

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究

(H15-新興-7)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神谷正男

平成 18 (2006) 年 3 月

## 目次

はじめに

I. 総括研究報告書	1
動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究 主任研究者 神谷正男	
II. 分担研究報告書	19
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	
エキノコックス症の感染源対策 分担研究者 奥祐三郎	25
エキノコックス診断法：インハウス・キットの開発 分担研究者 高倉 彰	32
エキノコックスの全長cDNAの解析 分担研究者 渡辺純一	34
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 分担研究者 川中正憲	36
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

## はじめに

20世紀のなかば、わが国では、主に学童を対象にした集団駆虫法を採用し、人体に固有の寄生虫病コントロールに成功している。

本研究班『動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究』では、感染源（リスク）が動物界にある寄生虫症を対象にしている。従来の人体寄生虫病対策とは異なり、野生動物などが、リスクの伝播に重要な役割を果たしているため対策は、より複雑である。

寄生虫・エキノコックスを重点的に取り上げた。わが国へは、20世紀はじめ、人間活動（動物の移送など）により持ち込まれた外来生物である。1980年代には北海道全域に分布するようになった。被害が増大しているにもかかわらず、生物学的リスクとして軽視されてきた。最近、世界銀行(WB)や世界保健機関(WHO)が経済的側面から注目している世界疾病負担(Global Burden of Disease: GBD)の解析ツールとしてのDALYs(障害調整生存年数)からエキノコックス症の重要性が論じられるようになってきた(Budke, C. M. et al.: Global Socioeconomic Impact of Cystic Echinococcosis, EID Vol 12, No. 2 February 2006)。

研究班は、これまでもエキノコックス感染源対策の重要性について指摘し、問題解決の技術開発を進めてきた。このリスクを放置すれば、人的被害のみならず、経済的損失、農業、観光への影響は甚大である。さらに病原体は拡散し本州へ侵入・定着する可能性がある。2005年9月には、埼玉県の北部で捕獲された野犬の糞からエキノコックス虫卵が確認された。感染源対策は急務である。

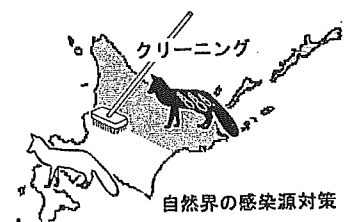
生物リスクの認知、分析、除去の面から、今後の対応、とくに、北海道の感染源リスクの低減、根絶へ向けた研究開発について新たな流れをまとめた。

研究にご理解をいただいた関係各位に感謝申し上げます。

主任研究者 神谷正男

酪農学園大学 環境システム学部 環境動物学研究室

OIE エキノコックス症リファレンス・ラボ <http://www.k3.dion.ne.jp/~fea/>



## 動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究

主任研究者 神谷正男 酪農大学環境システム学部環境動物学教室教授

### 研究の要旨

エキノコックス(多包条虫)症は主に野生動物間で伝播する動物由来寄生虫症で、わが国では北海道に限局していると考えられているが、本州への流行地拡大が懸念されている。多包条虫の主たる終宿主はキツネであるが、飼い犬も好適な宿主であり、人への感染源となり、北海道外への流行地拡大に関与する危険性が高いと考えられる。感染犬の移動を阻止するためには、まず北海道における流行を抑える必要がある。さらに、流行地拡大に関わると考えられる北海道における犬の感染状況の把握および感染犬に対する対策法の確立が急務であり、道外へ移動したペットのフォローアップも重要である。

このエキノコックス以外にもアライグマ回虫やトリヒナなども人に重篤な疾病を引き起こし、今後の感染拡大を防止しなければならない動物由来寄生虫である。

### エキノコックス感染源対策

1) エキノコックスの感染源対策(キツネの駆虫)のために 1998 年から農村地帯(小清水町)におけるベイト散布を実施し、散布法についてほぼ確立してきた。また、野外採取された糞便を用いたキツネの感染状況評価法も確立してきた。2005 年度は住民が今後感染源対策を実施できるように技術移転を試みた。すなわち、2003 年および 2004 年においてベイト散布を行わず、キツネにおける感染率が上昇した小清水町において、2005 年にベイトの散布法およびキツネの糞便採取法を地域住民に実地説明し、その後住民によるベイトの散布および糞便採取が行われた。住民により野外で採取された糞便の検査から、キツネの感染率が顕著に減少したことが示唆され、予め状況が把握されている小清水町のような地域では地域住民に感染源対策に関する技術移転が可能であることが示された。

2) 予め状況の把握されていない地域の住民によるベイト散布に向けて、倶知安町において地域住民に実地説明し、エキノコックス流行の事前調査が地域住民によりに試みられた。2005 年 7 月、9 月、11 月にそれぞれ約 90 個の糞便がほぼ全町から採取され、キツネの糞便採取は可能であることが示された。さらに、7-9 月では結果(糞便のエキノコックス陽性率)はあまり変動しないことも明らかとなった。今後、毎年 8 月に感染源対策としての評価を行うこととし、ベイト散布を計画している。

3) 山間部におけるベイト散布法を検討するために、2000 年(感染率 50%)より小樽市の山沿いおよび山間部の道路での調査およびベイト散布を試みてきた。2004 年におけるキツネのベイト摂取率は約 60% (4-7 月まで 4 回ベイト散布) で、キツネの多包条虫感染率の低下 (感染率 10%) が認められた。2005 年度には小樽市においてベイト散布を行わなかったが、感染率の上昇は認められなかった。

### 札幌市におけるエキノコックス感染リスクの評価

人口 200 万人の都市圏 (札幌、江別、北広島) に囲まれた野幌森林公園において、平成 17 年 7 月~12 月の期間、エキノコックス症感染源リスクの検出・分析・除去のための調査をキツネ糞便(抗原と虫卵検査)を対象に地理情報システム (GIS) を活用して実施した。陽性率の平均は、抗原 50%、虫卵 18%であった。抗原陽性率は調査期間中、漸増の傾向にあった (45~59%)。一方、環境汚染ならびに人体への感染リスクとして重要な虫卵の排出は、7~8 月は、認められなかったが、その後、9~10 月に 20%、11~12 月に 30% 台に上昇した。都市圏におけるエキノコックス汚染環境の修復作業に必要な基礎情報が得られた。GIS は、ハイリスク地域の特定、リスク除去の効果判定、時空間分析などに有効と考えられる。

### エキノコックス伝播の数理モデル

エキノコックス伝播の数理モデルの開発のために、従前のエキノコックス伝播数理モデルを深度化し、2005 年度は主な終宿主であるキツネの Individual model 化を行い、エキノコックス伝播ストカスティック数理モデルを構築した。

### 北海道のエキノコックス症流行抑制対策と廃棄物処理の実態調査

北海道で行われている媒介動物(キツネ)対策の1つとして、家庭からの生ゴミや酪農畜産施設の動物性廃棄物対策が上げられている。しかし、北海道の各種統計資料および報告書、現場調査の結果、北海道の関係各方面の連携がきわめて貧弱で、有効な対策・体制が構築されていない。また、対策の効果を評価する体制にもないことが明らかになった。

#### 北海道におけるペットの調査

本年度、北海道のペット検査頭数は584頭(犬:552 猫:32)で、室内飼育犬を含む2頭の犬がエキノコックス(多包条虫)に感染していることが判明した。これらの感染例は、法律に基づき、担当の獣医師により迅速に届け出がなされ、行政側もおおむね問題なく対処したと考えられる。これらの結果から、ペットの検査の必要性ならびに、それらの感染予防と飼育管理の重要性が示されたが、検査依頼件数が減少していることから、獣医師および飼い主のエキノコックスに対する関心が薄れてきていることが憂慮される。

#### 本州の動物病院に来院したペットおよび捕獲犬のエキノコックス調査

本州におけるエキノコックス流行状況の確認のために、東北の動物病院に来院したペットの検査を継続し、また、昨年度に引き続いて青森県での監視を行ったが、2005年度もエキノコックス感染動物は発見されなかった。しかし、埼玉県で捕獲犬で北海道由来と考えられる多包条虫寄生例が見出され、本症拡大阻止の有効な手立ての必要性が強く認識された。

#### 簡便で迅速なイムノクロマトキットの作成

ペットのエキノコックス症診断薬として、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の開発を検討した。2004年度の検討により、モノクローナル抗体EmA9とポリクローナル抗体を組み合わせたFull dip stick(FD)方式よりモノクローナル抗体EmiおよびEM11を用いたHalf dip stick(HD)方式の方が高い特異性を示したが、スクリーニングとしては高い感度を必要とするので、2005年度にはEmA9とポリクローナル抗体を組み合わせたHDの感度・特異性を、野外材料および感染実験材料を用いてFDと比較した。その結果、HDは検出感度がFDに比べ劣ること、反応時間が長いことが判明した。そこでスクリーニング用としては、より高感度な検出系が適していると考え、反応系をFDに戻し、改良するとともに診断薬申請の準備を開始した。

