

F-062 渡り鳥によるウエストナイル熱および血液原虫感染経路の解明とリスク評価に関する研究
(4) 鳥類消化管内寄生虫の遺伝子診断に関する研究

EF フェロー

Chen Zhao

独立行政法人国立環境研究所

環境研究基盤技術ラボラトリー

生物資源研究室

桑名 貴

平成 19～20 年度予算額 5,016 千円

(うち、平成20年度予算額 2,749千円)

※上記の合計予算額は、間接経費 1,157千円を含む

[要旨]本研究では、国内の絶滅危惧種の一つであるヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) の消化管内寄生虫を調査し、その寄生虫種を対象とした遺伝子診断法を開発するとともに寄生虫感染をコントロールする方法を開発する。最初にヤンバルクイナ 46 個体の消化管より内部寄生虫の分離を試みた。線虫類は 46 個体中 26 個体より分離され、形態学的観察によって *Heterakis* 属であることが確認された。また別の 2 個体からは鉤頭虫類 (*Acanthocephala*) を分離した。更に、13 個体からは斜睾吸虫科 (*Plagiorchiida*) と思われる吸虫が分離された (このうちの 7 検体からは線虫も分離された)。つぎに線虫と吸虫を識別するために、ユニバーサルプライマー 239 および 240 で増幅されたミトコンドリア DNA・チトクローム C・オキシダーゼ・サブユニット 1 (COX1) の塩基配列に基づいて、線虫および吸虫の特異的な PCR プライマーを設計した。そして、そのプライマーを使用した nested PCR 法を開発した。この nested PCR 法を線虫および吸虫の両方の虫卵を含む新鮮な糞便サンプルに応用したところ、今回設計した種特異的プライマーは、寄生虫の同定に使用可能であることが分かった。さらに、ヤンバルクイナの寄生虫の同定をより迅速に行うため、duplex real-time PCR アッセイ法を開発した。非特異的反応を避けるため、プライマー 239 と 240 によって増幅される部分より上流のチトクロームオキシダーゼ・サブユニット 1 遺伝子の配列を決定し、線虫用と吸虫用のプローブとプライマーをそれぞれ設計した。これらのプライマーとプローブを使用することで、反応回数は一回のみとなり、PCR 産物を確認するための電気泳動を実施する必要もなくなった。糞 42 サンプルについて nested PCR と duplex real-time PCR を適用し、信頼性と有効性の比較を行った。その結果、両方で寄生虫卵から寄生している線虫と吸虫を検出できることが分かった。ただし duplex real-time PCR の方が吸虫の検出感度が高く手順が簡素であるため、臨床現場での有用性は高い。

[キーワード] ヤンバルクイナ、*Gallirallus okinawae*、寄生虫、nested PCR、duplex real-time PCR

1. はじめに

ヤンバルクイナは、沖縄本島に分布するクイナ科の鳥類で1981年に発見された。ヤンバルクイナの個体数は、1985年には1,800羽前後と推定されていたが、現在では、800羽以下であると推定されている¹⁾。個体数減少の原因としては食肉類による捕食や森林伐採による生息域の減少があげられている。このような状況のため環境省は、本種を「絶滅危惧1A類」に分類している。また、2008年度より保護増殖事業が開始されることになっている。ある種が絶滅に迫いやられる大きな原因には捕食者の影響や生息域減少があげられる。この他に個体数が減少してきた場合には様々な感染症や寄生虫病が個体群内に蔓延しやすく、それらが絶滅の原因として重要となってくる。そのため、ヤンバルクイナの野生個体群内にどのような感染症や寄生虫が存在しているのか調査することは、野生個体群の絶滅リスクを評価する上で重要である。また、感染症や寄生虫に関する情報は飼育下繁殖を実施する上でも衛生管理面について重要な情報を提供することになる。しかしながら、ヤンバルクイナの消化管内寄生虫についてのデータは少ない。そのためヤンバルクイナの寄生虫を調査し、寄生虫を検出するための効果的な診断法を開発することは、ヤンバルクイナの寄生虫感染の蔓延を特に飼育下繁殖個体群について防止するために重要である。

一般に寄生虫の形態学的観察による同定は熟練を要する。このような制約を克服するために分子生物学的手法が寄生虫の検出や種判別に応用されてきた。特に、PCR法は、僅かな量の寄生虫由来のDNAを増幅することが可能であるため広く応用されている診断方法である。そこで本研究では、最初に野生ヤンバルクイナの寄生虫感染状況を明らかにした。次に分離された寄生虫の遺伝子配列を基に種特異的なプライマーを設計し、PCR法およびリアルタイムPCR法へ応用した^{2,3,4,5,6)}。

2. 研究目的

現在、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による遺伝子の分析は、寄生虫種の識別や遺伝的多様性の評価をするうえで広く応用されている。本研究では、ヤンバルクイナに見られる寄生虫の種特異的なプライマーを設計し、そのプライマーを使用したnested PCR法およびduplex real-time PCRによる寄生虫の検出・診断法を開発することを本研究の目的とした。また、臨床現場への応用も考慮し、虫卵を含む糞便サンプルからでも寄生虫の検出が可能か評価する。

3. 研究方法

（1）野生ヤンバルクイナからの寄生虫分離

野生ヤンバルクイナからの寄生虫分離ヤンバルクイナ 46 個体分の消化管より寄生虫の分離を実施し、形態学的な同定を実施した（表 1）。これらの消化管からは線虫、吸虫および鉤頭虫が分離され、条虫は分離されなかった。26 検体から線虫が分離され、光学顕微鏡による観察の結果、*Heterakis* 属であることを確認した。全ての吸虫は形態学的特徴 Plagiorchiida であることを確認した。また、鉤頭虫類 Acanthcephala を 2 検体より分離した（図 1）。

表 1. ヤンバルクイナの寄生虫感染の概要

総検体数	線虫が検出された 検体数	吸虫が検出された 検体数	鉤頭虫が検出された 検体数	線虫と吸虫の両方が検出 された検体数
46	26	13	2	7
寄生部位	盲腸、小腸、大腸	大腸および腎臓	小腸	

