

## マレーバク (*Tapirus indicus*) 糞便中に認められた虫卵のCOX1 および ITS 領域塩基配列を指標とした寄生蠕虫類同定の試み

大塚浩子<sup>1)</sup>, 大沼 学<sup>2,3)</sup>, 福本真一郎<sup>1)</sup>, 向井 猛<sup>4)</sup>, 白水 彩<sup>4)</sup>, 千葉 司<sup>4)</sup>, 浅川満彦<sup>1,5)</sup>

- 1) 酪農学園大学獣医学部獣医寄生虫学教室 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地
- 2) 北海道大学大学院獣医学研究科生態学教室 〒060-0818 北海道札幌市北区北 18 条西 9 丁目
- 3) 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター 〒484-8506 愛知県犬山市官林 41
- 4) 札幌市円山動物園 〒064-0959 北海道札幌市中央区宮ヶ丘 3 番地 1
- 5) 酪農学園大学野生動物医学センター 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地

(2003.1.31 受付, 2003.7.29 受理)

### Parasite Identification Based on the Sequences of COX1 and ITS Obtained from Fecal Eggs in an Asian Tapir (*Tapirus indicus*)

Hiroko OTSUKA<sup>1)</sup>, Manabu ONUMA<sup>2,3)</sup>, Shin-ichiro FUKUMOTO<sup>1)</sup>, Takeshi MUKAI<sup>4)</sup>,  
Aya SHIROZU<sup>4)</sup>, Tsukasa CHIBA<sup>4)</sup> and Mitsuhiro ASAKAWA<sup>1,5)</sup>

- 1) Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan
- 2) Laboratory of Wildlife Biology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, N18 W9 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0810, Japan
- 3) Center for Human Evolution Modeling Research, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan
- 4) Sapporo Maruyama Zoo, Miyagaoka, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 064-0959, Japan
- 5) Wild Animal Medical Center, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

**ABSTRACT.** On November 13, 2000, an Asian tapir (*Tapirus indicus*) was transferred from the Melaka Zoo in Malaysia to the Sapporo Maruyama Zoo in Japan. During quarantine at the Sapporo Maruyama Zoo, nematode and cestode eggs were observed and disinfection was conducted using Praziquantel. Segments were found in feces, but it was impossible to identify the cestode species morphologically because all were gravid segments filled with eggs. DNA extraction was conducted from the parasite eggs in the feces and from the segments. Sequences of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) in mitochondrial DNA and internal transcribed spacer (ITS) were ascertained. The results of a homology search showed that the sequences of ITS obtained from both the parasite eggs and the segments were similar to the sequence of a fungus. Two kinds of COX1 sequence were obtained from the parasite eggs; one was similar to *Ancylostoma*, while the other, a sequence that was the same as that obtained from the segments, was related to *Paranoplocephala*. The results of the present study indicated that species identification might be possible based on sequences obtained from parasite eggs in feces. Furthermore, the method might be useful for diagnosis of parasite infections in wild species with only scarce information about parasitic helminth fauna.

Key words : Asian tapir, feces, helminth egg, COX1, ITS

Jpn. J. Zoo. Wildl. Med. 9(1) : 31-37, 2004

### 序 論

現在日本には、多種多様な動物が愛玩用や動物園の展示動物として海外から輸入されている。しかし、それらの導入時に動

物検査はほとんど行われていないのが現状である。そのため、原産国で感染した病原生物が、その動物の移動に伴って日本国内に持ち込まれる危険性が非常に高い。寄生蠕虫類については動物園動物やペット用エキゾチックアニマルを対象にした調査

によって、外来寄生蠕虫の存在がすでに国内で確認されている [1-5]。

これらの寄生虫は人や同居している展示動物、さらには家畜や国内の野生動物へ感染を広げる可能性が十分に考えられる。また、このような外来寄生虫感染の広がりによって畜産分野や国内の野生動物に経済的、生物学的影響が及ぶ可能性がある。そのため早期に感染個体を確認し、適切な処置を施すことが重要である。したがって、エキゾチックアニマルや動物園動物を対象にした寄生蠕虫類の早期診断法の開発が必要だと考えられる。