#### 虫卵排泄前の糞便のPCRによる診断

現在までペットのエキノコックス検査法として、糞便内抗原検出法を開発してきたが、虫卵排泄前の期間における糞便内DNAによる確認法を試みた。すなわち、感染実験により感染後22日までの糞便を用いてエキノコックスDNA検査を実施した。しかし、重度感染犬においても検出率が低かったため、検出率を上げる必要があった。そこで駆虫薬投与直後の糞便を用いて検査を行ったところ、検出率の上昇は認められたが、さらに改善が必要とされた。単包条虫感染させた代替終宿主についても同様の結果であった。

#### 中央アジア・カザフスタンにおける調査

2005年8月、カザフスタン共和国教育科学省動物学研究所(旧科学アカデミー)との共同調査で、同国のロシア国境に近い地域に多包条虫流行地が確認された。最近の報告でエキノコックス症(単包条虫症)は、独立前の1974年~1994年と独立後の1994年~2003年で患者数は4倍に、また14歳以下の児童の感染率が35%増加しているとしている。その要因として、家畜、主に羊の飼養形態(牧畜規模の変化:少数飼育→牧羊犬の増加)が指摘されている。同国は、本研究班で検討されているエキノコックス感染源対策、とくに終宿主の「迅速診断法」を中心にした技術協力をJICAへ要請している(12案件中2位)。

#### 中国青海省におけるエキノコックス症の疫学調査

中国青海省の4箇所の集落を対象とし、住民1549名の超音波検査と、血清のエキノコックス抗体検査を行った。また、同地域において浮浪犬あるいは飼育犬のエキノコックス感染状況を調査した。これらの検査により、濃厚浸淫状況(約8パーセントの住民が有病者、犬の糞便の9.0%がテニア科条虫卵陽性)であることが明らかとなった。また、今後の対策研究に必要な生物材料を得る事が出来た。

#### エキノコックスの全長cDNAの解析

多包条虫の分子生物学的解明を目的として、多包条虫シスト塊から全長cDNAライブラリを作成し、ランダムクローンの5'端大量シーケンスを行った。既知のデータベースとの比較から約3分の1が宿主由来のクローンで、残りの3分の2がエキノコックス由来のクローンと推定された。本ライブラリは、エキノコックスの分子生物学的生態を解明するだけでなく、宿主の反応の研究にも有用と考えられる。

#### アジア条虫の代替宿主開発および人のアジア条虫症の診断法開発

東南アジアに分布し、ブタを中間宿主とするアジア条虫の代替宿主開発および人のアジア条虫症診断法開発を試みた。代替宿主としてのスナネズミの有用性と、診断のための糞便内の抗原検出法の有用性を示した。北海道のトリヒナの分類

*Trichinella* にはいくつかの遺伝子型および種が知られている(本州には T9 のみが分布)。2005 年度には北海道の *Trichinella* spp. の分類に関する遺伝子解析を行った。すなわち、Multiplex PCR、COI および ITS2 領域の塩基配列を調べたところ、T9 と *Trichinella nativa* の両者が発見され、ほとんどが T9 であった。現在、わが国において豚のトリヒナ検査は実施されていないが、今後、これらの公衆衛生上の重要性を調べるとともに、さらに大規模な調査が必要である。

#### アライグマ回虫の調査と虫卵鑑別法

アライグマ回虫症対策に関しては、今年度は神奈川県での監視体制の構築を図るために、重点的な調査研究を行った。322 頭のアライグマの糞便検査ではアライグマ回虫卵は発見できなかったが、2 頭にタヌキ回虫の寄生が認められた。この結果によりアライグマ回虫卵の鑑別の必要性が示されたため、今後の監視に必要な回虫卵のマルチプレックス PCR 法による迅速鑑別法を開発した。

#### 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		
嘉田良平	農林水産省農林水産政策研究所 (株式会社 UFJ 総合研究所 顧問、その後アマタ株式会社)	
高倉 彰	(財) 実験動物中央研究所	室長
渡辺純一	東京大学医科学研究所	助手
奥祐三郎	北海道大学大学院獣医学研究科	助教授

### エキノコックス感染源対策

#### 1. 農村地帯のベイト散布による感染源対策

##### A. 研究目的

我々は1997年から小清水町の農村地帯における調査を行い、ベイト散布法についてはほぼ確立し、また、野外採取された糞便を用いたキツネの感染状況評価法も確立してきた。今後住民が実施できるように技術移転を試みた。すなわち、2004年および2005年においてベイト散布を行わず、キツネの感染率が上昇した小清水町において、ベイトの散布法およびキツネの糞便採取法を地域住民(NPO法人オホーツクの村)に技術移転を試みた。

##### B. 研究方法

まず、NPO法人オホーツクの村の会員に小清水町全体のベイト散布地点(主に道路と防風林の交点)についてプロットした地図を配布し説明を加えた。その後、同伴し、小清水町を自動車で行き、数カ所において散布法を示し、またキツネ糞便採取ポイントと自動車からのキツネ糞便発見法および糞便の取り扱いの注意点(虫卵感染の予防)について実地で説明した。

##### C. 研究結果

ベイト散布前は糞便のエキノコックス抗原および虫卵陽性率が30%であったものが、2000年には5%に、2002年ではさらに2%程度にまで減少した。2002年にベイト散布を2004年まで中止したが、2004年には9%に上昇していた。2005年の5月から11月までの住民による毎月のベイト散布(約200地点、各10ベイト散布)が実施された。その間に8月に採取したキツネの糞便について検査したところ、糞便のエキノコックス抗原および虫卵陽性率が2%に減少し、住民によるベイト散布効果が認められた。

##### D. 考察

小清水では今まで我々研究者が様々なベイト散布法を試み、流行時今日の推移を調べるためにキツネ糞便を採取してきたが、地域住民でもこの作業が可能で、キツネの感染率が抑えられることが示された。今後、小清水では散布回数を減らすことを予定しているが、今回の試みで住民がベイトを散布しても効果があることが示唆された。これは、予め研究者がその地域についての情報を収集していれば、研究者から短時間の住民への実地説明で、ベイト散布およびキツネの糞便採取は可能であることが示された。すなわち、今後の北海道における感染源対策が専門家のアドバイスがあれば住民で実施可能であることが示唆された。

今後は、研究者が全く調査していなかった地域における感染源対策実施に向けて、専門家が如何にサポートするかについての研究が必要となるが、これについては次の節(倶知安町における感染源対策)で述べる。

##### E. 結論

エキノコックス感染源対策(ベイト散布)は予め状況が把握されている地域では専門家から、住民への技術移転は可能であることが示され、糞便採取についても可能であることが示された。

## 2. 倶知安町における感染源対策

### A. 研究目的

研究者が全く調査していなかった地域における地域住民による感染源対策実施に向けて、倶知安町で事前調査を行った。

### B. 研究方法

まず、現地の地図および航空写真を利用し、糞便採取ルートを打ち合わせし、一度現地で糞便採取を地域住民とともに実施した。なお、この時虫卵感染の危険性と感染予防については十分に注意を喚起した。また、町全体の虫卵汚染状況を把握するために、出来るだけ町全体をカバーするようにキツネ糞便を採取し、パイアスを防ぐため、偏らないように採取することを注意した。また、今後の糞便採取を容易にするために、すべての採取ポイントをプロットし、季節変動を把握するために、7月、9月、11月に採取するように指示した。

採取された糞便は環境動物フォーラムで虫卵と抗原検査を行ない、その結果とそれぞれの糞便の採取地点の関連を調べた。

ベイト散布の方法およびポイントについても地図を用いて説明し、一度地域住民とともに実施した。

### C. 研究結果

倶知安町のほぼ全域からキツネ糞便が採取され、7月-90個、9月-86個、11月-92個の糞便が採取され、これらの糞便の抗原陽性率は7月-19%、9月-16%、11月-26%で、抗原陽性かつ虫卵陽性率は7月-11%、9月-11%、11月-7%であった。陽性糞便は山沿いに多いことが示された。

### D. 考察

糞便を毎月86-92個採取できたことから、地域住民でもキツネの糞便採取が可能で、さらに、採取地点はプロットしてあるので、今後の糞便採取がより容易になるものと思われる。

エキノコックスの流行状況については、現在まで我々が調査してきた、小清水および小樽と比べるとひどくないことが示された。また、7月と9月の結果はほぼ同様で、毎年1回8月頃に調査を行うことによって、今後の流行の推移を調べることが出来るものと考えられた。

陽性糞便は山沿いに多いことから、ベイト散布はこのような地点に重点的に行うと効果的と考えられる。

### E. 結論

予め状況の把握されていない地域の住民によるベイト散布に向けて、倶知安町で、エキノコックス流行の事前調査が地域住民により7月、9月、11月におこなわれた。毎月86-92個の糞便が採取され、キツネの糞便採取は地域住民でも可能であり、さらに、7-11月では結果(糞便のエキノコックス陽性率)はあまり変動しないことも明らかとなった。今後、ベイト散布を計画している。

## 3. 山間地帯のベイト散布による感染源対策

### A. 研究目的

北海道では市街地辺縁部におけるエキノコックス症感染源対策も急務となっており、山沿いにおけるベイト散布法を確立する必要がある。本研究では山沿いおよび山間部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. 研究方法

