

日本国内の飼育犬・猫由来 *Giardia duodenalis* の
分子疫学的研究

飯島 裕子

Molecular epidemiological study of *Giardia duodenalis*
isolated from domestic dogs and cats in Japan

Yuko Iijima

目次

緒論	1
第 1 章 飼育犬由来 <i>G. duodenalis</i> の Multi-locus genotyping	
1. 序言	5
2. 材料および方法	6
3. 成績	8
4. 考察	10
第 2 章 飼育猫由来 <i>G. duodenalis</i> の Multi-locus genotyping	
1. 序言	16
2. 材料と方法	17
3. 成績	18
4. 考察	19
第 3 章 飼育犬・猫由来 <i>G. duodenalis</i> の 4 遺伝子座における DNA 配列の比較	
1. 序言	23
2. 材料と方法	23
3. 成績	24
4. 考察	25
総括	29
謝辞	33
文献	34
付図・付表	41

緒論

Giardia duodenalis (syn. *G. lamblia*, *G. intestinalis*) は、世界中に分布し、人や伴侶動物を含む幅広い範囲の哺乳類に感染し、下痢を引き起こす可能性がある消化管内寄生原虫である [6, 33, 44]。この寄生虫に関する記載は 1681 年のレーウエンフックによる発見に始まり、その後、様々な動物種の糞便中に発見され、それぞれに命名されたことから、種名に関して混乱があった [40]。現在、形態学的に 1 種とみなされている *G. duodenalis* は、*Giardia* 属の中で唯一、人からの検出が報告されている原虫である [33, 44]。分子学的解析手法の発展に伴い、この原虫は高い遺伝子学的多様性を持つ 1 つの種複合体であり、少なくとも assemblage A から H の 8 つのグループに分けられ、それぞれ宿主特異性が異なることが明らかとなった [6, 8, 33]。assemblage (=genotype) A と B は、人・家畜・野生動物を含む幅広い哺乳類から検出され、人獣共通感染性の遺伝子型とされる一方で、assemblage C から H は比較的高い宿主特異性を有し、assemblage C と D は犬、E は有蹄類家畜、F は猫、G は齧歯類、H は海棲哺乳類から主に検出されている [6, 33]。また、いくつかの assemblage では、さらに細かくサブタイピングが行われている。assemblage A は、sub-assemblage AI~AIII に分けられ、特に sub-assemblage AII は、人に対する宿主特異性が最も高いグループとされている [6, 33]。assemblage B では sub-assemblage BI~BIV が報告され、BIII と BIV が人への特異性が高いとされてきたが [26]、アロザイム電気泳動分析によって認められた BIII

と BIV の分類は、シーケンス解析では遺伝子座によって異なるサブグループを形成したことから、肯定されていない[6, 43]。

人のジアルジア症は、発展途上国における最も一般的な下痢症の原因の 1 つであり、また先進国においては、強い環境耐性を持つシストによる水系感染によるアウトブレイクが懸念されている[44]。我が国では、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(感染症法)によって五類感染症の全数把握疾患に指定され、年間 50~100 例ほどが報告されている[20]。その内、海外渡航者での症例が最も多く、ジアルジア症は国内において輸入感染症としての位置づけが強い。しかしながら、実際には、報告されている症例全体の約 4 割は感染源が不明であり、2010 年には国内初の *G. duodenalis* による水系感染によるアウトブレイクが報告されている[34]。これまで日本国内の発生報告で検出された *G. duodenalis* の多くは遺伝子学的解析が行われておらず、その由来を詳細に検討することは困難である。この病原体は人獣共通感染性の可能性があること、さらに One world-One health の理念に照らして考えれば、人と生活圏を共にする動物からの *G. duodenalis* 伝播リスクを評価することは、公衆衛生学上、重要であると考えられる。

犬・猫のジアルジア症は、特に幼若動物の慢性下痢症の原因として知られている[39]。国内の飼育犬における *Giardia* 保有率は、ELISA キットによる特異抗原の検出によれば、一般家庭飼育犬で 8.3%、ペットショップの子犬で 23.4%、繁殖施設飼育犬で 25.7% と報告されている [14, 15, 18]。また、国内の飼育猫における *Giardia* 保有率は、同じく特異抗原を検出する ELISA キットを

用いた調査によれば、一般家庭飼育猫で 1.5%、ペットショップの子猫で 10.1%、繁殖施設飼育猫で 18.7%とされている[12, 16, 17]。従って、現在、*G. duodenalis* は国内の飼育犬・猫で最も蔓延している消化管内寄生虫の 1 つである。飼育犬・猫でジアルジア感染が蔓延しているにもかかわらず、国内の *G. duodenalis* に関する分子疫学的な調査報告は限られており、飼育犬・猫由来 *G. duodenalis* の遺伝子学的な分布および人獣共通感染リスクの評価は、これまで十分には行われていない。

先述の通り、*G. duodenalis* は遺伝子型により宿主特異性が異なることから、人や動物由来 *G. duodenalis* の遺伝子型別を目的として、これまで一般的な nested PCR だけでなく、PCR-RFLP(制限酵素断片長多型)や Multiplex PCR、*assemblage* 特異的 PCR といった手法が、様々な遺伝子座を標的として用いられてきた[1, 24, 27, 33]。一部の *G. duodenalis* 株は、解析に用いた遺伝子座によって異なる型別の結果を示すために、現在では多遺伝子座を用いた遺伝子型別(Multi-locus genotyping : MLG)が最も情報量に優れ、型別決定に適していると考えられている[6]。解析に用いる遺伝子座間で型別の結果に矛盾を生じる理由は完全には解明されていないが、最近、人およびいくつかの哺乳類宿主において、特にジアルジア症が蔓延している場合に、異なる *assemblage* による混合感染が頻繁に見られることが明らかになっていることから、混合感染や各遺伝子座での PCR 増幅率の差異が主な原因ではないかと考えられている[33]。MLG では、複数の遺伝子座を用いて解析することで、検体中に存在する *G. duodenalis* *assemblage* を可能な限り見落としなく検出することが期待されて

いる。

本研究は、日本において様々な環境で飼育されている犬・猫由来の *G. duodenalis* を MLG により解析することで、犬・猫における *G. duodenalis* assemblage の分布を明らかにし、人獣共通感染のリスクを評価した。また、得られた *G. duodenalis* の DNA 配列の比較解析を行い、各 assemblage 内における遺伝子学的多様性および犬・猫における *G. duodenalis* の伝播について考察した。具体的には、第 1 章で飼育犬由来 *G. duodenalis* の MLG を、第 2 章で飼育猫由来 *G. duodenalis* の MLG を実施し、第 3 章では検出された *G. duodenalis* の DNA 配列を用いて系統発生的解析を行った。

第 1 章

飼育犬由来 *G. duodenalis* の Multi-locus genotyping

1. 序言

犬は人間によって家畜化された最も古い動物であり、現代においても伴侶動物や使役動物として、様々な環境で飼育されている [28]。2017 年に一般社団法人ペットフード協会によって実施された全国犬・猫飼育実態調査によると、国内の犬の飼育頭数は、減少傾向にはあるものの、今なお 892 万頭が飼育されている [10]。また、完全室内飼育の小型犬種が台頭し、犬の飼育環境は、より人の生活空間に近いものとなっていることから、人獣共通感染症のリスク管理の重要性が高まっていると言える。

犬由来 *G. duodenalis* の遺伝子学的評価は世界中で報告されているが [41]、国内においては、著者の知る限り、1 遺伝子による型別評価が 2 報あるのみである [11, 15]。犬由来 *G. duodenalis* の遺伝子型としては、犬に特異的な assemblage C や D が最も頻繁に検出されている一方で、人獣共通感染性の assemblage A や B、牛・豚などの家畜に特異的な assemblage E、猫に特異的な assemblage F も犬から検出されている [41]。従って、犬は幅広い *G. duodenalis* assemblage の宿主となる可能性を有している。