消化管寄生蠕虫類の一般的な生前診断は、糞便検査による虫卵や幼虫の検出、体外に排出された虫体の形態観察により行われている。したがって、対象動物の寄生蠕虫相について情報が蓄積されている場合は、糞便内虫卵の形態や体外に排泄された虫体の形態観察により種を同定することが可能である。しかし、そのような蓄積のない動物の場合、従来の形態学的方法だけでは診断が難しい場合がある。また、虫卵のみまたは虫体の断片のみから種を同定することも形態学的方法では困難である。最近では寄生虫種特異的なプライマーを作製し、虫卵から抽出した DNA をテンプレートに用いて PCR を行い、感染している消化管線虫の種を同定する方法が開発されている [6]。しかし、この方法は感染の可能性のある寄生虫種がかなり限定できる場合にのみ応用可能な方法である。したがって、寄生蠕虫相が未知の場合が多い野生動物に応用することは困難である。

本研究では寄生虫相の情報の乏しい希少動物における感染寄生虫の生前における種同定を虫卵のみで可能にする方法を開発するため、虫卵由来 DNA をテンプレートに PCR を行い、その PCR 産物の塩基配列によって寄生蠕虫の同定が可能か検討した。同定を行う上で指標となる配列は、寄生蠕虫類の分類に多用され情報が蓄積しているミトコンドリアの cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) 遺伝子および核ゲノム中に存在する Internal transcribed spacer 領域 (ITS) とした [7, 8]。

## 材料と方法

### 1. 供試動物

2000年11月13日にマレーシアのマラッカ動物園から札幌市円山動物園に搬入されたマレーバク (*Tapirus indicus*) 雌一頭を供試動物とした。このマレーバクは野生下で衰弱していたところをマラッカ動物園に保護収容されたものである。円山動物園における検疫期間中にショ糖浮遊法を用いて糞便検査をおこなった結果、このマレーバクからは線虫卵 (EPG 0.8) と多数の条虫卵が検出された (図 1)。

### 2. 虫卵及び条虫片節の採取およびその形態観察

マレーバク糞便内の条虫卵および線虫卵はショ糖浮遊法により回収した。この虫卵の一部を使用して形態観察を行い、他のものは DNA を抽出するまで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。虫卵の外部計測は条虫卵のみで実施した。片節は、ドロンシット® (ブラジクアンテル 5 mg/錠, バイエル) を 30 錠経口投与した 2 日後に糞便内へ排泄されたものを回収した。この片節の一部を酢酸カーミン染色し形態観察を行った。残った片節は DNA の抽出を行うまで 70% エタノール中に保存した。

### 3. 糞便中虫卵の COX1 および ITS 領域の塩基配列決定

#### 3-1. 糞便中虫卵からの DNA 抽出

マレーバクの糞便 30 g に蒸留水を加えて茶こしで濾し、その濾液を用いてショ糖浮遊法を行った。その後、上清の表面部分をピペットで約 500  $\mu\text{l}$  採取し、1.5 ml のエッペンチューブに分注した。これに蒸留水を約 500  $\mu\text{l}$  加え、全量を 1.0 ml とした。そのチューブを用いて 20,000  $\times g$ , 10 分の遠心分離を行い、上清を捨てた。沈渣を再び蒸留水で 1 ml までメスアップし、再び同様の遠心分離を行った。これらの作業を 5 回繰り返す、虫卵の洗浄を行った。最後に沈渣の入ったチューブを沸騰水中で 10 分間インキュベートし、DNA 抽出用サンプルとした。このサンプルから市販の DNA 抽出キット (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen) を使用し DNA の抽出を行った。