小樽市の市街地辺縁部(110 km<sup>2</sup>)の山沿いおよび山間部において、野生キツネを対象とした駆虫薬(プラジカンテル)入りベイト散布を1 km<sup>2</sup>あたり約20個の密度で道路沿いに行い、エキノコックス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4回テトラサイクリン入りのベイトを散布しベイト摂取率を調査した。2005年には散布を中止し、2004年度の検体を調べるとともに、散布中止後の流行状況の推移についてキツネを検査した。

ベイト摂取状況はキツネを剖検し、犬歯におけるテトラサイクリン沈着の指標となる蛍光のラインを検出した。

### C. 研究結果

キツネ犬歯のテトラサイクリン沈着によりベイト摂取率を調べたところ、2003年では1回のみでも45%の摂取率で、2004年の4回散布では60%

(幼獣100%、成獣40%)となった。

エキノкокスの感染状況(結腸便の糞便内抗原陽性率)については、6~9月に捕獲されたキツネのはベイト散布前の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、2004年は10%となった。2005年には散布を中止したが、10%を維持している。

#### 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。現在までの結果では、顕著に減少したものの、小清水町(やや平坦な農村地帯)での散布効果ほどではなく、10%程残っていた。今後、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、キツネの感染率の低下となるものと考えられた。これについては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が、ベイト中止しても容易には感染率は戻らない事が示された。

### 大都市・札幌圏の野幌森林公園における調査

#### A. 研究目的

人への感染ルートが不明であるエキノкокス症の対策には、感染源(リスク)の分析およびその除去が重要である。リスクの把握(ハイリスク地域の特定など)や最適なリスク除去対策の立案には、正確な感染源モニタリングによる基礎情報が不可欠である。そこで、本調査では、地理情報システム(GIS)を活用した都市圏におけるエキノкокス症感染源モニタリングを実施した。

#### B. 研究方法

人口200万人の都市圏(札幌、江別、北広島)にある野幌森林公園を調査地域とし、平成17年7月~平成18年12月の期間、キツネ糞便の採集を行った。採集時に糞便の位置情報をArcPadソフト

ウェアを利用したハンディGPSにより記録した。採取した糞便は殺卵処理後、虫卵検査およびサンドウィッチELISAによるエキノкокス抗原検査を行った。得られた糞便の情報および検査結果についてGISソフトウェア(ArcView)を用いて解析を行った。

#### C. 研究結果

合計131個の糞便が採取されたが、糞便の多くは公園縁の道沿い、公園周辺の畑において見つかった。また、糞便が採取できた地点は時期により変動が認められた(Figure)。検査陽性率の平均は、抗原50%、虫卵18%であった。抗原陽性率は調査期間中、漸増の傾向にあった(45~59%)。一方、環境汚染ならびに人体への感染リスクとして重要な虫卵は、7~8月は、検出されなかったが、その後、9~10月に20%、11~12月に30%の糞便で検出された。

#### D. 考察

本調査では、都市圏におけるエキノкокス症の感染源(リスク)の地理分布、季節変動についての基礎情報を得ることができた。GISを活用したキツネ糞便調査の解析がエキノкокス汚染環境のモニタリングに有用であることが示唆された。今回の知見は、今後、地域住民も参加する広範囲の環境修復作業にも活用可能である。

#### E. 結論

大都市圏(札幌、江別、北広島)に囲まれた野幌森林公園の野生動物(キツネ)が保有するエキノкокス症感染源(リスク)の実態、その推移(平成17年7月~平成18年12月)を地理情報システム(GIS)を活用して把握した。GISは、ハイリスク地域の特定、リスク除去の効果判定など、時空間分析に有効と考えられる。今後、ベイト(キツネ用駆虫剤)散布と組み合わせることにより、この地域のみならず、より広範囲の環境修復は可能である。

### エキノкокス伝播の数理モデルの開発

#### A. 研究目的

エキノкокス伝播数理モデルについては、平成2002年度より研究を開始し、2003年度にそのシミュレーションのための実装プログラムの開発を行い、2004年度には深度化を図るべく、捕食感染野ネズミの原頭節分布の部分設計等を行った。2005年度は、主要な終宿主であるキツネ集団の個体を基盤とするStochastic Individual Based Modelの開発を行った。合わせてエキノкокス・コントロー



ル対策効果をモデルに組み込む準備を開始した。

## B. 研究方法

### 1. ストカスチックモデルの構成

エキノコックス感染伝播は、複雑な感染環に支配され、野生動物がその主要な役割を担っていることから、その流行には大きな揺らぎが生ずる。エキノコックス流行の推移を中央値とともに信頼区間の範囲を予測することは、エキノコックス予測解析、エキノコックス・コントロール対策評価を行う上で、より有用な道具となる。このため、北海道における主要終宿主であるキツネ個体を基盤とするストカスチックモデルを開発した。このモデルには、各キツネ個体の誕生日、余命、雌キツネについては産仔数及びその時期を含むキツネ個体群動態を組み込んだ。また、エキノコックス感染については、感染時期及び虫卵排出期間、捕食ネズミの原頭節量分布に基づく worm burden、感染経路に基づく免疫作用を組み込んだ。

### 2. 野ネズミにおける原頭節形成過程モデルの構成

キツネにおける worm burden を求めるために、野ネズミにおいて、エキノコックス虫卵経口摂取後の原頭節形成過程を当初指数的に増加し、後に飽和量にいたるロジステック曲線によりモデル化した。

## C. 研究結果

キツネ個体群に対するエキノコックス伝播ストカスチックモデルの構成を行い、野ネズミの原頭節形成過程モデルを作成した。またこのモデルに基づくシミュレーションを実施した。

## D. 考察

i) 感染キツネ個体群における worm burden の分布は、ほぼフィールド・データより得られる範囲となった。しかしながら分布が指数的なため、平均値にはずれが生じた

ii) キツネにおける獲得免疫の効果については不明な点が多く、今回のモデルではその枠組みのみを準備したが作動させていない。この点については今後の研究の進展を待つ必要がある。

iii) 本モデルに、コントロール効果の組み込みを行いモデルの有用性を高める必要がある。

iii) 北海道大学・獣医学・寄生虫学教室のフィールド研究結果に基づく Follow-up Study が今後の重要な課題である。

## 北海道のエキノコックス症流行抑制対策と廃棄物処理の実態調査

## A. 研究目的

エキノコックス症の流行抑制には、媒介動物への対策が最大かつ必須の課題である。感染源動物とくにキツネ対策としては、個体数抑制と多包条虫感染抑制が主に実施されてきた。本研究は、個体数抑制対策および人里にキツネを寄せないための方法として「北海道エキノコックス症対策実施要領」が挙げている餌資源、すなわち生ゴミ、動物性廃棄物対策を取り上げた。

## B. 研究方法

研究材料は、主に北海道庁刊行物（「北海道農林水産統計年報-総合編」（農林水産省北海道統計情報事務所）、「北海道農林水産統計年表-市町村別編」（同）、「飼育動物診療年報」（農政部酪農畜産課）、「食肉検査グループ事業概要」（保健福祉部食品衛生課）および「産業廃棄物実態調査報告書」（北海道環境生活部環境室循環型社会推進課）と「鳥獣関係統計」（環境省自然環境局野生生物課）によった。また、北海道水産林務部企画調整課ホームページ（<http://www.pref.hokkaido.jp/srinmu/sr-kcsei/index.html>）「データでみる北海道の水産」、「漁業養殖業生産統計年報」（農林水産省統計情報部）及び「北海道農林水産統計年報」から水産林務部水産経営課ホームページ（<http://www.pref.hokkaido.jp/srinmu/sr-skeie/contents/index.htm>）「平成15年度漁業系廃棄物発生量調査（平成14年度分）」、「北海道エキノコックス症対策協議会資料」（北海道保健福祉部）を参照した。また、情報を補足・確認するため北海道保健福祉部疾病対策課、同環境生活部循環型社会推進課、同農政部畜産振興課の担当者とメール及び直接面談による情報交換を行った。さらに、北海道北広島市のゴミ処理場を視察し、雪面に残されたキツネ足跡から、ごみ処理場におけるキツネ生態を観察した。

## C. 研究結果

北海道におけるエキノコックス症媒介動物(キツネ)に対する個体数抑制対策に関して、(a) 酪農畜産振興とキツネ個体群との関係 (b) キツネの餌資源としての酪農畜産・漁業由来の廃棄物 (c) キツネが利用可能な一般廃棄物-生ごみ、という観点から1950年から現在までの動きを、前述の資料にもとづいて解析を行った。

北海道のエキノコックス症対策とくに感染源動物対策の重点がキツネの餌資源に置かれていることは、「北海道エキノコックス症対策実施要領」（「実施要領」）に明記されている。そして、エキノコッ

クス症対策は保健福祉部疾病対策課、廃棄物対策全般は環境生活部環境室循環型社会推進課、酪農畜産廃棄物は農政部畜産振興課、水産廃棄物は水産林務部水産経営課がそれぞれ担当している。ところが、疾病対策課担当者は、廃棄物処理の実態をまったく知らなかった。廃棄物対策を担当する循環型社会推進課の担当者は、違法建築廃材対策で手一杯で、エキノコックス症対策どころではなかった。保健福祉部長から農政部長にエキノコックス症媒介動物（キツネ）対策として「実施要領」への「協力依頼」（平成5年6月）が行われているが、疾病対策課が開設しているホームページ「エキノコックス症知識と予防」には、道民の生ゴミ対策への協力要請だけで、農政部や循環型社会推進課との関係は一切記載がなく、これら各部の廃棄物関係統計資料へのリンクもまったくない。昨年後半、ようやく厚生労働省、国立感染症情報センター、北海道立衛生研究所とのリンクが設置されたが、廃棄物関連のリンクは未設置である。これでは、道民に一方的に生ゴミ処理の責任を押しつけておきながら、道民が折角、分別収集した生ゴミの大半を行政が野外処分場に投棄して、キツネの繁殖を助けていると言っても過言ではない。