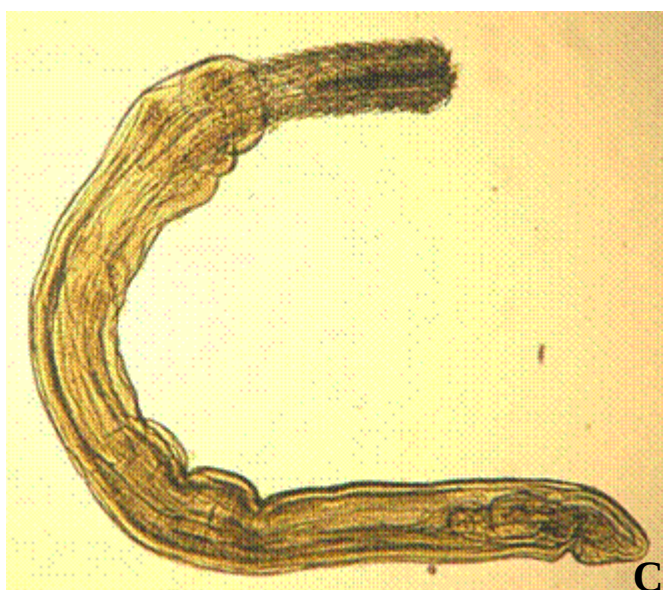
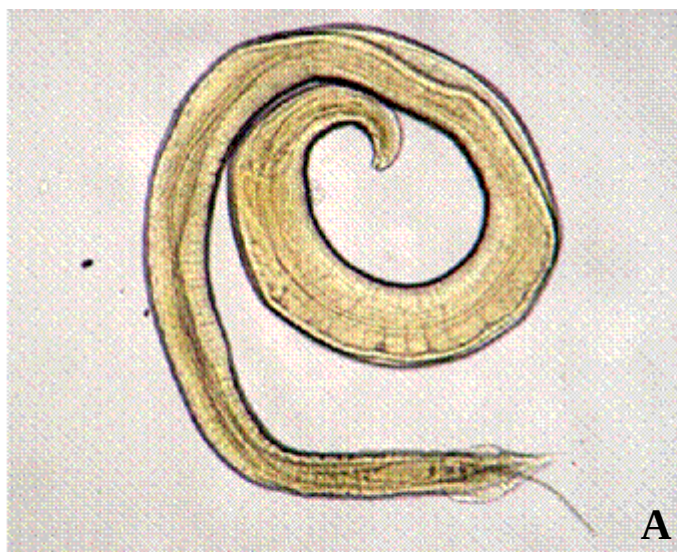


図1 ヤンバルクイナの消化管より検出された *Heterakis* 属の線虫 (A) と斜睾吸虫科 (Plagiorchiida) の吸虫 (B) および鉤頭虫類 (Acanthocephala) (C)。

(2) 種特異的な PCR 用プライマーの設計

今回は、分離された寄生虫種のなかで特に寄生例の多かった *Heterakis* 属の線虫と斜睾吸虫科 (Plagiorchiida) の吸虫を研究対象とした。種特異的なプライマーの設計座位はミトコンドリアDNAのチトクロームC・オキシダーゼ・サブユニット1(*cox1*)とした。一回目のPCRにはプライマー239と240を使用した。PCR産物の長さは、約450bpである。

239 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3')

240 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3')

PCR用のテンプレートは線虫3個体（ヤンバルクイナ検体No.489Aより分離）と吸虫2個体（検体No.80Aおよび検体No.377Aより分離）から抽出したDNAを使用した。3個体の線虫から得られたシーケンス結果を比較した（図2）。その結果、線虫3個体から同一の配列が得られた。したがって、これらの*Heterakis*属の線虫はすべて同一種であると考えられる。同様に2個体の吸虫から得られたシーケンス結果を比較したところ、配列が同一であったため、これらも同一種であると考えられる。今回得られた配列データの多重アライメントの結果に基づいて、ヤンバルクイナの線虫および吸虫を検出するための種特異的プライマーを設計した。線虫用の種特異的プライマーは以下のとおりである。

ONCF (5'-TAGGTATGGTATATGCTATTTTAAAGA-3')

ONCR (5'-CAACAATAAAGGTTGAAAACTATTT-3')

このプライマーを使用した場合のPCR産物の長さは206bpである。

更に、吸虫を検出する特異的なプライマーには、以下のフォワードプライマーのみを設計した。

OTC (5'-GCAGAAATTAGAAATAATGACTC-3')

これは、ユニバーサル・リバープライマー240との組合せで378bpのPCR産物を増幅することが可能である。

（3）duplex real-time PCR アッセイ法のプライマーとプローブ

duplex real-time PCRアッセイ法に用いるプライマーとプローブを設計するにあたって、さらなる塩基配列情報を得るために、プライマー239と240によって増幅されるcox1遺伝子領域（シーケンス_{239/240}）より上流に位置する新しい遺伝子領域を、新しく設計されたユニバーサルプライマーで増幅し、配列を決定した。具体的には、線虫 *Heterakis sp.* のフォワードプライマーの設計（NCF: 5'-AGTTCTAATCATAAGGATATTGG-3'）は、上科Ascaridoidea に属する3種の寄生虫（*Ascaris suum*, X54253 ; *Toxacara canis*, AM411108 ; *Anisakis simplex*, AY994157）のアラインメントをもとにしたもので、シーケンス_{239/240}にあるリバープライマー（NCR: 5'-ACCTCCTTTTTACCAGTCAA-3'）と組み合わせると、773bpのDNAフラグメントを増幅できる。同様に吸虫 *Glaphyrostomum sp.* のフォワードプライマーの設計（TCF: 5'-ATGATTTTTTTTTTTTAAATGCC-3'）はcox1遺伝子の全配列がわかっている5種（*Paragonimus westermani*, NC_002354 ; *Fasciola hepatica*, AF216697 ; *Opisthorichis felinus*, NC_011127 ; *Schistosoma haematobium*, NC_008074 ; *Trichobilharzia regent*, NC_009680）の分析に基づいて設計されたもので、シーケンス_{239/240}にあるリバープライマー（TCR: 5'-ACCCACCATTCCAAACCCAGG-3'）と同時に用いると、561bp のDNAフラグメントが得られる。real-time PCRアッセイ法の種特異的なプライマーとプローブは増幅されたPCR産物の新規の塩基配列解析に基づいて設計、合成した（図3）。