#### 3-2. PCR

PCR 用プライマーは ITS 領域増幅用として A (5'CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA3') [9] と HC2 (5'ATATGCTTAACTTCAGCGGG3') [10] を、COX1 増幅用としては肝蛭 (*Fasciola hepatica*) の COX1 配列をもとに作製された 239 (5'TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT3') [11] と 240 (5'TAAA GAAAGAACATAATGAAAATG3') [11] を使用した。プライマー A と HC2 によって増幅される PCR 産物のサイズは約 1,000 bp と予想された。また、プライマー 239 と 240 によって増幅される PCR 産物のサイズは約 450 bp と予想された。これらのプライマーは本研究室のこれまでの実験結果から葉状条虫 (*Anoplocephala perfoliata*)、大条虫 (*A. magna*)、拡張条虫 (*Moniezia expansa*)、ベネデン条虫 (*M. benedeni*)、牛捻転胃虫 (*Mecistocirrus digitatus*)、*Spiculopteragia houdemeri*、*Nippostrongylus brasiliensis*、*Orientstrongylus ezoensis* で PCR に使用可能であると確認されている (大沼, 未発表)。PCR 反応液 (50  $\mu\text{l}$ ) の組成を以下に示す。GeneAmp 10  $\times$  PCR BufferU (Applied Biosystems) : 5  $\mu\text{l}$ , 25mM  $\text{MgCl}_2$  溶液 : 3  $\mu\text{l}$  (最終濃度 1.5mM), GeneAmp dNTP MIX (Applied Biosystems) : 5  $\mu\text{l}$  (各塩基の最終濃度 200  $\mu\text{M}$ ), 各プライマー : 1  $\mu\text{l}$  (各プライマーの最終濃度 0.5  $\mu\text{M}$ ), AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) : 0.25  $\mu\text{l}$  (最終濃度 1.25units), DNA テ

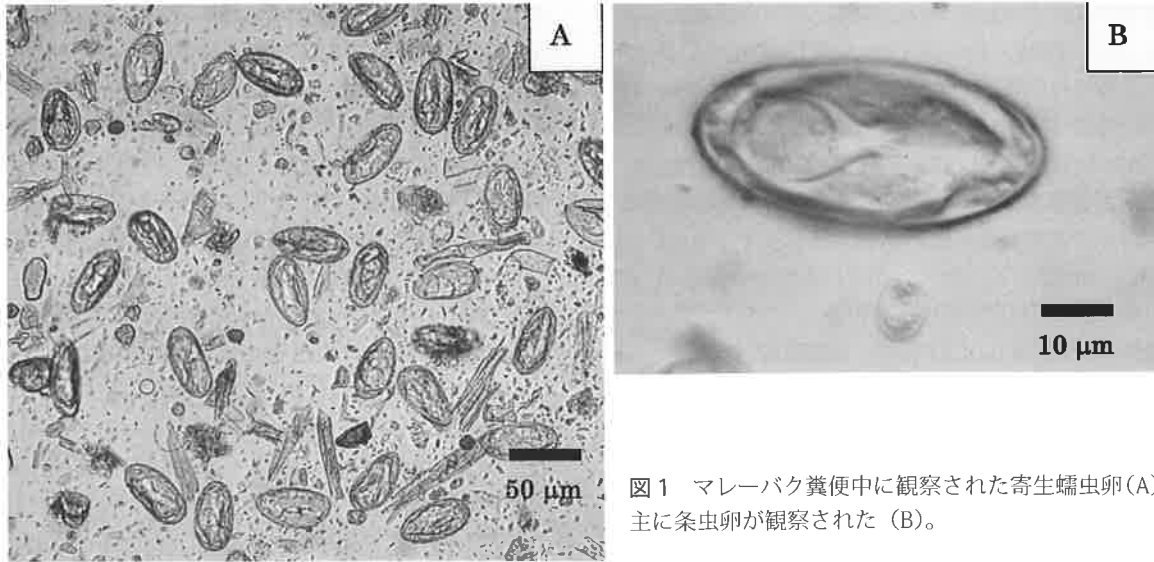


図1 マレーバク糞便中に観察された寄生蠕虫卵(A)。主に条虫卵が観察された(B)。

プレート：5  $\mu$ l, 蒸留水：29.75  $\mu$ l。PCR条件は以下の通りである。95 $^{\circ}$ C - 10分間1サイクル, 続いて94 $^{\circ}$ C - 30秒, アニリング55 $^{\circ}$ C-30秒, 伸張反応72 $^{\circ}$ C-30秒を35サイクル, 最後に72 $^{\circ}$ C - 10分間の伸張反応を行った。反応終了後, 反応液5  $\mu$ lを2%アガロースゲルで電気泳動した。その後, エチジウムブロマイド染色を施しPCR産物の確認を行った。増幅が確認された場合はQIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いてPCR産物の精製を行った。