第 1 章では国内の様々な環境で飼育されている犬由来の *G. duodenalis* 株について MLG により遺伝子型を決定することで、各 assemblage の分布を調査し、人獣共通感染のリスク評価を行った。

2. 材料および方法

2-1. 糞便材料

2014年8月から2017年7月までの期間に、日本国内で飼育されている犬の糞便を、消化器症状の有無に関わらず収集し、ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)キット(SNAP *Giardia*, IDEXX Laboratories, Inc., Maine, USA)により *Giardia* 特異抗原が陽性となった210検体について、遺伝子学的解析を実施した。これらの内、48検体は国内の9カ所の動物病院(北海道1カ所、東北4カ所、関東2カ所、近畿1カ所、九州1カ所)に来院した一般家庭飼育犬から採取したものであり、87検体は7カ所のペットショップ(東北4カ所、関東3カ所)、46検体は6カ所の繁殖施設(東北2カ所、関東1カ所、中部3カ所)、17検体は動物看護師やトリマーのための専門学校、12検体は犬の訓練施設で、それぞれ飼育されている犬から得たものであった。全ての検体は、犬の所有者から調査協力の了承を得た上で提供されたものである。糞便は自然排泄されたものを採取した後に4℃で保存し、採取より3日以内にシストの回収およびDNAの抽出を行った。

2-2. シストの回収およびDNA抽出

G. duodenalis のシストは、比重1.26のショ糖液を用いて遠心浮遊法により回収した。シストからのDNA抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いて、製品の使用説明書に従い実施し、得られたサンプルは解析まで-20℃で保存した。

2-3. PCRによるDNA増幅

MLGに用いられる標的遺伝子としては、18S ribosomal RNA

(18S rRNA)、glutamate dehydrogenase (GDH)、beta-giardin (BG)、triose phosphate isomerase (TPI)の4遺伝子が最も汎用されている[6]。今回は、これらの4遺伝子を標的とした各 nested PCRに加えて、TPIにおいて汎用されているプライマーが、犬特異的な assemblage Dを検出しにくいとの報告があることから、犬特異的 assemblage の検出に優れたプライマーを用いた TPI 遺伝子を標的とする nested PCR も併せて実施した[2, 4, 5, 9, 22, 23, 37]。各 PCR のプライマー、予想される増幅産物の断片長および PCR の温度条件を Table 1 に示した(Table 1)。

18S rRNA、GDH、TPI を標的とした primary PCR の反応液は、Go Taq (Promega, Madison, USA) 1.25U、5×Colorless Buffer (Promega) 5 μ l、MgCl₂ 最終濃度 2.0mM、各 dNTP 200 μ M、各プライマー 0.25 μ M、鋳型として DNA 抽出物 3 μ l を含み、MQ 水により最終容量 25 μ l とした。BG では、MgCl₂ の最終濃度を 3.0mM とした。全ての secondary PCR は鋳型として primary PCR 産物を用い、primary PCR と同様の反応液を用いた。

全ての secondary PCR 産物を 1.5% アガロースゲル上で電気泳動した。AtlasSight DNA stain (Bioatlas, Tartu, Estonia)により染色し、UV トランスイルミネーター上で可視化された増幅産物を確認した。想定される断片長の産物を認めた検体について PCR 陽性とし、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いて増幅 DNA 産物を精製した。

2-4. 配列解析および遺伝子型別

精製した PCR 産物のシーケンス解析は外部業者に委託した (Fasmac Co., Ltd., 厚木)。読み取ったシーケンスのアラインメ

ント処理および比較を MEGA 7.0.26 (www.megasoftware.net)
により行った。BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
を用いて GenBank 上に登録された DNA 配列と比較し、最も一致
率の高い配列を検索することで、検出した *G. duodenalis* の
assemblage あるいは sub-assemblage を決定した。検出さ
れた配列は、accession number LC437354~LC437648 にて、DNA
Data Bank of Japan (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/DDBJ/>)のデ
ータベースに登録した。

2-5. 統計解析

データは、年齢(1歳未満、1歳以上)、糞便性状(固形便、
軟~下痢便)、由来(一般家庭、ペットショップ、繁殖施設、専門
学校、犬の訓練施設)の分類ごとに集計し、またペットショップと
繁殖施設に関しては、各施設(店舗 A~H、繁殖施設 A~F)ごとの
集計も行った。フィッシャーの直接確率計算法で各群間を比較し、
 $P < 0.05$ の場合に有意と判定した。

3. 成績

3-1. PCR 陽性率と Single-loci genotyping

合計 170 検体(81.0%; 170/210)で、PCR により *G. duodenalis*
の DNA 断片を得た。170 検体の内訳としては、一般家庭由来 39
検体、ペットショップ由来 69 検体、繁殖施設由来 37 検体、専門
学校由来 13 検体、犬の訓練施設由来 12 検体であった。各遺伝子
座における PCR の陽性数および型別結果を Table 2 に示した
(Table 2)。犬特異的 assemblage を検出する TPI 遺伝子を標的と
した PCR の陽性率が最も高く(75.7%; 159/210)、次いで

BG(53.8%; 113/210)、TPI(51.0%; 107/210)、GDH(49.0%; 103/210)と続き、18S rRNAでの陽性率(34.8%; 73/210)は最も低かった。

assemblage A および B のサブタイプを決定する型別の結果、全ての assemblage A 株は、GDH および BG で sub-assemblage AI、TPI では sub-assemblage AII として型別された。また全ての assemblage B 株は、TPI の塩基配列に基づき、BIV として型別された。

いくつかのシークエンスファイルにおいて、2 つの異なる assemblage の重複が認められた。それらの大部分(18S rRNA : 3 検体、GDH : 14 検体、BG : 11 検体、犬特異的 assemblage の TPI : 20 検体)は、assemblage C と D の重複であり、1 検体は BG で assemblage A と D が重複し、別の 1 検体は TPI で assemblage A と C の重複が見られた。

3-2. Multi-locus genotyping

83 検体は、4 遺伝子座で実施された 5 つの PCR 間で結果に矛盾を生じず、単一の assemblage として同定されたのに対し、87 検体は、それぞれ複数の異なる assemblage の DNA 配列を含んでいた。犬特異的 assemblage が全体の 81.8%(139/170)を占め、assemblage C が 15.3% (26/170)、D が 30.0% (51/170)、mixed assemblage C+D が 36.5% (62/170)となった。30 検体(17.6%)は人獣共通感染性とされる assemblage A あるいは B を含み、assemblage A が 2.9% (5/170)、A+D が 9.4% (16/170)、A+C+D が 2.9% (5/170)、B が 0.6% (1/170)、B+D が 1.8% (3/170)であった。1 検体は猫特異的な遺伝子型である assemblage F の遺伝子

を含んでいた(D+F: 0.6%)。

3-3. カテゴリー間の比較

雌雄、年齢、糞便性状ごとの *assemblage* 分布を Table 3 に示す(Table 3)。雌雄および糞便性状(固形便、軟～下痢便)のカテゴリー間で *assemblage* 分布の差は認められなかった。年齢では1歳齢以上の犬では1歳齢未満に比べて、人獣共通感染性 *assemblage* を含む検体が多かった($P < 0.01$)。

検体のソースごとに見ると、一般家庭、ペットショップ、繁殖施設、専門学校、犬の訓練施設のいずれからも、人獣共通感染性 *G. duodenalis* の *assemblage* A が検出された(Table 4)。専門学校では、他の検体ソースに比べ有意に高い割合で *assemblage* A が検出された。さらに、ペットショップ、繁殖施設の施設ごとに集計したところ、人獣共通感染性 *assemblage* の分布が特定の施設に偏在している傾向が認められた(Table 5)。

4. 考察

世界中で数多く報告されている犬由来 *G. duodenalis* の分子疫学調査の中でも、本研究は著者の知る限り最も大規模な調査であり、また日本国内においては最初の犬由来 *G. duodenalis* の MLG 調査である。さらに、繁殖施設、専門学校、犬の訓練施設の飼育犬を調査対象に含めたものはこれまでにない。本研究の結果として、様々な飼育環境で飼育される犬のグループ間における *assemblage* 分布の比較が可能となり、*assemblage* 分布および人獣共通感染リスクに影響し得る因子の考察が可能となった。