線虫の real-time PCRアッセイ法のプライマーとプローブは次の通りである：

フォワードプライマー：5'-CTYTRGGWATRGTTATGCTATTTTAA-3'

リバープライマー：5'-CAAWAMAGGTTGAAAAACYATYTTAG-3'

プローブ：5' (Eclipse)-GTAGTTTGGGCT (ROX)-3'

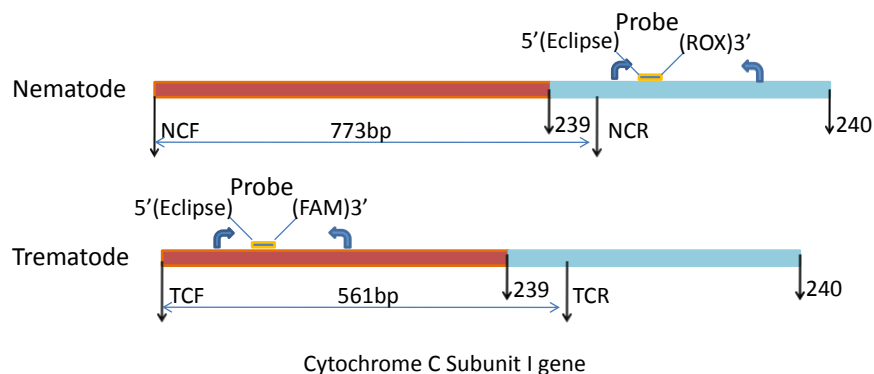
吸虫の real-time PCRアッセイ法のプライマーとプローブは次の通りである：

フォワードプライマー：5'-AAGCTTATGGCTGTTGTTACCTTCA-3'

リバープライマー：5'-CGAAAGTCCAGCCAAATGTAATG-3'

プローブ：5' (Eclipse)-AAAGTTCACCCC (FAM)-3'

Design of Primers and Probes in Duplex Real-time PCR



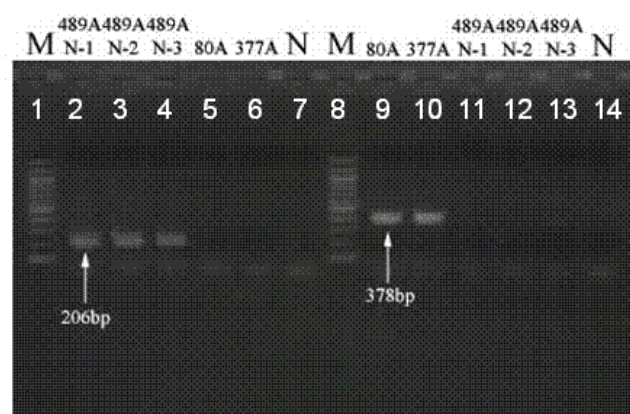
*Nematode primers can detect all 3 various sequences of Heterakis found in Okinawa rail

図 3. duplex real-time PCR アッセイ法のプライマーとプローブの設計

4. 結果・考察

(1) PCR 用プライマーの種特異性の検証

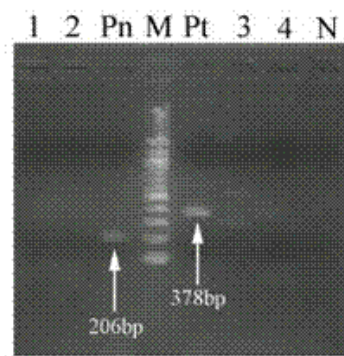
今回設計したプライマーの信頼性と特異性を確認するため、種特異的プライマーを使用したPCRを実施した。このときのテンプレートはプライマー239および240で得られたPCR産物を使用した。PCRの結果を図4に示した。この結果から今回設計した種特異的プライマーはそれぞれの種のDNAを特異的に増幅することが確認された。したがって、この結果から今回新たに設計した種特異的プライマーは臨床応用することが可能であると考えられる。



M: 100bpラダーマーカー、N: 陰性コントロール、489N-1～489N-3: 3線虫個体、80A および 377A: 2吸虫個体、レーン2-6: 5検体におけるプライマーペアのONCFとONCRによるPCRの結果、レーン9-13: 5検体におけるプライマーペアのOTCと240によるPCRの結果。

図 4. 線虫と吸虫の検体における種特異的プライマーによる nested PCR の結果

次に2つの特異的なプライマーペアが、宿主であるヤンバルクイナのDNAを増幅し擬陽性反応を引き起こす可能性があるのか検討した。2個体のヤンバルクイナから採取した血液より抽出したDNAをテンプレートとして、特異的プライマーでのnested PCRを実施した。その結果、線虫用のプライマーであるONCFおよびONCRを使用した場合には非特異反応は見られなかった（図5）。一方、吸虫用のプライマーであるOTCおよび240を使用してnested PCR法を行った場合、陽性コントロールとは長さの異なるPCR産物が増幅される場合があった。しかし、これは陽性コントロールとの比較によって容易に非特異的反応と判定可能であった。

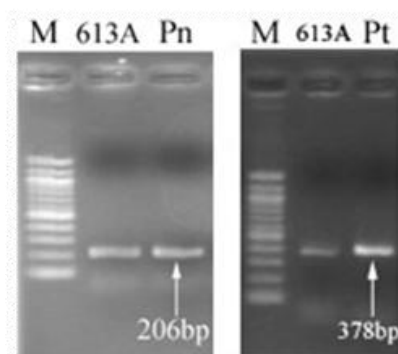


M : 100bpラダーマーカー、Pn : 線虫に対する陽性コントロール、Pt : 吸虫に対する陽性コントロール、1-2 : プライマーONCF/ONCRによるヤンバルクイナ血液サンプルでのnested PCRの結果、3-4 : プライマーOTC/240によるヤンバルクイナ血液サンプルでのnested PCRの結果

