

the Application of Biotechnology to Zoonotic Disease Diagnosis. Montevideo, Uruguay, 17 Nov (2005)

9) 野中成晃、佐野隆史、井上寛史、片倉 賢、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鑑別法の検討、第140回日本獣医学会学術集会、鹿児島、かごしま県民交流センター (2005)

10) 張 秀玲、野中成晃、ウィ・ホンキェン、神谷正男、奥 祐三郎、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宿主に対するその感染能、同上 (2005)

11) 神廣創太、野中成晃、片倉 賢、八木欣平、奥祐三郎、駆虫を利用した多包条虫のプレパテント期におけるDNA診断、同上 (2005)

12) Ikeda, T., Nonaka, N., Katakura, K., and Oku, Y. Comparison of den site selection by red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) in the two cities of Hokkaido, Ninth International

Mammalogical Congress (IM9), 札幌市 (2005)
13) 井上寛史、神廣創太、野中成晃、佐野隆史、片倉 賢、奥 祐三郎、糞便由来DNAによる糞主動物の鑑別と多包条虫の検出-糞便表面洗浄液を用いて-, 寄生虫学会北日本支部大会, 北海道江別市酪農学園大学 (2005)

14) 神廣創太、野中成晃、片倉 賢、八木欣平、奥祐三郎、プレパテント期におけるイヌの多包条虫感染の診断のための糞便内DNA検出, 同上 (2005)

15) 池田寛子、野中成晃、片倉 賢、奥 祐三郎、都市部に生息するキタキツネ (*Vulpes vulpes schrencki*) の営巣地選択について, 同上 (2005)

16) Ishikawa, H., Mathematical modeling of *Echinococcus multilocularis* transmission in Japan. Taeniasis / Cysticercosis and Echinococcosis International Symposium with Focus on Asia and the Pacific, Asahikawa, Hokkaido (2005)

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

分担研究者 神谷正男 酪農学園大学環境システム学部 教授

研究協力者 ホセ・T.ラガバ 中央ミンダナオ大学獣医学部 助教授
(ヒューマンサイエンス財団 リサーチレジデント)

同 スミヤ・ガンソリグ 環境動物フォーラム 研究員

同 小林文夫 環境動物フォーラム 研究員

同 岡崎克則 北海道倶知安町風土館 学芸員

同 金子正美 酪農学園大学環境システム学部 教授

研究の要旨

本年度(平成17年4月～平成18年3月)は、これまでの事業、エキノコックス症感染源対策：リスクの検出・分析・除去に関する研究、技術開発を継続したが、とくに以下の項目について検討した。

1. 虫卵排泄前の糞便サンプル PCR による診断

虫卵排泄前における多包条虫感染ペットの糞便 DNA による診断を犬の実験感染からの糞便材料により試みたが、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、より迅速かつ安定的なリスク検出へ向けた改善が必要と考えられる。

2. 北海道の感染源動物(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。

3. 大都市・札幌圏の野幌森林公園における調査

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～平成18年12月の期間、エキノコックス症感染源リスクの検出・分析・除去に関する調査をキツネ糞便内の抗原と虫卵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。

4. 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)との共同で実施した現地調査で、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。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。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)。

1. 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、犬や猫に実験的に感染させ、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

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日目には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。

C. 研究結果

下記の表の上の数字は投与虫体数、下にある数字は、剖検時に回収された虫体数を示している。特異的バンドの有無で陰性、陽性を判断した。

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、プレパテントピリオドの感染犬においては、糞便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。