本調査により、国内の飼育犬由来の糞便から *G. duodenalis*

assemblage A、B、C、D、Fが検出された。これらの遺伝子型は、いずれも海外の調査で犬からの検出が報告されているが[3, 35]、日本国内で犬から assemblage Bおよび Fが検出されたのは初めてである[11, 15]。今回、国内で飼育されている犬においても幅広い *G. duodenalis* assemblage を保有していることが確認された。全体としては、犬特異的 assemblage(C、D、C+D)が主であったが、人獣共通感染性 assemblage も遺伝子型別が可能だった検体の 17.6%で検出された。従来報告においても、犬に由来する *G. duodenalis* では、犬特異的 assemblage が多数を占め[3, 29]、人獣共通感染性 assemblage の保有率は、調査によって 0%~92.6%と幅広い値が報告されている[25, 41]。本調査では、人獣共通感染性 assemblage が一般家庭、ペットショップ、繁殖施設、専門学校、犬の訓練施設のいずれの飼育犬からも検出されたことから、日本国内の様々な環境で飼育されてる犬が、*G. duodenalis* の人獣共通感染リスクを有していることが明らかとなった。

カテゴリ間の比較では、1歳齢以上の犬から、1歳齢未満の子犬に比べて有意に高い割合で人獣共通感染性 assemblage が検出された。しかしながら、assemblage Aが最も多く検出された専門学校の飼育犬が全て成犬であったことから、必ずしも年齢と assemblage の分布に関連があるとは断言できない。考慮すべき点として、成犬のジアルジア感染では、症状が明らかでない場合が多く[39]、子犬以上に感染が見落とされやすことから、成犬の保有する *G. duodenalis* の人獣共通感染リスクに関しては、より注意を払う必要があると考えられる。

ペットショップと繁殖施設における飼育施設間の比較では、人

獣共通感染性 *assemblage* の分布に偏りが見られた。ペットショップの検体は全て 1 歳齢未満の子犬由来であり、繁殖施設に関しては、*assemblage* A が検出された繁殖施設 A の検体は 1 歳から 9 歳の成犬由来であった。*assemblage* C あるいは D 以外の、犬特異的ではない *assemblage* が多数犬から検出された飼育施設においては、他動物の糞便による飼育環境の汚染も疑われるが [3]、本調査では犬由来株のみを調査対象としているため、推測の域を出ない。いずれにせよ、本研究の結果から、施設ごとの飼育環境や感染コントロールの違いが *assemblage* 分布に大きく影響する因子である可能性が示され、各飼育施設における管理の重要性が示唆された。

今回、遺伝子型別に成功した検体の半数以上が複数の *assemblage* の遺伝子を含む *mixed assemblage* として同定された。先述したように、*G. duodenalis* は、特に感染が蔓延している場合に、複数の *assemblage* による混合感染が頻繁に生じることが知られている [33]。従って、今回の調査で多くの検体が *mixed assemblage* として同定されたことは、犬が幅広い *G. duodenalis assemblage* の宿主になり得ることと、国内の飼育犬においてジアルジア感染が蔓延している現状の 2 つの要因によってもたらされた可能性が高い。

assemblage F は、猫に対し高い宿主特異性を持ち、犬からの検出報告は非常に稀である。今回、*assemblage* D+F として同定された 1 検体は、一般家庭飼育の 5 カ月齢のミニチュアダックスフンドであり、完全室内飼育で他に同居動物は無く、ペットショップで購入された犬であった。従って、ペットショップで飼育され

ていた際に、他の子犬や子猫から感染した可能性が高い。最近の報告で、犬特異的 *assemblage* C と D が猫から検出されていることから [13, 35]、宿主特異性が高いと言われる *assemblage* C、D、F においても、まれに犬-猫の種間で伝播する可能性があると考えられる。しかし、こうした *assemblage* C、D、F の種間伝播の頻度は限られていることから、多量のシストへの暴露や、宿主の免疫力が低い等の、好適でない宿主に伝播するだけの大きな感染要因の存在も疑われる。

今回検出された全ての *assemblage* A 株のサブタイピングにおいて、GDH と BG 遺伝子座では、いずれも *sub-assemblage* AI と同定されたが、TPI では *sub-assemblage* AII の配列を示した。*assemblage* A 株でのこういった MLG による組み合わせは、これまでに記載が無い [6]。今回、*assemblage* A の配列が検出された検体のほとんどが、他遺伝子座で *assemblage* C や D を含む *mixed assemblage* となっており、今回の調査結果のみで単一の *assemblage* A 株に由来する組み合わせであると判断することは難しい。しかしながら、複数の検体で同様のサブタイピング結果の矛盾が認められることから、*assemblage* A の 1 つの遺伝子型である可能性は高い。本調査で検出された *assemblage* A 株の最終的なサブタイピングに関しては、恐らく、いずれの株も *sub-assemblage* AI として分類すべきである。これまで、*assemblage* A のサブタイピングにおいて、系統発生的に、GDH 遺伝子座で BG や TPI よりも強固なクラスターを形成することがわかっており、GDH によるサブタイピングが最も信頼性が高い [6]。しかし、TPI での結果を無視して MLG によるサブタイピン

グを行うのであれば、サブタイピングに TPI を用いる意義が揺らいでしまうことから、各遺伝子座における結果を重み付けして総合的に解釈するための新たな方法が必要と考えられる。

G. duodenalis 検出のための PCR の陽性率について、今回の調査では全体で 81.0% となり、これは過去の他の調査と同等であった [41]。 *G. duodenalis* の検出法としては、現在 ELISA キットが最も感度が高いとされており、PCR はあくまで遺伝子型別のためのツールとして認識されている [42]。それぞれの PCR の陽性率に関しては、今回、犬特異的 *assemblage* の TPI 遺伝子を標的としたものが最も高く、18S rRNA で最も低かった。MLG で標的とした 4 遺伝子は、いずれもハウスキーピング遺伝子であるが、中でも 18S rRNA は細胞内に多コピーで存在するために、一般的には *G. duodenalis* の存在を最も検出しやすい標的遺伝子であるとされる [33]。しかし、*assemblage* ごとに各遺伝子座における PCR の増幅率が異なる可能性が指摘されており [33]、あくまで今回の結果からは、全体の多くを占める *assemblage* C および D の検出率が、18S rRNA の PCR では低かったと言える。

結論として、本研究は日本国内の様々な環境で飼育されている犬由来 *G. duodenalis* の *assemblage* 分布を明らかにした。人獣共通感染性の *assemblage* が様々なソースの犬から検出されたことから、国内の飼育犬が保有する *G. duodenalis* は、潜在的な人獣共通感染リスクを有することが明らかとなった。また飼育施設によっては *assemblage* 分布が大きく異なり、人獣共通感染リスクが増大する可能性があることが明らかとなった。 *G. duodenalis* が国内の飼育犬で蔓延している寄生虫であることを考慮すれば、

この人獣共通感染リスクは無視できないものと考えられる。

第 2 章

飼育猫由来 *G. duodenalis* の Multi-locus genotyping

1. 序言

現在、国内の猫の飼育頭数は 952 万頭と、犬の飼育頭数を超え、伴侶動物としての猫の存在感は増している [10]。また近年、動物愛護管理法およびこれに係る告示である家庭動物等の飼養及び保管に関する基準が整備され [19]、一般的な猫の飼養に関しても、屋外での餌付けから完全室内飼育へとシフトしている。人と猫の関係は、より密接なものとなっていることから、猫が保有する人獣共通感染症のリスク管理に関しても、その重要性は今後、より高まっていくと予想される。

G. duodenalis は、猫においても一般的な人獣共通感染性の病原体であり、過去の猫由来 *G. duodenalis* の調査では、主に猫特異的な遺伝子型である assemblage F が同定され、一部で人獣共通感染性の assemblage A が検出されている [41]。まれに assemblage B、C、D、E も報告されているが、これらの検出頻度は極めて低い [23, 30, 36]。