### 3-3. PCR産物の塩基配列決定とホモロジー検索

pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System 1 (Promega)を使用して精製されたPCR産物のクローニングを実施した。コンピートセルはDH5  $\alpha$ を使用し, 形質転換後LBA培地を使用して一晩培養した。その後, 生育したコロニーを対象にPCRによるインサートチェックを行った [12]。このとき使用したプライマーはM13-21: 5'TGTA AACGACGCGCAAGT3' とM13-Reverse: 5'CAGGAAACAGCTATGACC3'である。そしてCOX1については約450bpのPCR産物がインサートされていたコロニー10個, ITS領域についてはインサートが確認されたコロニーからランダムに10コロニーを選択しシーケンシングを行った。シーケンシングにはDynamic ET Terminator (Amersham Pharmacia)を使用した。シーケンシング用プライマーはT7: 5'TAATACGACTACTATAGGG3' と, SP6: 5'ATTTAGGTGACACTATAG3'を使用し, ABI Prism310 (Applied Biosystems)によって塩基配列を決定した。最後に得られた塩基配列についてBLASTによるホモロジー検索を実施した。

### 4. 片節のCOX1およびITS領域の塩基配列決定

70%エタノールで固定された1片節を1.5mlエッペンチューブに入れ, PBS 500  $\mu$ lを使用して洗浄した。その後市販の

DNA抽出キット(DN easy Tissue Kit, Qiagen)を使用し, DNAの抽出を行った。その後のPCRから塩基配列決定までの作業は虫卵において実施した方法と同一である。最後に得られた塩基配列についてBLASTによるホモロジー検索を実施した。

## 結 果

### 1. 条虫卵の形態観察

条虫卵の大きさは平均68.5  $\mu$ m  $\times$  39.3  $\mu$ m, 六鉤幼虫の大きさは27.8  $\mu$ m  $\times$  20.0  $\mu$ mで, 発達した洋梨状装置によって包まれていた(図1)。虫卵の形態や外部計測値から今回観察された条虫卵は裸頭条虫科のものであると考えられた。また, 糞便内から検出した虫卵と片節内から得た虫卵の形態は一致していた。

### 2. 片節の形態観察

今回得られた虫体は老熟片節であったため, 内部は虫卵で満たされ, 十分な内部構造の観察ができず, 形態による種の同定はできなかった。

### 3. 虫卵由来のITS領域とCOXT領域の塩基配列

COXT領域を対象にしたPCRでは450から800bp付近にかけて複数のPCR産物を確認した(図2)。約450bpのPCR産物がインサートされていた10個のコロニーをシーケンシングした結果, 2種類の塩基配列を確認した。それらについてBLASTによるホモロジー検索を実施した結果, 一方は*Paranoplocephala omphalodes* (AY181549), *P. kalelai* (AY189959), *P. blanchardi* (AY189956) および*P. macrocephala* (AY181517)に近縁の配列で, 虫卵から得られた配列との差は*P. omphalodes*で12.5%, 他の3種では13.4%であった(図3)。もう一方は, *Ancylostoma ceylanicum*

(AF225917), *A. tubaeforme* (AJ407940), *Necator americanus* (AJ417719) および *A. canium* (AJ407964) に類似の配列で、虫卵から得られた配列との差はそれぞれ 12.0%, 12.0%, 13.0% および 15.4% であった (図 4)。

虫卵を用いた ITS 領域の PCR では 350 ~ 600bp 付近に PCR 産物を確認することができた (図 2)。この糞便中の虫卵から得られた PCR 産物の塩基配列は、BLAST によるホモロジー検索の結果 *Penicillium* 属, *Paecilomyces* 属, *Eupenicillium* 属などの真菌類のものに類似していた。

#### 4. 片節由来の ITS 領域と COX1 領域の塩基配列

片節を用いた COX1 領域の PCR では 450 bp 付近に PCR 産物を確認した (図 2)。この配列は虫卵から得られた 2 種類の配列のうち *Paranoplocephala* 属に類似していたものと一致した。