犬2例(犬FおよびG)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

投与原頭節数	1,000,000	150,000	150,000	150,000	1,000	200,000	200,000
DPI	イヌA	イヌB	イヌC	イヌD	イヌE	ネコA	ネコB
0	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	-	+	ND	ND
2	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	ND	ND
5	-	-	-	-	-	-	ND
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	-	ND	ND
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	ND
15	+	-	-	-	-	+	-
16	-	-	-	-	-	+	-
17	-	-	-	-	-	ND	ND
18	-	-	-	-	-	ND	+
19	-	-	-	-	-	+	-
20	-	+	-	-	-	ND	ND
21	-	ND	ND	ND	+	-	-
22	ND	ND	-	-	-	-	-
回収虫体数	530,500	64,920	48,560	77,060	900	4500	4500
定着率	53.1%	43.3%	32.6%	51.4%	90.0%	2.3%	2.3%

投与原頭節数	100,000	10,000
DPI	イヌF	イヌG
0	-	-
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14a	-	+
14b	+++++	---++
14c	+++++	ND
15	---+++	---++
16	-----	-----
17	ND	ND
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
回収虫体数	0	0

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 箇所でバンドが検出され、駆虫後 9 時間と、駆虫翌日では 2/5 箇所で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。

D. 考察

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。

E. 結論

虫卵排泄前における感染ペットの糞便 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

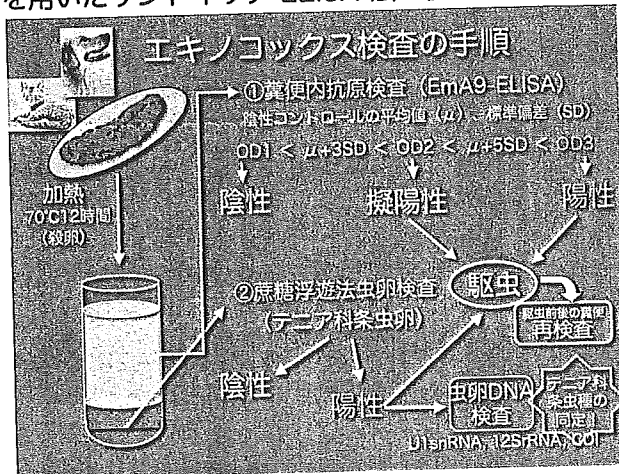
2. 北海道のペットの調査

A. 研究目的

北海道の飼い犬および飼い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把握のために、ペットの糞便検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(平成 17 年 4 月-平成 18 年 3 月)も北海道内の動物病院から依頼された糞便について検査を継続した。糞便内抗原はモノクローナル抗体 EmA9 を用いたサンドイッチ ELISA 法で検査し、テニア



科条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症例については、虫卵の DNA の検査を行い、多包条虫であることを確認した。エキノコックス感染と判断された場合は、ガイドラインに沿って、担当獣医師に届け出の必要性和感染犬周辺の虫卵汚染の可能性と、対策の必要性を説明し、飼い主の感染の可能性があるため、保健所と連絡を取り、血清検査を受診することを勧めた。

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

年には約 1000 頭の依頼があったが、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、これら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кок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кокスに感染していることが判明し、これらの症例はすべて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кокスに対する関心が薄れてきているものと憂慮される。

3. 大都市・札幌圏の野幌森林公園における調査

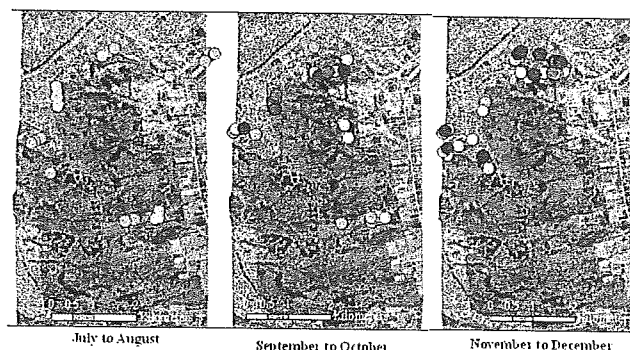
A. 研究目的

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、糞便の多くは公園辺縁の道沿い、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。