図 5. 種特異的プライマーのヤンバルクイナ血液サンプルに対する Nested PCR の結果

(2) ヤンバルクイナ新鮮糞便への nestedPCR 法の応用

新鮮な糞便サンプルは、ヤンバルクイナ(検体No. 613)の大腸から採取した。この糞便サンプルからは光学顕微鏡による観察の結果、線虫と吸虫の虫卵が確認された。この糞サンプルからのDNA抽出にはQIAamp DNA stool mini kitを使用した。また、可能な限りPCR阻害物質を除去するために2回フェノール、クロロホルム、イソアミル・アルコール法によるDNAの精製を行い、nested PCRを実施した。その結果、光学顕微鏡による観察と一致して、線虫と吸虫の種特異的なPCR産物が増幅されることを確認した（図6）。このことから、本研究で開発したnested PCR法はヤンバルクイナの糞便サンプルを利用した線虫および吸虫の感染の診断に応用可能であることを確認した。

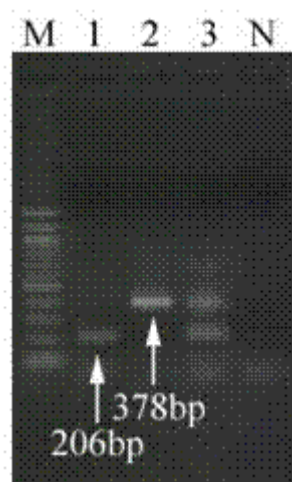


M : 100bpラダーマーカー、613A : 糞便サンプル、Pn : 線虫に対する陽性コントロール、Pt : 吸虫に対する陽性コントロール。

図 6 糞便サンプル NO.613 における nested PCR 結果

（３）Duplex nested PCR 法の検討

今回設計した特異的なプライマーペア（ONCF/ONCRおよびOTC/240）は、ヤンバルクイナの線虫および吸虫感染の診断に応用可能であることを確認した。さらに診断時間を短縮するために線虫用と吸虫用のプライマーを混合して反応させるduplex nested PCRを試みた。テンプレートには線虫と吸虫のDNAを混合したものを使用した。その結果、2種類のプライマーはそれぞれに干渉することなく、線虫と吸虫の種特異的なPCR産物を一回の反応で増幅することを確認した（図7、レーンNo.3）。このことから、今回設計した種特異的なプライマーによるDuplex nested PCR法はヤンバルクイナの線虫および吸虫の感染の診断に応用可能であることが分かった。



M：100bpラダーマーカー、1：プライマーONCF/ONCRによる検体No.489Aに対するnested PCRの結果、2：プライマーOTC/240による検体No.80Aに対するnested PCRの結果、3：duplex nested PCRの結果、N：陰性コントロール。

図7 Duplex nested PCR の結果

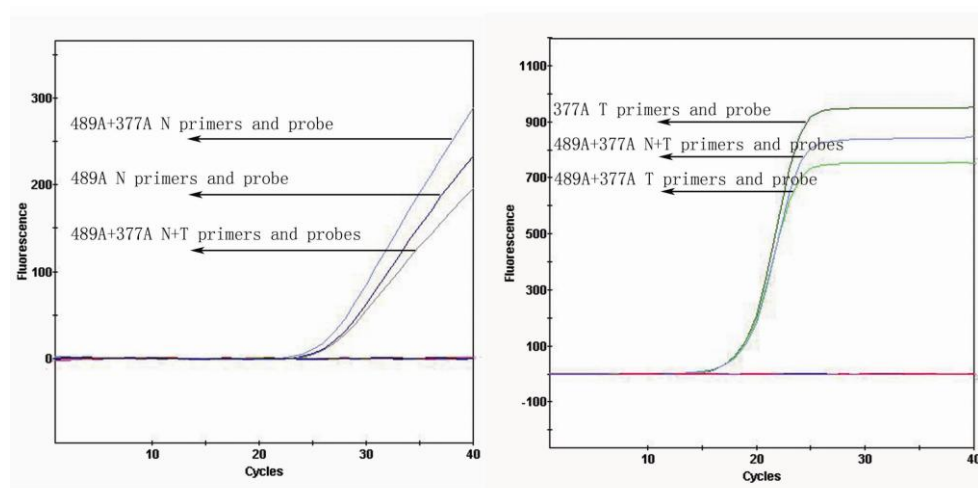
（４）real-time PCR アッセイ法の開発

新しく合成されたプライマーとプローブの種特異性を調べるために、表2に示した real-time PCRアッセイ法の特異性試験を実施した。その結果、real-time PCR反応混合物に相当量のDNAテンプレート、プライマーおよびプローブが加えられると、非特異的な蛍光シグナルによる干渉を受けずに蛍光シグナルが表示され、PCR増幅は種特異的であることが明らかになった（図8）。次に、duplex real-time PCRアッセイ法の手順を開発するために線虫と吸虫のDNAテンプレート、プライマーおよびプローブを混合したところ、対応する蛍光シグナルが観察できることから、duplex real-time PCRアッセイ法の確立に成功したことが示された。さらに、ヤンバルクイナの血液 2サンプル（537Aと707A）および消化管2サンプル（688Aと704A）から分離されたDNAもduplex real-time PCRアッセイ法で解析したところ完全な陰性反応が得られたことから、検出結果はヤンバルクイナ自身のゲノムバックグラウンドによる影響を受けないことも明らかになった（図9）。

表 2 プライマーとプローブの特異性試験のための実験設計

DNA テンプレート	線虫の プライマー	線虫の プローブ	吸虫の プライマー	吸虫の プローブ	推定結果		実際の結果	
					ROX	FAM	ROX	FAM
489A	√	√	×	×	+	-	+	-
489A	√	×	×	√	-	-	-	-
489A	×	√	√	×	-	-	-	-
489A	×	×	√	√	-	-	-	-
377A	√	√	×	×	-	-	-	-
377A	√	×	×	√	-	-	-	-
377A	×	√	√	×	-	-	-	-
377A	×	×	√	√	-	+	-	+
489A+377A	√	√	×	×	+	-	+	-
489A+377A	√	×	×	√	-	-	-	-
489A+377A	×	√	√	×	-	-	-	-
489A+377A	×	×	√	√	-	+	-	+
489A+377A	√	√	√	√	+	+	+	+
537A 血液	√	√	√	√	-	-	-	-
707A 血液	√	√	√	√	-	-	-	-
688A 消化管	√	√	√	√	-	-	-	-
704A 消化管	√	√	√	√	-	-	-	-

