

終宿主診断法の改善、犬猫における監視と予防・治療体制の検討

主任研究者 神谷正男 酪農大学環境システム学部客員客員教授

研究要旨

本州への多包条虫症の流行地拡大が予想され、以前に感染犬が本州に持ち込まれたことも知られている。自然界ではキツネが多包条虫の主たる終宿主であるが、飼い犬も好適な宿主であり、人との密接な関わりがあることから、北海道外への感染犬の移動を阻止しなければならない。したがって、北海道における犬の感染状況の調査および、感染犬に対する対策法の確立が急務であり、道外移動したペットのフォローアップも重要である。我々は、北海道(一部道外も含む)の飼い犬および飼い猫の検査(糞便内抗原・虫卵検査)を行ってきたが、2004年度においては犬(北海道1048頭、その他59頭)、猫(北海道105頭、その他1頭)を検査(糞便内抗原および虫卵検査)し、犬ではELISA擬陽性および陽性が8頭あり、そのうち犬3頭においては虫卵も検出され、虫卵の遺伝子検査からも3例とも多包条虫感染と確認された。さらに、下痢便中に多包条虫様の片節が発見された犬の症例も1例発見され、この虫卵の遺伝子を検査により多包条虫と確認された。合計4例の感染犬が2004年度に北海道で発見された。なお、本州の犬はすべて陰性であった。

A 目的

現在、わが国におけるエキノコックス(多包条虫)の分布は北海道に限局していると考えられている。北海道においては、1980年代に道東から全道への流行地拡大が確認され、さらに1990年代には主な終宿主であるキツネが感染率が上昇し、現在ではほぼ40%と多包条虫は猖獗を極めている。北海道においては年間発生患者数も増加してきている。今後、本州への分布拡大が予想され、すでに感染犬が本州に持ち込まれたことを我々は報告した。自然界ではキツネが主たる終宿主であるが、犬も好適な宿主であり、人との密接な関わりがあること、北海道外への感染犬の移動を阻止しなければならない。したがって、北海道における犬の感染状況の調査および、感染犬に対する対策法の確立が急務であり、道外移動したペットのフォローアップも重要である。

B 方法

すでに、我々はエキノコックスに特異的なモノクローナル抗体 EmA9 を用いたサンドイッチ ELISA 法により終宿主の糞便内抗原検出法を開発してきた。現在、症例数を重ねることによって、その特異度・信頼性を検討している。本年度も獣医師から依頼された糞便を用いて糞便内抗原の検査と虫卵(テニア科虫卵)検査を実施し、飼い主のアンケート調査と関連させ、テニア科虫卵が発見された場合は、その遺伝子を解析することにより多包条虫であることを確認している。

C 結果

北海道(一部道外も含む)の飼い犬および飼い猫の検査(糞便内抗原・虫卵検査)を行ってきたが、2004年度においては犬(北海道1048頭、その他59頭)、猫(北海道105頭、その他1頭)を検査(糞便内抗原および虫卵検査)し、犬ではELISA擬陽性および陽性が8頭あり、そのうち犬3頭においては虫卵も検出され、遺伝子検査からも3例とも多包条虫であると判断された。これらの犬は主に室内飼いで、散歩には行っているが、同居の猫がしばしば野ネズミを運んでくることが知られている。駆虫およびその後の対処については前述のガイドラインに沿って行っている。猫については1例ELISA陽性で、虫卵は検出されなかったが、駆虫前後でELISAの反応が陰転し、エキノコックス症の疑いが極めて高いことが示された。

昨年6月の網走近辺の感染犬については、下痢便中に多包条虫様の片節が発見されたもので、虫卵の遺伝子を検査することにより、多包条虫と確認された症例である。

あきる野市へのムツゴロウ動物王国の移転に伴い、飼育動物を検査したが、すべて陰性であることを確認後本州に搬入された。北海道外のペットでは全く多包条虫は検出できなかった。

D 考察

飼い主の犬についてのアンケートについては今後

登録し、解析する予定であるが、感染犬の飼育形態については、飼い主と密接な関係にあることが示されている。当初予想された、屋外飼育で、放し飼いの犬だけでなく、現在の一般的な飼育形態である、主に室内飼育で、毎日リードに繋がれて散歩に出る犬でも感染している例が発見され、今後さらに発見されるもの予想される。今後、飼い主の血清診断を数年続けることにより、飼い主への感染源としての重要性も推定できる。

今年度はあきる野市へのムツゴロウ動物王国の移転に伴い、飼育動物を検査したが、不特定多数の人と接する機会のある犬および猫については飼育環境および形態の指導や、定期的な検査の義務づけが必要と思われる。

エキノコックス症の疑いが極めて高い猫が発見されたが、アンケート調査の結果でも猫がしばしばネズミを捕食することが示された。特に郊外や農村部の猫については今後とも注意を要する。

なお、現在の検査体制では週に1回のみでの検査で、検査材料郵送のタイミングが悪いと、検査依頼から結果の報告まで10日要することもあり、休日を挟んだ場合はさらに検査結果の報告が遅れる。出来るだけ早急に結果が判明することが必要である。現在他の節に記載したようにインハウス検査キット(インムノクロマト)を開発しており、現場でキットで検査し、陽性であった症例については、研究室において虫卵(テニア科虫卵)検査と再度の糞便内抗原検査(ELISA)、さらに遺伝子検査を行う検査体制が必要である。

E 結論

北海道(一部道外も含む)の飼い犬および飼い猫の検査(糞便内抗原・虫卵検査)を行ってきたが、2004年度においては犬(約1100頭)、猫(約100頭)を検査し、そのうち犬3頭が多包条虫感染であると確定された。さらに、昨年6月の網走近辺の感染犬については、下痢便中に多包条虫用の片節が発見されたもので、虫卵の遺伝子を検査することにより、多包条虫と確認され。合計4例の感染犬北海道から2004年度に発見された。

F 健康危険情報

昨年10月の獣医師の届け出に義務化以前において2例(5月滝川近辺と6月網走近辺)の多包条虫感染犬について報告した。本年1月以降は抗原陽性かつ虫卵陽性で、この虫卵の遺伝子検査を実施し、この例(岩見沢)について連絡した。さらに、今年の3月(樺戸郡)に抗原陽性、虫卵陽性の犬についても、

虫卵の遺伝子検査を実施し、獣医師に連絡した。

G 研究発表

発表論文(原著)

1. YOKOHATA, Y. and KAMIYA, M. (2004) Analyses of regional environmental factor on the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in foxes in Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Zoo Wildl.*, 9(2) 91-96.
2. NONAKA, N., OKU, Y. and KAMIYA, M. (2003) Control and management of parasitic zoonoses maintained in wildlife: A trial of Hokkaido University against Echinococcosis. Technology Innovation and its Relations to Humanities and Social Sciences. M. Nakamura and K.-J. Lee. Sapporo, Hokkaido University Press: 93-100.
3. 野中成晃、江越健太郎、奥祐三郎、神谷正男 (2003) テニア科条虫類の遺伝子同定法開発の試み 獣医寄生虫学会誌 2(1) 37
4. 奥祐三郎、巖城隆、野中成晃、金井祐太、水野文子、神谷正男 (2003) 北海道におけるエキノコックス感染源対策の試み 獣医寄生虫学会誌 2(1) 38
5. 井上貴史、大出武、金井祐太、巖城隆、水野文子、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 (2003) 都市周辺におけるエキノコックス感染源対策-小樽における野生キツネへの集団駆虫の試み- 獣医寄生虫学会誌 2(1) 40
6. 奥祐三郎、野中成晃、八木欣平、神谷正男 (2004) 犬のエキノコックス症(シンポジウム) 獣医寄生虫学会誌 3(1) 17-19
7. 奥祐三郎、劉俊佑、野中成晃、神谷正男 (2004) 札幌市北東部における多包条虫媒介動物調査 獣医寄生虫学会誌 3(1) 30
8. 加藤有香、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 (2004) テニア科条虫卵の同定法、特に虫卵DNAの抽出とCOI遺伝子の利用 獣医寄生虫学会誌 3(2) 31
9. 今野兼次郎、畑英一、野中成晃、奥祐三郎、伊藤琢也、酒井健夫、神谷正男 (2004) 関東地方におけるイヌおよびネコの寄生虫疫学調査 獣医寄生虫学会誌 3(2) 47
10. CHANG, S. L., NONAKA, N., KAMIYA, M., KANAI, Y., OOI, H. K., CHUNG, W. C., and OKU, Y. (2005) Development of *Taenia saginata asiatica* metacestodes in SCID mice and its infectivity in hamsters and gerbils used as alternative definitive hosts. *Parasitology Research*, (in press)

11. KATO, N., NONAKA, N., OKU, Y., and KAMIYA, M. (2005) Modified cellular immune responses in dogs infected with *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*, (in press)
12. KATO, N., NONAKA, N., OKU, Y., and KAMIYA, M. (2005) Immune responses to oral infection with *Echinococcus multilocularis* protoscoleces in gerbils: modified lymphocyte responses due to the parasite antigen. *Parasitology Research* (in press)
13. CASARAVILLA, C., MALGOR, R., ROSSI, A., SAKAI, H., NONAKA, N., KAMIYA, M. and CARMONA, C. (2005) Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection *Parasitol. Int.*, 54, 43-49
14. KAMIYA, M., OOI, H. K., and OKU, Y. (2005) A new era after the Japan-Taiwan Symposium on "Infectious Diseases Animals and Quarantine. Emerging Infectious Diseases (EID online) (in press)

論文発表 (原著以外)