ITS 領域の PCR では 600bp 付近に PCR 産物を確認することができた (図 2)。この PCR 産物の塩基配列は、BLAST によるホモロジー検索の結果 *Penicillium* 属, *Paecilomyces* 属, *Eupenicillium* 属などの真菌類のものに類似していた。

### 考 察

プライマー 239 と 240 を使用して PCR を行った結果、糞便内虫卵からは裸頭条虫科の条虫類 (*Paranoplocephala* 属) に類似した配列と鉤虫科 (Ancylostomidae) の線虫類に類似した配列が確認された。前者の配列は同じプライマーにより片節から増幅された PCR 産物の塩基配列と一致した。虫卵の形態や外部計測値からも今回観察された条虫卵は裸頭条虫科のものであると考えられる。Sawada and Pappasarthorn (1966) ら

は、タイのマレーバクよりこの科の *Paranoplocephala indicata* を検出した [13]。今回、検体としたマレーバクは野生由来の個体であり、この *P. indicata* が寄生していた可能性も考えられる。これまでのところ *P. indicata* の COX1 塩基配列は報告されておらず、虫卵と片節から得られた COX1 領域の配列が *P. indicata* のものであることは確認できなかった。また、今回、虫卵由来の PCR 産物からは鉤虫類に類似の配列も確認された。検疫期間中に行なわれた虫卵検査でも線虫卵 (EPG は 0.8) が確認されていた。このことから、EPG が 0.8 程度であれば、今回実施した方法によって線虫の感染を確認できると考えられる。線虫類ではミトコンドリア DNA 塩基配列の同種内変異は最大で 6% だとされている [14]。ホモロジー検索で最も類似度が高いとされた *A. ceylanicum* および *A. tubaeforme* の配列と今回得られた配列との差は 10% 以上であったため、今回糞便を採取したバクに感染していた種がこれらである可能性は低く、感染していた線虫は別の鉤虫類であったと考えられる。

ITS 領域の PCR において、虫卵および片節から得られた配列は全て真菌類のものであった。この真菌類の配列は糞内に存在していたものか、駆虫薬により死亡した虫体に糞便内の真菌類が付着または侵入したものに由来する可能性が高い。前述したように今回使用した ITS 領域用プライマーセットは、予備実験において幾つかの条虫および線虫に対して使用可能であることが確認されていた。しかし、今回寄生のみられた条虫および線虫の ITS 領域を増幅することはできなかったと考えられる。

本研究の手技では、施設やコストの面で多数の検体を処理することは容易ではない。したがって、家畜に対しては蓄積された寄生蠕虫類の塩基配列情報から種特異的プライマーを製

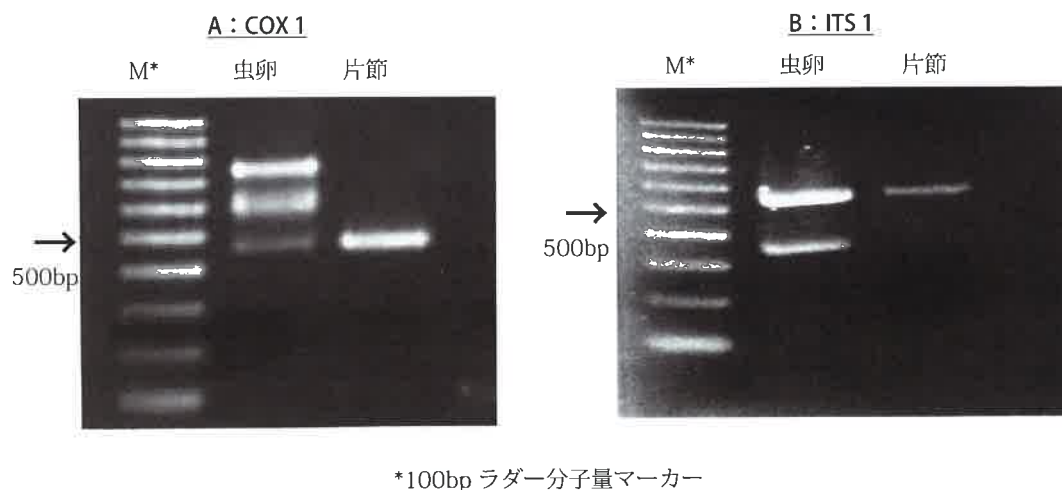


図 2 COX1 (A) および ITS1 (B) を対象とした PCR の結果。

し、糞便中虫卵から DNA を抽出し PCR を行う方法が実用的である。しかし、寄生蠕虫類の情報が限られている野生動物では、種特異的プライマーを作製することは難しい。したがって本法のように適用範囲が広いプライマーで PCR を行い、その PCR 産物をシークエンシングする方法は野生動物の寄生虫診断方法としては有用であると考えられる。また、今回の結果から本法

