





## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	Phrompraphai Totsapon (DV15008 獣医内科学)
学位論文題目	Molecular epidemiological study of <i>Enterocytozoon bieneusi</i> infection in dogs, in Japan
担当者	主査 北里大学教授 工藤 上  副査 北里大学教授 岡野 昇三  副査 北里大学教授 胡 東良  副査 サエキベテリナリィサイエンス取締役 佐伯 英治 

## 論文審査の要旨

本研究は、後天性免疫不全症候群（AIDS）や臓器移植等の免疫が低下した状態の人に対して、慢性の下痢を引き起こす病原体である *Enterocytozoon bieneusi* (*E. bieneusi*) の感染伝播が、人との接触が密である飼育犬を介して生じる可能性があるかどうかを大規模な分子疫学的調査により評価した日本国内で初めての報告である。

### 第 1 章：日本国内の一般家庭で飼育されている犬における

#### *E. bieneusi* の分子学的感染状況と遺伝子型

合計 597 の新鮮な糞便検体を、日本国内の 6 つの異なる地方に存

在する 9 カ所の動物診療施設に来院した一般家庭で飼育されている犬から、無作為に 1 頭につき 1 回採取した。すべての犬は、各種疾患や予防のために来院したものであり、飼育者は、それらの子犬（2～3 カ月齢）の時期に 3 つの異なるルート（一般個人の家庭、ペットショップ、繁殖施設）から入手し、飼育していた。

*E. bienewsi* の検出は、リボソーム DNA の ITS 領域を標的とした nested PCR 法で実施し、遺伝子型は、PCR で得られた増幅産物のシーケンス解析結果を GenBank に登録されているデータベースと比較して決定した。

本研究は、日本国内の一般家庭で飼育されている犬における *E. bienewsi* の感染状況を分子生物学的手法で明らかにした最初の報告である。一般家庭の飼育犬 597 頭中、26 頭（4.4%）が *E. bienewsi* 陽性だった。1 歳齢未満の犬における感染率（8.3%）は、1 歳齢以上の犬（3.4%）より有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。入手ルートでは、繁殖施設由来の犬における感染率（14.3%）は、ペットショップ由来の犬（3.9%）や一般個人の家庭に由来する犬（3.2%）の感染率より有意に高かった（いずれも  $P < 0.05$ ）。*E. bienewsi* は、1 地方を除くすべての地方で検出された。*E. bienewsi* が陽性だった 26 検体の遺伝子型は、すべて犬に特異的な遺伝子型である PtEb IX と 99～100% 一致していた。

以上の成績から、日本国内の一般家庭で飼育されている犬における *E. bienewsi* 感染は低い感染率ではあるが、一般的であることが示唆された。免疫の未熟さが 1 歳齢未満の犬における高い感染率の一因であると考えられ、また、繁殖施設由来の犬の高い感染率は、調査した犬に占める 1 歳齢未満の犬の割合が比較的高かったことに

起因すると考えられた。今回検出された *E. bieneusi* は、すべて犬特異的遺伝子型であったことから、日本国内の一般家庭で飼育されている犬から人への *E. bieneusi* 感染リスクは、低いものと考えられる。

## 第 2 章：日本国内のペットショップ飼育子犬における *E. bieneusi* の分子学的感染状況と遺伝子型

合計 621 の新鮮な糞便検体を、日本国内の 3 つの異なる地方に存在する 4 カ所のペットショップ（PS-A～PS-D）で飼育されている子犬（3 カ月齢以下）から、無作為に 1 頭につき 1 回採取した。

621 頭中、38 頭（6.1%）の子犬が PCR 陽性であり、*E. bieneusi* の感染はすべての施設で認められた。それぞれのペットショップにおける感染率は 1.3～12.2% であり、最も高い PS-D の感染率（12.2%）は、他の 3 カ所のペットショップ（PS-A、PS-B および PS-C）における感染率より有意に高かった（ $P < 0.01$  または  $P < 0.05$ ）。*E. bieneusi* が陽性だった 38 検体のシーケンス解析では、37 検体が遺伝子型 PtEb IX と 99～100% 一致し、残りの 1 検体は遺伝子型 CD7 と 100% 一致していた。

本研究では、犬に特異的な遺伝子型である CD7 を日本の犬から初めて検出した。また、日本国内のペットショップで飼育されている子犬の *E. bieneusi* 感染率は、概ね低いことが示唆された。特定のペットショップにおける高い *E. bieneusi* 感染率に影響した最も重要な因子は、不十分な衛生管理であると推測された。人への *E. bieneusi* 感染伝播において、ペットショップで飼育されている子犬のレゼルボアとしての役割は、低いと考えられる。

### 第 3 章：日本国内の繁殖施設で飼育されている犬における

#### *E. bieneusi* の分子学的感染状況と遺伝子型

合計 314 の新鮮な糞便検体を、日本国内の 5 つの異なる地方に存在する 5 カ所の繁殖施設（BK-1～BK-5）で飼育されている犬から無作為に 1 頭につき 1 回採取した。

本研究は、日本国内の繁殖施設において分子生物学的に *E. bieneusi* の感染率を明らかにした初めての報告である。全体の感染率は 11.8% (37/314) であり、*E. bieneusi* の感染は、すべての施設において 2.1～20.3% の感染率で認められた。BK-5 の感染率 (20.3%) は、3 カ所の繁殖施設（BK-1、BK-2 および BK-3）の感染率より有意に高かった（いずれも  $P < 0.01$ ）。さらに、有意差はなかったが、1 歳齢未満の犬における感染率 (22.5%) は、1 歳齢以上の犬 (10.2%) より高い傾向だった。陽性だった 37 検体のシーケンス解析では、33 検体が遺伝子型 PtEb IX と 99～100% 一致し、残りの 4 検体は遺伝子型 CD7 と 99～100% 一致した。

これらの成績から、繁殖施設で飼育されている犬の *E. bieneusi* 感染率は、犬の年齢よりも各施設の衛生状態に関連することが示唆された。すなわち、密な飼育状況下での *E. bieneusi* 孢子による環境汚染とストレスによる免疫抑制状態が、*E. bieneusi* の再感染および／または再活性化を引き起こし、いくつかの施設における高い感染率を誘導した大きな要因であると推測された。一方、遺伝子型 PtEb IX と CD7 はいずれも犬特異的遺伝子型であることから、*E. bieneusi* の人への伝播において、繁殖施設の飼育犬が果たすレゼルボアとしての役割は、低いものと考えられる。

本研究は、日本国内の一般家庭で飼育されている犬やペットショップの子犬および繁殖施設で飼育されている犬における *E. bienersi* の感染状況を大規模な調査で分子生物学的に評価した報告であり、得られた成績から、日本国内の飼育犬における *E. bienersi* の感染は一般的なものであるが、その感染率は高いことが明らかになった。ただし、繁殖施設で飼育されている犬では、1 歳未満の犬と特定の施設の犬において感染率が高いことが確認された。今回の研究で分離した株の遺伝子型は、すべて犬に特異的な遺伝子型である PtEb IX または CD7 であり、人獣共通感染性の遺伝子型は検出されなかったことから、日本国内では *E. bienersi* が飼育犬から人へ伝播する可能性は低いことが示唆された。以上の知見は、人とコンパニオンアニマルである犬が共に健康で共生するために、重要な情報を提供するものであり、最終試験の成績と併せて審査員一同は合格と判定し、博士（獣医学）の学位授与が適当であると認める。