1. KAMIYA, M. (2003) Echinococcosis/ Hydatidosis. Annual report of OIE Reference Laboratories and Collaborating Centres. 152-154
2. KAMIYA, M., NONAKA, N., GANZORIG, S. and OKU, Y. (2004) "Effective counter-measures against alveolar echinococcosis in red fox population of Hokkaido, Japan." Echinococcosis In Central Asia: Problems And Solutions. Ed. Torgerson & Shaikenov, Dauri, Almaty, 273-282
3. 神谷正男 (2004) "エキノコックス症 (単包条虫症, 多包条虫症)" 人獣共通感染症, 401-404, 医薬ジャーナル社, 大阪
4. 神谷正男 (2004) エキノコックス症 感染症, 81-84, 朝倉書店, 東京.
5. 神谷正男 (2004) 北海道に潜むエキノコックス症がペットの移動で本州へ南下!?. 公衆衛生情報, 34(10), 46-49
6. 神谷正男 (2004) エキノコックス症の危機管理へ向けて -現状と対策-. 日獣会誌, 57(10), 605-611
7. 神谷正男 (2004) エキノコックス症の流行 -感

- 染源対策は急務, 公衆衛生, 68(11), 874-879
8. 神谷正男 (2004) 自然界からの侵入 エキノコックス. *Pharma Medica*, 22(11), 17-20.
9. 神谷正男 (2004) エキノコックス症 共通感染症ハンドブック 日本獣医師会, 98-99
10. 神谷正男 (2005) エキノコックス症 感染症の診断・治療ガイドライン 2004 日本医師会 108-111
11. 神谷正男 (2005) エキノコックス症 Echinococcosis (4類-全数)/(包虫症) Hydatidosis 感染症予防必携、第2版, 59-61, (財)日本公衆衛生協会, 東京
12. 奥祐三郎・神谷正男(2004)寄生虫性ズーノーシス 獣医公衆衛生学 第3版 高島郁夫・熊谷進 文永堂出版 141-159

学会・講演会発表

1. 野中成晃、千種雄一、松本淳、森嶋康之、松尾加代子、奥祐三郎、神谷正男 豆状条虫の代替宿主の検討と多包条虫終宿主診断抗体主mA9の交差反応について 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
2. 巖城隆、井上貴史、金井祐太、張秀玲、小林文夫、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 北海道小清水町における多包症感染源対策：駆虫薬入りベイト散布と中止後の経過 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
3. CHANG, S.L. NONAKA, N., OKU, Y., OOI, H.K. and KAMIYA, M. Preliminary study of alternative host model for *Taenia soginata asiatica* 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
4. 井上貴史、金井祐太、巖城 隆、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 駆虫薬入りベイト散布による都市周辺部でのエキノコックス症感染源対策の試み 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
5. 小林文夫、井上貴史、金井祐太、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 エキノコックス虫卵がキツネの被毛に付着している可能性について 73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
6. 加藤有香、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 テニア科条虫卵の同定法、特に虫卵DNAの抽出とCOI遺伝子の利用 第137回獣医学会、日本大学、2004.04.02-04
7. 奥祐三郎、劉俊佑、野中成晃、神谷正男 札幌市北東部における多包条虫媒介動物調査 第137回獣医学会、日本大学、2004.04.02-04

8. 奥祐三郎、野中成晃、八木欣平、神谷正男 犬のエキノコックス症 (シンポジウム) 第137回獣医学
会、日本大学、2004.04.02-04

9. 神谷正男 エキノコックス症・・・その危機管理
へ向けて 岐阜大学 21 世紀 COE プログラム・野
生動物の生態と病態からみた環境評価 岐阜大学、
2004.06.11-12

10. MATSUMOTO, J., KAMIYA, M., and
GOTTSTEIN, B. Search for molecular
viability/activity markers in *Echinococcus*
multilocularis metacestodes under different
maintenance conditions. Jun 21st International
Congress of Hydatidology, ナイロビ (ケニア)
2004年8月

11. KAMIYA, M., NONAKA, M., GANZORIG, S.,
and OKU, Y. Effective countermeasures
against alveolar echinococcosis in red fox
population of Hokkaido Japan. Echinococcosis
understanding of the epidemiology and
transmission dynamics and recommendations
for surveillance and control in Central and
Northern Asia キルギスタン (シオルパン-アタ)
2004. 09.08-09

12. 神谷正男 生物災害に備える社会技術: リスク・
コミュニケーションの実践 エキノコックス感染源情
報を例にして 第 138 回日本獣医学会学術集会、
北海道大学、2004.09.10-12

13. 金井裕太、間野勉、野中成晃、奥祐三郎、神谷
正男 旋毛虫 *Trichinella* sp. の北海道各地の野生
動物における流行 第138回日本獣医学会学術集会
2004.09.10-12 北海道大学

14. 今野兼次郎、畑英一、野中成晃、奥祐三郎、伊
藤琢也、酒井健夫、神谷正男 関東地方におけるイ
ヌおよびネコの寄生虫疫学調査 第138回日本獣医
学会学術集会 2004.09.10-12 北海道大学

15. 萩野和正、堀尾政博、金澤保、小林文夫、巖城
隆、奥祐三郎、神谷正男、八木欣平、林利彦、二瓶
直子、小林睦生 ハエ類がヒトの多包虫感染に関与す
る可能性の検討 -野外ハエ類の多包虫虫卵摂取に
ついて- 2004年度 衛生動物学会

16. 神谷正男、小林文夫、巖城 隆、野中成晃、奥
祐三郎 エキノコックス症におけるリスク・コミュ
ニケーションの実践 第 51 回日本寄生虫学会・日
本衛生動物学会北日本支部合同大会、秋田県総合保
健センター 2004. 09.17

17. 巖城隆、浜崎今日子、野中成晃、奥祐三郎、塚
田英晴、神谷正男 北海道のエキノコックス症 (多
包条虫症) 感染源対策: 野生ギツネに対する駆虫薬

入り餌 (ベイト) 散布 第10回日本野生動物医学会
大会 2004.09.16-19 東京大学弥生講堂

18. 野中成晃、奥祐三郎、巖城隆、小林文夫、神谷
正男 ペットのエキノコックス検査: 信頼性の評価
と陽性犬の事例が示すもの 第51回日本寄生虫学
会・日本衛生動物学会北日本支部、秋田県総合保健
センター 2004.09.17

19. 金井裕太、間野勉、野中成晃、奥祐三郎、神谷
正男 旋毛虫 *Trichinella* sp. の北海道各地の野生動
物における流行調査 第51回日本寄生虫学会・日本
衛生動物学会北日本支部、秋田県総合保健センター
2004.09.17

20. 神谷正男 台湾との合同シンポジウム「動物の
感染症と検疫」 札幌コンベンションセンター、
2004.10.20-21

21. 神谷正男 合同シンポジウム開催にあたって・
この世界が変わる時です: When the world
changed 台湾との合同シンポジウム「動物の感染
症と検疫」 札幌コンベンションセンター、
2004.10.20-21

22. 加藤尚子、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 イ
ヌにおけるエキノコックス感染初期の免疫応答に
ついて 第64回日本寄生虫学会東日本支部大会第3
回分子寄生虫・マラリア研究会フォーラム、東京大
学、2004.10.29-31

23. 野中成晃、奥祐三郎、巖城隆、小林文夫、神谷
正男 飼い犬のエキノコックス感染状況調査: 診断
法の適合性と陽性犬の事例が示すもの 第4回人と
動物の共通感染症研究会、東京大学本郷キャンパス
安田講堂、2004.11.06

24. 神谷正男、佐藤直樹、奥祐三郎 北海道におけ
る人のエキノコックス感染症の現状と獣医師の役
割 北海道小動物獣医師会・北海道獣医師会主催学
術セミナー 2005.02.27 札幌市 教育文化会館

25. KAMIYA, M. Contribution from the OIE
Reference Laboratory for echinococcosis in
Japan. The 72nd Annual Convention &
Scientific Conference. フィリピン (ダバオ)
2005.02.16-18

エキノコックスの感染源対策

(ベイト散布による感染源対策、Multiplex-PCRによる糞由来動物種判定法の開発、多包条虫に対する終宿主の免疫応答、多包虫の増殖と14-3-3、本州におけるペットと豚のエキノコックス調査、エキノコックス伝播の数理モデルの開発、その他)

研究分担者	奥祐三郎	北海道大学大学院獣医学研究科助教授
研究協力者	神谷晴夫	弘前大学医学部教授
研究協力者	石川洋文	岡山大学環境理工学部教授
研究協力者	今野兼次郎	群馬大学医学部助手
研究協力者	阿部仁一郎	大阪市立環境科学研究所研究員
研究協力者	野中成晃	北海道大学大学院獣医学研究科講師

研究の要旨

すでに我々は、ほぼ平坦な農村地帯(小清水)におけるベイト散布法についてはほぼ確立してきたが、今回は山沿いおよび山間部の道路でのベイト散布を試みた。これによりキツネの多包条虫感染率の低下が認められたが、さらに効果をあげるためには、ベイト散布の継続およびベイトの散布法についてさらに検討が必要と考えられた。キツネにおける多包条虫流行状況を把握するために、我々は野外採取した糞便を用いている。この糞便由来動物種を確認するために、凍結糞便表面の洗浄液のからの DNA 抽出および今回設計したプライマーセットを用いた Multiplex-PCR により、野外応用が十分可能な手法を確立した。ベイト散布以外にも将来的な終宿主対策として、ワクチン製造が重要と考えられるが、この基礎情報のため終宿主の液性および細胞性免疫応答を調べ、これらが誘導されることを確認し、一方、多包条虫は糖鎖を多く含んだ物質を排泄・分泌することで、局所の免疫応答を抑制することが示唆された。強い病原性を発揮する多包虫(幼虫)の増殖機構を解明するために、細胞増殖に関わると考えられる 14-3-3 の遺伝子発現レベルを解析し、これが虫体の胚細胞の活発な増殖と関連することが示唆された。本州におけるエキノコックスの侵入を調べるために、東北、関東および関西地方のペットおよび捕獲犬を調べたがエキノコックスは発見されなかった。また、東北地方において食肉検査所で調べられた豚からも検出されなかった。今回は従前のエキノコックス伝播数理モデルを深度化し、主要終宿主であるキツネの Individual model 化を計画し、全体計画の構築、捕食感染エゾヤチネズミよりの原頭節分布の部分設計等、モデル化に必要とされる準備を行った。