4. 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。

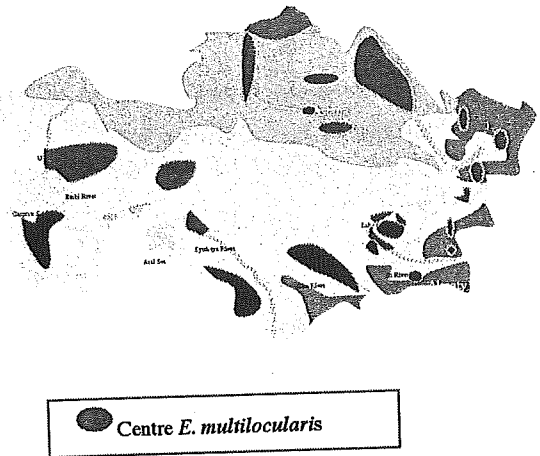
C. 研究結果

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. スクリヤピ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。

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. 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)
 6. 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)
 7. Kamiya, M., Ooi, H.K. and Oku, Y. Conference summary, symposium on infectious diseases of animals and quarantine. *Emerging Infectious Disease*, 11, 5, (2005)
<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no05/04-1348.htm>
 8. 神谷正男 エキノコックス症 (犬) . *Journal of Small Animal Medicine*, 7(2), 34-40, (2005)
 9. 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)
 10. 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)
 11. Kamiya, M. et al. Current strategies against *Echinococcus* zoonosis in Japan. *Rev Sci Tech Off Int Epiz(OIE) 2006*;25 (in press).
 12. 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, (in press)
2. 学会発表
1. 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)
 2. 佐野隆史、井上貴史、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-. 第 74 回日本寄生虫学会, 米子コンベンションセンター, (2005)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)
 6. 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)
 7. Kamiya, M. Use of in-house assays to enhance screening of zoonotic infections. in 7th OIE/WAVLD Seminar on Biotechnology on the Application of Biotechnology to Zoonotic Disease Diagnosis. Montevideo, Uruguay, 17 Nov, (2005)
 8. 張秀玲、野中成晃、ウィ・ホンキェン、神谷正男、奥祐三郎. 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宿主に対するその感染能. 同上, (2005)

エキノコックス症の感染源対策

(ベイト散布による感染源対策、本州におけるペット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)

分担研究者	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	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	野中成晃	北海道大学大学院獣医学研究科	講師
研究協力者	岡崎克則	北海道倶知安町風土館	学芸員
研究協力者	金子正美	酪農学園大学環境システム学部	助教授

研究の要旨

1) 我々は、エキノコックスの感染源対策のために1998年から農村地帯(小清水)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を確立してきた。今後住民が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、2004年および2005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、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。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、予め状況の把握されている地域では地域住民に感染源対策技術移転が可能であることが示された。2) 次に、山間部におけるベイト散布法を検討するために、2001年より小樽市の山沿いおよび山間部の道路での散布を試みてきた。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。3) 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、倶知安町で技術移転を試み、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。各月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ることが示された。さらに、7-9月ではエキノコックスの流行状況(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、倶知安町ではベイト散布を計画している。4) 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年度は主要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。本州での流行状況の確認のために東北のペット調査を継続しているが、2005年度も感染動物は発見されなかった。エキノコックスの研究に加えて、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、診断のための糞便内の抗原検出法の有用性を示した。