日本国内の猫では過去に、単一遺伝子による評価が 1 報、繁殖施設あるいは猫カフェの猫を対象とした *G. duodenalis* の MLG 調査が、それぞれ報告されている [13, 38]。第 2 章では、未調査であり、かつ人との密接な接触が予想される一般家庭飼育猫およびペットショップの飼育猫に由来する *G. duodenalis* 株について MLG により遺伝子型を決定することで、各 assemblage の分布を明らかにし、人獣共通感染のリスク評価を行った。

2. 材料と方法

2-1. 糞便材料

2014年4月から2016年12月までの期間に、日本国内で飼育されている猫の糞便を、消化器症状の有無に関わらず収集し、ELISAキットで *Giardia* 特異抗原が陽性となった合計 57 検体について遺伝子学的解析を実施した。13 検体は国内の 10 カ所の動物病院(東北 3 カ所、関東 2 カ所、中部 4 カ所、九州 1 カ所)に来院した一般家庭飼育猫から採取したものであり、残りの 44 検体は 7 カ所のペットショップ(東北 5 カ所、関東 2 カ所)の飼育猫から得たものであった。全ての検体は、猫の所有者から調査協力の了承を得た上で提供されたものである。自然排泄されたものを採取した後に 4°C で保存し、採取より 3 日以内にシストの回収および DNA の抽出を行った。

2-2. シストの回収および DNA 抽出

G. duodenalis のシストの回収およびシストからの DNA 抽出は第 1 章と同様に実施した。

2-3. PCR による DNA 増幅

G. duodenalis の 4 つの遺伝子座 18S rRNA、GDH、BG、TPI を標的とする各 nested PCR を行った。各 PCR のプライマー、予想される増幅産物の断片長および PCR 温度条件は、18S rRNA、BG、TPI に関しては第 1 章と同様に実施したが、GDH ではプライマーを変更しており、また本章では犬特異的 assemblage 検出のための TPI を標的とした PCR は実施していない (Table 6) [2, 5, 9, 22, 32, 37]。PCR 反応液の構成、PCR 産物の電気泳動および

精製は、第 1 章と同様に実施した。

2-4. 配列解析および遺伝子型別

精製した PCR 産物のシーケンス解析および型別決定は第 1 章と同様に実施した。検出された配列は、accession number LC341258~LC341260 および LC341552~LC341576 にて、DDBJ のデータベースに登録した。

3. 成績

3-1. PCR 陽性率と Single-loci genotyping

合計 44 検体(一般家庭から 11 検体、ペットショップから 33 検体)で型別が可能であった。各遺伝子座における陽性数および型別の結果を Table 7 に示した(Table 7)。18S rRNA、GDH、BG、TPI の各 PCR での検出率は、それぞれ 88.6%(39/44)、45.5%(20/44)、45.5%(20/44)、34.1%(15/44)であった。

サブタイピングの結果、検出された assemblage A 株は全て、GDH と BG では sub-assemblage AI、TPI では sub-assemblage AII として型別された。また assemblage B の 1 検体は TPI 遺伝子配列に基づき、assemblage BIV と型別された。

1 検体は、GDH 遺伝子座において assemblage A と F の重複した配列を示した。

3-2. Multi-locus genotyping

40 検体は単一の assemblage として同定された。猫特異的な assemblage F が最も頻繁に認められ(75%; 33/44)、次いで assemblage A が検出された(13.6%; 6/44)。一般家庭飼育猫由来の 1 検体は assemblage B であった(2.3%)。4 検体は遺伝子座間

での矛盾を生じ、いずれも *assemblage* F と A の遺伝子配列を認めた(9.1%)。全体で人獣共通感染性 *assemblage* の A または B を含む検体の割合(25.0%)は、犬よりも高い傾向が見られた。

3-3. カテゴリー間の比較

雌雄、年齢、糞便性状ごとの結果を Table 8 に示した(Table 8)。ペットショップからの検体は、全て 1 歳齢未満の猫に由来し、一般家庭飼育の猫についても、1 歳齢以上の成猫は 2 頭のみであった。これらのカテゴリーごとの結果に加え、検体のソースごとの型別結果においても *assemblage* の分布に明らかな偏りは見られず(Table 9)、7 店舗中 5 店舗のペットショップの飼育猫から *assemblage* A が検出された。

4. 考察

本研究は、著者の知る限り、猫由来 *G. duodenalis* を MLG により解析した最も大規模な調査である[13, 45]。また、ペットショップの猫を対象にした調査は世界的にもこれまで報告がない。

本調査では猫から *assemblage* F、A、B が検出された。検体のほとんどが猫特異的な *assemblage* F であり、次いで A が多く同定され、過去の調査と共通した結果であった[3, 33]。今回の結果において強調すべき点は、人獣共通感染性の *assemblage* A が、異なる地域(東北、関東、九州)の一般家庭飼育猫と、複数のペットショップ(東北 3 店舗、関東 2 店舗)の飼育猫から検出され、国内の飼育猫に広く分布していることが明らかになったことである。これまで、*assemblage* F は、猫を集団あるいは多頭飼育しているような、猫間での感染が繰り返される環境では、競合的に他

の *assemblage* を打ち負かすことが出来るとされてきたが[3]、今回 *assemblage* A が幅広く分布していたことから、国内の飼育猫において一定の割合で *assemblage* F と A が共存し、また猫由来 *G. duodenalis* の人獣共通感染リスクも一定のレベルで広く存在することが示唆された。

今回の調査では、一般家庭飼育猫から *assemblage* B が検出された。*assemblage* B はヒトで最も頻繁に見られる *assemblage* で幅広い哺乳類に感染するとされるが、猫での検出例はほとんどなく[33]、国内では初となる。今回 *assemblage* B が検出された猫は 5 カ月齢の保護猫で、感染源を推測することは困難であった。一般家庭飼育猫は飼い主との密接な接触が予想されることから、猫が *assemblage* B を保有し得る点は、人獣共通伝播のリスク管理のために、適切に認識されるべきだろう。

猫では 4 検体で遺伝子座間の結果の不一致が認められ、この内 1 検体では GDH において *assemblage* A と F の配列の重複が認められた。犬の調査では型別に成功した約半数が *mixed assemblage* であったのに対し、猫では *mixed assemblage* の割合は低かった。猫は犬に比べると *G. duodenalis* の保有率が全体に低いことから、*mixed assemblage* の頻度が *G. duodenalis* の蔓延と関連しているとする論説に同調する結果となった[33]。

本調査で *assemblage* A と同定された株のサブタイピングでは、GDH と BG においては *sub-assemblage* AI、TPI では *sub-assemblage* AII と同定され、第 1 章で犬から検出された *assemblage* A 株と共通する結果となった。また猫では犬に比べて *mixed assemblage* となった株が少なく、複数の *G. duodenalis* 株

の混合感染が犬より少ないと推測されることから、これが単一の *G. duodenalis* 株に由来する遺伝子型の組合せである可能性が、より高いと考えられた。*G. duodenalis* 株の共有に言及するためには、より細かい配列の比較を行い、犬・猫から検出された株が厳密に遺伝子学的に相同であるかを検討する必要があるものの、この新たなタイプの *assemblage* A 株が、国内に広く、種を超えて分布している可能性が示唆された。

遺伝子座ごとの PCR 陽性率では 18S rRNA で最も高く、TPI で最も低くなった。これは犬での調査結果と大きく異なる点である。つまり、猫で多数派を占めた *assemblage* F に関しては、18S rRNA で最も感度良く検出することが出来たと言える。実際、*assemblage* A に関しては、今回、18S rRNA よりも TPI で多く検出されている。従って、*assemblage* ごとに各 PCR での増幅率が異なるとする考えは[33]、第 1 章および本調査の結果からも肯定される。将来的には、*assemblage* ごとの増幅率の差が明らかになり、各遺伝子座における *assemblage* 間の PCR 増幅の優先関係が整理されることで、*G. duodenalis* の遺伝子型別における手法の最適化や、系統立った結果の解釈法が提案可能ではないかと期待される。