#### D. 考察

以上述べてきた通り、現状では北海道における媒介動物（キツネ）対策としての動物性廃棄物対策は、担当部局に丸投げされ、相互の有機的連携がまったくない。エキノコックス症対策担当の疾病対策課は廃棄物処理の実態をまったく把握しておらず、関心もない。従って、媒介動物対策としての廃棄物対策がどのような成果を挙げているについてもまったく把握していない。つまり、媒介動物対策としての廃棄物対策は、市民に対して生ゴミ処理を啓蒙し、エキノコックス対策として有用と述べているが、効果は全く不明である。僅かに希望が残されているとすれば、北海道でも廃棄物の再資源化や焼却処理が徐々に進行しているので、その展開に期待するほかない。

#### E. 結論

北海道で行われている媒介動物（キツネ）への個体数抑制および人里に近づけない対策として、家庭からの生ゴミや酪農畜産施設からの動物性廃棄物対策が上げられている。統計資料や報告書および現場調査の結果、関係各方面の連携がきわめて貧弱で、有効な対策・体制が構築されていないだけでなく、対策の効果を評価する体制にも欠けていることが

分かった。

## 北海道のペットの調査

### A. 研究目的

北海道の飼い犬および猫のエキノコックス感染状況の把握、感染動物の摘発・治療、さらにペットへの感染経路の推定のために、ペットの調査と飼育状況のアンケート調査を継続した。

### B. 研究方法

本年度も北海道内の動物病院から依頼された依頼検体について検査を継続した。糞便内抗原はモノクロナール抗体 EmA9 を用いたサンドイッチ ELISA 法で検査し、虫卵は蔗糖液を用いた遠心浮遊法によって検査した。糞便内抗原陽性および擬陽性反応を示した症例で、虫卵が検出できなかった症例については再検査した。テニア科条虫卵の検出されたものについては、虫卵の DNA の検査を行い、多包条虫であることを確認した。

### C. 研究結果

検査頭数は計 584 頭(犬：552 猫：32)であった。犬では 2 頭がエキノコックス症と診断された。2 例とも駆虫薬を投与されたが、駆虫直前の糞便からテニア科虫卵が検出され、この虫卵の DNA で多包条虫であることが確認された。2004 年 10 月以降、感染症法の改定にしたがい、これらは担当の獣医師により迅速に届け出がなされた。なお、感染例には屋内飼育が含まれていた。駆虫確認については、2 症例について駆虫後の検査で、陰転が確認された。

#### 犬の検査結果

	ELISA 陰性	ELISA 擬陽性	ELISA 陽性	計
虫卵陰性	548	2	2*	552
虫卵陽性	0	0	0	0
計	548	2	2	552

ELISA 陽性・擬陽性の 4 頭のうち

\*: ELISA 陽性の 2 例は虫卵 DNA 検査の結果エキノコックスと判定され、ELISA 擬陽性の 2 例は再検査の結果エキノコックスではない可能性が示唆され陰性と判定した。

#### 猫の検査結果

	ELISA 陰性	ELISA 擬陽性	ELISA 陽性	計
虫卵陰性	31	0	0	31
虫卵陽性	1*	0	0	1
計	32	0	0	32

\*: この 1 頭はエキノコックスではない他のテニア科条虫(猫条虫など)に感染しているものと思われた。

#### D. 考察

今年度の調査では、犬 552 頭中 2 頭がエキノコックスに感染していたことが判明し、ペットの感染予防と飼育管理の重要性が示された。ペットの感染は飼い主やその家族のみならず周辺住民への感染の可能性を示すものである。2003 年および 2004 年には 1000 件以上の依頼があったが、今年は依頼数が半減し、獣医師および飼い主の関心が薄れてきたものと憂慮される。

2004 年 10 月以降、感染症法の改定にしたがい、感染例はすべて担当の獣医師により迅速に届け出がなされた。エキノコックスの虫卵を排泄するペットが確認された場合、対処法については当研究班の報告書として 2004 年末に配布されガイドラインに沿って説明した。届け出に対する行政の対応も迅速に行われた。一部では、保健所の担当者が届け出について知らなかった例もあったが、おおむね問題なく対処されたと考えられる。

#### E. 結論

2005 年度における北海道のペットの検査頭数は 584 頭 (犬: 552 猫: 32) で、室内飼育犬を含む 2 頭の犬がエキノコックスに感染していることが判明し、これらの症例は担当の獣医師により迅速に届け出がなされ、行政側もおおむね問題なく対処したと考えられる。これらの結果からペットの検査の必要性が示され、ペットの感染予防と飼育管理の重要性が示されたが、検査依頼件数が減少していることから、獣医師および飼い主のエキノコックスに対する関心が薄れてきているものと憂慮される。

### 本州におけるペットのエキノコックス調査

#### i. 東北の動物病院を介したペットの調査

##### A. 研究目的

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、東北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継続した。

##### B. 研究方法

東北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。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. 研究結果

2005 年度においては東北地方の動物病院 4 ケ所から犬、猫併せて 45 検体を集めた。これらの東北地方の犬では 29 検体中 3 検体(10%)、猫では 16 検体中 3 検体(19%)で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、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。

#### 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、今後の調査継続が必要である。

#### ii. 青森におけるキツネおよび犬の調査

##### A. 研究目的

前年度、「北海道から他都府県へ移動する犬の実態調査(移動犬調査)」で明らかにしたように、エキノコックスは飼育犬を介して本州へ人為的に移入されている。しかし、その定着ならびに拡散の実態はいまだ明らかでない。そこで引き続き、青森県での終宿主候補動物(キツネおよび犬)を対象とした調査研究を進めた。これに加え、食肉検査における豚での感染監視体制の構築を図った。北海道での流行地拡大時に示されたように、豚はエキノコックス症の拡散を監視する上で格好の歩哨動物となる。また、移動犬調査の結果、非北海道群(北海道以外の都府県に本来の飼育地を持つ群)の多くが関東地方で飼育されていることが分かったので、当該地方における監視体制の整備に取り組んだ。

##### B. 研究方法

青森県における終宿主調査は、引き続きキツネおよび犬について実施した。キツネ由来の検体については、前年度同様、同県猟友会に依頼し、狩猟期間および有害獣駆除期間に県内で捕獲された個体の糞便ならびに野外採取された糞便の提供を受けた。犬由来の検体は猟友会員の飼育個体と動物管理センターへ収容された個体を調査対象とした。収集された糞便の検査は蔗糖遠心浮遊法およびホルマリン酢酸エチル遠心沈殿法で行った。エキノコックス属を含むテニア科条虫では虫卵の形態のみからは種の鑑別が困難なため、検出されたテニア科条虫卵について分子同定を行った。豚のエキノコックス症調査では、十和田食肉衛生検査所における屠畜検査の際に本症感染が疑われた病変部位を収集し、病理組織学的に検索を行った。

### C. 研究結果

青森県では猟犬由来 24 検体、動物管理センター収容犬 86 検体の合計 108 検体について検査を行ったが、エキノコックス感染例は発見されなかった。キツネ由来の検体は現在収集検索中である。

豚ではこれまでに疑いのあった 10 検体を検索したが、いずれも病理組織学的に否定された。

### D. 考察

国内唯一のエキノコックス症流行地である北海道からの流行地拡大に関してはいくつかの経路が推察され、その中には宿主動物の自然あるいは人為的移動が含まれる。我々は、従来のキツネに加え、犬にも着目して調査研究を展開してきた。今回は感染動物発見されなかったが、今後の検査も必要と思われる。

### E. 結論

青森県内で飼育または捕獲管理下にある犬合計 108 頭を検査したが、エキノコックス陽性例は発見されなかった。

#### iii. 埼玉における収容犬の調査

##### A. 研究方法

関東地方では、埼玉県衛生研究所と同県動物指導センターが動物由来感染症予防の一環として共同で行っている収容犬の内部寄生虫調査のなかで、エキノコックス感染が疑われるものについて確認を行った。

##### B. 研究結果

埼玉県では、5月下旬に県北部で捕獲された雌犬 1 頭からテニア科条虫卵が検出され、虫卵から得た DNA を出発材料として 12S rRNA 領域の塩基配列を解読したところ、多包条虫（北海道分離株）の配列と完全に一致した。この事例は、感染症法改正後に北海道外で初めて発見された犬のエキノコックス症として届出がなされた。犬での感染発見を受け、埼玉県内で中間宿主動物に対する流行調査が実施された。検査対象となった動物は少数であるが、現在のところ感染動物は発見されていない。