1. 農村地帯のベイト散布による感染源対策

A. 研究目的

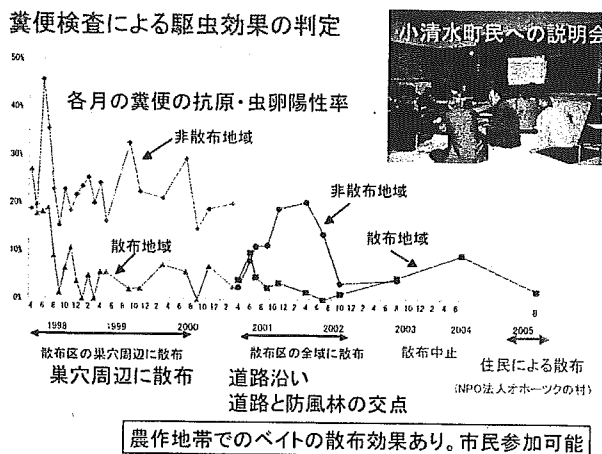
すでに我々は、小清水町の農村地帯におけるベイト散布法についてはほぼ確立し、今後住民が実施できるように技術移転を試みた。すなわち、2004年および2005年においてベイト散布を行わず、キツネにおける感染率が上昇した小清水町において、ベイトの散布法およびキツネの糞便採取法を地域住民(NPO法人オホーツクの村)に技術移転を試みた。

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、ベイト散布法について説明を加えた。その後、小清水町を自動車で同伴して回り、数カ所の地点における散布法を示した。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

1998年から2005年までのベイト散布地域と非散布地域の感染状況(抗原および虫卵陽性糞便数/全採取糞便数)の推移を下記の図に示した。ベイト散布前は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、糞便の抗原および虫卵陽性率が



2%に減少し、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ベイトを散布し、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、今年度は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(糞便採取地点、ベイト散布地点)を収集していれば、研究者から短時間の住民への講習で、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。これについては倶知安の節で記載する。

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. 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 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(プラジカンテル)入りベイト散布を1 km²あたり約20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



主に山間部の道路沿いに自動車からベイト散布(密度: 約20個/km)

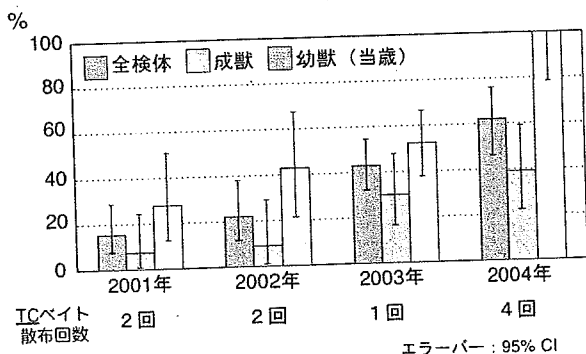
	2001年	2002年	2003年	2004年
散布地域	西側半分	全域	全域	全域
散布頻度	2回(5,6月)	2回(6,7月)	7回(5-11月)	7回(5-11月)
バイオマーカーベイト散布	2回	2回	1回(6月)	4回(5-8月)

流行状況の推移についてキツネを検査した。

C. 研究結果

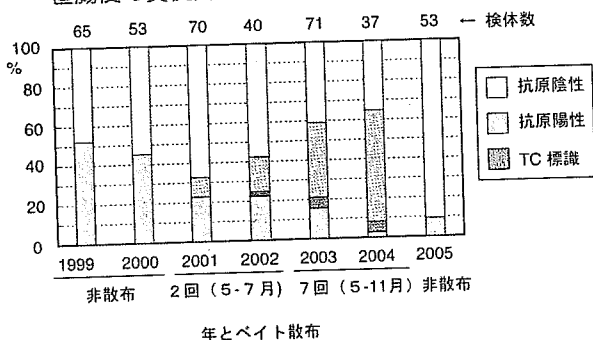
キツネによるベイト摂取を犬歯のテトラサイクリン沈着により調べたところ、2003年では1回のみでも45%の摂取率で、2004年の4回散布では60%(幼獣100%、成獣40%)となった。

キツネのベイト摂取状況 (テトラサイクリン標識陽性率)
(当該年度の標識のみを対象)



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。

6-9月に小樽において捕獲されたキツネの直腸便の糞便内抗原陽性率



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、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、10%程残っており、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。