本研究は、日本国内の一般家庭およびペットショップの飼育猫由来 *G. duodenalis* の *assemblage* 分布を明らかにした。猫に特異的な *assemblage* F が主体的に分布している一方で、人獣共通感染性の *assemblage* A が幅広く検出され、国内の飼育猫が保有する *G. duodenalis* が潜在的な人獣共通感染リスクを有することが明らかとなった。また猫では *assemblage* A が犬よりも高い割

合で、また施設による偏りなく分布しており、*assemblage A* が猫間で維持されている可能性が考えられた。

第 3 章

飼育犬・猫由来 *G. duodenalis* の 4 遺伝子座における DNA 配列の比較

1. 序言

これまで述べてきたように、*G. duodenalis* は非常に豊かな遺伝子学的多様性を有する原虫である。人や動物由来の *G. duodenalis* の遺伝子多型をより詳細に解析することにより、*assemblage* 内の遺伝子学的なサブグループと宿主の関係、各グループの人獣共通感染や動物種間伝播の可能性、汚染源の追跡やアウトブレイクの調査、ならびに伝播動態に関する情報提供に役立つことが期待される [6]。

各 *assemblage* 内における遺伝子多型の解析は、これまで、人獣共通感染性の *assemblage* A や B では盛んに試みられているが [6, 33]、犬由来の *assemblage* C・D や猫由来の *assemblage* F では、多数の株を系統発生的に分類し、遺伝子学的に相同あるいは近似した株がどのように共有されているかを明らかにするような詳細な解析はなされていない。

第 3 章では、第 1 章と第 2 章で得られた *G. duodenalis* の DNA 配列を用いて系統発生的な解析を行い、飼育犬・猫由来 *G. duodenalis* の遺伝子学的な近似や多様性を明らかにし、各株の犬・猫における伝播について考察した。

2. 材料と方法

2-1. 材料

飼育犬・猫での調査で得られた合計 649 の DNA 配列 (18S rRNA: 112, GDH: 123, BG: 133, TPI: 281) を遺伝子座ごとに、MEGA 7.0.26 を用いてアラインメント処理し、比較した。相同な配列を整理し、計 321 の互いに異なる DNA 配列 (18S rRNA: 14, GDH: 59, BG: 71, TPI: 177) にそれぞれナンバリングした。これらの配列は、DDBJ データベースに accession number LC341258~LC341260、LC341552~LC341576 および LC437354~LC437648 で登録した。この内、シークエンスファイルにおいて内部に塩基の double peak を示したものを除き、最終的に計 104 (18S rRNA: 6, GDH: 15, BG: 24, TPI: 58) の DNA 配列を、系統樹解析の対象とした。double peak を有していた配列を除外した理由としては、遺伝子配列の異なる複数株の混合感染に由来する可能性が高いためである。

2-2. 系統樹解析

前述の MEGA ソフトウェアを用いて、木村 2 パラメータモデルに基づく最尤法により、各遺伝子座ごとに系統樹を作成した [21]。系統樹の信頼性はブートストラップ法 1000 回により評価した。参照配列として、GenBank より assemblage A、B、E、G の配列を引用した。参照配列の accession number を表に示した (Table 10)。また、アウトグループとして *G. muris* の配列を用いたが、*G. muris* は GDH 遺伝子配列が未登録であったため、GDH では *G. ardeae* の配列を用いた。

3. 成績

18S rRNA、GDH、BG、TPI のそれぞれの遺伝子座における系

統樹を Fig. 1~4 に示した。参照配列には accession number を付記し、本研究で同定したサンプルについては「動物種_assemblage_配列識別番号（相同な配列となった検体数）」の表記で示した。

assemblage A に関しては、18S rRNA、GDH、BG においてそれぞれ単一の配列となり、犬由来株と猫由来株が完全に相同な配列となった。TPI では犬由来株と猫由来株のそれぞれでバリエーションが見られたが、いずれも共通のクラスターに属し、1 つの犬由来株と猫由来株は相同であった。assemblage B は研究全体を通して検出された検体数が限られるが、TPI 遺伝子で犬由来株の 1 つと猫由来株の配列が一致した。assemblage C では、BG、TPI で内部にクラスターを形成した。assemblage D は、本研究において最もバリエーションが豊富な assemblage となり、GDH、BG、TPI で、それぞれ内部にクラスターを形成した。assemblage F は BG において内部にクラスターを形成し、GDH では 3 つ、TPI では 2 つの遺伝子多型を示した。

assemblage C と D では GDH、BG、TPI 遺伝子において、assemblage F では BG 遺伝子において、内部にクラスターの形成が認められたことから、これらのクラスター構成と各株のステータス(検体提供元、検体採取地域、動物の年齢、糞便性状)との関連について検討した。しかしながら、これらのステータスに関してクラスターごとの明らかな偏りは見られなかった。

4. 考察

検出された assemblage A 株は、18S rRNA、GDH、BG 遺伝子座において、それぞれ単一の遺伝子配列にまとめられ、犬由来株

と猫由来株で配列は完全に一致した。TPI 遺伝子においては、わずかに多様性がみられたものの、全てが単一のクラスターに含まれ、犬由来株の 1 つと猫由来株の 1 つの配列が一致した。従って、本研究で検出された *assemblage A* 株が、国内の飼育犬・猫で広く見られる遺伝子型であることが示された。これまでの犬・猫由来 *assemblage A* 株の遺伝子学的多様性に関する記載としては、犬由来の 10 株が BG 遺伝子座において 3 つの遺伝子多型に分けられたとする報告や[29]、犬由来 7 株全てが GDH で遺伝子学的に異なっていた報告がある[7]。猫では、10 株が 18S rRNA において 3 つの遺伝子多型に分けられ[31]、別の報告では 5 株全てが BG で遺伝子学的に異なっていた[23]。これらの報告は対象とする犬・猫の飼育状況などがそれぞれ異なり、また今回の結果では、飼育犬で施設ごとに検出数の偏りがあるために一概に比較出来ないが、国内の飼育犬・猫が保有する *assemblage A* 株の遺伝子学的多様性が乏しいことが示唆された。*assemblage B* は、今回検出された検体数が限られているものの、犬由来株と猫由来株の TPI 遺伝子配列が完全に一致した。*assemblage B* は A よりも犬・猫での検出頻度が低いために、過去の報告と比較することが難しいが、一般的に *assemblage A* 以上に遺伝子学的に多様であるとされている[6]。以上のことから、日本国内の飼育犬・猫が保有する *assemblage A* と *B* は遺伝子学的な多様性が少なく、遺伝子学的に限られた株が幅広く共有されていると考えられた。また、犬-犬および猫-猫間のみならず、犬-猫の種間で伝播および維持が可能であることが示唆された。

一方で *assemblage C* と *D* では GDH、BG、TPI 遺伝子におい

て、*assemblage F* では BG 遺伝子において、多様な遺伝子多型が認められたことから、クラスター構成と各株のステータス(検体提供元、検体採取地域、動物の年齢、糞便性状)との関連について検討したが、これらの因子がクラスターを特徴づけることはなかった。過去に述べられた *assemblage A* や *B* におけるサブタイピングでは、宿主域の違いによってサブグループを特徴づけている [33]。 *assemblage C*、*D*、*F* は、そもそも宿主特異性の高い遺伝子型であり、宿主域によって差異化される可能性は低いと考えられたが、今回それ以外の、採取地域や飼育施設、あるいは糞便性状といった因子による偏りもほとんど見られなかった。つまり、相同な(あるいは近似した)塩基配列を有する *G. duodenalis* が地理的に離れた地域で採取されたり、また同じ飼育施設の犬・猫であっても系統の遠い配列が検出されたりした。一般的には地理的隔離や、飼育施設の違いのような空間的隔離によって独自の遺伝子変異が蓄積し、遺伝子多型を形成すると考えられるが、今回の結果から、これらの *assemblage* の遺伝子学的多様性の形成は、地理的あるいは空間的隔離によって説明することが困難であった。一般的な犬・猫の繁殖施設では、血統管理のために定期的に、特に遠隔地から、新たに動物を導入する。また、ペットショップでは一定期間売れ残った動物を別の店舗へ移すことで、商品である犬・猫を入れ替える場合がある。動物の移動と共に、*G. duodenalis* が移動と蔓延を繰り返した結果、遠隔地や異なる飼育施設で同型の遺伝子が検出されたり、同じ飼育施設内で様々な遺伝子多型がみられた可能性が考えられた。