は線虫類と条虫類が混合感染した場合にも対処できることが示唆された。

今後の課題としては集卵方法の改良があげられる。本研究ではショ糖浮遊法により条虫卵および線虫卵を回収したため、この方法で虫卵回収が難しい吸虫の感染を見落とす可能性が高い。したがって今後は虫卵を回収するとき沈澱法を併用し、吸虫

	10	20	30	40	50
<b>Sequence 1</b>	TTCTTTTGG	GGCATCCTGA	GGTTATGTT	TTAATTTTGC	CAGGTTTGG
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	.GA.....	.....A..	A..G.....	.....A..	.....A.....
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	.GG.....	T..C..G..	A..G.....	.....A..	.....G.....
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	.GG.....	T.....G..	..G.....	.....A..	.....A.....
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	.GA.....	.....A..	A..G.....	.....A..	.....A.....
	60	70	80	90	100
<b>Sequence 1</b>	GGTCATTGGC	CATATTTGTT	TGAGTTTAAAG	AATGATGTCG	GATGTATTTG
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	A..CT..A..G	.....	.....G.....	G.....	.....G.....
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	..CT..A..T	.....	.....G.....	.....A.....	.....G.....
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	T..A..A..T	.....	.....G..G..	.....A.....	.....G.....
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	A..CT..A..G	.....	.....G.....	G.....	.....A.....G.....
	110	120	130	140	150
<b>Sequence 1</b>	GATTTTATGG	TTTGTTGTTT	GCGATGTTT	CTATAGTGTG	TCTTGGTAGT
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	.G.....	.....A.....	.....A.....	.....A..	T..G.....G
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	.....	.....	.....T.....	.....A..	T..G.....
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	.G.....	.....A.....	T.....	.....A..	T..A.....A
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	.G.....	C..A.....	.....A.....	.....A..	T..G.....G
	160	170	180	190	200
<b>Sequence 1</b>	AGTGTATGGG	GACATCATAT	GTTTACTGTT	GGTTTAGATG	TTAAGACAGC
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	.....T.....	T..C.....	.....	.....	.....
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	.....T.....	.....G.....	.....	.....	C.....
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	.....G.....	.....	.....	C..T..C..	.....
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	.....T.....	T..C.....	.....	.....	.....
	210	220	230	240	250
<b>Sequence 1</b>	TGTTTTTTTT	AGATCTGTTA	CTATGATTAT	AGGAGTACCA	ACTGGTATAA
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	A.....	.....T.....	A.....	.....	.....
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	.....	.....T.....	G.....	.....T..G..	.....
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	.....	.....T.....	.....	.....G.....T	.....T.....
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	A.....	.....T.....	G.....	.....	.....
	260	270	280	290	300
<b>Sequence 1</b>	AGGTTTTTAC	TTGATTGTAT	ATGTTATTAG	GTTCTGGGGT	TAATAAGGGT
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	.....G.....	.....G.....	.....G...A	A...AAT..	.....A..
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	.....G.....	A..G.....	.....G...A	A...AAT..	.....C...A..
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	.....G.....	A..G..A..	.....GA..A	A...A.T..	.....A..
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	.....G.....	.....G.....	.....G...A	A...AAT..	.....C...A..
	310	320	330	340	
<b>Sequence 1</b>	GATCCAGTTT	TATGATGGTT	GATTTCTTTT	GTAGTCTTTT	TTAC
<i>P. omphalodes</i> (AY181549)	.....TA...	.....G.....	A.....	A...C.....	.....
<i>P. kalelai</i> (AY189959)	.....TA...	.....G.....	AC..A.....	A...A.....	.....
<i>P. blanchardi</i> (AY189956)	.....CA...	.....A..	A.....	A.....	.....
<i>P. macrocephala</i> (AY181517)	.....TA...	.....G.....	A.....	A...C.....	.....