1.ベイト散布による感染源対策

特に、市街地辺縁部山沿いにおける駆虫薬入りベイト散布による多包条虫症感染源対策の試み

A 目的

近年北海道ではキツネの多包条虫感染率が 40%にも達し、これらの感染源動物に対する対策が必要となっている。すでに平坦な農村地帯におけるベイト散布による多包条虫感染源対策についてはほぼ確立してきたが、北海道では市街地辺縁部における多包条虫症感染源対策も急務となっており、山沿いにおける散布法を確立する必要がある。本研究では山沿いにおける駆虫薬入りベイト散布による多包条虫症感染源対策を試みた。

B 方法

小樽市の市街地辺縁部 (110 km²) の山沿いおよび山間部において、多包条虫症の感染源である野生キツネを対象とした駆虫薬 (ブラジカンテル) 入りベイト散布を 1 km²あたり約 30 個の密度で道路沿いに行い、多包条虫症のコントロールを試みた。キツネによるベイトの摂取確認のためテトラサイクリンをバイオマーカーとしてベイトに添加した。2001~2002 年は試験的に 5~7 月に 2 回の散布を行い、ベイト摂取群での多包条虫感染の減少を確認した。さらに効果を高めるために、2003・2004 年は積雪のない 5~11 月に毎月 1 回計 7 回のベイト散布を行った。2003 年には 6 月にのみテトラサイクリン入りのベイトを散布し、1 回散布によるキツネのベイト摂取率を調査した。2004 年度には

2003 年度に採取した動物を検査し、ベイト散布も実施した。

C 結果

キツネによるベイト摂取を犬歯のテトラサイクリン沈着により調べたところ、73 頭中 33 頭 (45%) のキツネでベイト摂取が確認された。6～9月に捕獲されたキツネの結腸便の糞便内抗原陽性率はベイト散布前の 1999・2000 年は 50% 程度であったが、ベイト散布を実施した 2001～2003 年は 20%前後を推移し、このようにベイト散布により山沿いにおいてもキツネの多包条虫感染率が低く抑えられていることが示唆された。2004 年の検体は現在処理中であるが、2003 年の頻回ベイト散布による累積効果によるさらなる感染率減少が期待される。また、ベイト摂取(犬歯のテトラサイクリン沈着)と腸管のエキノコックスの検査結果から、ベイト摂取による駆虫効果が確認された。

D 考察

山沿いおよび山間部の道路でのベイト散布では、散布すべきポイントが把握困難であったため、道路沿いにほぼ一定の間隔で散布しているが、ベイトの散布の持続および頻回散布により、ベイトの摂取率の向上が見られ、ベイト散布によるキツネの感染率の低下は認められるものと考えられる。しかし、現在までの結果では、小清水(やや平坦な畑作地)での散布効果ほどは顕著ではなく、今後さらに検討が必要である。ベイト摂取率についてはベイト散布を重ねる毎に上昇がみられ、ベイト散布を継続することによりその地域のキツネのベイト摂取率が上昇することが期待される。

E 結論

山沿いおよび山間部の道路でのベイト散布によりキツネの感染率の低下が認められた。さらに感染源対策としての効果を高めるためには、ベイト散布の継続および頻回散布などの検討が必要である。

2. Multiplex-PCR による糞由来動物種判定法の開発

A 目的

キツネの多包条虫感染状況を調べるために、野外の糞便を採取し、その形態からキツネ由来の糞便と判断しているが、その糞便がキツネ由来であること

の確認が必要である。糞便由来動物種を同定するために、Multiplex-PCR による鑑別法の開発を試みた。

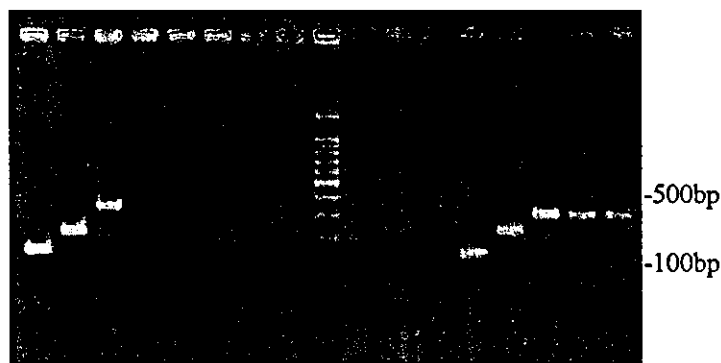
B 方法

まず、糞便からの DNA 抽出法を検討し、その後各種動物種の同定のために、Multiplex PCR の特異的プライマーを設計し、既知動物種の方法を用いて同定を確認した。さらに、糞便を屋外に放置し、長期間の雨ざらし状態でも排泄動物種の同定が可能であるか確かめた。最後に、野外採取された多数の糞便を用いて、実用的であるかどうか確認した。

C 結果

まず、糞便を混和後 DNA 抽出を試み PCR を実施したところ、PCR 阻害物質の混入が問題となった。そこで、糞便表面の大腸粘膜細胞を採取するために、糞便を凍結し、その糞便表面の洗浄液のみを利用した。この方法により、糞の PCR 阻害物質の DNA 抽出物への混入を抑え、より効率の高い PCR を行うことができた。

次に、Multiplex-PCR の増幅標的とする部位としてミトコンドリア DNA の D-loop 領域を選び、プライマーは、リバーズには哺乳動物共通部分を使用し、フォワードにはアカギツネ、タヌキ、イヌ、ネコ、アライグマ、イタチ類にそれぞれ特異的なものを使用した。6 種類の特異プライマーは増幅産物の大きさが約 160bp、240bp、300-330bp の三段階の組合せが二組になるよう設計し、鑑別可能とした。



1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16
各食肉目の DNA をテンプレートとし、Mix1(1-8)、Mix2(9-16)のプライマーを用い、Hot StarTaq Master Mix Kit により行った PCR で得られた産物のアガロース電気泳動像
以下に各レーンの説明を示す。
1,9:キツネ、2,10:アライグマ、3,11:犬、4,12:猫、5,13:タヌキ、
6,14:キテン、7,15:クロテン、8,16:ミンク、M:マーカー(100bpごと)

さらに、夏期に 2 ヶ月間屋外に放置された糞便で

も排泄動物の同定が可能であることが確認された。2004年5月～8月に小樽市および余市町で採集した147個の糞便を調べ、140個(95%)の動物種が特定された。また、見かけ上キツネとして採集した糞便のうち87%がキツネのものとDNA検査結果で判定された。

D 考察

糞便に含まれるPCR阻害物質の混入を最小限にとどめ、かつ糞便の宿主細胞由来のDNAを効果的に抽出することが重要と考えられた。今回の方法ではかなり長期間雨ざらし状態であった糞便でも、排泄動物の同定が可能であり、野外採取された多数の糞便を用いた結果からも、実用的なレベルに達しているものと思われる。

E 結論

糞便由来動物種の同定のために、凍結糞便表面の洗浄液からのDNA抽出および、今回用いたプライマーセットを用いたMultiplex-PCRを検討し、野外応用にも十分実用的な手法を確立した。

3. 多包条虫に対する終宿主の免疫応答

A 目的

人への多包虫感染機会を減少させるために、キツネの捕獲、駆虫薬入りのベイトの散布などいくつかの試みがなされてきたが、終宿主に対するワクチン開発も重要な課題である。しかし、犬を用いた実験は使用できる動物数が限られるため、論文もわずかである。今回は、本来の終宿主である犬(2頭)と代替終宿主モデルであるスナネズミ(多数)を用いて、多包条虫の感染に対する免疫応答を観察し、腸粘膜における多包条虫の定着・生存に重要と考えられる寄生虫成分の免疫系への影響について調べ、また、糖鎖成分についても解析した。

B 方法

まず、感染後の免疫応答を明らかにするために、2頭の犬を用いて多包条虫感染後の液性および細胞性免疫応答を経時的に観察した。その後代替終宿主としてスナネズミ(多数)に原頭節を経口投与して感染に対する免疫応答を観察した。さらに多包条虫抗原による免疫応答の抑制効果を調べるために、リンパ系細胞に原頭節の虫体抗原および

排泄・分泌抗原、成虫の虫体抗原および排泄・分泌抗原をマイトジェン(ConAおよびLPS)と共刺激し、増殖応答の抑制を観察した。さらに多包条虫抗原の糖鎖成分について検討した。

C 結果

犬における感染

感染後、寄生虫に対する抗体産生が誘導され(血清IgG1は感染後10日目、IgG2は感染後7日目から)、特に原頭節の排泄・分泌抗原に対する抗体応答が顕著であった。ConAに対する末梢血単核球の増殖応答は感染後7日目に低下し、一過性の免疫抑制が示唆された。感染後21日目に脾細胞、腸間膜リンパ節およびパイエル板細胞の細胞増殖応答を調べたところ、1頭の犬のパイエル板細胞において、原頭節の排泄・分泌抗原に対する増殖応答が観察された。しかし、原頭節抗原の添加によってConAに対する細胞増殖応答が全体的に抑制され、特に原頭節の排泄・分泌抗原で抑制が顕著であった。

