25**: 163-169.
61. Skhal, D., Aboualchamat, G., Mariri, A. A. and Nahhas, S. A. 2017. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages and sub-assemblages in symptomatic patients from Damascus city and its suburbs. *Infect. Genet. Evol.* **47**: 155-160.
62. Sotiriadou, I., Pantchev, N., Gassmann, D. and Karanis, P. 2013. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. *Parasite* DOI: 10.1051/parasite/2013008.
63. Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., Das, P., Lal, A. A. and Xiao, L. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 1444-1452.

64. Sunnotel, O., Lowery, C. J., Moore, J. E. Dooley J. S. G., Xiao, L. and Millar, B. C. 2006. *Cryptosporidium*. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 7-16.
65. Suzuki, J., Murata, R., Kobayashi, S., Sadamatsu, K., Kai, A. and Takeuchi, T. 2011. Risk of human infection with *Giardia duodenalis* from cats in Japan and genotyping of the isolates to assess the route of infection in cats. *Parasitology* **138**: 493-500.
66. Tangtrongsup, S. and Scorza, V. 2010. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Topics Companion Anim. Med.* **25**: 155-162
67. Taylor, M. A., Coop, R. L. and Wall, R. L. 2007. Parasites of dogs and cats. pp.356-458. *In*: Veterinary parasitology, 3rd ed, (Taylor, M. A., Coop, R. L. and Wall, R. L. eds), Oxford, Blackwell Publishing.
68. Thompson, R. C. A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* **126**: 15-35.
69. Thompson, R. C. A. and Ash, A. 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect. Genet. Evol.* **40**: 315-323.
70. Tysnes, K. R., Luyckx, K., Cantas, L. and Robertson, L. J. 2016. Treatment of feline giardiasis during an outbreak of diarrhoea in a cattery: potential effects on faecal *Escherichia coli* resistance patterns. *J. Feline Med. Surg.* **18**: 679-682.

71. Uehlinger, F. D., Naqvi, S. A., Greenwood, S. J., McClure, J. T., Conboy, G., O'Handley, R. and Barkema, H. W. 2017. Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Vet. Parasitol.* **244**: 91-96.
72. Wang, H., Zhao, G., Chen, G., Jian, F., Zhang, S., Feng, C., Wang, R., Zhu, J., Dong, H., Hua, J., Wang, M. and Zhang, L. 2014. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Henan, China. *Plos One* **9**: e100453.
73. Wielinga, C. M. and Thompson, R. C. 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* **134**: 1795-1821.
74. Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* **124**: 80-89.
75. Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C. A., Fayer, R. and Lal, A. A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *App. Environ. Microbiol.* **65**: 3386-3391.
76. Xu, H., Jin, Y., Wu, W., Li, P., Wang, L., Li, N., Feng, Y. and Xiao, L. 2016. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. *Parasites Vectors* DOI: 10.1186/s13071-016-1409-5.

77. Yang, R., Ying, J. L. J., Monis, P. and Ryan, U. 2015. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. *Exp. Parasitol.* **155**: 13-18.
78. Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Kimata, I., Furuya, M., Tani, H. and Sasai, K. 2010. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Vet. Parasitol.* **174**: 313-316.
79. Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M. and Spruill, C. L. 1979. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in formalin-ether sedimentation technique. *J. Clin. Microbiol.* **10**: 852-853.
80. Yu, J. R., Lee, S. U. and Park, W. Y. 2009. Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. *Korean J. Parasitol.* **47**: 293-297.

**Table 1 Prevalence of intestinal parasites in breeding cattery cats in Japan**

Parasite	Overall (n = 342)	Age		P-value	Fecal condition			P-value (a vs. b vs. c)
		<1 year (n = 50)	≥1 year (n = 292)		Normal <sup>a</sup> (n = 271)	Soft <sup>b</sup> (n = 63)	Diarrhea <sup>c</sup> (n = 8)	
<i>Giardia</i> spp.	18.7% (64) *	42.0% (21)	14.7% (43)	<0.001	17.0% (46)	27.0% (17)	12.5% (1)	NS
<i>Isoospora</i> spp.	5.0% (17)	24.0% (12)	1.7% (5)	<0.001	5.2% (14)	3.2% (2)	12.5% (1)	NS
<i>Giardia</i> spp. plus <i>Isoospora</i> spp.	2.9% (10)	18.0% (9)	0.3% (1)	<0.001	3.3% (9)	0% (0)	12.5% (1)	NS
Total infection	20.8% (71) <sup>†</sup>	48.0% (24)	16.1% (47)	<0.001	18.8% (51)	30.2% (19)	12.5% (1)	NS
	Overall (n = 286)	Age		P-value	Fecal condition			P-value (a vs. b vs. c)
		<1 year (n = 34)	≥1 year (n = 252)		Normal <sup>a</sup> (n = 229)	Soft <sup>b</sup> (n = 49)	Diarrhea <sup>c</sup> (n = 8)	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1.4% (4)	2.9% (1)	1.2% (3)	NS	0.9% (2)	4.1% (2)	0% (0)	NS

\* Number of infected cats

<sup>†</sup>This total number is smaller than sum of each parasite because of multiple infections