今回 4 つの遺伝子それぞれで系統樹を描出した。描かれた系統

樹のうち、18S rRNA で最もシンプルな系統樹が得られ、TPI で最も複雑な樹となった。用いられた 4 遺伝子は、それぞれ塩基置換率が異なり、18S rRNA、GDH、BG、TPI でそれぞれヌクレオチド当たり 0.01, 0.03, 0.06, 0.12 と報告されている [43]。塩基置換率が低い遺伝子では、理論上、株間の差異が小さくなり、型別のための解像度が低くなることから、こうした要素が系統樹の構成に大きく影響したと考えられた。今回実際に、18S rRNA では *assemblage* 内のサブタイピングが難しく、この遺伝子における系統樹はあくまで全体的な概略を示し、他の遺伝子での系統樹と比較し、妥当性を評価するためのものと考えられた。

本研究により国内の飼育犬・猫由来 *G. duodenalis* の遺伝子学的多様性が明らかとなった。*assemblage* A と B に関しては、飼育犬・猫が保有する株の遺伝子学的多様性が乏しく、犬-猫の種間で伝播・維持される可能性が示された。*assemblage* C、D、F では、遺伝子型の分布に地理的あるいは飼育施設による偏りが見られなかったことから、人の手による動物の移動と共に、遺伝子学的に異なる株が拡散している可能性が考えられた。

総括

G. duodenalis は、世界中に分布し、幅広い範囲の哺乳類に感染し、下痢を引き起こす可能性がある消化管内寄生原虫である。この寄生虫は 1 つの種複合体であり、現在、8 つの遺伝子学的 *assemblage* に分けられ、それぞれ宿主特異性が異なる。現在、*G. duodenalis* 株の人獣共通感染リスクを評価するための遺伝子学的解析手法として、多遺伝子座での遺伝子型別 (Multi-locus genotyping : MLG) が、最も情報量に優れ、型別決定に適していると考えられている。国内の飼育犬・猫において *G. duodenalis* は最も蔓延している寄生虫の 1 つであるにもかかわらず、過去の分子疫学的な調査報告は限られている。本研究は、国内の飼育犬・猫由来の *G. duodenalis* を MLG により解析することで、犬・猫における *G. duodenalis* *assemblage* の分布を明らかにし、人獣共通感染のリスクを評価した。また、得られた *G. duodenalis* の DNA 配列の比較解析を行い、各 *assemblage* 内における遺伝子学的多様性および犬・猫における伝播について考察した。

第 1 章では日本で初めて犬由来の *G. duodenalis* 株を MLG により遺伝子型を決定することで、各 *assemblage* の分布を明らかにし、人獣共通感染のリスク評価を行った。ELISA キットで *Giardia* 特異抗原陽性となった計 210 検体 (一般家庭から 48 検体、ペットショップから 87 検体、繁殖施設から 46 検体、専門学校から 17 検体、犬の訓練施設から 12 検体) を解析した。*G. duodenalis* の 4 つの遺伝子座 18S rRNA、GDH、BG、TPI を標的とする各 nested PCR に加え、犬特異的 *assemblage* の検出に優れた TPI を標的とする nested PCR を行い、増幅産物のシーケンス解析

より遺伝子型別を行った。その結果、計 170 検体(一般家庭から 39 検体、ペットショップから 69 検体、繁殖施設から 37 検体、専門学校から 13 検体、犬の訓練施設から 12 検体)で *G. duodenalis* の遺伝子型が決定可能であった。83 検体は PCR 間での結果に矛盾を生じず、単一の *assemblage* として同定されたのに対し、87 検体は、複数の異なる *assemblage* を含んでいた。犬特異的な *assemblage* が全体の 81.8% (139/170)を占め、*assemblage* C が 15.3% (26/170)、D が 30.0% (51/170)、mixed *assemblage* C+D が 36.5% (62/170)となった。30 検体(17.6%)は人獣共通感染性とされる *assemblage* A あるいは B を含み、*assemblage* A が 2.9% (5/170)、A+D が 9.4% (16/170)、A+C+D が 2.9% (5/170)、B が 0.6% (1/170)、B+D が 1.8% (3/170)であった。1 検体は猫特異的な遺伝子型である *assemblage* F を含んでいた(D+F: 0.6%)。一般家庭、ペットショップ、繁殖施設、専門学校、犬の訓練施設のいずれからでも、人獣共通感染性の *assemblage* A が検出され、国内の飼育犬由来 *G. duodenalis* における人獣共通感染リスクの存在が明らかとなった。また、ペットショップ、繁殖施設の店舗あるいは繁殖施設ごとに分布をみると、人獣共通感染性 *assemblage* の分布が飼育施設ごとに偏っていた。従って、繁殖施設ごとの感染コントロールの重要性が示唆された。

第 2 章では、未調査であり、かつ人との密接な接触が予想される一般家庭飼育猫およびペットショップの飼育猫に由来する *G. duodenalis* 株について MLG により遺伝子型別を行い、各 *assemblage* の分布を明らかにすることで、人獣共通感染リスクを評価した。

ELISAキットで *Giardia* 陽性となった計 57 検体(一般家庭から 13 検体、ペットショップから 44 検体)を解析した。*G. duodenalis* の 4 つの遺伝子座 18S rRNA、GDH、BG、TPI を標的とする各 nested/semi-nested PCR を行い、増幅された PCR 産物の配列解析より遺伝子型別を実施した。計 44 検体(一般家庭から 11 検体、ペットショップから 33 検体)で型別が可能であった。猫特異的な assemblage F が 75%を占め(33/44)、次いで assemblage A が 13.6%検出された(6/44)。1 検体は assemblage B であった(2.3%)。4 検体は遺伝子座間での矛盾を生じ、検体中に assemblage A と F が含まれていた(9.1%)。全体で人獣共通感染性 assemblage の A または B を含む検体の割合(25.0%)は犬よりも高い傾向が見られ、複数の異なる地域の一般家庭飼育猫および 5 店舗のペットショップの飼育猫から assemblage A が検出された。人獣共通感染性である assemblage A の幅広い分布が明らかとなり、国内の飼育猫由来の *G. duodenalis* の人獣共通感染リスクが明らかとなった。

第 3 章では、第 1 章と第 2 章で得られた *G. duodenalis* の DNA 配列を用いて系統発生的な解析を行い、飼育犬・猫由来 *G. duodenalis* の遺伝子学的な近似や多様性を明らかにし、各株の犬・猫における伝播について考察した。

飼育犬・猫での調査で得られた合計 649 の DNA 配列(18S rRNA: 112, GDH: 123, BG: 133, TPI: 281)を遺伝子座ごとにアラインメント処理し、比較した。配列内に double peak を示したものを除き、最終的に合計 104 (18S rRNA: 6, GDH: 15, BG: 24, TPI: 58) の異なる配列を用いて最尤法により系統樹を作成した。その結果、assemblage A と B では、検出された検体数に限りがあるものの、

遺伝子学的な多様性が乏しく、いくつかの犬由来株と猫由来株では配列が完全に一致した。従って、これらの *assemblage* A 株あるいは B 株が幅広く分布し、犬－猫間でも伝播する可能性あることが示唆された。*assemblage* C、D、F は系統樹において遺伝子学的多様性が認められたが、検体提供元や検体採取地域による偏りが見られなかった。人の手による動物の移動と共に、遺伝子学的に異なる株が拡散している可能性が考えられた。