489A：線虫のDNAテンプレート；377A：吸虫のDNAテンプレート；537Aと707A：血液のDNAテンプレート；688Aと704A：消化管のDNAテンプレート；ROX：線虫での試験における蛍光シグナル；FAM：吸虫での試験における蛍光シグナル；√：反応液に相当量のプライマーとプローブが加えられた；×：反応液に相当量のプライマーまたはプローブが加えられなかった；+：陽性反応；-：陰性反応。



489A：線虫のDNAテンプレート；377A：吸虫のDNAテンプレート；N：線虫；T：吸虫

図 8 real-time PCR アッセイ法によるプライマーとプローブの特異性試験の結果 (1)

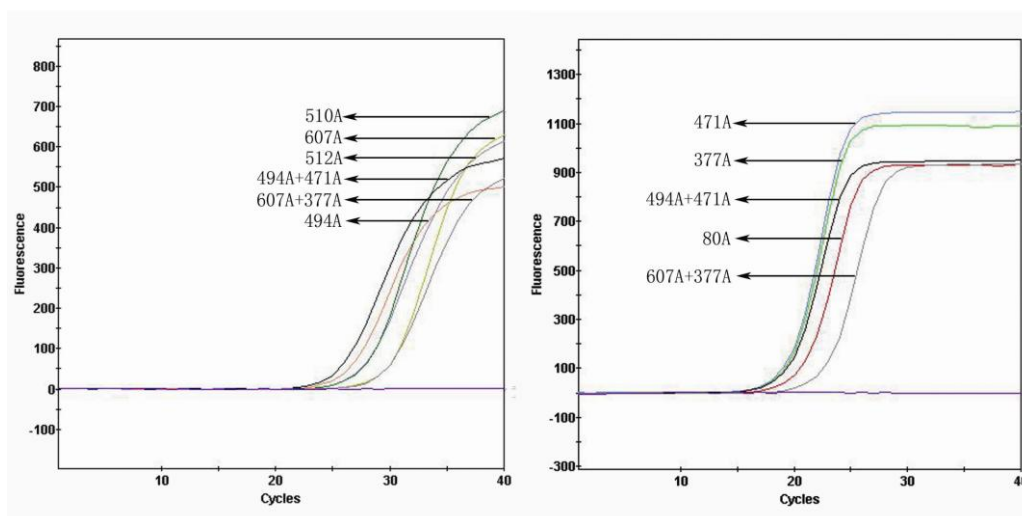
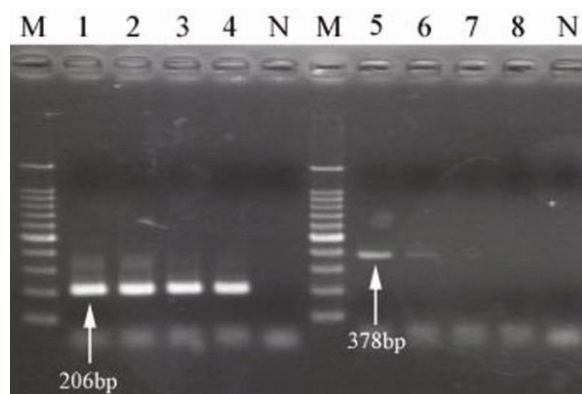


図9 real-time PCR アッセイ法によるプライマーとプローブの特異性試験の結果 (2)

duplex real-time PCRアッセイ法の有効性について評価を進めるために、線虫4個体 (494A、510A、512A および607A) および吸虫3個体 (80A、377A and 471A) が用いられた。分離された寄生虫はすべて、別個のヤンバルクイナから得られたものである。

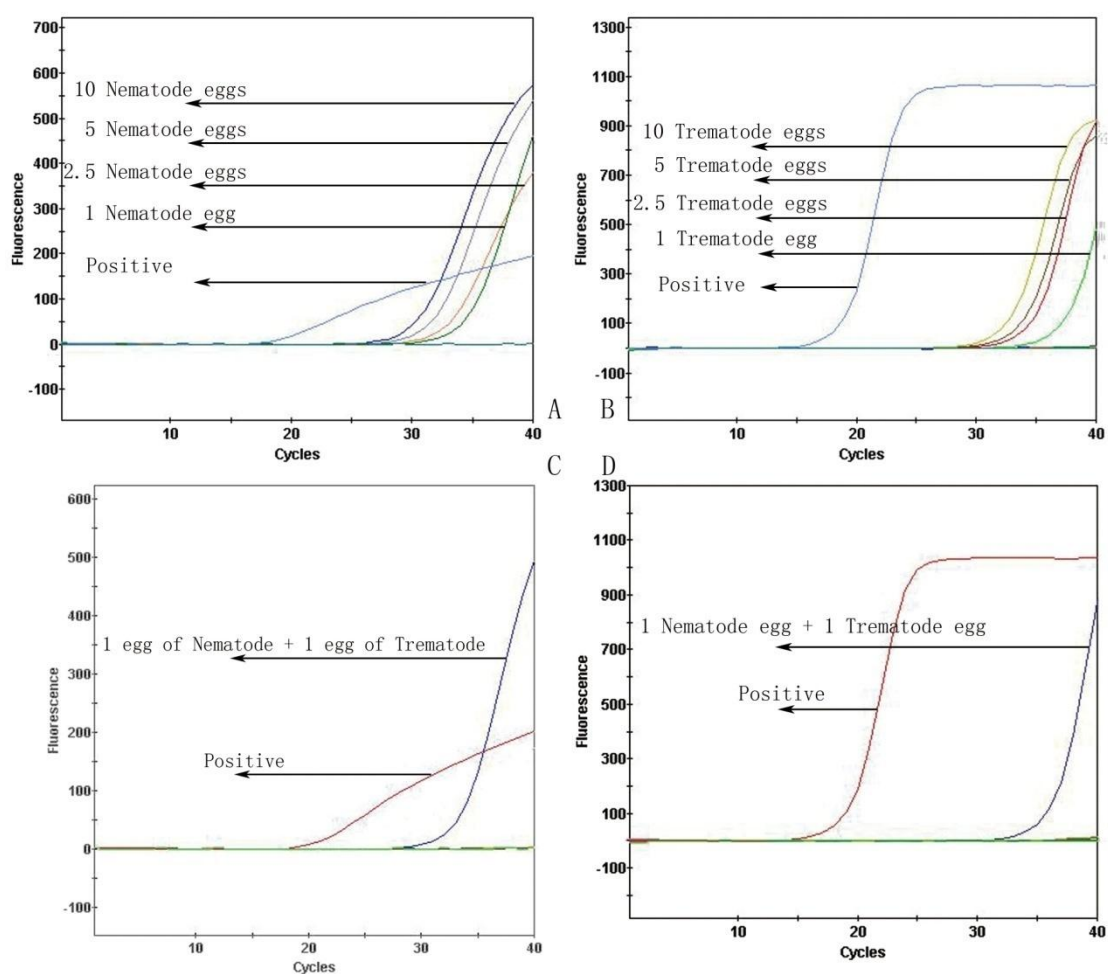
(5) nested PCR 法および real-time PCR アッセイ法による線虫卵と吸虫卵の検出感度試験