スナネズミにおける感染

プレドニゾン未処置動物では感染後3日以内にほとんどの虫体が体外に排出され、原頭節に対する腸管IgA抗体は感染後7日目より上昇が認められ、14日目の検査では血清IgG抗体が検出された。一方、プレドニゾン処置動物では抗体応答は認められず、虫体が長期間残存した。プレドニゾン未処置のスナネズミに原頭節を経口投与した後、原頭節抗原に対する脾細胞、腸間膜リンパ節およびパイエル板細胞の増殖応答を調べたところ、パイエル板細胞で顕著な増殖応答が観察された。原頭節虫体抗原による免疫応答の抑制効果をマイトジェン(ConAおよびLPS)に対するリンパ球増殖応答の阻害程度により調べたところ、スナネズミにおいても原頭節抗原によるリンパ球増殖応答の抑制が認められた。

多包条虫抗原の宿主免疫応答の抑制効果

ほとんどの多包条虫抗原が脾細胞のConA応答を用量依存的に抑制したが、LPS応答の抑制は顕著でなく、ConA応答の抑制効果は原頭節排泄・分泌抗原において顕著であった。

多包条虫抗原の成分解析

糖染色によって多包条虫抗原は糖鎖成分を含有していることが明らかとなった。特に原頭節排泄・分泌抗原の糖/蛋白比が高い値を示した。原

頭節および成虫抗原(虫体抗原および排泄・分泌抗原を含む)の多包条虫感染犬の血清を用いたイムノブロットングによる解析から、多包条虫に対する抗体の多くが糖に対するものであることが示唆された。多包条虫抗原の糖鎖成分を調べるためにレクチンブロットを行ったところ、すべての多包条虫抗原において、N型およびO型糖鎖の両方を混合していた。また、多包条虫の成虫がO型糖鎖を含有・分泌していることを初めて明らかにした。

D 考察

まず、腸粘膜における虫体の免疫原としての原頭節の重要性が示唆された。原頭節から排泄・分泌される物質に対する腸管局所の液性および細胞性免疫応答が示唆された。しかし、原頭節成分による局所の免疫応答の抑制が示唆され、これは虫体の小腸における定着を促進するものと推測された。また、この原頭節排泄・分泌抗原の抑制効果は感染前・感染後のリンパ球の両方において観察されたことから、原頭節排泄・分泌抗原は感染初期だけでなく、再感染時においても虫体の定着・生存を促進する役割を果たすことが推察された。多包条虫抗原はB細胞の機能より、T細胞またはマクロファージの機能を顕著に抑制することが示唆された。多包条虫が排泄・分泌する物質に含まれる糖鎖、特にムチン型糖鎖およびシアル酸が宿主-寄生虫相互関係において重要な役割を果たしている可能性がある。

E 結論

犬およびスナネズミの感染実験から終宿主の腸粘膜に寄生する多包条虫に対して液性および細胞性免疫応答が誘導されるが、多包条虫が糖鎖を多く含んだ物質を排泄・分泌することで、局所の免疫応答を抑制することが示唆され、この糖鎖を多く含む排泄・分泌物が寄生虫の腸における定着・生存に関与するものと推察された。

4. 多包虫の増殖と14-3-3

A 目的

多包虫(多包条虫の幼虫)は人を含む中間宿主体内で無性的に増殖し、無数の小嚢胞を形成しながら組織内に浸潤し、他臓器への転移し、患者を死に至らしめる。したがって、多包虫の発育・増殖活性の評価が重要である。一般に細胞増殖に関与することが知られている14-3-3の遺伝子発現レベルにより、

多包虫の発育・増殖活性を評価することを目的とした。

B 方法

多包虫が産生する2種類のタンパク14-3-3および11/3-10(免疫原として重要)の多包虫由来タンパクの遺伝子発現レベルをリアルタイムPCR法により調べ、感染マウスにおける多包虫発育と、この2種類のタンパクを経時的に定量的に測定し、さらに、多包虫体内における14-3-3の局在を調べた。まず、多包虫をヌードマウスおよび野生型対照マウス(BALB/c系)に同時に接種し、その後の虫体の発育を観察した。

C 結果

感染後2か月には、ヌードマウスでのみ著しい虫体重量の増加が認められた。この感染後2か月目のヌードマウス由来虫体では、胚細胞層の増殖が顕著であり、さらに胚細胞層から分化・派生した繁殖細胞および原頭節の形成が認められた。ヌードマウス由来虫体における14-3-3発現が顕著に上昇したのに対して、野生型マウス由来虫体では感染後1か月の発現レベルにとどまった。一方、11/3-10遺伝子発現については、感染後1か月の虫体では、ヌードマウス由来虫体と野生型マウス由来虫体との間で、大きな差がみられなかった。感染後2か月では、ヌードマウス由来虫体における11/3-10発現は感染後1か月とほぼ同レベルであったが、野生型マウス由来虫体では、11/3-10の発現レベルが低下していた。さらに、多包虫体内における14-3-3の局在を、免疫組織化学法により調べた。その結果、同タンパクは多包虫のクチクラ層には検出されず、胚細胞層に発現がみられた。

D 考察

多包虫の顕著な増殖が認められたヌードマウスにおいては14-3-3発現が顕著に上昇したこと、多包虫体内における14-3-3が増殖する胚細胞層の局在したことから、14-3-3が虫体の胚細胞の活発な増殖に関連すると考えられた。

E 結論

多包虫が産生する14-3-3および11/3-10は、虫体の増殖活性に関連して異なる発現パターンを示すことが明らかとなった。特に14-3-3は、虫体の胚細胞の活発な増殖に関連することが示唆された。

5. 本州におけるペットと豚のエキノコッ

クス調査

5-1.本州の動物病院に来院したペットおよび捕獲犬の多包条虫調査

A 目的

エキノコックスの本州への流行地拡大が危惧されている。流行状況を明らかにするために、本州の動物病院に来院したペットおよび捕獲犬の多包条虫調査を行った。

B 方法

東北地方および関東地方の動物病院に協力を仰ぎ、飼い犬および飼い猫の糞便を集めた。大阪では大阪市内で捕獲された放浪犬および不要犬の糞便を集めた。糞便の虫卵検査については比重 1.27 のシヨ糖を用いて遠心浮遊法で実施し、さらに、エキノコックス感染に関して EmA9 を用いたサンドイッチ ELISA 法で糞便内抗原検査を実施し、さらに、ペットについては飼い主へのアンケート調査も併せて実施した。

C 結果

東北地方の動物病院 19ヶ所でイヌ、ネコ併せて 457 検体、関東地方では同じく 19ヶ所で 385 検体を集めた。これらの東北地方のイヌでは 314 検体中 26 検体、8.3%で、ネコでは 142 検体中 20 検体、14.1%でなんらかの消化管内寄生虫が確認された。また、関東地方のイヌでも 279 検体中 24 検体、8.6%で、ネコでは 96 検体中 5 検体、5.2%からなんらかの消化管内寄生虫が確認された。多包条虫を含むテニア科条虫卵は検出されず、ELISA 法によるエキノコックスの糞便内抗原検出においては、全ての検体が陰性であった。

東北地方の犬から検出された寄生虫

感染寄生虫種	陽性数	陽性率 (%)
イヌ鞭虫	13	4.1
イヌ回虫	8	2.5
マンソン裂頭条虫	4	1.3
イヌ鉤虫	2	0.6

東北地方の猫から検出された寄生虫

感染寄生虫種	陽性数	陽性率 (%)
ネコ回虫	13	9.2
マンソン裂頭条虫	7	4.9
<i>Isospora</i> spp.	3	2.1

関東地方の犬から検出された寄生虫

感染寄生虫種	陽性数	陽性率 (%)
イヌ鞭虫	15	5.4
<i>Isospora</i> spp.	4	1.4
イヌ回虫	3	1.1
イヌ鉤虫	3	1.1

関東地方の猫から検出された寄生虫

感染寄生虫種	陽性数	陽性率 (%)
ネコ回虫	5	5.2

さらに、大阪市内で捕獲された放浪犬 81 頭と飼育放棄犬 19 頭の 100 頭について、多包条虫の感染の有無を糞便の虫卵検査とサンドイッチ ELISA による抗原検査 (100 頭中 84 頭について実施) にて調査したところ、全頭において多包条虫を含むテニア科条虫卵は見出されず、また、多包条虫の糞便内抗原も 84 頭から検出されなかった。

大阪の放浪犬および飼育犬 (不要犬) の検査結果

寄生種	放浪犬 81	飼育犬 19	感染率 (%)
テニア科条虫	0	0	0 (0)
多包条虫**	0 (66)	0 (18)	0 (0)
犬回虫	3	1	4 (4)
犬鞭虫	6	0	6 (6)
犬鉤虫	5	0	5 (5)
<i>Isospora</i>	5	0	5 (5) †
<i>Giardia</i>	3	0	3 (3) ‡
<i>Cryptosporidium</i>	0	0	0 (0)

*検査総個体数 (100 個体) あたりの感染率

** 糞便内抗原の検出による () 内の 66 と 18 は検査に供した各犬の糞便数

† 5 株全て *Isospora ohioensis*

‡ 2 株は Assemblage C、1 株は Assemblage A (A-I)

D 考察および結論

今回の調査では全くエキノコックスは検出されなかったが、今後の監視が是非必要である。

5-2.本州の豚の多包虫検査

A 目的 豚は全頭食肉処理場で獣医師により検査されていることから、エキノコックス症の監視のためには有用な指標となりうる。現在豚の多包虫診断は肉眼的な病変を検出し、その材料を病理組織学的にクチクラ層を検出することにより行われている

が、クチクラ層の検出が困難なことがある。より確実な検査法が望まれる。

B 方法、結果、考察、結論

弘前の食肉衛生検査所との共同研究で多包虫のPCRによる検査法の確立し、今後の疫学調査に利用できるようにした。豚の肝臓の病変からエキノコックスの疑いのため、本年度に約20件の検査依頼があったが、陽性例は検出されなかった。