以上の成績から、日本国内の飼育犬・猫由来の *G. duodenalis* が潜在的な人獣共通感染リスクを有していること、これらの人獣共通感染性 *G. duodenalis* が犬－犬あるいは猫－猫間のみならず犬－猫の種間においても伝播、維持される可能性が示された。本研究の成果は、*G. duodenalis* の疫学的な動態や遺伝子学的特徴に対する理解を深め、小動物臨床現場において獣医師が飼育犬・猫由来 *G. duodenalis* の人獣共通感染リスクを認識し、飼い主へ適切なインフォームを行うために役立つと考えられる。

謝辞

本論文の稿を終えるにあたり、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、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ご指導、ご助言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、ご助言いただいた北里大学獣医学部の木村祐哉講師、亀島聡助教、古舘菜穂子技術係長、ともにご尽力いただ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、検体の収集にご協力くださった伊藤動物病院院長、伊藤洋一博士、ならびに本研究の趣旨をご理解いただき、調査にご協力くださった関係各位に厚く御礼申し上げます。

最後に、これまでの筆者の生活を支え、応援してくれた家族に深謝いたします。

文献

1. Amar, C. F., Dear, P. H., Pedraza-Díaz, S., Looker, N., Linnane, E. and McLauchlin, J. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol.* 40:446-52.
2. Appelbee, A. J., Frederick, L. M., Heitman, T. L. and Olson, M. E. 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol.* 112:289-94.
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.* 26:180-9.
4. Cacciò, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A. and Pozio, E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol.* 38:1523-31.
5. Cacciò, S. M., De Giacomo, M. and Pozio, E. 2002. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol.* 32:1023-30.
6. Feng, Y. and Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis.

Clin Microbiol Rev. 24:110-40.

7. Gil, H., Cano, L., de Lucio, A., Bailo, B., de Mingo, M. H., Cardona, G. A., Fernández-Basterra, J. A., Aramburu-Aguirre, J., López-Molina, N. and Carmena, D. 2017. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infect Genet Evol.* 50:62-69.
8. Heyworth, M. F. 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite.* 23:13.
9. 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.
- 10.一般社団法人ペットフード協会. 2018. 平成 29 年全国犬猫飼育実態調査.<https://petfood.or.jp/data/chart2017/index.html>
11. Itagaki, T., Kinoshita, S., Aoki, M., Itoh, N., Saeki, H., Sato, N., Uetsuki, J., Izumiyama, S., Yagita, K. and Endo, T. 2005. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet Parasitol.* 133:283-7.
12. Ito, Y., Itoh, N., Kimura, Y. and Kanai, K. 2015. Prevalence of intestinal parasites in breeding cattery cats in Japan. *J Feline Med Surg.* 18:834-7.
13. Ito, Y. Iijima, Y. Itoh, N. and Kimura, Y. 2017. Multilocus

- genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from breeding cattery cats in Japan. *JFMS Open Rep.* 3:2055116917745237.
14. Itoh, N., Kanai, K., Tominaga, H., Kawamata, J., Kaneshima, T., Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F. and Higuchi, S. 2011. *Giardia* and other intestinal parasites in dogs from veterinary clinics in Japan. *Parasitol Res.* 109:253-256.
15. Itoh, N., Itagaki, T., Kawabata, T., Konaka, T., Muraoka, N., Saeki, H., Kanai, K., Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F. and Higuchi, S. 2011. Prevalence of intestinal parasites and genotyping of *Giardia intestinalis* in pet shop puppies in east Japan. *Vet Parasitol.* 176:74-8.
16. 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.* 14:436-9.
17. 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.* 15:908-10.
18. Itoh, N., Kanai, K., Kimura, Y., Chikazawa, S., Hori, Y. and Hoshi, F. 2015. Prevalence of intestinal parasites in breeding kennel dogs in Japan. *Parasitol Res.* 114:1221-4.
19. 環境省 web サイト. 2018. <http://www.env.go.jp/nature/dobu>

tsu/aigo/1_law/index.html

20. 国立感染症研究所. 2018. 感染症発生動向調査. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
21. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Molecular Evolution*. 16:111-120.
22. 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*. 35:207-13.
23. 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*. 168:231-9.
24. Levecke, B., Geldhof, P., Claerebout, E., Dorny, P., Vercammen, F., Cacciò, S. M., Vercruyse, J. and Geurden, T. 2009. Molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphisms. *Int J Parasitol*. 39:1595-601.
25. Li, W., Liu, C., Yu, Y., Li, J., Gong, P., Song, M., Xiao, L. and Zhang, X. 2013. Molecular characterization of *Giardia*

- duodenalis* isolates from police and farm dogs in China. *Exp Parasitol.* 135:223-6.
26. Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G. and Ey, P. L. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol.* 3:29-38.
27. Ng, C. T., Gilchrist, C. A., Lane, A., Roy, S., Haque, R. and Houpt, E. R. 2005. Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. *J Clin Microbiol.* 43:1256-60.
28. 大森理絵, 長谷川寿一. 2009. 人と生きるイヌーイヌの起源から現代人に与える恩恵まで. 動物心理学研究 59:1:3-14
29. Pallant, L., Barutzki, D., Schaper, R. and Thompson, R. C. 2015. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors.* 8:2.
30. Palmer, C. S., Traub, R. J., Robertson, I. D., Devlin, G., Rees, R. and Thompson, R. C. 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol.* 154:142-7.
31. Papini, R., Cardini, G., Paoletti, B. and Giangaspero, A. 2007. Detection of *Giardia* assemblage A in cats in Florence, Italy. *Parasitol Res.* 100:653-6.
32. 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.* 4:125-30.
33. Ryan, U. and Cacciò, S. M. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol.* 43:943-56.
34. 篠崎 邦子, 岸田 一則, 豊田 隆弘, 遠藤 幸男, 小林 八重子, 石田 俊靖. 2014. ジアルジアによる集団感染事例について. *IASR.* 414:7-8.
35. Sommer, M. F., Rupp, P., Pietsch, M., Kaspar, A. and Beelitz, P. 2018. *Giardia* in a selected population of dogs and cats in Germany - diagnostics, coinfections and assemblages. *Vet Parasitol.* 249:49-56.
36. Sprong, H., Cacciò, S. M., van der Giessen, J. W. on behalf of the ZOOPNET network and partners. 2009. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 3:e558.
37. 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.* 9:1444-52.
38. Suzuki, J., Murata, R., Kobayashi, S., Sadamasu, 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.
39. Tangtrongsup, S. and Scorza, V. 2010. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Top Companion Anim Med*. 25:155-62.
40. Thompson, R. C. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*. 126:15-35.
41. Thompson, R. C. A. and Ash, A. 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol*. 40:315-323.
42. 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.
43. Wielinga, C. M. and Thompson, R. C. 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*. 134:1795-821.
44. Xiao, L. and Fayer, R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol*. 38: 1239-1255
45. Yang, R., Ying, J. L., Monis, P. and Ryan, U. 2015. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. *Exp Parasitol*. 155:13-8.