顕微鏡下で内径50 μ mのマイクロピペットを用いて、線虫および吸虫の成熟個体から卵を採取した。検出感度試験は、線虫または吸虫の卵を10個、5個、2.5個、1個含む段階的DNA希釈液を用いて、nested PCR 法および duplex real-time PCRアッセイ法で行った。その結果、電気泳動解析で検出可能な寄生虫卵の数は、種特異的 nested PCR 増幅では線虫卵が1個、吸虫卵が5個であったのに対し (図10)、duplex real-time PCRアッセイ法では両寄生虫卵を1個ずつ含む場合も検出可能であり、この方法の検出感度がより高いことが示された (図11、表3)。



M : 100bpラダーマーカー ; 1-4 : 線虫卵を10個、5個、2.5個、1個含む段階的DNA希釈液での nested PCR 法による検出結果 ; 5-8 : 吸虫卵を10個、5個、2.5個、1個含む段階的DNA希釈液での nested PCR 法による検出結果 ; N : 陰性コントロール。

図10 寄生虫卵を用いた nested PCR 法の検出感度試験結果



A : 線虫卵を10個、5個、2.5個、1個含む段階的DNA希釈液での duplex real-time PCR法による検出結果 ;
 B : 吸虫卵を10個、5個、2.5個、1個含む段階的DNA希釈液での duplex real-time PCR法による検出結果 ; C、
 D : 線虫卵と吸虫卵を1個ずつ含む検査液での duplex real-time PCR法による検出結果。

図 11 寄生虫卵を用いた duplex real-time PCR アッセイ法の検出感度試験結果

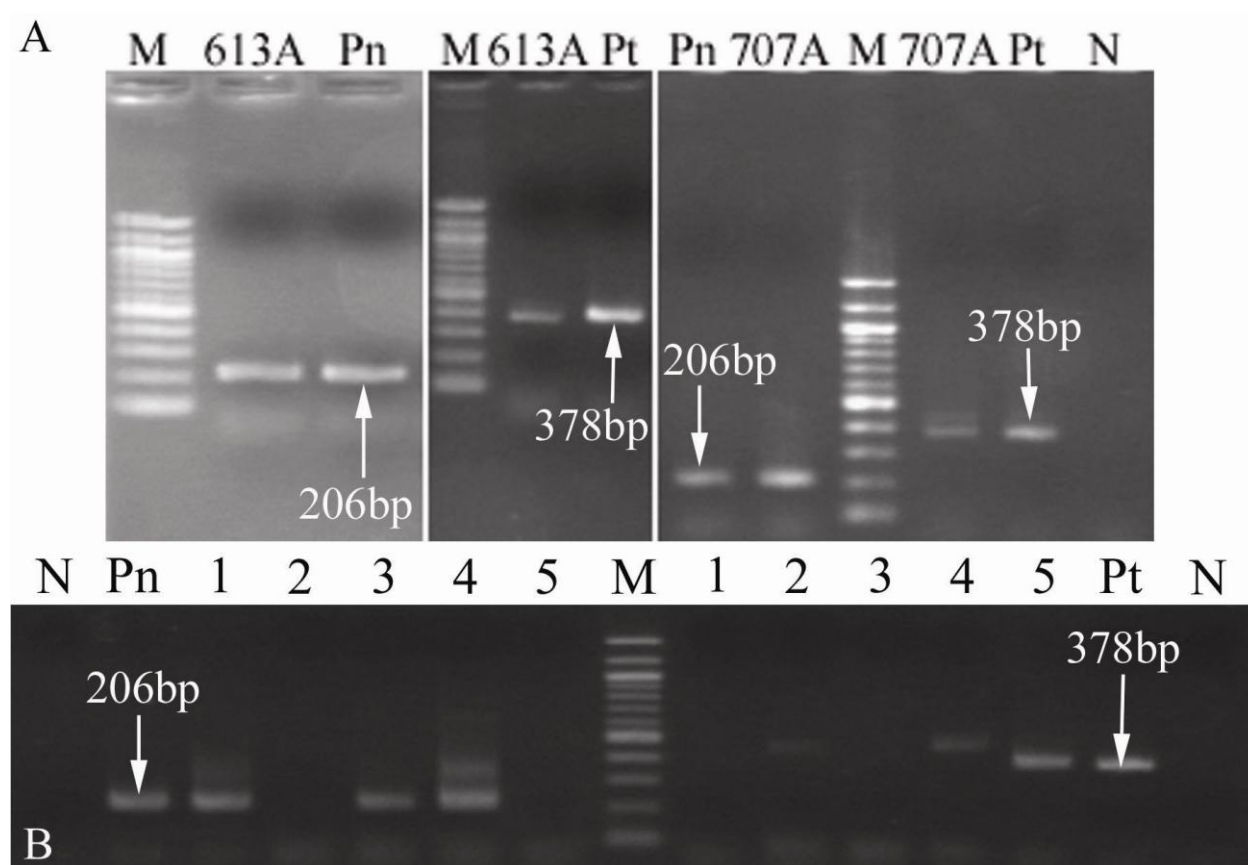
表 3 duplex real-time PCR アッセイ法での寄生虫卵希釈液のサイクル閾値