##### C. 考察

今回、埼玉県内で発見された犬の感染例は、エキノコックスの拡散防止対策を策定するにあたって緊急性をもって解決すべき問題を提起している。移動犬調査の結果が示唆するように、エキノコックスの本州への侵入は北海道からの移動犬がキャリア

となって引き起こされる可能性が高い。しかしながら、これらの犬に対する検疫はまったく実施されていない。また、畜犬登録の不徹底により移動そのものの把握も困難である。実際、埼玉県で発見された感染犬は捕獲個体であり、鑑札等は無かった為に北海道との関連を証明できていない。イギリスでは PETS (the Pet Travel Scheme) が施行され、同国内へ持ち込まれる犬に対してマイクロチップ挿入による個体管理が行われている。さらに同法ではエキノコックス（多包性）の伝播防止の立場から入国直前の駆虫薬投与を義務付けている。これらは本州への流行地拡大を防止する上で参考とすべき事項であろう。

埼玉県の例は発見時にすでに虫卵を排泄しており、中間宿主動物への感染源となっていた可能性も否めない。さらに県下での犬ならびに中間宿主を対象とした動物疫学調査を進めていく必要がある。

### D. 結論

埼玉県内で捕獲された犬 1 頭でエキノコックス感染を確認した。感染地は不明であるが、12S rRNA 領域の塩基配列は北海道産エキノコックスと完全に一致した。

### 簡易迅速なイムノクロマトキットの作成

#### A. 研究目的

ペットの診断薬として、簡便で、高い感度・特異性を有し、かつ迅速に診断できる検査キットの開発を検討した。2004 年度の検討により、モノクローナル抗体 EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた Full dip stick (FD) 方式より Emi および EM11 を用いた Half dip stick (HD) 方式の方が高い特異性を示したが、スクリーニングとしては高い感度を必要とするので、2005 年度には EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた HD の感度・特異性を野外材料および感染実験材料を用いて FD と比較した。

#### B. 研究方法

##### i. 野外および感染実験糞便における検討

本州由来(陰性)糞便および感染実験糞便(陽性)計 126 検体を用いて EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた HD (Half Dipstick) と FD (Full Dipstick) の感度・特性を従来法であるサンドイッチ ELISA と比較した。

##### ii. 感染実験糞便を用いた検出感度の検討

原頭節 1000 個および 100 万個を感染させたピエグル犬から、経日的に糞便を採取し、EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた HD および FD の

検出感度を ELISA と比較した。

### iii. FD 方式の最適化

判定をより明確化するために、検体パットの変更とバックアップ検査法としての ELISA との試薬共有化のために、便懸濁用緩衝液の再検討を実施し、その系の感度・特異性を感染実験糞便 126 検体および陰性糞便 162 検体を用い再確認した。

## C. 研究結果

### i. 野外および感染実験糞便における検討

EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた HD と ELISA を比較した結果、感度 86.7%、特異性 100%であった。つぎに FD は感度 98.8%、特異性 90.7%を示した。この結果、ELISA に比べ、HD は、感度が、FD は特異性が劣ることが示された。

### ii. 感染実験糞便を用いた検出感度の検討

原頭節 100 万個群では HD, FD および ELISA は感染後 3 日目から検出できた。つぎに原頭節 1000 個感染群では、ELISA は吸光値が低いが感染 9 日目から陽転した。それに対し HD は感染 16 日目のみで陽性を示した。また FD は感染後 11 日目で陽転した。この結果、低濃度感染における HD および FD の検出感度は ELISA に比べ劣ること、特に HD が低感度であることが示された。

### iii. FD 方式の最適化

検体パットを従来のセルロース系からガラス繊維系に、滴下検体量を 50  $\mu$ l から 100  $\mu$ l の変更した結果、反応ラインが明確になり、検出感度も従来の 125ng/ml から 31ng/ml へと向上した。つぎに便懸濁緩衝液を ELISA と共有化するための FD の改良を実施し、FD の感度・特異性を再確認した。その結果、改良 FD は ELISA に比べ感染実験糞便において感度は 98.8%、特異性 90.7%を示し、陰性糞便において 82.1%の特異性を示した。その結果緩衝液を ELISA と共有化しても同等の検出感度を有することが確認された。

## D. 考察・結論

EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた FD より特異性が高い HD が検査系として有望と考え、その感度を ELISA と比較した。その結果、HD は検出感度が劣ることが判明した。この理由は、使用モノクローナル抗体の反応性が悪いことが考えられた。この結果をふまえ、本感染症の早期摘発には、特異性より感度が重要と考え、FD の最適化を実施し、ELISA と同等の感度を確保できた。しかし FD の特異性は ELISA に比べ、80~90%程度であることから偽陽性反応の出現することが懸念される。し

たがって、EmA9 とポリクローナル抗体を組み合わせた FD は first screening のための検査系としては有効であるが、実用化のためには ELISA, PCR によるバックアップ体制が不可欠であることが示された。今後は FD による本感染症診断キットの承認申請手続きを開始するとともに、確認検査等のバックアップ体制を確立したいと考える。

## 虫卵排泄前の糞便の PCR による診断

### A. 研究目的

感染症法の改正により、2004 年 10 月より獣医師がエキノコックスに感染した犬を見つけた場合は、すぐに届け出なければならなくなった。犬の診断基準は、1.糞便に排泄された成虫・片節の発見(同定) 2.糞便内抗原検出 3.虫卵の DNA による確認である。特に DNA による検査が最も特異性が高く信頼できると考えられている。

現在、主に糞便内抗原検査と虫卵検査が行われており、両検査によってエキノコックスが疑われた場合、虫卵の DNA 検査で確認されている。しかし、DNA の検査は虫卵が検出された症例のみ可能で、抗原のみ検出されるが、虫卵が排泄されないプレパテントピリオドの感染の犬では、抗原検査のみ可能である。しかし、小腸に寄生している未熟虫体の一部が糞便とともに自然に排泄されることも予想される。したがって、虫卵からではなく、糞便から直接エキノコックスの DNA を検出することを計画した。そこで、多包条虫を犬や猫に実験的に感染させ、もしくは単包条虫を代替終宿主に感染させ、プレパテントピリオドにおいて、直接糞便からエキノコックスの DNA を検出することを試みた。

### B. 研究方法

#### i. 多包条虫感染犬について

様々な数(1,000-1,000,000)の原頭節を犬(5頭、A-E)および猫(2頭、A および B)に感染させ、虫卵排泄前の 22 日まで、経時的に糞便 200mg を採取した。

これらの糞便から QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて DNA 抽出し、プライマー(Em-1、Em-2、Em-3、Em-4)を用いて、Single-Tube Nested PCR (van der Giessen, 1999)を行い、多包条虫ミトコンドリア 12s rRNA 遺伝子の増幅の有無を調べた。また、別の感染犬 2 頭(F および G、10,000 もしくは 100,000 投与)を用いて感染後 14 日目に駆虫薬プラジカンテルを用いて駆虫し、糞便を採取して、糞便 DNA を上記と同様に調べた。

#### ii. 単包条虫感染代替終宿主について

実験感染には代替終宿主として免疫抑制スナネズミ 1 頭を用いた。青海省産ヒツジ由来単包虫原頭節約 7 万を経口投与し、安楽殺を行った感染後 30 日目まで糞便を経口的に採取した。また、腸管からのエキノコックス排除による糞便内 DNA 消失の傾向を見るため、感染 27 日後にプラジクアンテル(50 mg/kg B.W.) による駆虫処理を行い、安楽殺後に摘出した腸管内腔を実体顕微鏡下で検索し駆虫効果を確認した。糞便内 DNA の抽出には QIAamp DNA Mini Stool Kit (QIAGEN GmbH, Germany) を用い、12S rRNA 領域を標的部位とするプライマーペア (P60.for.と P375.rev.) を用いて検出を試みた。

### C. 研究結果

#### i. 多包条虫感染犬について

虫体の回収率は犬では約 50%が、猫では 2.5%となっており、多いものでは 50 万匹も虫体が回収された。

感染直後にほぼすべての例で陽性になったが、これは投与した材料に定着する原頭節だけでなく、エキノコックスのシスト成分が多量に含まれていることによると考えられた。しかし、その後の検出率は低く、50 万匹以上回収された犬でも 21 日間で 5 回のみです。その他の例では 2-4 回程度であった。以上の結果から、プレパテントペリオドの感染犬においては、糞便中に含まれる多包条虫由来細胞・片節が、少量で、DNA を検出できる可能性は高くないものと考えられた。そこで、あらかじめ駆虫薬を投与すれば投与後の糞便には、同時に多数の虫体が排出されるので、DNA 検出率が向上すると考えた。

駆虫実験については犬 2 例のみの実験であるが、駆虫前後については、同一糞便の 5 つの部位から DNA 抽出し、駆虫当日は、駆虫直前、駆虫後 9 時間、駆虫後 12 時間の 3 回採糞した。感染から 13 日目までは、全くバンドは検出されなかった。犬 F では、駆虫直前は 5 ヲ所いずれも特異的バンドは検出できなかったが、駆虫後 9 時間、12 時間に採取した糞便においては、5 つの抽出物すべてから検出された。また、犬 G では、駆虫直前においても 5 ヲ所中 1 箇所バンドが検出され、駆虫後 9 時間と、駆虫翌日では 2/5 箇所バンドが検出された。