Table 1. 犬由来 *G. duodenalis* 検出のための PCR で用いたプライマー

遺伝子	プライマー (配列)	断片長 (bp)	PCR 条件 ^a	引用文献
SSU rRNA	Gia2029 (AAGTGTGGTGCAGACGGACTC)	497	96°C 45s, 60°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[2]
	Gia2150c (CTGCTGCCGTCCTTGGATGT)			
	RH11 (CATCCGGTCGATCCTGCC)	292	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[9]
	RH4 (AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG)			
GDH	Gdh1 (TTCCGTRTYCAGTACAATC)	754	96°C 30s, 50°C 30s, 72°C 1min →35 cycles	[4]
	Gdh2 (ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA)			
	Gdh3 (ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT)	530	96°C 30s, 62°C 30s, 72°C 1min →35cycles	
	Gdh4 (GTGGCGCARGGCATGATGCA)			
β-giardin	G7 (AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC)	753	96°C 45s, 64°C 30s, 72°C 45s →35cycle	[5]
	G759 (GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC)			
	GiarF (GAACGAACGAGATCGAGGTCCG)	511	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[22]
	GiarR (CTCGACGAGCTTCGTGTT)			
TPI	AL3543 (AAATIATGCCTGCTCGTCG)	605	96°C 45s, 53°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[37]
	AL3546 (CAAACCTTITCCGCAAACC)			
	AL3544 (CCCTTCATCGGIGGTAACCT)	532	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	
	AL3545 (GTGGCCACCACICCCGTGCC)			
	TPIDF (CCGTTTCATAGGTGGCAACTT)	532	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[23]
	TPIDR (GTAGCC ACTACA CCAGTTCC)			

^a 全ての PCR で初期変性は 96°C で 4 分間、最終伸長は 72°C で 4 分間とした。

Table 2. 遺伝子座ごとの犬由来 *G. duodenalis* の遺伝子型別結果

assemblage	18S rRNA	GDH	BG	TPI	TPI for dog
A	3	10	9	22	-
B	-	-	1	4	-
C	28	34	33	80	30
D	38	45	58	-	109
F	1	-	-	-	-
overlap A/C ^a	-	-	-	1	-
overlap A/D ^a	-	-	1	-	-
overlap C/D ^a	3	14	11	-	20
合計	73	103	113	107	159

^a 異なる2つの assemblage が重複した検体数

Table 3. 各カテゴリーにおける国内の飼育犬由来 *G. duodenalis* assemblage の分布

	人獣共通感染性 assemblage を含む検体					犬/猫特異的 assemblage の検体				合計
	A	A+D	A+C+D	B	B+D	C	D	C+D	D+F	
性別										
雄	-	10	2	1	1	15	31	24	1	85
雌	5	6	3	-	2	11	20	38	-	85
年齢										
1 歳未満	2	5	2	1	2	17	41	37	1	108
1 歳以上 ^a	3	9	3	-	1	9	8	23	-	56
不明	-	2	-	-	-	-	2	2	-	6
糞便性状										
固形便	5	14	3	-	3	23	42	48	1	139
軟～下痢便	-	2	2	1	-	3	9	14	-	31
合計	5	16	5	1	3	26	51	62	1	170

^a 1 歳以上の成犬は 1 歳未満の子犬に比べ assemblage A を含む検体数の比率が、有意に高かった ($P < 0.01$)。

Table 4. 検体ソースごとの国内の飼育犬由来 *G. duodenalis* assemblage の分布

	人獣共通感染性 assemblage を含む検体					犬／猫特異的 assemblage の検体				合計
	A	A+D	A+C+D	B	B+D	C	D	C+D	D+F	
一般家庭	1	2	-	-	1	6	13	15	1	39
ペットショップ	1	5	1	1	2	9	30	20	-	69
繁殖施設	2	-	1	-	-	5	6	23	-	37
専門学校 ^a	1	9	1	-	-	2	-	-	-	13
犬の訓練施設	-	-	2	-	-	4	2	4	-	12

^a 専門学校では、人獣共通感染性 assemblage を含む検体数の比率が、他の全ての検体ソースに比べ有意に高かった($P < 0.01$)。

Table 5. 国内のペットショップおよび繁殖施設ごとの飼育犬由来 *G. duodenalis* assemblage の分布

	人獣共通感染性 assemblage を含む検体					犬/猫特異的 assemblage の検体				合計
	A	A+D	A+C+D	B	B+D	C	D	C+D	D+F	
ペットショップ										
店舗 A	-	-	-	-	-	2	12	3	-	17
店舗 B ^a	-	3	1	1	2	-	5	4	-	16
店舗 C	-	-	-	-	-	3	8	3	-	14
店舗 D	1	2	-	-	-	2	2	6	-	13
店舗 E	-	-	-	-	-	1	2	-	-	3
店舗 F	-	-	-	-	-	1	1	1	-	3
店舗 G	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
繁殖施設										
繁殖施設 A	2	-	1	-	-	2	-	11	-	16
繁殖施設 B	-	-	-	-	-	1	1	5	-	7
繁殖施設 C	-	-	-	-	-	-	3	4	-	7
繁殖施設 D	-	-	-	-	-	1	1	1	-	3
繁殖施設 E	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
繁殖施設 F	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2

^a 店舗 B では、人獣共通感染性 assemblage を含む検体数の比率が、店舗 A および C より有意に高かった ($P < 0.05$)。

Table 6. 猫由来 *G. duodenalis* 検出のための PCR で用いたプライマー

遺伝子	プライマー (配列)	断片長 (bp)	PCR 条件 ^a	引用文献
SSU rRNA	Gia2029 (AAGTGTGGTGCAGACGGACTC)	497	96°C 45s, 60°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[2]
	Gia2150c (CTGCTGCCGTCCTTGGATGT)			
	RH11 (CATCCGGTCGATCCTGCC)	292	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[9]
	RH4 (AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG)			
GDH	GDHeF (TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT)	458	96°C 30s, 56°C 30s, 72°C 1min →35 cycles	[32]
	GDHiF (CAGTACAACCTCYGCTCTCGG)	432	96°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1min →35cycles	
	GDHiR (GTTRTCCTTGCACATCTCC)			
β-giardin	G7 (AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC)	753	96°C 45s, 64°C 30s, 72°C 45s →35cycle	[5]
	G759 (GAGCCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC)			
	GiarF (GAACGAACGAGATCGAGGTCCG)	511	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[22]
	GiarR (CTCGACGAGCTTCGTGTT)			
TPI	AL3543 (AAATIATGCCTGCTCGTCCG)	605	96°C 45s, 53°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	[37]
	AL3546 (CAAACCTTITCCGCAAACC)			
	AL3544 (CCCTTCATCGGIGGTAACCT)	532	96°C 45s, 57°C 30s, 72°C 45s →35 cycles	
	AL3545 (GTGGCCACCACICCCGTGCC)			

^a 全ての PCR で初期変性は 96°C で 4 分間、最終伸長は 72°C で 4 分間とした。

Table 7. 遺伝子座ごとの猫由来 *G. duodenalis* の遺伝子型別結果

assemblage	18S rRNA	GDH	BG	TPI
A	4	4	3	9
B	1	-	-	1
F	34	15	17	5
overlap A/F ^a	-	1	-	-
合計	39	20	20	15

^a 異なる 2 つの assemblage が重複した検体数

Table 8. 各カテゴリーにおける国内の飼育猫由来 *G. duodenalis* assemblage の分布

	人獣共通感染性 assemblage を含む検体			猫特異的 assemblage の検体	合計
	A	A+F	B	F	
性別					
雄	4	1	1	18	24
雌	2	3	-	15	20
年齢					
1 歳齢未満	6	3	1	32	42
1 歳齢以上	-	1	-	1	2
糞便性状					
固形便	4	3	1	30	38
軟～下痢便	2	1	-	3	6
合計	6	4	1	33	44

Table 9. 検体ソースごとの国内の飼育猫由来 *G. duodenalis* assemblage の分布

	人獣共通感染性 assemblage を含む検体			猫特異的 assemblage の検体	合計
	A	A+F	B	F	
一般家庭	2	1	1	7	11
ペットショップ	4	3	-	26	33
店舗 A	-	2	-	12	14
店舗 B	1	1	-	6	8
店舗 C	1	-	-	4	5
店舗 D	-	-	-	3	3
店舗 E	-	-	-	1	1
店舗 F	1	-	-	-	1
店舗 G	1	-	-	-	1

Table 10. 本研究で用いた *Giardia* の GenBank 参照配列

	18S rRNA	GDH	BG	TPI
assemblage A	AB569367	AI : AY178735 AII : AY178737	AI : X85958 AII : AY072723	AI : AF069556 AII : U57897
assemblage B	AB569368	BIII : AY178756 BIV : AY178749	AY228631	BIII : AY368165 BIV : AF069560
assemblage E	AY297957	AB182127	DQ116608	AB569406
assemblage G	AF199450	AY178745	EU769221	AF069562
<i>Giardia muris</i>	AF113895	—	EF455599	AF069565
<i>Giardia ardeae</i>	—	AF069060	—	—