6.エキノコックス伝播の数理モデルの開発

A 目的

北海道におけるエキノコックス流行は、主に終宿主であるキツネと中間宿主であるエゾヤチネズミに関わる感染環を通して維持されている。今回は従前のエキノコックス伝播数理モデルを深度化を試みた。

B 方法

ストカスティック個体基盤モデル、キツネ個体エキノコックスモデルおよび感染強度について検討した。

C 結果

キツネ個体群に対するエキノコックスのストカスティックモデルの全体設計を行い、従前に開発した主要中間宿主のネズミ生態モデルとの結合を図った。さらに感染した野ネズミの原頭節分布の部分設計した。

D 考察

環境中の虫卵量と野ネズミ感染との関係は非線形なものと考えられる。これに関するフィールドデータおよび実験データは存在しないが、終宿主から中間宿主への感染伝播にかかる重要部分であり。今後適切なモデルを構築しなければならない。本モデルの完成後、ベイト散布などのコントロール効果の組み込みを行う必要がある。また、野外ベイト散布の結果との関連について検討することが課題である。

E 結論

主要終宿主であるキツネの Individual model 化を計画し、全体計画の構築、捕食感染エゾヤチネズミの原頭節分布の部分設計等、モデル化に必要なとされる準備を行った。

7.その他

人獣共通寄生虫である重要なトリヒナについて

は、すでに北海道の野生動物間で流行していることを示してきたが、本年度はこれらの分類に関する遺伝的な解析を行い、北海道にはT9と *Trichinella nativa* の両者が分布することを明らかにした。なお、本州にはT9のみが分布していることが知られている。今後これらの公衆衛生上の重要性を調べ、さらに大規模な調査が必要である。

さらに、わが国のキツネで普通に見られる吸虫 *Alaria* sp. は人獣共通寄生虫の一つと考えられ、北米において人の様々な臓器からメソセルカリアが検出されている。わが国ではその生活環は知られていなかった。今年度、我々は北海道のカエル類から *Alaria* 属のメソセルカリアを検出し、その遺伝子解析から *Alaria alata* の可能性が高く、感染実験によりスナネズミが待機宿主となることを示した。

最後に、2004年10月からのエキノコックス感染犬の届け出に関連して、「犬のエキノコックス症対策ガイドライン2004」の作成に参加した。

研究発表

論文発表(原著)

1. NONAKA, N., OKU, Y. and KAMIYA, M. (2003). Control and management of parasitic zoonoses maintained in wildlife : A trial of Hokkaido University against Echinococcosis. Technology Innovation and its Relations to Humanities and Social Sciences. M. Nakamura and K.-J. Lee. Sapporo, Hokkaido University Press: 93-100.
2. 野中成晃、江越健太郎、奥祐三郎、神谷正男 (2003) テニア科条虫類の遺伝子同定法開発の試み 獣医寄生虫学会誌 2(1) 37
3. 奥祐三郎、巖城隆、野中成晃、金井祐太、水野文子、神谷正男 (2003) 北海道におけるエキノコックス感染源対策の試み 獣医寄生虫学会誌 2(1) 38
4. 井上貴史、大出武、金井祐太、巖城隆、水野文子、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 (2003) 都市周辺におけるエキノコックス感染源対策-小樽における野生キツネへの集団駆虫の試み- 獣医寄生虫学会誌 2(1) 40
5. 奥祐三郎、野中成晃、八木欣平、神谷正男 (2004) 犬のエキノコックス症 (シンポジウム) 獣医寄生虫学会誌 3(1) 17-19
6. 奥祐三郎、劉俊佑、野中成晃、神谷正男 (2004) 札幌市北東部における多包条虫媒介動物調査 獣医寄生虫学会誌 3(1) 30
7. 加藤有香、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男

- (2004) テニア科条虫卵の同定法、特に虫卵DNAの抽出とCOI遺伝子の利用 獣医寄生虫学会誌 3(2) 31
8. 今野兼次郎、畑英一、野中成晃、奥祐三郎、伊藤琢也、酒井健夫、神谷正男 (2004) 関東地方におけるイヌおよびネコの寄生虫疫学調査 獣医寄生虫学会誌 3(2) 47
9. OKU, Y., MALGOR, R., BENAVIDEZ, U., CARMONA, C. and H.KAMIYA. (2004) Control program against hydatidosis and the decreased prevalence in Uruguay. International Collaboration in Community Health, MITA and SATOH, Elsevier, 98-104.
10. CHANG, S. L., N. NONAKA, N., KAMIYA, M., KANAI, Y., OOI, H. K., CHUNG, W. C., and OKU, Y. (2005) Development of *Taenia saginata asiatica* metacestodes in SCID mice and its infectivity in hamsters and gerbils used as alternative definitive hosts. *Parasitology Research*, (in press)
11. KATO, N., NONAKA, N., OKU, Y., and KAMIYA, M. (2005) Modified cellular immune responses in dogs infected with *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*, (in press)
12. KATO, N., NONAKA, N., OKU, Y., and KAMIYA, M. (2005) Immune responses to oral infection with *Echinococcus multilocularis* protoscoleces in gerbils: modified lymphocyte responses due to the parasite antigen. *Parasitology Research* (in press)
13. ISHIKAWA, H. (2005) Evolving mathematical models of infectious diseases with route of transmission, special edition from international symposium on numerical simulation of environmental problems. J. Fac. Environmental Sci., & Tech. Okayama U.
14. MATSUO K. and KAMIYA H. (2005) Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *J. Parasitol.* 90(1), 208-209.
15. CHISTY, M.M., NARGIS, M., INABA, T., ISHITA, K., OSANAI, A. and KAMIYA, H. (2004) Transmission electron microscopy of *Schistosoma mansoni* cercariae treated with hinokitiol (beta-thujaplicin), a compound for potential skin application against cercarial penetration. *Tohoku J. Exp. Med.*, 202:63-67.
16. CHISTY, M.M., NARGIS, M., SATO, H., INABA, T., TAKAHASHI, G. and KAMIYA, H. (2004) *Schistosoma mansoni*: Kinetics of glomerulonephritis in mongolian gerbils and its correlation with intensity and duration of infection. *Parasite*, 9. 143-151
17. 石田邦夫、八木澤誠、神谷晴夫. (2004) 筋肉トリヒナ切片を用いた旋毛虫症の免疫診断 弘前医学, 55 : 43-48.
18. 野中成晃 (2004) 北海道に蔓延する人獣共通寄生虫・エキノкокスの終宿主確定診断の確立とエキノкокス症感染源対策への応用 上原記念生命科学財団研究報告集 18,78-80
19. 須貝道博、木村憲央、石戸圭之輔、棟方博文、袴田健一、神谷晴夫、佐藤宏 (2005) 肺病巣を伴った小児肝多包虫症の一例 小児科 (印刷中)
20. CASARAVILLA, C., MALGOR, R., ROSSI, A., SAKAI, H., NONAKA, N., KAMIYA, M. and CARMONA, C. (2005) Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection *Parasitol. Int.*, 54, 43-49

論文発表(原著以外)

1. 神谷晴夫. (2004) "顎口虫症." 人獣共通寄生虫症、358-362、医薬ジャーナル社、大阪、
2. 奥祐三郎. (2004) "旋毛虫症." 人獣共通感染症、366-373 医薬ジャーナル社、大阪
3. 野中成晃. (2004) "回虫症." 人獣共通感染症、374-378, 医薬ジャーナル社、大阪
4. 奥祐三郎. (2004) "肝吸虫症." 人獣共通感染症、382-386, 医薬ジャーナル社、大阪
5. 奥祐三郎. (2004) "メダゴニムス症." 人獣共通感染症、396-400, 医薬ジャーナル社、大阪
6. 野中成晃 (2004) 鉤虫症 共通感染症ハンドブック 日本獣医師会 134-135
7. 奥祐三郎(2004) エキノкокス症 共通感染症ハンドブック 日本獣医師会 218-219
8. 奥祐三郎 (2003) "北海道のエキノкокス." はらのむし通信, (183), 3-12. 2003
9. 嶋田雅暁, 赤尾信明, 石渡賢治, 奥祐三郎, 奥沢英一, 竹内勤, 名和行文, 西山利正, 原樹, 濱田篤郎, 堀尾政博. (2004) "日常診療で役に立つ寄生虫情報システム." 治療, 86 (10),

10. 神谷晴夫. (2004) プライマリケアのための寄生虫および動物媒介疾患. 呼吸器検査-喀痰、胸水、気管支鏡-. 治療、86、: 2665-2669.
11. 神谷晴夫、稲葉孝志 (2004) 旋毛虫症 別冊日本臨床 領域別症候群
12. 神谷晴夫 (2003) 最近注目される人獣共通寄生虫症 顎口虫症、動物由来回虫症 日本医事新報 4116, 33-36
13. 神谷晴夫. (2005) 動物由来寄生虫症-特に頭にくる寄生虫について. Neuroinfection, 10(1) (印刷中)
14. 長内理大、神谷晴夫 (2005) 条虫の石灰小体の性状とその機能. 弘前医学、56(印刷中).
15. KAMIYA, M., NONAKA, N., GANZORIG, S. and OKU, Y. (2004) "Effective counter-measures against alveolar echinococcosis in red fox population of Hokkaido, Japan." Echinococcosis In Central Asia: Problems And Solutions. Ed. Torgerson & Shaikenov, Dauri, Almaty, 273-282
16. KAMIYA, H. (2003) Schistosomiasis mansoni Progress of Medical Parasitology in Japan Vol 8, Meguro Parasitological Museum, Tokyo. 129-136
17. 野中成晃 (2004) 回虫症 新版主要症状を基礎とした猫の臨床 218-220 前出吉光監修 デーリイマン社、札幌
18. 野中成晃 (2004) ジアルジア症 新版主要症状を基礎とした猫の臨床 242-244 前出吉光監修 デーリイマン社、札幌
19. 野中成晃 (2004) 条虫症 新版主要症状を基礎とした猫の臨床 247-251 前出吉光監修 デーリイマン社、札幌
20. 野中成晃 (2004) トキソプラズマ症 新版主要症状を基礎とした猫の臨床 268-271 前出吉光監修 デーリイマン社、札幌
21. 野中成晃 (2004) 鉤虫症 新版主要症状を基礎とした猫の臨床 272-274 前出吉光監修 デーリイマン社、札幌
22. 野中成晃 (2004) 主要な消化管内寄生虫病一覽 新版主要症状を基礎とした猫の臨床 363-364 前出吉光監修 デーリイマン社、札幌
23. 奥祐三郎・神谷正男(2004)寄生虫性ズーノーシス 獣医公衆衛生学 第3版 高島郁夫・熊谷進文永堂出版 141-159