このように検出率は向上したが、糞便から検査材料を採取する部位による差が認められた。

#### ii. 単包条虫感染代替終宿主について

糞便内 DNA は感染翌日には検出されたが、その検出結果は常に一定して陽性を示すのではなく間欠的であった。即ち、感染当日～感染 27 日後の感

染期間を通じての検出感度は 26%と計算された。また、駆虫(安楽殺後の腸管検索で虫体は発見されず、駆虫成功を確認)にともなう変化では、駆虫翌日(感染後 28 日)午前中採取の糞便検体は陽性を示したが、午後採取のものでは不検出となり、これは実験感染終了日まで持続した。

### D. 考察

#### i. 多包条虫感染犬について

今回の感染犬および猫からの感染後 22 日までの糞便を用いた実験において、重度の感染でも DNA の検出率が低く、診断法としては全く不十分と考えた。駆虫後の検査では検出率が上昇したが、理想的には駆虫薬を用いなくても高感度に診断可能な方法が望まれる。DNA の抽出法やプライマーを変更することなどにより、検出率の改善が必要である。

#### ii. 単包条虫感染代替終宿主について

今回の実験感染で感染翌日に検出された陽性例は、腸管に定着できず排泄された原頭節由来の DNA を検出したものであろう。また、駆虫処理日には不検出であった糞便内 DNA がその翌日午前中に陽転したことは、プラジクアンテルによって一時に排泄された虫体が糞便内に存在していたことを示唆している。感度は不十分であるが、他の届出基準には遺伝子検出に優る特異度を示すものはない。より正確な診断を行うため、糞便を出発材料とした場合の DNA 抽出法を改良していく必要がある。

### E. 結論

単包条虫および多包条虫感染について虫卵排泄前における感染動物の糞便 DNA による診断を試みたが、検出率が低く、駆虫直後(12 時間以内)の糞便を用いた場合は検出率が改善されたが、今後の改善が必要と考えられた。

## 中央アジア・カザフスタンにおける調査

### A. 研究目的

カザフスタン共和国教育科学省動物学研究所は、旧ソ連時代から動物由来寄生虫病の研究分野では中央アジア諸国の中核研究機関として業績をあげている。エキノコックスに関して、同国の独立前後の変化を文献的に明らかにすることを目的とした

### B. 研究方法

2005 年 8 月、B. シャイケノフ教授(動物学研究所)との共同で流行地ならびに文献調査を実施した。

### C. 研究結果

単包条虫 (*Echinococcus granulosus*) の流行地は同国、南西部から南東部の牧畜地帯、とくにアルマティ県、ザンブル県に集中しこの地域が、流行地全体の 82~85% を占めている。また、図に示すように多包条虫 (*E. multilocularis*) の流行地は同国の中央部、東北部ならびにロシア国境に隣接する地域に拡大していることが、終宿主 (キツネ、イヌ) と中間宿主のげっ歯類の調査で確認された。最近の報告で人体例 (単包虫症) は、独立前の 1974 年~1994 年と独立後の 10 年以内 (1994 年~2003 年) 患者数は 4 倍に上昇し、2003 年は 979 例が外科手術を受けた。また 14 歳以下の児童の感染率が 35% 増加している (Baitursynov et al., 2004; Shaikenov et al., 1999, 2002a, b, 2003, 2004; Shaikenov and Torgerson, 2004; Torgerson et al., 2003a, b)。

#### D. 考察

動物学研究所 (旧科学アカデミー) は、寄生虫系統分類学的世界的なリーダー、K. I. スクリヤビン教授により開設され、人獣共通寄生虫、とくに旋毛虫、エキノコックス、肝吸虫の研究では顕著な業績を残し、旧ソ連時代から動物由来寄生虫病の研究では中央アジア諸国の中核研究機関として貢献してきた。しかし独立後、社会体制が変わりこの分野の研究体制も著しく弱体化している。独立後の単包虫症患者数増加も、家畜、主に羊の飼養形態の変化に起因していると考えられる。すなわち、牧畜規模の変化である。旧ソ連時代、大規模農業が推進され、羊の多頭飼育がされていたが、独立後、小規模農家が形成され少数飼育農家が多くなった。このことは小規模でもほぼ以前と同数の牧羊犬を確保する必要があり、結果的には、牧羊犬の増加→感染犬の増加→感染リスクの増大につながったと考えられる。同国は、また、野生動物間で伝播する多包条虫の分布拡大を加えて新興・再興感染症としては重要なエキノコックス症への対応が急がれている。本研究班との共同研究がきっかけとなり、現在、検討されているエキノコックス感染源対策、とくに終宿主の「迅速診断法」を中心にした技術協力を JICA へ要請している (12 案件中 2 位)。この協力は、同国にとどまらず、近隣諸国、アフガニスタン等の民政安定にも関連し、わが国の国際貢献として重要な課題と考えられる。

#### E. 結論

カザフスタン共和国 教育科学省動物学研究所 (旧科学アカデミー) との共同で実施した調査で、

同国のロシア国境に近い地域他に多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) 流行地が確認された。人体単包条虫症 (単包虫症) は、独立後、患者数は 4 倍に、また、児童の感染率が急増している。その要因として、家畜、主に羊の飼養形態 (牧畜規模の変化: 少数飼育→牧羊犬の増加) が考えられる。

### 中国青海省におけるエキノコックス症の疫学調査

#### A. 研究目的

中国青海省は、単包条虫と多包条虫が同所的に分布し両方の寄生虫感染によってヒトのエキノコックス症が起きている。この地において、ヒトと終宿主動物の疫学調査をヒューマンサイエンス振興財団の中国疾病予防センター寄生虫研究所への委託事業として実施した。即ち、中国青海省におけるエキノコックス症の疫学調査を現地の研究機関と協力して実施すると共に、我国でのエキノコックス症対策研究に必要な生物材料を得ることが出来た。

#### B. 研究方法

調査地は、青海省果洛 (グオルオチベット族自治州) の久治 (チクジイル) に設定した。この地域は 3600-4500m の高地にあり人口約 2 万人のうちチベット人が 87% を占め、青海省と四川省とのボーダーに位置する。エキノコックス症については殆ど調査されていない。

調査方法は、4 箇所の集落を対象として住民検診の中で、超音波による検査と血清採取を行い抗体の検出を試みた。また、同地域での浮浪犬あるいは飼育犬のエキノコックス感染状況を調査した。

#### C. 研究結果

検診に応じた住民は 1549 名であった。超音波検査では 124 名が陽性と判定され (嚢型: 85、泡型: 39) 陽性率は 8.01% であった。血液採取に応じた住民は 1113 名で、IHA による抗体検査では、陽性者が 287 名 (25.79%) という結果であった。超音波検査で陽性を示したの者及び IHA で陽性の者について、現在それらの抗体応答についてウエスタンブロット法などで精査している。この地域で採集された犬の糞は 155 検体であるが、14 検体 (9.0%) からテニア科条虫卵が検出された。現在 PCR 法によって虫種の確認とエキノコックス卵である事の検索を実施している。

#### D. 考察

住民検診は 4 箇所で行ったが、超音波検査で陽性

率の高い集落は 16.9% (検査した 283 名のうち 48 名が陽性) を記録し、最も陽性率が低かったのは 2.7% (18/656) の町域であった。現在、多包虫症と単包虫症との区別及び、地域、年齢、性、職業での疫学的特徴について解析中である。

## E. 結論

中国青海省果洛のチベット人居住地においてエキノコックス症の疫学調査を行い、超音波検査で 1549 名の住民のうち約 8 パーセントの 124 名が有病者であるという高度侵淫地を見出した。現在、疫学的特徴について解析を行っている。

## エキノコックスの全長 cDNA の解析

### A. 研究目的

生物の設計図であるゲノムの解析研究は、今日、急速な勢いで進められている。周知のごとく、われわれ自身、人類のゲノム配列は、すでに解読されており、病原体についても、医学的、獣医学的重要性のために、多くの種で、精力的にゲノム解読が進められ、熱帯熱マラリア原虫など、寄生原虫ではいくつかの種ですでに終了している。しかし、エキノコックス条虫のように、ゲノムサイズの大きなものは、費用対効率の問題から、ゲノム解読は、今後の課題として残されている。

一方、ゲノム解読が生物の機能のすべてを解明するものでないことも事実である。特に、イントロンの多い真核生物では、コンピュータによる予測がしばしば不正確で、解読されたゲノム情報からただちに発現遺伝子の構造が解明されるわけではない。また、alternative splicing による機能調整などの解明にも、実際に組織の中で発現している遺伝子の解析が重要になってきた。

我々は、熱帯熱マラリア原虫を材料として全長 cDNA ライブラリを作成し、ランダムクローンの解析を行ってきた。遺伝子間配列や、イントロンなど、多くの非翻訳配列を含むゲノム塩基配列と比較して、発現遺伝子の正確な構造そのものを反映する全長 cDNA の解析は、多細胞真核生物であるエキノコックスの分子生物学的解明を効率的に行うにもっともふさわしいアプローチである。今回、多包虫シスト塊を材料として全長 cDNA ライブラリを作成し、多数のクローンの 5' 端シーケンスを解読、解析した。