図3 寄生虫卵より得られた COX1 配列のホモロジー検索結果。最も類似度が高かった配列は *Paranoplocephala omphalodes*, *P.kalelai*, *P.blanchardi* および *P.macrocephala* の COX1 配列であった。

	10	20	30	40	50
<b>Sequence 2</b>	AAGTATTGGT	TTGATTGGTT	GTGTGGTTTG	AGCTCATCAT	ATGTACACTG
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	..G.....	..A.....	..A.....	..C.....	..T.....
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	.....	.....	..T..G..	..C.....	..T.....
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	.....	.....	.....	.....	..T.....
	60	70	80	90	100
<b>Sequence 2</b>	TGGGAATAGA	TTTGGATTCT	CGTGCTTATT	TTACAGCTGC	TACTATGGTA
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	..A..G....	..A.....	..A.....	.....	..A..A...
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	..T..T....	.....	.....	.....	..A.....
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	..T..T..G..	.....	..A.....	.....	..T.....
	110	120	130	140	150
<b>Sequence 2</b>	ATTGCTGTTT	CCACAGGTGT	TAAAGTGTTT	AGTTGATTAG	CTACATTATT
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	.....	..A.....	.....	.....	.....
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	.....	..A..T....	.....	.....	.....
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	.....	..G.....	.....	.....	.....
	160	170	180	190	200
<b>Sequence 2</b>	TGGTATAAAA	ATAAGATTTC	AGCCTTTGTT	GTTGTGAGTT	ATAGGTTTTA
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	.....	..G..AT...	.....	.....	.....
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	.....	..GGTT....	.....	.....	.....
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	.....	.....	.....	.....	.....
	210	220	230	240	250
<b>Sequence 2</b>	TTTTTTTATT	TACCATTGGT	GGGTTGACAG	GTGTAGTTTT	ATCAAATTCT
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	.....	.....	.....	.....	.....
	260	270	280	290	300
<b>Sequence 2</b>	AGACTAGATA	TCATTTTACA	TGATACTTAT	TATGTAGTTA	GACATTTTCA
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	.....
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	..T.....	..T..C..G..	.....	.....	..TTG-----
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	..TT.....	..T.....	.....	.....	..T-----
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	..GT.G....	..T.....	..C.....	.....	..TTG-----
	310	320	330	340	
<b>Sequence 2</b>	TTATGTTCTT	TCTTTAGATC	CAATAATCAC	TAGTGATTCC	
<i>A. caninum</i> (AJ407964)	.....	.....	.....	.....	
<i>A. ceylanicum</i> (AF225917)	.....	.....	.....	.....	
<i>A. tubaeforme</i> (AJ407940)	.....	.....	.....	.....	
<i>N. americanus</i> (AJ417719)	.....	.....	.....	.....	

図4 寄生虫卵より得られたCOX1配列のホモロジー検索結果。最も類似度が高かった配列は *Ancylostoma ceylanicum*, *A. tubaeforme*, *Necator americanus* および *A. caninum* のCOX1配列であった。

感染にも対応できるようにすべきである。次に使用するプライマーを再検討していくべきである。前述したようにITS領域については真菌類のものを増幅する結果となったため、今回使用したプライマー(AおよびHC2)は本診断法には適用できない。COX1用のプライマー(239および240)についても適用できる種の範囲が確定されていない。したがって今後は寄生蠕虫類

に特異性が高くかつ適応範囲の広いプライマーの開発が必要である。

寄生蠕虫類の種を同定することにより適切な駆虫薬を選択することが可能となり、宿主動物への負担も軽減できると考えられる。このことは飼育期間の延長や繁殖成績の向上の上でも重要であろう。しかし、絶滅危惧動物を含む野生動物と動物園

動物の寄生虫診断法として本法を確立するためには、その寄生蠕虫相についての情報を収集するとともに、確認された種の COX1 や ITS 領域の塩基配列情報を蓄積していく必要がある。