学会・講演会発表

1. 野中成晃、千種雄一、松本淳、森嶋康之、松尾

- 加代子、奥祐三郎、神谷正男 豆状条虫の代替宿主の検討と多包条虫終宿主診断抗体主mA9の交差反応について 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
2. 巖城隆、井上貴史、金井祐太、張秀玲、小林文夫、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 北海道小清水町における多包症感染源対策：駆虫薬入りペイト散布と中止後の経過 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
3. CHANG, S.L. NONAKA, N., OKU, Y., OOI, H.K. and KAMIYA, M. Preliminary study of alternative host model for *Taenia soginata asiatica* 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
4. 井上貴史、金井祐太、巖城 隆、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 駆虫薬入りペイト散布による都市周辺部でのエキノコックス症感染源対策の試み 第73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
5. 小林文夫、井上貴史、金井祐太、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 エキノコックス虫卵がキツネの被毛に付着している可能性について 73回日本寄生虫学会大会、群馬大学、2004.04.03-04
6. 加藤有香、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 テニア科条虫卵の同定法、特に虫卵DNAの抽出とCOI遺伝子の利用 第137回獣医学会、日本大学、2004.04.02-04
7. 奥祐三郎、劉俊佑、野中成晃、神谷正男 札幌市北東部における多包条虫媒介動物調査 第137回獣医学会、日本大学、2004.04.02-04
8. 奥祐三郎、野中成晃、八木欣平、神谷正男 犬のエキノコックス症 (シンポジウム) 第137回獣医学会、日本大学、2004.04.02-04
10. MATSUMOTO, J., KAMIYA, M., and GOTTSTEIN, B. Search for molecular viability/activity markers in *Echinococcus multilocularis* metacestodes under different maintenance conditions. Jun 21st International Congress of Hydatidology, ナイロビ (ケニア) 2004年8月
11. 萩野和正、堀尾政博、金澤保、小林文夫、巖城隆、奥祐三郎、神谷正男、八木欣平、林利彦、二瓶直子、小林睦生 ハエ類がヒトの多包虫感染に關与する可能性の検討 -野外ハエ類の多包虫虫卵摂取について- 2004年度 衛生動物学会
11. 野中成晃、奥祐三郎、巖城隆、小林文夫、神谷正男 ペットのエキノコックス検査：信頼性の評価と陽性犬の事例が示すもの 第51回日本寄生虫学

- 会・日本衛生動物学会北日本支部、秋田県総合保健センター2004.09.17
12. 金井裕太、間野勉、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 旋毛虫 *Trichinella* sp. の北海道各地の野生動物における流行調査 第51回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部、秋田県総合保健センター2004.09.17
13. 野中成晃、奥祐三郎、巖城隆、小林文夫、神谷正男 飼い犬のエキノコックス感染状況調査：診断法の適合性と陽性犬の事例が示すもの 第4回人と動物の共通感染症研究会、東京大学本郷キャンパス安田講堂、2004.11.06
14. 加藤尚子、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 イヌにおけるエキノコックス感染初期の免疫応答について 第64回日本寄生虫学会東日本支部大会第3回分子寄生虫・マalaria研究会フォーラム、東京大学、2004.10.29-31
15. 今野兼次郎、畑英一、野中成晃、奥祐三郎、伊藤琢也、酒井健夫、神谷正男 関東地方におけるイヌおよびネコの寄生虫疫学調査 第138回日本獣医学会学術集会、北海道大学、2004.09.10-12
16. 奥祐三郎 北海道におけるエキノコックス症の現状と対策、第80回帯広畜産大学獣医学談話会、帯広畜産大学、2004.07.03
17. 奥祐三郎 「エキノコックス：感染源に迫る」(招待講演) 台湾との合同シンポジウム「動物の感染症と検疫」、札幌コンベンションセンター、2004.10.20-21
18. 奥祐三郎 エキノコックス感染症に遭遇したら 獣医事シンポジウム 2004年度北海道小動物獣医師会、ロイトン札幌 2004.11.6-7
19. 奥祐三郎 エキノコックス症についての最近の知見 北海道獣医師会道南支部公衆衛生講習会、2004.09.28 八雲町
20. 神谷正男、佐藤直樹、奥祐三郎 北海道における人のエキノコックス感染症の現状と獣医師の役割 北海道小動物獣医師会・北海道獣医師会主催学術セミナー 2005.02.27 札幌市 教育文化会館
21. 今野兼次郎、畑英一、野中成晃、奥祐三郎、伊藤琢也、酒井健夫、神谷正男 関東地方におけるイヌおよびネコの寄生虫疫学調査 第138回日本獣医学会学術集会 2004.09.10-12 北海道大学
22. 巖城隆、浜崎今日子、野中成晃、奥祐三郎、塚田英晴、神谷正男 北海道のエキノコックス症(多包条虫症)感染源対策：野生ギツネに対する駆虫薬入り餌(ベイト)散布 第10回日本野生動物医学大会 2004.09.16-19 東京大学弥生講堂
23. 八木欣平、藤田修、奥祐三郎 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification of DNA) method を用いた *Echinococcus multilocularis* 特異的な12S rRNA遺伝子の検出について 第138回日本獣医学会学術集会 2004.09.10-12 北海道大学
24. 金井裕太、間野勉、野中成晃、奥祐三郎、神谷正男 旋毛虫 *Trichinella* sp. の北海道各地の野生動物における流行 第138回日本獣医学会学術集会 2004.09.10-12 北海道大学
25. 八木欣平、奥祐三郎、澤田幸治 虫卵感染で継代を行っている2系統(根室株およびヨーロッパ株)の多包条虫の性格について 第137回獣医学会
26. 神谷晴夫 動物由来寄生虫症一特に頭に来る寄生虫について、第9回日本神経感染症学会学術集会、2004.10.08、弘前
27. 神谷晴夫 寄生虫感染症における紫外線照射の功罪、第15回太陽紫外線防御研究委員会シンポジウム「太陽紫外線の恩恵と警告」、2005.3.11、弘前
28. 長内理大、佐藤宏、神谷晴夫 多包虫石灰小体に存在するタンパク質の生化学的解析、第73回日本寄生虫学会、2004.4.03~04 前橋
29. 長内理大、佐藤宏、神谷晴夫：多包虫石灰小体に存在するタンパク質の解析、第51回日本寄生虫学会北日本支部会、2004.09.17、秋田
30. 西村司、那須美行、敦賀俊彦、神谷晴夫：てんかん発作を背景に発見されたヒト有鉤囊虫症の一例、第44回東北医学検査学会、2003.10.18、弘前
31. ISHIKAWA, H. Evolving mathematical models of infectious diseases with route of transmission, International symposium on numerical simulation of environmental problems. Nov. 2004. Okayama U.
32. 石川洋文 キタキツネとエキノコックス：今北海道で 平成16年度岡山大学環境理工学部講座「環境問題への数理学とコンピューターによるアプローチ」岡山大学環境理工学部 2004

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

エキノコックス症ならびにアライグマ回虫症の実態調査と対策

(エキノコックス症の本州への流行地域拡大防止対策に関する研究、アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視)

分担研究者	川中正憲	国立感染症研究所寄生動物部第二室長
研究協力者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部研究員
同	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部主任研究員
同	荒川京子	国立感染症研究所寄生動物部非常勤研究員
同	阿部幸一	青森県環境保健センター微生物部長
同	大野譲治	青森県環境保健センター研究管理員
同	和栗 敦	青森県環境保健センター主任研究員
同	川口 愛	青森県環境保健センター技師
同	土井陸雄	横浜市立大学医学部名誉教授

研究要旨

わが国では、北海道が唯一のエキノコックス（多包虫）症の流行地であるが、他の都府県への感染源の拡散と流行地の拡大を具体的に監視し阻止する方策を提案する事が本研究班の課題となっている。その為の可能な方策の一つとしては北海道から移動する飼育犬への対策があり、前提として実態調査を実施する必要がある。そこで、昨年度の準備期間を経て、今年度はフェリー会社などの協力を得て実際に移動犬調査を実施した。また、北海道に隣接する青森県でのエキノコックス調査は格別の重要性があり、終宿主動物としての犬とキツネを重点的に調査した。これらの飼育犬を対象とした調査の実践をもとに、本年度は対策指針である「犬のエキノコックス症対策ガイドライン 2004-人のエキノコックス症予防のために-」の作成に寄与する事ができた。アライグマ回虫症対策に関しては、引き続きアライグマの調査を実施しているが、幸いにして日本では今年度も野性アライグマからは感染個体は検出されていない。

