

1. 犬のエキノコックス感染診断法として糞便内 DNA検出法を適用するための基礎的研究

- 入江 隆夫（北海道立衛生研究所 感染症部医動物グループ）
- 浦口 宏二（北海道立衛生研究所 感染症部医動物グループ）
- 伊東 拓也（北海道立衛生研究所 感染症部医動物グループ）

【研究目的】

人のエキノコックス症（本研究では特に多包虫症を指す）は、病巣の外科的摘出以外に効果的な治療法がない動物由来寄生虫症であり、感染予防が極めて重要である。人への感染源として伴侶動物である犬の重要性が指摘され、感染症法では犬のエキノコックス感染は届け出対象と定められている。そのため、感染犬の早期発見につながるよう、信頼性が高く迅速な診断法が求められている。PCR法によるDNA検出は道内・国内の家畜保健所や衛生研究所などで実施できるため、本法を利用した犬のエキノコックス感染の検査系を確立することは、獣医師および自治体による飼育犬の診断・届け出・駆虫をこれまでよりも迅速・容易にし、人のエキノコックス感染予防に貢献すると期待される。そこで本研究では、犬の糞便内に排出されるエキノコックス由来DNAの検出法の有用性を検討することを目的とし、夾雑物に左右されない安定したPCR法によるDNA増幅条件および糞便からの効率の良いDNA抽出方法について、添加回収試験を中心とした基礎的評価を行った。

【研究の必要性】

多包条虫は野生動物（北海道ではキツネとネズミ類）の間で生活環が維持されており、人の多包虫症は厚労省研究班(2009)により国内の動物由来感染症の中でも高リスク感染症に位置づけられた人獣共通寄生虫症である。国内では主に北海道で毎年20名前後の患者が報告されており、宿主動物に対するコントロールが困難であることや罹患すると外科的摘出のほかに効果的な治療法がないことから、感染予防が極めて重要である。

人の感染予防として、従来行われてきたキツネなど媒介動物対策や飲料水対策に加え、近年では飼育犬の感染防止および早期発見・駆虫が求められている。犬はキツネと同様終宿主であるが、人と密接な生活をするため、感染した際には人にとってよりハイリスクな感染源動物となる。そのため感染症法により感染犬の全数把握が義務づけられており、これまでに北海道のみならず埼玉県や愛知県でも感染例が報告されている。犬はエキノコックスの寄生を受けても特異的な症状を示さないため、正確な診断系が求められる。診断の基準として、a) 虫体又はその一部（片節）の確認による病原体の検出、b) ELISA法による病原体の抗原の検出（ただし駆虫後に不検出となったときに限る）、c) PCR法による病原体の遺伝子の検出、という3つの方法が示されている（神谷, 2004）。このうち、a) は診断

的駆虫との組み合わせにより適用の可能性があるが、精度評価が不十分であり、これまでのところ一般的な方法とはなっていない。また、b) を基盤に作製されたキットを用いたスクリーニング検査が行われていたが、このキットの製造販売が中止されたため、犬のエキノコックス感染の診断が容易に行える検査法が早急に必要となった。そこで我々は、c) 糞便内に排出される多包条虫の虫体および虫卵由来DNAのPCR法による検出系が診断法として適用できないかに着目し本研究を実施した。海外では野外終宿主の感染状況のモニタリングなどに一部試みられている手法であるが(Dinkel et al., 1998)、本研究が目的とする個体の診断に適用するには検出限界や検出可能期間など精度についての検討が不十分である。そこで本研究では、糞便から多包条虫特異DNAを直接検出する方法について、PCR法によるDNA増幅条件、糞便からのDNA抽出方法、そして実験感染犬における検出可能期間について評価し、個体診断に適用し得る最適な条件を検討した。

【実施内容・結果】

1. 多包条虫 DNA 増幅のための PCR 条件の検討

北海道立衛生研究所で継代維持されている多包条虫成虫体から抽出した DNA を 1 ag ~ 1 pg/μl になるように段階希釈し、PCR 反応による増幅対象領域および使用する酵素を比較検討し、もっとも高感度に DNA を増幅できる PCR 反応条件を検討した。