3. 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開始した。

B. 研究方法

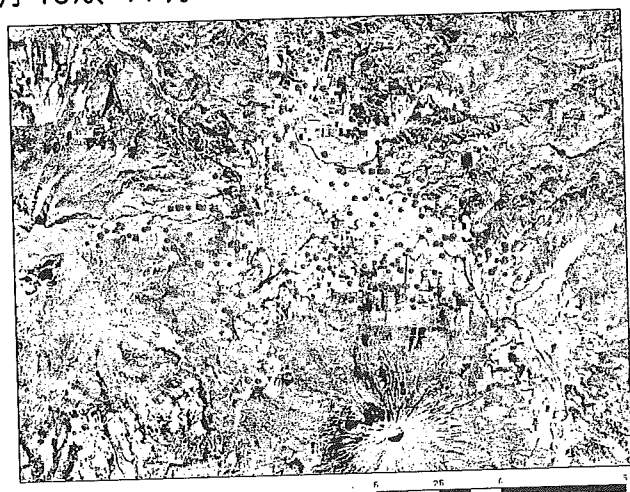
まず、現地の地図および航空写真を利用し、糞便採取ルートを打ち合わせし、一度現地で糞便採取を地域住民とともに実施した。なお、この時虫卵感染の危険性と感染予防については十分に注意を喚起した。また、町全体の虫卵汚染状況を把握するために、出来るだけ町全体をカバーするようにキツネ糞便を採取し、パイアスを防ぐために、偏らないように採取することを説明した。また、今後の糞便採取を容易にするために、すべての採取ポイントをプロットし、季節変動を把握するために、7月、9月、11月に採取するように指示した。

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

糞便を各月 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、採取地点を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井子とが示された。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る。

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。各月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。

4. 本州におけるペットのエキノコックス調査

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。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 ヶ所から犬、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。

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	1	3.4
マンソン裂頭条虫	2	6.9

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	2	12
マンソン裂頭条虫	1	6

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。

5. エキノコックス伝播の数理モデルの開発

A. 研究目的

エキノコック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、捕食感染野ネズミより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。合わせてエキノコックス・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

i. ストカステックモデルの構成

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テ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、感染経験に基づく免疫作用を組み込んだ。

ii. 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テ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。

6. その他

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。アジア条虫の囊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。ポ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。これは継続的なプレドニゾ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。

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) 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: 96-101. (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) Kato, N., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. Modified cellular immune responses in dogs infected with *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*, 95(5): 339-345. (2005).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 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 3(2): 30. (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 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., 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) Ishikawa H. Mathematical modeling of *Echinococcus multilocularis* transmission, *Parasitology International*, 55S, S259-S261 (2006)
- 14) Nishina T, Chen TT, Fujita K, Ishikawa H. A stochastic model of *Echinococcus multilocularis* focusing on protoscoles. *J. Fac. Environmental Sci. & Tech. Okayama U.*, 11(1). 9-14 (2006)
- 15) Chang, S. L., Ooi, H. K., Nonaka, N., Kamiya, M., Oku, Y., Development of *Taenia saginata asiatica* cysticerci to infective stage and its tapeworm stage in Mongolian gerbils. *Journal of Helminthology* 80, 1-5. (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、井上貴史、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) 井上貴史、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バ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) 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)

7) 野中成晃、佐野隆史、井上貴史、片倉 賢、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鑑別法の検討, 第140回日本獣医学会学術集会, 鹿児島, かごしま県民交流センター (2005)

8) 張 秀玲、野中成晃、ウィ・ホンキエン、神谷正男、奥祐三郎, 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宿主に対するその感染能, 同上 (2005)

9) 神廣創太、野中成晃、片倉 賢、八木欣平、奥祐三郎, 駆虫を利用した多包条虫のプレパテント期における DNA 診断, 同上 (2005)

10) Ikeda, T., Nonaka, N., Katakura, K., and Oku, Y. Comparison of den site selection by red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) in the two cities of Hokkaido, Ninth International Mammalogical Congress (IM9), 札幌市 (2005)