1. エキノコックス症の本州への流行地域拡大防止対策に関する研究

1-1 北海道からフェリーを用いて他都府県へ移動する犬の実態調査

A. 研究目的

多包性エキノコックス症（以下、多包虫症とする）は、本来は野生動物（キツネ・野ネズミ）間に流行巢が形成される。犬も感染野ネズミを捕食することで終宿主（す

なわち人体への感染源）となりうるが、実際の感染は比較的まれである。しかしながら、ヒトと密接な関係にある犬の多包虫感染は、単に感染源としての問題のみならず、本症の流行地拡大において重大な意味をもつ。野生動物の感染と異なり、感染犬は人為的に広範かつ迅速に清浄地へ運ばれる可能性を有するからである。わが国では北海道が唯一の多包虫症流行地であるが、ここから年間1万頭以上の犬が他都府県へ移動しているとの推計結果が報告さ

れている(土井, 2003)。これまで行われてきた調査で北海道内で飼育される犬の多包条虫保虫率が1%前後を示してきたことをあわせて考えると、流行地拡大を防止する上で無視できない集団といえよう。そこで北海道外へ移動する犬の実態調査と、犬を伴って移動する飼い主の多包虫症に対する認知度の調査を行い、さらに実際に移動した犬の多包条虫検査を実施することで、多包虫症拡大防止対策のあり方を検討した。

B. 研究方法

2003年9月～2004年9月まで北海道と他県との連絡航路をもつフェリー会社の協力を得て、以下の調査を行った。

一次調査：犬を連れて道内各港から本州へ向けて出発する飼い主への質問票調査。この調査は、乗船手続きの際に窓口で犬の同乗申請を行った者への調査票(多包虫症を解説した折込み印刷物および質問を印刷したハガキ)の配布による。

二次調査：一次調査への回答者を対象に行った。この調査は、犬の検査を希望する飼い主から受け付けた糞便検体の検査と、より詳細な質問票調査からなる。糞便の検査は糞便内抗原ならびに虫卵の検出によって行った。糞便内抗原の検出には市販キット(CHEKIT®-Echinotest, Dr. Bommeli AG, スイス)を使い、虫卵の検出は比重1.27の蔗糖液を用いる遠心浮遊法によって行った。質問票調査には、犬の個人情報(品種・性等)・移動の目的・北海道滞在時(北海道現住者では居住時)の飼育管理の方法に関する質問項目が含まれた。集計項目の群間比較として統計学的検定を行った場合は有意水準5%以下を有意とみなした。

C. 研究結果

一次調査：163名の飼い主から回答があった。回答者の現住地内訳は、北海道居住者(以下、北海道群とする)が40名、北海道以外の都府県居住者(以下、非北海道

群とする)が123名であった。北海道旅行者の多包虫症に関する認知度として、一次調査では「北海道に人のエキノコックス症があることを知っているかどうか」を質問したが、「知っている」と回答したのは、北海道群98%(39/40)、非北海道群77.2%(95/123)で、認知度に関して両群間には有意な差が認められた(Fisher's exact $P < 0.01$, 2-tailed)。

二次調査：上述の一次調査回答者163名中139名が二次調査の対象となった(二次参加率85.9%)。二次調査対象者の現住地内訳は、北海道居住者29名(二次参加率73%)、非北海道群110名(二次参加率89.4%)で、両群の参加率の差は有意であった(Fisher's exact $P < 0.05$, 2-tailed)。

北海道からの出発港上位3港は、北海道群は苫小牧(34%)・函館(31%)・小樽(21%)、非北海道群は函館(52%)・小樽(21%)・苫小牧(16%)であった。

両群が犬を連れて移動した目的をみると、北海道群は「観光」が最も多く(11名)、他に「転居」および「帰省」が同数(8名)あり、この3つが移動目的の9割以上を占めた。一方、非北海道群の主たる移動目的は「観光」(74.5%, 82/110)であった。別荘等利用の長期滞在(6名)を除く非北海道群104名の滞在日数は平均11.5日(95%信頼区間[CI]: 8.7-14.3)であった。

両群に伴って北海道から移出した犬の頭数は、北海道群の移動に伴った犬(以下、北海道犬群とする)が41頭、非北海道群の移動に伴った犬(以下、非北海道犬群とする)が142頭で、これを飼い主1名あたりの随伴頭数で見ると、北海道群が平均1.4頭[95%CI: 1.1-1.7]、非北海道群が平均1.3頭[95%CI: 0.5-2.0]であった。各犬群の年齢中央値は北海道犬群が5歳[95%CI: 4-6]、非北海道群が4歳[95%CI: 3.5-5]であった。おもな犬の品種は、北海道犬群では雑種が最多で(17頭)、ゴールデンレトリバーとビーグル(各

4頭)がそれに続く。非北海道犬群ではミニチュアダックスが最も多く(20頭)、次いで雑種(16頭)、ゴールデン/ラブラドルレトリバー(各9頭)であった。

糞便内抗原陽性は両群各1頭から発見された(陽性率:北海道群2.2% [95% CI: 0.1-11.5]、非北海道群0.8% [95% CI: 0.02-4.1])。この抗原陽性犬については飼い主ならびに担当獣医師へ連絡をとり、すみやかに治療(駆虫薬投与)を行い、いずれも再検査で糞便内抗原の陰転が確認された。遠心浮遊法での陽性例は発見されなかった。

D. 考察

北海道群および非北海道群に随伴する犬各1頭から多包条虫感染が疑われる例を発見した。この結果が示すように、わが国のように有病地と清浄地が海で隔てられている場合、最も蓋然性の高い侵入経路は、有病地からの感染犬の人為的持ち込みと思われる。よって、この集団に対する監視は流行地域拡大を防止する上で不可欠といえる。

一次調査において有病地に居住する北海道群は多包条虫へのきわめて高い認知度を示したが、一方で二次調査への参加率は非北海道群を下回る。このことは北海道群の多包条虫に対する「慣れ」あるいは「軽視」を示唆するものかもしれない。上述の監視体制構築とも関連し、夕病地住民に対してより一層の啓発が求められる。

E. 結論

北海道から移動する犬の移動実態ならびに多包条虫感染調査を行い、感染が疑われる2例を発見した。

F. 健康危険情報

「北海道内の飼い犬におけるエキノコックス感染例及び北海道から移動する犬の感染実態調査と感染予防対策について(情報提供及び啓発依頼)」(健感発第0402001号)平成16年4月2日

G. 研究発表

- 1) 森嶋康之・荒川京子・杉山 広・川中正憲。北海道から移動するイヌの多包条虫感染実態調査。第73回日本寄生虫学会大会(2004年4月)。

1-2 青森県におけるエキノコックス調査

A. 研究目的

わが国における多包条虫の大部分は、多包条虫の土着が認められる北海道での発生であるが、北海道以外の都府県でも現在までに77例が報告され、その中には北海道や海外有病地とは無関係な原発疑いの17症例が含まれている。とりわけ青森県は最多の北海道外例および原発疑い例が確認されている(それぞれ22症例および9症例)。これは、北海道・青森両県間の人的・物的交流の緊密さに起因すると考えられるが、その具体的な要因については解明されていない。1999年に同県産の豚から多包条虫が発見され、同県での多包条虫定着が疑われてきた。しかしながら、その後現在まで青森県の終宿主動物からの多包条虫検出の報告はない。多包条虫は青森県において土着しているのか、あるいは北海道からの侵入を受けつつあるのか、などを調査し、監視体制と拡大防止対策のあり方の検討を継続した。

B. 研究方法

多包条虫の終宿主となる動物としてキツネおよび犬を対象とした。キツネ由来の材料は、県猟友会の協力を得て、猟期および有害獣駆除期間(2003年12月~2004年6月)に県内にて採取されたキツネ直腸便および落下便を収集した。多包条虫が定着していた場合、主たる終宿主であるキツネの生息地で活動する猟犬もまた感染の機会が考えられる。そこで猟友会員が飼育する猟犬の糞便検査も行った。糞便内抗原の検出および虫卵の検出方法は1-1と同

様の方法で実施した。さらに陽性例については糞便内 DNA の検出も行った。糞便検体からの鋳型 DNA の精製は QIAamp® DNA Stool Mini Kit (キアゲン) で行い、Dinkel ら(1998)が報告した nested-PCR 法に若干の改変を加えて多包条虫特異配列の増幅を試みた。以上と糞便を用いた調査のほか、今後の疫学調査における予備的資料(材料入手の可否および容易性)とする目的で、同県内でのキツネの捕獲・生息に関する状況の質問票調査も併せて実施した。また、犬に関する質問票調査も同時に実施した。

C. 研究結果

採集された検体数は、キツネ由来の糞便が 15 市町村から 38 検体(10 検体については採取地不明)、猟犬由来の糞便が 16 支部 110 検体(14 検体は支部不明)であった。これらについて糞便内抗原検出法による検査を行ったところ、キツネ検体はすべて陰性であったが、猟犬検体からは陽性 1 例が発見された(陽性率: 0.9% [95% CI: 0.02-4.96])。この陽性個体についてはさらに試験的駆虫を実施し、駆虫後 3 日目まで排泄全量を採集した糞便を用いて詳細に検討したところ、糞便内抗原の陰転が確認された。しかし、駆虫薬の投与によって排出が予想される糞便内の虫体あるいは特異的 DNA は濾便の簡易沈殿および nested-PCR のいずれの方法でも検出されず、陽性を寄生虫学的に証明することはできなかった。

青森県猟友会員を対象とした同県におけるキツネの狩猟・生息状況に関する質問票調査では、87 名中 40 名が「キツネを捕獲したことがある」と回答した。これらの一猟期中の捕獲数は平均 1.1 頭であった。同県におけるキツネの生息状況(回答者数 73 名、複数回答可)は、「最近個体数が増加した」(45 名、62%)・「交通事故死体が増えた」(23 名、32%) などのようなキツネの個体数増を示唆する回答が全県的に寄せられた一方で、「最近個体数