### B. 研究方法

北海道大学獣医学研究部奥祐三郎助教授より提

供を受けた。スナネズミの腹腔内に *Echinococcus multilocularis* 幼虫を接種、2~3 ヶ月間にわたって、増殖させた。ネズミの腹腔内よりシスト塊を回収し、液体窒素で急速凍結させ、-80 度に保存した。虫体の 10 倍量の Trizol をくわえ、ポリトロンホモジナイザーで粉碎、RNA を抽出、polyA RNA を精製し、ベクタートラッパー法で全長 cDNA ライブラリを作成した。ランダムクローン 13,000 個からプラスミドを抽出し、5' 端のワンパスシーケンスを行った。その結果を、既知のデータベースと BLAST 検索で比較した。

### C. 研究結果と考察

クローンの約 3 分の 1 は、スナネズミ、ラット、マウスの既知の遺伝子と高い相同性を示し、宿主由来と考えられた。残りの 3 分の 2 は、エキノコックス由来と推定された。既知のエキノコックス遺伝子と一致したのも少数認められたが、大多数は未知の遺伝子であった。

前者はマウスの免疫グロブリンのホモログなどを含み、それらの解析からエキノコックスに対する宿主の反応を発現遺伝子のレベルで解明することが可能と考えられた。マウスホモログの全長率は 90% 以上と非常に高く、本ライブラリの品質の高さを示すものと考えられた。

後者のシーケンスはデータベース化し、インターネット上で Full-Echinococcus として公開する準備をすすめている (<http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp>)。これらのクローンは、およそ、1000 個の遺伝子に対応すると考えられる。それらの全長を解読することで、多数のエキノコックスの遺伝子を網羅的に解析することが可能である。また、クローンは、遺伝子全長をふくむリソースとして特異な生態を呈する多包虫の分子生物学的研究に利用可能である。

## アジア条虫の代替宿主開発と糞便内抗原検出法による診断

### A. 研究目的

アジア条虫 *Taenia asiatica* は豚を中間宿主とし、人のテニア症としてアジア各国で流行していることが近年判明した条虫である。本寄生虫の研究は代替宿主が開発されることにより、促進されるものと考えられる。アジア条虫の嚢虫および成虫を実験室内で得るために、実験小動物を用いた代替宿主について検討した。さらに人の成虫感染における糞便内抗原の検出法として、サンドイッチ ELISA を検討



した。

## B. 研究方法

まず、アジア条虫の代替中間宿主として SCID マウスとスナネズミを用い、これらの腹腔内や皮下に六鉤幼虫を投与し、皮下における定着と長期間における囊虫の生存を観察した。

さらに、人のアジア条虫感染診断用の糞便内抗原検出法の確立のために、成虫の排泄・分泌抗原と虫体抗原に対するポリクローナル抗体を作製し、サンドイッチ ELISA に用いた。ボランティアの成虫感染における糞便内抗原の経時的な推移を調べ、同時に、糞便から虫卵および片節の検出を行い、人の診断法として比較検討した。

## C. 研究結果

代替中間宿主として、SCID マウスとスナネズミの皮下において定着し、長期間生存することが示された。さらに、これらの囊虫の感染能については人と代替終宿主（ハムスターとスナネズミ）において確認された。一方、代替終宿主として、ハムスターとスナネズミでは虫体回収率は低く、発育も限られているものの、小腸から幼若成虫が得られた。

糞便内抗原検出法の開発を試み、成虫の発育につれてサンドイッチ ELISA の OD 値の上昇を認め、虫卵および片節が検出出来ない時期においても抗原検出率が上昇し、サンドイッチ ELISA の有用性が示唆された。OD 値の変動の原因の一つとして、糞便内における虫卵と抗原の分布について調べたが、虫卵については顕著なバラツキが認められたが、抗原についてはそれほど大きな変動は認められなかった。最後に、サンドイッチ ELISA を用いて代替終宿主における成虫の生存・排除をモニターしたところ、感染後 12 日以降については抗原が検出された。

## D. 考察

代替中間宿主として、SCID マウスとスナネズミ有用性は明らかであるが、代替終宿主としては更に改善が必要である。これは継続的なブレドニゾロン処置により有る程度の改善は可能と予想される。

アジア条虫の糞便内抗原検出法については、今回の少数の検体を用いた結果からは有望と考えられたが、今後多数の野外サンプルを用いた確認が必要と考えられる。最後に、感染経過のモニター法としてのサンドイッチ ELISA の可能性が示唆された。

## E 結論

スナネズミはアジア条虫の代替宿主として有用である。人の診断法および感染経過のモニター法としての糞便内抗原検出法(サンドイッチ ELISA)の可能性が示唆された。

## 北海道のトリヒナの分類

### A. 研究目的

動物由来寄生虫である重要なトリヒナについては、北海道において野生動物（キツネ、タヌキ、クマ、齧歯類）における流行状況を調査してきた。2003-2004 年にはキツネ 350 頭検査し、49 頭（14%）から筋肉トリヒナを検出し、小樽だけでなく、道東や道北においても *Trichinella* spp. が流行していることを明らかにした。*Trichinella* spp. のなかでも、本州には T9 のみが分布していることが知られているが、2005 年度には北海道の *Trichinella* spp. の分類に関する遺伝的な解析を行った。

### B. 研究方法

Multiplex PCR (Zaelenger et al 1999)、COI および ITS2 領域の塩基配列を調べた。

### C. 研究結果と考察

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。現在わが国においては豚のトリヒナ検査は実施されていないが、北海道のキツネの 14% が感染していることから、今後、流行地拡大および野生動物における感染率の増加の可能性も考えられる。今後、これらの公衆衛生上の重要性を調べるとともに、さらに大規模な調査が必要である。

## アライグマ回虫の調査と虫卵の遺伝子診断

### i. アライグマ回虫の神奈川地区における長期的監視体制確立の試み

#### A. 研究目的

過去 5 カ年間にわたり神奈川県内における野生のアライグマについてアライグマ回虫寄生調査を行ってきた。今年度は、「外来生物法」の施行を背景に、これまで生息頭数の急速な拡大にもかかわらずほとんど未調査であった横須賀地区のサンプル収集ができた。これらの地区から得られたデータを加えて神奈川県の基幹データとし、自治体の各行政機関に要請して、神奈川県におけるアライグマ回虫卵汚染監視体制の構築を図った。

## B. 研究方法

神奈川県環境農政部緑政課が実施した横須賀市大楠山地区の「アライグマの生息状況調査」と、横須賀市による有害鳥獣駆除事業との、両事業により2005年7月末より同年9月上旬までに横須賀市で捕獲されたアライグマの糞便について、アライグマ回虫卵の検索を行った。併せて、県の行政部により各市町の行政担当者等を対象として複数回開催された講習会において、アライグマ回虫の健康危害ならびに感染研によりこれまで実施してきた神奈川のアライグマ回虫調査について講演を行い、監視体制構築の重要性について理解を求めた。また、アライグマ駆除請負業者から送付されたアライグマ糞便の検査も引続き実施した。

## C. 研究結果

市内20ヶ所において捕獲された、雌40頭および雄51頭の計91頭(表1)のアライグマについて糞便検査を実施した。その結果、同市内の武と林の2ヶ所の地区で捕獲された2頭のアライグマから回虫卵ならびに虫体が検出された。これら検出された虫卵、虫体について形態学的観察ならびに遺伝子解析を行ったところ、いずれもタヌキ回虫であることが判明した。その他のアライグマ糞便からはいずれもアライグマ回虫およびその他の寄生虫卵は検出されなかった。また、神奈川県内の横須賀市を含む6市で捕獲された合計231頭のアライグマの便について検便を行ったが、先に述べた横須賀の2頭を除き、寄生虫卵は検出されなかった(表2)。

## D. 考察

これまで神奈川県横須賀・三浦地区はアライグマ個体数が最も急増している地区である。にもかかわらず、その駆除等に行政のかかわりが希薄であったため、糞便サンプル収集の手立てが得られず、アライグマ回虫汚染の実態は明らかではなかった。しかし、平成17年6月1日に「外来生物法」が施行されたのを機に、行政による調査や駆除が始動したことから、これまで未調査であった地区のアライグマについてもサンプル収集が可能となった。

これまでに行ってきた調査では、野生のアライグマにアライグマ回虫の寄生例は見つかっていない。今回の調査結果においても、現時点で神奈川県内のアライグマにはアライグマ回虫の寄生例は発見されなかった。これらの調査を通じて、県の衛研などの行政機関による定期的なサンプリングによる糞便検査の実施に向けての取り組みが開始された。検査体制の実質的な稼働は次年度以降になるが、今後

は神奈川県におけるアライグマ回虫卵汚染のモニタリングシステムが自治体として主体的に実施されることが期待される。定期的なサンプル収集は、これまで特定の市町に限られていたので、それ以外の地域からのサンプル収集とモニタリングの効率的な運用が今後の課題となる。

## E. 結論

神奈川県横須賀地区で捕獲されたアライグマについて、アライグマ回虫を主眼とした寄生虫検査を実施した。アライグマ回虫卵は検出されなかったが、タヌキ回虫が2例から検出された。その他の地区で捕獲されたアライグマも全て陰性であったことから、現時点では、野生のアライグマにアライグマ回虫寄生例はないものと判断された。