**Table 2 Prevalence of intestinal parasites in individual breeding cattery cats in Japan**

Parasite	Breeding catteries						
	No.1 (n = 14)	No.2 (n = 14)	No.3 (n = 189)	No.4 (n = 43)	No.5 (n = 13)	No.6 (n = 15)	No.7 (n = 54)
	(0) <sup>a</sup>	(0)	(37)	(1)	(8)	(4)	(0)
<i>Giardia</i> spp.	35.7% (5) <sup>*</sup>	7.1% (1)	21.7% (41)	7.0% (3)	69.2% (9)	0% (0)	9.3% (5)
<i>Isospora</i> spp.	7.1% (1)	0% (0)	2.6% (5)	0% (0)	76.9% (10)	0% (0)	1.9% (1)
<i>Giardia</i> spp. plus <i>Isospora</i> spp.	0% (0)	0% (0)	1.1% (2)	0% (0)	61.5% (8)	0% (0)	0% (0)
Total infection	42.9% (6) <sup>†</sup>	7.1% (1)	23.3% (44)	7.0% (3)	84.6% (11)	0% (0)	11.1% (6)
	Breeding catteries						
	No.1 (n = 13)	No.2 (n = 10)	No.3 (n = 148)	No.4 (n = 43)	No.5 (n = 10)	No.6 (n = 15)	No.7 (n = 47)
	(0)	(0)	(24)	(1)	(5)	(4)	(0)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	10.0% (1)	0% (0)	6.4% (3)

a = number of <1 year cats

\* Number of infected cats

† This total number is smaller than sum of each parasite because of multiple infections

**Table 3** Species of *Cryptosporidium* isolates from 4 breeding cattery cats

Breeder	Age	Gender	Species of <i>Cryptosporidium</i>	Accession No. in GenBank	Similarity
No.5	1 month	Male	<i>C. felis</i>	KF287127	100%
No.7	1 year	Female	<i>C. felis</i>	KM977642	100%
No.7	5 year	Female	<i>C. felis</i>	AF112575	99%
No.7	5 year	Female	<i>C. felis</i>	KM977642	100%

**Table 4 The primers used for PCR assays in the present study**

Gene	Assay type	Primer (sequence)	Size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
SSU rRNA	nested PCR	Gia2029 (AAGTGTGGTGCAGACGGACTC)	497	60	Hopkins et al. 1997. (18)
		Gia2150c (CTGCTGCCGTCCTTGGATGT)			
		RH11 (CATCCGGTCGATCCTGCC)	292	57	
		RH4 (AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG)			
gdh	semi-nested PCR	GDHeF (TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT)	458	56 (1st.)	Read et al. 2004. (52)
		GDHiF (CAGTACAACCTCYGCTCTCGG)	432	58 (2nd.)	
		GDHiR (GTTRTCCTTGACATCTCC)			
bg	nested PCR	G7 (AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC)	753	64	Lalle et al. 2005. (35)
		G759 (GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC)			
		GiarF (GAACGAACGAGATCGAGGTCCG)	511	55	
		GiarR (CTCGACGAGCTTCGTGTT)			
tpi	nested PCR	AL3543 (AAATIATGCCTGCTCGTCG)	605	53	Sulaiman et al., 2003. (63)
		AL3546 (CAAACCTTITCCGCAAACC)			
		AL3544 (CCCTTCATCGGIGGTAACCTT)	532	57	
		AL3545 (GTGGCCACCACICCCGTGCC)			





**Table 5 Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in breeding cattery cats**

Breeding cattery	Assemblages and sub-assemblages				Total	
	SSU rRNA	gdh	bg	tpi		
No.1	1	C	C	D	D	C+D
	2	F	F	F	-	F
	3	F	C	-	-	F+C
	4	F	-	-	-	F
No.3	1	A	F	F	F	A+F
	2	F	AI	AI	AII	F+A (AI+AII)
	3	-	F	-	-	F
	4	-	F	-	-	F
	5	F	F	F	-	F
	6	F	F	F	F	F
	7	F	-	F	-	F
	8	F	F	F	-	F
	9	F	-	-	-	F
	10	F	F	F	-	F
	11	A	AI	AI	AII	A (AI+AII)
	12	F	F	F	-	F
	13	A	AI	AI	AII	A (AI+AII)
	14	F	-	-	-	F
	15	F	AI	F	-	F+A (AI)
	16	F	-	-	-	F
	17	F	-	-	-	F
	18	F	-	-	-	F
	19	A	AI	AI	AII	A (AI+AII)
	20	A	AI	AI	AII	A (AI+AII)
	21	F	-	-	-	F
	22	F	C	F	-	F+C
	23	F	-	-	-	F
	24	F	-	-	-	F
	25	F	F	F	-	F
	26	F	AI	F	AII	F+A (AI+AII)
No.4	1	F	F	-	-	F
	2	F	F	F	-	F
	3	-	F	-	-	F
No.5	1	-	F	-	-	F
	2	-	F	-	-	F
	3	-	F	-	-	F
	4	-	F	-	-	F
	5	F	F	-	-	F
	6	-	-	-	AII	A (AII)
No.7	1	F	-	-	-	F
	2	C	C	-	C	C

∴ Not amplified

**Table 6 Assemblages of *Giardia duodenalis* isolates detected at differential loci**

Genes	Assemblage	Genotyped numbers	Accession numbers in GenBank
SSU rRNA (n=33)	F	26	JX275387
	A	5	KX384156
	C	2	KJ027401
gdh (n=29)	F	18	KJ194112, AB569374
	A	7	KJ741298, KU565025, AB692779
	C	4	AB569390, DQ417370
bg (n=19)	F	13	AY647264, KM977659
	A	5	KR075938, KR051224
	D	1	AY545647
tpi (n=11)	F	2	KP866788
	A	7	KP780958, KP780964
	C	1	KP258397
	D	1	KJ668131