11) 井上貴史、神廣創太、野中成晃、佐野隆史、片倉 賢、奥祐三郎, 糞便由来 DNA による糞主動物の鑑別と多包条虫の検出-糞便表面洗浄液を用いて-, 寄生虫学会北日本支部大会, 北海道江別市酪農学園大学 (2005)

12) 神廣創太、野中成晃、片倉 賢、八木欣平、奥祐三郎, プレパテント期におけるイヌの多包条虫感染の診断のための糞便内 DNA 検出, 同上 (2005)

13) 池田貴子、野中成晃、片倉 賢、奥祐三郎, 都市部に生息するキタキツネ (*Vulpes vulpes schrencki*) の営巣地選択について, 同上 (2005)

14) Ishikawa, H., Mathematical modeling of *Echinococcus multilocularis* transmission in Japan. Taeniasis / Cysticercosis and Echinococcosis International Symposium with Focus on Asia and the Pacific, Asahikawa, Hokkaido (2005)

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動物医学研究室

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

エキノコックス汚染拡大を防止するための診断薬として、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。前年度の検討により、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) 方式が高い特異性を示すことが確認できた。そこで本年度は引き続き 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。

A. 研究目的

本寄生虫感染動物を摘発・治療し、汚染拡大を防止するためには、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試薬が必要である。そこで本研究ではこれらの条件を満たす検査法として、エキノコックスモノクローナル抗体を補足抗体としたイムノクロマト法による本感染症の診断のためのインハウスキットの開発・実用化を検討した。

B. 研究方法

1. 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 HD と FD の感度・特性を従来法である ELISA と比較した。

2. 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 万個を感染させたビーグル犬から、経日的に糞便を採取し、HD および FD の検出感度を ELISA と比較した。

3. 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

1. 野外および感染実験糞便における検討

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。

2. 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。

3. 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 μ l から 100 μ 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

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、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。

エキノкокスの全長cDNAの解析

(多包虫の全長cDNAライブラリの作成と5'端解析)

研究分担者 渡辺純一 東京大学医科学研究所助手
研究協力者 豊田敦 理化学研究所上級研究員

研究の要旨

北海道大学では、エキノкокス(多包条虫)の生態を解明する目的で、虫体をスナネズミの腹腔内で増殖させる系を確立し、野外から採取したエキノкокスを研究室内で維持してきた。今回、本条虫の分子生物学的解明を目的として、多包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кокス由来のクローンと推定された。本ライブラリは、エキノкок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。

A 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кок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кок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 材料と方法

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 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。

We welcome your comments and feedback about our database. Please feel free to contact us..... jwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

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

（本州におけるエキノコックス症の動物疫学調査、北海道の多包虫症流行抑制対策と廃棄物処理の実態調査、中国青海省におけるエキノコックス症の疫学調査、犬のエキノコックス症診断法の検討、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、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）

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	和栗 敦	青森県環境保健センター主任研究員
同	寺田秀幸	青森県十和田食肉衛生検査所検査第一課長
同	土井陸雄	横浜市立大学名誉教授（衛生学）
同	余森海	中国疾病予防センター寄生虫病研究所

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、犬の監視体制を構築することが重要である。今年度は、昨年度に引き続いて青森県での監視を重視したが、埼玉県の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。北海道内でのキツネ対策としての廃棄物処理の実態調査は、改善すべき行政の問題点を明らかにした。また、中国青海省におけるエキノコックス症調査研究により、この地での濃厚侵淫状況を明らかにすると共に、今後の対策研究に必要な生物材料を得る事が出来た。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べく重点的な調査研究を行った。その結果、当該地のアライグマには少なからずタヌキ回虫の寄生が認められたことから、今後の監視に必要な回虫卵の分子同定の迅速鑑別法を開発した。

1. 本州におけるエキノコックス症の動物疫学調査

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、引き続きキツネ及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オ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。

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。

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る 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。

一方、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。

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本虫拡散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、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