## ii. マルチプレックスPCRによるアライグマ回虫とタヌキ回虫との迅速鑑別

### A. 研究目的

アライグマにはアライグマ回虫だけでなくタヌキ回虫も寄生する。タヌキ回虫に比較して、アライグマ回虫のヒトなどへの病原性は極めて高いので、感染源となる虫卵で両種を正確に鑑別する事は重要な研究課題であった。そこで我々は、従来の形態鑑別に代替する方法として、両種に各々特異的なプライマーを用いたPCR法を開発し、両種を正確・客観的に鑑別できる事を明らかにした。本年度は、より迅速な鑑別法の確立を目指して、マルチプレックスPCR法の確立を試みた。

### B. 研究方法

アライグマ回虫とタヌキ回虫の成虫からDNAを調整し、両種に各々特異的なプライマーをまず作製し、これと線虫のリボソームDNAに対するコンセンサスなプライマー・ペアとを同時に用いて、ITS2領域のPCR増幅を試みた(マルチプレックスPCR)。また、イヌ回虫やクマ回虫の成虫からもDNAを調整し試験に供した。

### C. 研究結果

マルチプレックスPCR法により、予想サイズの種特異バンドが、アライグマ回虫(約400bp)とタヌキ回虫(約340bp)の各々から増幅された。更にこの両種からは、回虫に共通するバンド(約500bp)も同時に増幅された。一方、イヌ回虫やクマ回虫から調整したDNAからは、回虫に共通するバンド(約500bp)だけが増幅された。成虫由来のDNA材料を段階希釈して検討したところ、虫卵

1個から調整されるDNA量(約100ng)よりも相当少ない量のDNA(2.5ng)を用いても、同様の結果が得られた。

#### D. 考察

今回開発したマルチプレックスPCR法により、回虫であるとの同定と、アライグマ回虫かタヌキ回虫かの鑑別が同時に行い得る事が分かった。本法は感度も高く、虫卵1個を対象とした種鑑別にも適用できると推察された。

#### E. 結論

アライグマ回虫とタヌキ回虫とを虫卵で迅速に鑑別するためのマルチプレックスPCR法を開発・確立した。

#### F. 健康危険情報

「埼玉県における犬のエキノコックス症感染事例について(情報提供)」平成17年9月8日

北海道においてエキノコックス感染と診断された2例については担当の獣医師から迅速に届け出された。

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Casaravilla, C., Malgor, R., Rossi, A., Sakai, H., Nonaka, N., Kamiya, M. and Carmona, C. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection. *Parasitology International*, 54(1) 43-49 (2005)
2. Kato, N., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. Modified cellular immune responses in dogs infected with *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*, 95 339-345 (2005)
3. Kato, N., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. Immune responses to oral infection with *Echinococcus multilocularis* protoscoleces in gerbils: modified lymphocyte responses due to the parasite antigen. *Parasitology Research*, 96(1) 12-17 (2005)
4. Chang, S. L., Nonaka, N., Kamiya, M., Kanai, Y., Ooi, H. K., Chang, W. C. and Oku, Y. Development of *Taenia saginata asiatica* metacestodes in SCID mice and its infectivity in human and alternative definitive hosts. *Parasitology Research* 96(1) 96-101 (2005)
5. 長内理大、神谷晴夫 条虫の石灰小体の性状とその機能 弘前医学 56 37-44 (2005)
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 獣医寄生虫学会誌 3 (2) 31 (2005)
7. 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 獣医寄生虫学会誌 3 (2) 47 (2005)
8. 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 獣医寄生虫学会誌 3 (2) 32 (2005)
9. 野中成晃 飼い犬のエキノコックス感染とその診断 *Journal of Veterinary Medicine (JVM)* 58 341-342 (2005)
10. 奥祐三郎 気をつけようエキノコックス 北海道百科 4 101-103 (2005)
11. Kamiya, M., Ooi, H.K., and Oku, Y. Conference summary, symposium on infectious diseases of animals and quarantine *Emerging Infectious Disease* 11 5 (2005)
12. Matsuo K. and Kamiya H. Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *J. Parasitol.* 90 208-209 (2005)
13. Morishima Y, Sugiyama H, Arakawa K, Ohno J, Waguri A, Abe K and Kawanaka M. A coprological survey of the potential definitive hosts of *Echinococcus multilocularis* in Aomori Prefecture. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 58 327-328 (2005)
14. 山本徳栄、近 真理奈、山口正則、丹野瑛子、小山雅也、前野直弘、東 久、水澤 馨、木村 弘、森嶋康之、川中正憲 埼玉県内の犬の糞便から検出されたエキノコックス(多包条虫)の虫

- 卵 病原微生物検出情報 26 306 -307 (2005)
15. Hayashimoto, N., Aiba, T., Itoh, K., Kato, M., Kawamoto, E., Kiyojawa, S., Morichika, Y., Muraguchi, T., Narita, T., Okahima, Y., Takakura, A., and Itoh, T. Identification procedure for *Pasturella pneumotropica* in microbiologic monitoring of laboratory animals. *Experimental Animals*, 54(2), 123-129 (2005)
  16. 神谷正男 エキノコックス症 (犬) *Journal of Small Animal Medicine* 7(2) 34-40 (2005)
  17. Ishikawa, H. Mathematical modeling of *Echinococcus multilocularis* transmission, *Parasitology International*, 55S S259-S261 (2006)
  18. Nishina T, Chen TT, Fujita K, and Ishikawa H, A stochastic model of *Echinococcus multilocularis* focusing on protoscolex J. *Fac. Environmental Sci. & Tech. Okayama U.*, 11(1) 9-14 (2006)
  19. 野中成晃、井上實史、佐野隆史、片倉賢、福井大祐、奥祐三郎 多包条虫疫学調査への応用を目的とした野外採取糞便の排泄動物種鑑別法の検討 *日本獣医寄生虫学会誌* 4 (2) 38 (2006)
  20. 神廣創太、野中成晃、片倉賢、八木欣平、奥祐三郎 駆虫を組み合わせたプレパテント期における多包条虫感染の copro-DNA 診断 *日本獣医寄生虫学会誌* 4 (2) 39 (2006)
  21. 張秀玲、野中成晃、黄鴻堅、神谷正男、SCID マウスとスナネズミにおけるアジア条虫の幼虫の発育と人および代替終宿主に対するその感染能 *日本獣医寄生虫学会誌* 4 (2) 40 (2006)
  22. Morishima Y, Sugiyama H, Arakawa K and Kawanaka M. Intestinal helminths of dogs in northern Japan. *Veterinary Record* in press (2006)
  23. Chang, S. L., Ooi, H. K., Nonaka, N., Kamiya, M., and Oku, Y. Development of *Taenia saginata asiatica* cysticerci to infective stage and its tapeworm stage in Mongolian gerbils. *Journal of Helminthology* 80 (in press) (2006)
  24. Kamiya, M., J.T.G. Lagapa, Nonaka, N., Ooi, H. K., Kamiya, H. and Oku, Y. Current strategies against *Echinococcus* zoonosis in Japan. The scientific and Technical Review of the OIE., 2006, OIE (in press)
2. 学会発表
    - 1) 加藤尚子、野中成晃、松田 肇、片倉 賢、奥祐三郎、多包条虫 *Echinococcus multilocularis* 抗原の糖鎖解析, 第 74 回日本寄生虫学会, 米子コンベンションセンター (2005)
    - 2) 佐野隆史、井上實史、福井大祐、野中成晃、片倉 賢、神谷正男、奥 祐三郎, 野外採取した糞便の Multiplex-PCR による排泄動物の鑑別-多包条虫症の動物疫学調査への応用を目的として-, 同上 (2005)
    - 3) 井上實史、金井祐太、野中成晃、片倉 賢、神谷正男、奥 祐三郎, 北海道小樽市における駆虫薬入りベイト散布によるキツネの多包条虫感染率の低下, 同上 (2005)
    - 4) 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、関東および東北地方の動物病院に来院したイヌおよびネコを対象として行った消化管内寄生虫感染状況調査, 同上 (2005)
    - 5) Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. *Echinococcus multilocularis* Infection in Companion Animals in Japan and its Related Aspects for Health Risk Management, The 20th International Conference of The World Association for The Advancement of Veterinary Parasitology, ニュージーランド、クライストチャーチ (2005)
    - 6) Kamiya, M., Lagapa, J.T.G., Nonaka, N., Ooi, H.K., Oku, Y., and Kamiya, H. Japan's contribution for the control of echinococcosis in definitive hosts: in memory of Prof. Dr. Haruo Kamiya. *ibid.*, (2005)
    - 7) Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M., Control options for *Echinococcus multilocularis* in Japan from the veterinary point of view, Taeniasis/ Cysticercosis and Echinococcosis International Symposium with Focus on Asia and Pacific and The Third Congress of Federation of Asian Parasitologists focused on Cestode Zoonoses, 旭川市、旭川グランドホテル (2005)
    - 8) Kamiya, M. Use of in-house assays to enhance screening of zoonotic infections. in 7th OIE/WAVLD Seminar on Biotechnology on