卵の数	ROX Ct	FAM Ct
10	33.30	30.51
5	33.91	31.78
2.5	35.10	32.60
1	36.57	35.23
1+1 ^a	36.79	33.96

1+1^a : duplex real-time PCRアッセイ法の反応液には線虫卵1個と吸虫卵1個が入っていた。ROX : 線虫での試験における蛍光シグナル ; FAM : 吸虫での試験における蛍光シグナル ; Ct : サイクル閾値。

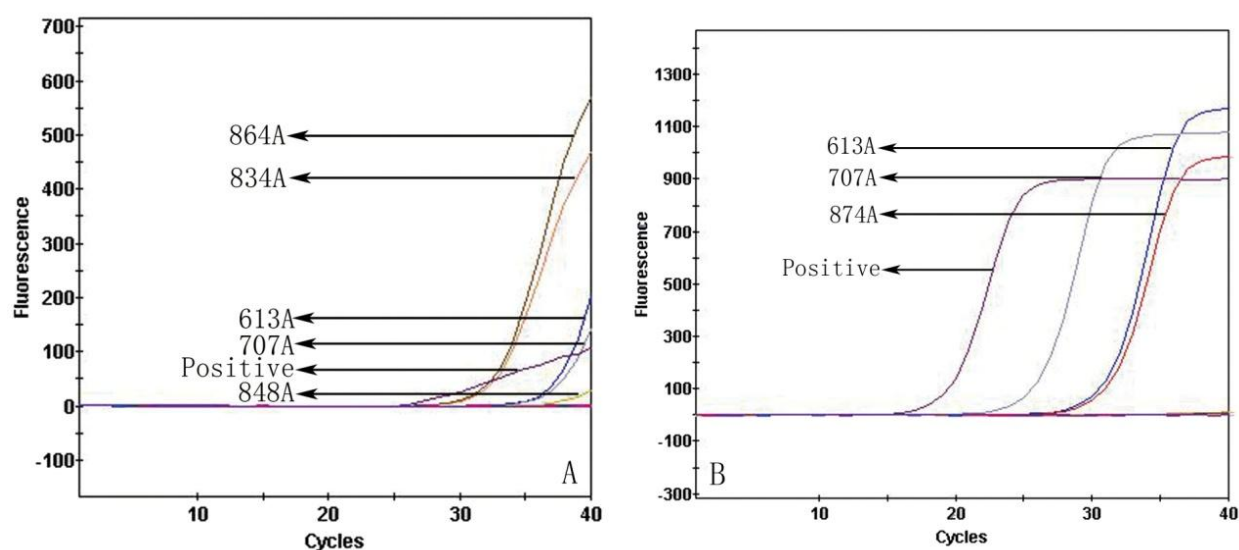
(6) nested PCR 法および real-time PCR アッセイ法による糞サンプルの検出

まず、交通事故で死亡した複数のヤンバルクイナの大腸に含まれる消化管内容物から抽出したDNA7検体（613A、707A、834A、835A、848A、864A、874A）をPCR法に基づく診断技術によって試験した。PCRアッセイ法を行う前に、消化管内容物のプレパレートを作成して顕微鏡下で観察し、寄生虫卵を含んでいないかどうかを調べた。これらのサンプルでは、nested PCR 法および real-time PCRアッセイ法とも同様の検出結果を示した（図12、13）。興味深いことに、サンプル835Aは顕微鏡観察では吸虫卵を含むことが分かったが、nested PCR 法および real-time PCRアッセイ法とも陰性の結果を示した。別のサンプル（848A）では、片方ではなく両方のPCR法で矛盾する結果が得られた。このサンプルでは顕微鏡下では寄生虫卵は観察されなかったが、nested PCR 法と real-time PCRアッセイ法の双方で弱いながら線虫陽性反応が出て、*Heterakis sp.*の感染を示した。これは、事前に小腸で線虫2個体が観察されていた事実と一致することから、PCR法に基づく診断の検出有効性が高いことを示すものである（表4）。



A : 613Aと707Aは線虫卵と吸虫卵の双方を含むことがわかっていた糞2サンプル ; B : どちらかの寄生虫の卵を含むかまたは含まない糞5サンプルに対する nested PCR 法の結果。M : 100bp ラダーマーカー ; Pn : 線虫の陽性コントロール (206bp) ; Pt : 吸虫の陽性コントロール (378bp) ; N : 陰性コントロール。

図 12 糞 7 サンプルに対する nested PCR 法の結果



A : duplex real-time PCRアッセイ法での線虫陽性結果 ; B : duplex real-time PCRアッセイ法での吸虫陽性結果。

図 13 糞 7 サンプルに対する duplex real-time PCR アッセイ法の結果

表 4 顕微鏡観察、nested PCR 法および duplex real-time PCR アッセイ法での糞 7 サンプルにおける寄生虫感染の検出結果

サンプル ID	顕微鏡観察		nested PCR 法		duplex real-time PCR アッセイ法	
	線虫卵	吸虫卵	線虫感染	吸虫感染	線虫感染	吸虫感染
613A	+		+	+	+(36.68)	+(28.61)
707A	+	+	+	+	+(37.09)	+(23.76)
834A	+	-	+	-	+(31.86)	-
835A	-	+	-	-	-	-
848A	-	-	+	-	+(39.85)	-
864A	+	-	+	-	+(31.64)	-
874A	-	+	-	+	-	+(29.10)

+ : 陽性結果 ; - : 陰性結果 ; ? : 同定が不明確 ; カッコ内の数値はサイクル閾値を示す。

PCR法に基づく2つの寄生虫感染診断法を臨床的に応用できるかどうかをさらに評価するために、捕獲後に生息環境に近い状況で飼育された、生きたヤンバルクイナから綿棒で糞35サンプルを採取した。DNAの抽出前に顕微鏡観察を行った。これらのサンプルで寄生虫卵を観察することは困難だったが、いくつかのサンプルが線虫または吸虫の卵を含有しているように思われた。しかし、nested PCR 法および duplex real-time PCRアッセイ法の双方とも陽性反応結果を示し、いくつかの結果は顕微鏡観察結果と異なるものだった(表5)。綿棒採取の糞5サンプルでは、PCR法に基づく両手法で異なる陽性反応結果が得られた(表5に下線太字で表示)。即ち、duplex real-time PCRアッセイ法では線虫陽性反応を得たものの nested PCR 法では陰性のサンプルがあったことから、この新しく開発した duplex real-time PCR法は、迅速に高い検出感度と高い種特異性を示すことから実用的価値が高いと同時に、線虫(*Heterakis* sp.)と吸虫(*Glaphyrostomum* sp.)の双方を同時に検出できるという利点を示すと考えられる(表5)。