増幅対象として、核 DNA の U1 small nuclear RNA (Bretagne et al., 1993)、ミトコンドリア DNA の 12S ribosomal RNA (Stieger et al., 2002) および Cytochrome c oxidase subunit I (COI, Nonaka et al., 2008) の 3 領域を選択し、それぞれの中で多包条虫に特異的な DNA 塩基配列を候補とした。増幅酵素である DNA polymerase には、KAPA Taq Extra PCR Kit (日本ジェネティクス)、KAPA 2G Robust HS (日本ジェネティクス)、AmpdirectPlus+BIOTAQ (島津製作所) など数種を用い比較した。

その結果、ミトコンドリア DNA COI 領域 243 bp を対象とし、KAPA 2G Robust HS を使用した多包条虫特異的 PCR 反応でもっとも良好な結果が得られ、虫体 DNA 100 ag 以上を含む場合に安定して増幅可能であった。以降の検討にはこの PCR 条件を適用した。

2. 糞便内多包条虫 DNA の抽出方法の検討

多包条虫の原頭節および虫卵を用い、糞便検体からの多包条虫 DNA の抽出法を比較した。抽出法の候補として、I: Dinkel et al (1998) の熱アルカリ抽出法の改良法、市販キットである II: QIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN) および III: PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO) の 3 法を取り上げ、それぞれの抽出効率を比較した。

まず糞便を用いずに、原頭節 (1 個) もしくは虫卵 (1 もしくは 10 個) から各法で DNA 抽出を行い、PCR により抽出の成否を判定した。その結果、原頭節 1 個を用いた試験ではいずれの抽出法によっても PCR 陽性であった。しかしながら虫卵を用いた際には、抽出法 I および III では添加虫卵数が 1 個でも PCR による検出が可能であったが、抽出法 II で

は 10 個の虫卵を添加した試験でのみ PCR 陽性を示した。

次に抽出方法ごとの最大処理可能糞便量（抽出法 I は 0.5 g とし、抽出法 II および III は製品マニュアルに記載された最大量である 0.2 g および 0.25 g とした）に対し、原頭節（1 個）もしくは虫卵（1 もしくは 10 個）を添加し、各法による DNA 抽出を試みた。原頭節 1 個を添加した場合には、全ての試行で PCR 陽性であったが、虫卵添加時には、抽出法 I および III では 1 個の虫卵使用時に PCR 陽性を示したのに対し、抽出法 II では 10 個の虫卵使用時にも PCR 陰性であった。

3. 実験感染犬における糞便内多包条虫 DNA 検出可能期間の判定

実験感染犬の糞便を感染初期から虫卵排出期まで継続的に採取し、糞便内 DNA 検出を試みた。今回は、原頭節 50 万個を経口投与した犬の糞便を投与翌日から 35 日目の間に 29 回採取し、上記抽出法 I-III の処理を行い PCR 陽性となる検体数を比較した。その結果、感染直後（1-2 日目）および虫卵排出期（26 日目以降）はいずれの抽出法を用いた場合でも PCR 陽性であった。一方で、3-25 日目の虫卵非排出期（18 検体）には、抽出法 I-III の順に 61.1%（11/18）、33.3%（7/18）、66.7%（12/18）の陽性率であり、抽出法 II は他の 2 法よりも低かった（表 1）。PCR 陰性であった抽出 DNA 液について、検出最小量である 100 ag の虫体 DNA を添加して再度 PCR を行ったところ DNA の増幅が確認できたため、PCR 反応阻害物質の存在は認めなかった。

抽出法により検出率に差はみられたものの、今回採取したすべての糞便検体は、少なくともいずれか 1 つの方法においては PCR 陽性を示しており（表 1; 抽出法 I-III 合計）、今回の感染条件では感染後 35 日目までの全期間に渡り糞便内に多包条虫 DNA が存在することが明らかとなった。

【考察と今後の課題】

本研究では、最初に多包条虫 DNA を効率よく検出するための PCR 条件を決定した。今回得られた PCR 条件では、多包条虫 DNA 100 ag を安定して検出できた。これは、原頭節 1 個の DNA 量約 1.5 ng、虫卵 1 個の DNA 量約 8 pg (Rishi and McManus, 1987) を大きく下回ることから、非常に高感度な検出条件であると考えられる。