## 要 約

マラッカ動物園 (マレーシア) より札幌市円山動物園に搬入された一頭のマレーバク (*Tapirus indicus*) の糞便検査を行ったところ、線虫卵と多数の条虫卵を検出した。プラジクアンテル投与後、糞中より条虫片節が採取されたが老熟片節であった。そこで、糞便中の虫卵および駆虫後排泄された片節から DNA を抽出し、ミトコンドリアの cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) 遺伝子および核ゲノム中に存在する Internal transcribed spacer 領域 (ITS) を対象に PCR を行った。このとき、条虫類と線虫類に共通して使用できるプライマーを用いた。その後 PCR 産物の塩基配列を決定し、BLAST によるホモロジー検索を行った。その結果、ITS 領域用プライマーによって得られた、虫卵および片節由来の PCR 産物はすべて真菌類 ITS の配列と類似していた。一方、COX1 用プライマーによって得られた虫卵由来の PCR 産物からは 2 種類の配列が得られ、一つは裸頭条虫科 (Anoplocephalidae) の *Paranoplocephala* 属に、もう一つは鉤虫科 (Ancylostomidae) の *Ancylostoma* 属に近縁の配列であった。このことから本研究において応用された方法は、寄生蠕虫相の情報が少ない野生動物の寄生蠕虫症診断法として有用である可能性が示唆された。

キーワード: マレーバク, 糞便, 蠕虫卵, COX1, ITS

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり手法上の助言、ご指導をいただいた、酪農学園大学獣医学部獣医放射線学教室の遠藤大二助教授、材料としてマレーバクの糞便採取に協力して頂いた札幌市円山動物園の職員の方々に深謝いたします。なお、この研究の一部は、文科省科学研究費基盤研究助成 (14560271)、同省ハイテクリサーチ研究助成 (酪農学園大学大学院) および平成 12・13 年度厚生科学研究助成の補助を受けた。

## 引用文献

1. 日本生態学会編. 2002. 外来種ハンドブック, pp357-361. 地人書館,

東京.

2. 井出百合子, 稲葉智之, 浅川満彦. 2000. 有袋目と貧歯目を中心とするペット用輸入哺乳類の寄生蠕虫類保有状況. *野生動物医誌* 5: 157-162.
3. 木本有子, 浅川満彦. 1998. 北海道江別市内で販売されていたカメ類の寄生線虫類. *野生動物医誌* 3: 75-77.
4. Nakamura S, Asakawa M. 2001. New record of parasitic nematodes from five species of the order Anseriformes in Hokkaido, Japan. *Jpn J Wildl Med* 6: 27-33.
5. 鈴木由香, 浅川満彦. 2000. 札幌市内のペットショップで販売されていたヌマガメ科のカメ類における寄生蠕虫類調査—特に *Serpinema* 属線虫の分布について. *野生動物医誌* 5: 163-170.
6. Zarlenga DS, Chute MB, Gasbarre LC, Boyd PC. 2001. A multiplex PCR Assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 97: 199-209.
7. Blouin MS. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 32: 527-531.
8. Morgan JAT, Blair D. 1998. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology* 116: 289-297.
9. Neefs JM, Van de Peer Y, Hendricks L, De Wachter R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl Acids Res* 18: 2237-2318.
10. Navajas M, Cotton D, Kreiter S, Gutierrez J. 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp Appl Acarol* 15: 211-218.
11. Zarlenga DS, Hoberg EP, Stringfellow F, Lichtenfels JR. 1998. Comparisons of two polymorphic species of *Ostertagia* phylogenetic relationships within the *Ostertagiinae* (Nematoda: Trichostrongyloidea) inferred from ribosomal DNA repeat and mitochondrial DNA sequences. *J Parasitol* 84: 806-812.
12. 中山広樹. 1998. PCR 生成物のサブクローニング. *バイオ実験イラストレイテッド* 3' 本当に増える PCR, pp.60-84. 秀潤社, 東京.
13. Sawada I, Papasarathorn T. 1966. *Paranoplocephala indicata* n.sp. (Cestoda: Anoplocephalidae) from the Malayan Tapir, *Tapirus indicus*. *Jpn J Zool* 15: 125-128.
14. Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB. 1998. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol Biol Evol* 15: 1719-1727.