表5 顕微鏡観察、nested PCR 法および duplex real-time PCR アッセイ法による
生きたヤンバルクイナにおける寄生虫感染の検出結果

サンプル ID	顕微鏡観察		nested PCR 法		duplex real-time PCR アッセイ法	
	線虫卵	吸虫卵	線虫感染	吸虫感染	線虫感染	吸虫感染
Neo1	-	-	-	-	-	-
Neo2	-	-	-	-	-	-
Neo3	-	-	-	-	-	-
Neo4	-	-	-	-	-	-
Neo5	-	-	+	-	+(37.31)	-
YER No. 14	-	-	+	-	+(35.32)	-
YRC ケー ジ内	-	-	-	-	-	-
YRC 3♀	-	-	-	-	-	-
YRC 2♀	-	-	-	-	-	-
YRC 3♂	+?	-	-	-	-	-
YRC 2♂	-	-	-	-	-	-
YRC 1♂	-	+?	+	-	+(37.06)	-
YRC 1♀	-	-	-	-	-	-
YRC 4♂	-	-	-	-	-	-
YRC 4♀	-	-	-	-	-	-
20060422-①	-	-	-	-	-	-
20060422-②	-	-	+	-	+(38.35)	-
20060422-③	-	-	-	-	-	-
20060507-①♂	-	-	-	-	-	-
20060507-②	-	-	-	-	-	-
20060723	-	-	+	-	+(37.64)	-
20070224-①	+?	-	-	-	-	-
20070224-②	-	-	-	-	-	-
20070309-①	-	-	-	-	-	-
20070309-②	-	-	-	-	+(36.25)	-
20070309-③	-	-	-	+	-	-
20070731	-	-	-	-	-	-
20070906	-	-	-	-	+(38.14)	-
20070912	-	-	-	-	-	-
20070922-①	-	-	-	-	+(30.60)	-
20071005-①	-	-	+	-	+(37.07)	-
20071005-②	+	-	-	-	+(37.16)	-
20071114	-	-	+	-	+(37.67)	-
黒♂	-	-	-	-	+(37.53)	-
20080326-①	-	-	-	-	-	-
白♀	-	-	-	-	-	-
20080326-②	-	-	-	-	-	-

+ : 陽性結果 ; - : 陰性結果 ; ? : 同定が不明確 ; カッコ内の数値はサイクル閾値を示す。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究では最初にヤンバルクイナの寄生虫を形態学的に観察した。その結果、線虫 (*Hterakis*属)、鉤頭虫 (*Acanthcephala*属)、斜睾吸虫科 (*Plagiorchiida*) の吸虫が分離された。これらの結果は初報告であり、非常に重要な知見である。また、今回開発したnested PCR法による診断方法は、擬陽性反応を伴うことも無く、寄生虫の種の識別が可能であった。さらに糞便サンプル内の寄生虫卵の識別に対しても応用可能であった。

次により迅速に臨床へ応用できる新しいPCRアッセイ法、即ち duplex real-time PCRアッセイ法の開発を試みた。real-time PCRアッセイ法で重要な点は、従来のPCR法より検出感度が高く、複数の寄生虫種を一度に検出でき、時間と手間を抑えることができることである。各手法を評価するために、寄生虫卵の段階的希釈液を用いて nested PCR 法および real-time PCRアッセイ法の検出感度を試験して比較したところ、real-time PCRアッセイ法は吸虫卵の検出感度が高いことが分かった。さらに、ヤンバルクイナの種特異的寄生虫感染の識別を行うに当たり、PCR法に基づく2つの手法、nested PCR 法および real-time PCRアッセイ法を臨床的に有効であるかどうか糞42サンプルを用いて検討したところ、duplex real-time PCRアッセイ法の有用性がより高いという結果を得た。国内絶滅危惧鳥類を対象にした類似の研究成果はなく、絶滅危惧鳥類を対象にした寄生虫診断学的に貴重な結果である。

(2) 地球環境政策への貢献

今年度より開始されるヤンバルクイナの飼育下繁殖においては感染症および寄生虫病のコントロールプログラムが非常に重要になると予想される。今回開発した方法を飼育下繁殖における衛生管理プログラムに導入することで、寄生虫感染の蔓延を早期に防止できることが期待される。また、飼育下繁殖へ新規に導入するヤンバルクイナに対して検疫を実施する場合にも適用可能な検査方法である。

6. 引用文献

- 1) BirdLife International (2007) Species factsheet: *Gallirallus okinawae*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 1/2/2008
- 2) Bell AS, Ranford-Cartwright LC., Real-time quantitative PCR in parasitology. 2002. Trends Parasitol. 18(8):337-42.
- 3) Dante S. Zarlenga, James Higgins, PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. 2001. Veterinary Parasitology 101: 215-230.
- 4) Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C., [Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania]. 2004. Parassitologia. 46(1-2):163-7.
- 5) Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Andrew Thompson RC., Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. 2005. Trends Parasitol. 21(7):340-6.
- 6) Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P., Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. 2005. Clin Microbiol Infect. 11(3):170-6.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) Zhao, C., Onuma, M., Asakawa, M., Nagamine, T., Kuwana, T. Preliminary studies on developing a nested PCR assay for molecular diagnosis and identification of nematode (*Heterakis isolonche*) and trematode (*Glaphyrostomum* sp.) in Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*). *Veterinary Parasitology* (in press)

(2) 口頭発表 (学会)

- 1) ヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) 消化管内寄生虫の遺伝子診断法に関する研究 Chen Zhao、大沼学、浅川満彦、長嶺隆、桑名貴、第14回日本野生動物医学会大会 (2008)

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への発表・報道等

なし

(6) その他

なし