次に行った抽出法の比較では、用いた方法によって PCR の成否に差がみられた。糞便からの微生物 DNA を抽出する際には、糞成分に含まれる糖やタンパク質などの夾雑物が抽出やその後の PCR 反応を阻害してしまうことが知られている。これらをできる限り除去し、多包条虫 DNA を高純度で、かつできるだけ多く抽出することが今回の試験においても重要な課題であった。今回の 3 法については、抽出 DNA 液中に PCR 阻害物質は含まれていないことが確認できたため、抽出法による PCR の成否の差は、多包条虫 DNA が十分量抽出できたかによるものと考えられた。抽出法 II は Protainase K によるタンパク質分解が抽出の基軸となっており、糞便検体からの微生物 DNA などを抽出するために開発されたキット

として世界的に広く使用されている。しかしながら今回の結果から、糞便内の多包条虫 DNA を抽出する場合にはその効率は決して高くないことが示された。一方で、抽出法 I は強力なアルカリによる抽出を基軸としており、また抽出法 III はビーズによる物理的破壊の過程が含まれる。糞便から検出された多包条虫 DNA の由来としては、脱落した片節や細胞片などが考えられる。糞便内の多包条虫組織から DNA を抽出する際には、酵素による溶解よりも、抽出法 I や III のように組織を効率よく壊す方法が有効であると示唆された。

今回の感染実験犬においては、感染初期から 35 日目までの全期間に渡って糞便内に多包条虫 DNA が存在することが明らかとなり、犬の多包条虫感染の検査に DNA 検出法が適用できると考えられた。特に、感染直後、および感染 26 日目以降の虫卵排出期はいずれの方法でも多包条虫 DNA が検出可能であり、前者は犬に経口摂取された後に腸内に定着できなかった虫体、後者は成熟して切り離された多量の片節と虫卵が含まれるため、多包条虫 DNA が十分に抽出できたものと考えられた。

一方で虫卵非排出期については、3 つの抽出法を合わせた検出率は 100%であったが、各法単独でみると、もっとも良好であった抽出法 III でも 67%の検出率にとどまった。PCR 陽性を示した検体が抽出法間で異なることから、おそらく虫卵非排出期には、脱落虫体などの多包条虫組織が糞便内に微量でかつ偏在しているため、抽出に用いた検体内にこれが含まれていたか否かが PCR の結果を左右したと考えられる。このことを加味すると、DNA 抽出に用いる糞便量を多くすることで、多包条虫組織の混入する確率が上がり、検出率も向上すると期待される。しかしながら、抽出法 III は市販キットであるため改良が困難であり、一度に処理できる糞便量は 0.25 g が上限となっている。そのため今後は、処理糞便量を増加可能な抽出法 I についてさらに検討し、虫卵非排出期の検出感度が向上するよう改良を進めていく。また、個体や食物によって pH や夾雑物の量など糞便の性状が異なることに対応するため、さまざまな状態の糞便を用いて抽出法の安定性を評価する必要がある。あわせて、犬の多包条虫感染診断法としての精度（特に感度）の評価が必要である。

引用文献

Bretagne et al. (1993) *Parasitology* 106: 193-199

Dinkel et al. (1998) *J Clin Microbiol* 36: 1871-1876

神谷 (2004) 犬のエキノコックス症対策ガイドライン

Nonaka et al. (2008) *Parasitol Int* 57: 519-520

Rishi and McManus (1987) *Parasitology* 94: 369-383

Stieger et al. (2002) *Parasitology* 124: 631-640

表 1. 各抽出法による実験感染犬糞便の PCR 陽性数

感染後日数	採便回数	陽性検体数			
		抽出法 I	II	III	I-III 合計
1-2	2	2	2	2	2
3-14	9	4	1	5	9
15-25	9	7	6	7	9
26-35	9	9	9	9	9
合計(%)	29	22 (75.9)	18 (62.1)	23 (79.3)	29 (100)

抽出法 I: 熱アルカリ抽出法、II: QIAamp DNA Stool Kit、III: PowerSoil DNA Isolation Kit

【経費使途明細】

検体採取用消耗品 (グローブ、密閉容器)	38,426
虫卵精製用消耗品 (ナイロンメッシュ、試薬)	42,042
DNA 抽出・精製用試薬 (抽出キット、緩衝液、試薬)	120,668
PCR 関連試薬 (プライマー、増幅酵素)	157,423
PCR 関連消耗品 (チューブ、チップ)	103,761
データ解析・整理用消耗品 (泳動撮影用印刷紙、ノート他)	37,820
振込手数料	4,860
	505,000