が減少した」(11 名、15%)・「交通事故死体が減った」(4 名、5%) もあり、地域あるいは猟友会支部による一定傾向は確認されなかった。

D. 考察

青森県における調査でも 1-1 と同様に糞便内抗原の検出にスイス製キットを利用した。この検査系の検査特性値は感度 86.3%、特異度 98.3% である(メーカー公表グラフから算出)。青森県の猟犬における多包条虫保虫率が北海道の犬と同様に 1% と仮定すると、この方法を適用した場合の陽性予測値は 42.1% となる(逆に陰性予測値は 99.9% 以上で、陰性結果を得た検体は真の陰性とみなすことができる)。青森県はいまだ多包条虫の土着が確認されておらず、そのため発見された陽性例の取り扱いにあたっては寄生虫学的証明が必須と考えられる。今後さらに検討数を増やして調査を進めるため、キツネについては 2004 年度猟期も検体の収集および検査を継続すると同時に、一般家庭の飼育犬および保健所で捕獲された放浪犬からの採材を行っている。

第 6 回自然環境保全基礎調査(環境省)によれば、青森県におけるキツネの生息区画率は 60.9% で、ほぼ全県的に生息するが、津軽半島側より下北半島側で高い。今回の検討対象としたキツネ由来材料もこれと一致し、下北半島側で採取されたものが半数以上であった。しかしながら、今回の質問票調査の結果を、多包条虫疫学調査で大量の検体を利用する北海道の例(北海道, 2003) と比べると、青森県ではハンターがキツネ猟に積極的でなく、かつ捕獲数も少ない(青森県平均 1.1 頭/年 vs. 北海道 2.9 頭/年)。今後、同県で疫学調査を実施する際には材料入手が解決すべき最大の問題となると思われる。

E. 結論

多包条虫の侵入・土着が懸念される青森県において終宿主となりうる動物(キツネ

および犬)について糞便を用いた調査を行った。キツネ由来の検体はすべて陰性であった。犬由来の検体から糞便内抗原陽性1例が発見されたが、寄生虫学的証明はできなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 森嶋康之・荒川京子・杉山 広・川中正憲・大野譲治・阿部幸一。青森県における飼育犬およびキツネの多包条虫感染調査。第64回日本寄生虫学会東日本支部大会(2004年10月)。

1-3 対策指針「犬のエキノコックス症対策ガイドライン 2004 -人のエキノコックス症予防のために-」の作成

平成16年10月1日の、獣医師による犬エキノコックス症の届け出義務化に伴って、対策指針の策定を行う事が研究班に要請された。特に、1-1と1-2で述べた実践が、北海道外への移動犬対策の指針を策定する上での科学的な根拠を与えるものとなった。本指針は平成16年12月に、全国の関係方面へ向けて配布された。

2. アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視

2-1 動物展示施設におけるアライグマ回虫症の感染予防対策について

動物展示施設は、レクリエーションの場であると共に、教育、調査・研究、種の保存等といった大切な使命を担っており、今日の社会において欠かせない存在となっている。しかしながら、動物展示施設の特

殊性から、通常、ヒトと触れあうことのない野生動物等が飼育係等の従事者や来園者と直接的・間接的に接触する可能性がある。アライグマ回虫はヒトに感染すると致死的な神経障害を惹起しうるが、動物展示施設においてアライグマの本種寄生例が少なからず検出されている。これらの陽性動物展示施設に対して、昨年度に策定した「アライグマに寄生するアライグマ回虫の検査等のガイドライン」に基づく検査と対策を継続している。

2-2 野生アライグマの糞便内虫卵検査

野生アライグマによるアライグマ回虫幼虫移行症の発生予防と監視の為に、捕獲個体の糞便内虫卵検査を継続実施している。検査には神奈川県はアライグマ駆除業者、自治体から、また愛知県は開業獣医師から、直接送付された糞便を用いた。平成15年度の検査件数を県別に挙げると、神奈川県(112)、愛知県(7)であった。現在までのところ、これらの糞便からはアライグマ回虫卵は検出されていない。

健康危険情報

なし

研究発表

- 1) 川中正憲、坂本京子、杉山広、森嶋康之。動物展示施設におけるアライグマ回虫症の感染予防対策について、第73回日本寄生虫学会大会(2004年4月)。

エキノコックス診断法：インハウス・キットの開発

研究分担者 高倉 彰(財) 実験動物中央研究所免疫研究室

研究協力者 鈴木 宏和 わかもと製薬株式会社開発本部

研究協力者 持田 立子 わかもと製薬株式会社開発本部

研究要旨

エキノコックス感染動物を摘発・治療することにより、汚染拡大防止するためには、簡便で、高い感度・特異度を有し、かつ迅速に診断できる検査キットが必要である。EmA9 モノクローナル抗体を用いたところ、非特異反応が多く見られたので、他のモノクローナル抗体 Emi および Em11 を用いて、Half dip stick と Full dip stick による比較を行い、感度・特異度ともに高い結果が得られたが、迅速性において Half dip stick が優れていた。

A 研究目的

エキノコックス感染動物を摘発・治療することにより、汚染拡大防止するためには、簡便で、高い感度・特異度を有し、かつ迅速に診断できる検査キットが必要である。そこで本研究では前年度において EmA9 モノクローナル抗体を用いたインムノクロマト法によるインハウス・キットの開発を試み、かなり実用的と思われる結果を得たが、EmA9 モノクローナル抗体の残りのロットに変更したところ、非特異反応が多く見られ、特異度が 70-80% となった。そこで、他のモノクローナル抗体(Emi および Em11) を用い、高い感度・特異度のインムノクロマト法を開発することを目的とした。

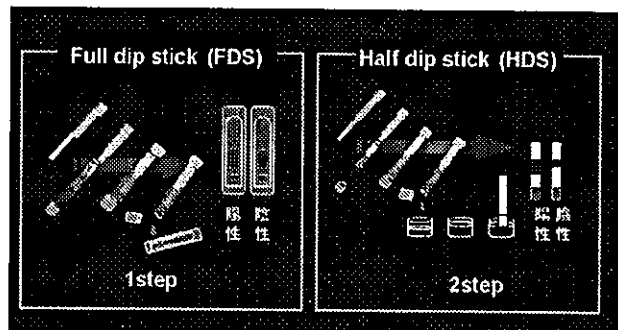
B 研究方法、

抗体の候補としてエキノコックスに対するポリクローナル抗体、およびモノクローナル抗体 Emi および Em11、さらに、EmA9 の組み合わせもふくめてインムノクロマト法を実施し、現在用いられている EmA9 を用いたサンドイッチ ELISA の結果と比較した。特に、Half dip stick と Full dip stick の比較を行った。さらに、現在のサンドイッチ ELISA の改善、糞便採取器具の改善も試みた。

C. 研究結果

Half dip stick (HDS) と Full dip stick (FDS) の比較
糞便試料の量を増やすために、糞便懸濁試料を一度 EmA11 標識ラテックス(LTX) と別の容器で反応させた後、その液に固相に Emi を用いたインムノクロマトの濾紙の一部を浸し、反応させる方法(HDS)と、

EmA11 標識 LTX を含むインムノクロマトの濾紙に直接糞便懸濁試料を滴下する方法(FDS)を比較した。



HDS での最小感度は 125 ng/ml (ELISA と同等) 便検体評価で特異性 95% 以上と良好であり、FDS での最小感度は 1000 ng/mL と良くなかったことから、HDS がより期待できた。なお、ポリクローナル抗体と EmA9 の組み合わせの感度は HDS と同等であった。

FDS の改善

しかし、FDS が HDS より簡易であるため、ニトロセルロース膜の Emi 固相化濃度、Emi 固相化位置、紙のポアサイズ、テストストリップ幅の検討、ラテックスについては EmA11-LTX 量と EmA11 標識濃度の検討、試料については便懸濁倍率を検討したが、HDS ほどの改善は認められなかった。しかし、サンプル量、展開方法・ケース、反応時間では改善が認められた。

それぞれの最高の条件での剖検結果(虫体・虫卵検査)と比較した場合、感度、特異度は HDS・FDS とともに 87.8%、99.4% となった。ただし、FDS の反応

時間に長時間(60分)要することから、迅速性についてはHDS(10-30分)より劣った。現在のサンドイッチELISAと比較した場合、HDSでは感度、特異度は94.5%、98.9%、FDSでは94.5%、99.5%となり、いずれも高い相関を示した。

D 考察

まず、前年度の結果からEmA9を用いたインムノクロマトを選択したが、その後の大量生産に向けてのモノクローナル抗体EmA9生産において、理由は不明であるが、非特異反応が見られ、試行錯誤により改善を試みたが、個の非特異反応を抑えることは出来なかった。したがって、他のモノクローナル抗体(EmiおよびEm11)について検討したところ、これらのモノクローナル抗体がEmAの代用となり、かつ、非特異反応がほとんど見られなかった。したがって、これらのモノクローナル抗体とEmA9を用いたインムノクロマト法、さらにコントロールとし

て現在のEmA9 サンドイッチELISAの結果を比較しながら、改善を試みた。これらのモノクローナル抗体を用いたFDSがHDSの比較では、感度の点でHDSがFDSより良かった。しかし、その後のHDSの改善により特異度・感度共に優れた方法となったが、迅速性についてはまだHDSが優れていた。

今後は、便の保存安定性、基準方法を虫卵および虫体検査としたインムノクロマト法の特異度・感度の検討、申請用基礎データの取得(用法・用量、保存試験開始)、さらに申請(2005年9~10月頃)安定性は6ヵ月を目指している。

E. 結論

モノクローナル抗体EmiおよびEm11を用いて、Half dip stickとFull dip stickによる比較を行い、感度・特異度ともに高い結果が得られ、迅速性においてHalf dip stickがより優れていた。