

## 町内で北大獣医学研究科寄生虫学教室による「エキノコックス」の調査が行われています



### エキノコックスって何？

エキノコックスは寄生虫の一種です。成虫はキツネに、幼虫は野ネズミに主に寄生します。成虫は卵を作り、その卵が何らかの原因で人の口に入ると、腸で幼虫になり、やがて肝臓に寄生してエキノコックス症という病気を引き起こします。

### どのように感染するの？

エキノコックスの卵が口に入ってしまった場合に感染します。エキノコックスが寄生したキツネやそのふんに直接さわったり、ふんに汚染された山菜や水を口にすると感染の危険があります。「人から人」や「豚や野ネズミから人」に直接感染することはありません。

### エキノコックス症ってどんな病気？

感染してから自覚症状が出るまでに数年から10数年かかり、気がつかないうちに悪化してしまう病気です。放っておくと命にかかわることもあります。

### 平成10年から調査実施

同大学では、平成10年から町内のキツネの調査と駆虫薬散布によるエキノコックス対策を行っています。毎年、6月に繁殖状況調査を行い巣穴を確認し、駆虫薬を散布。その後、巣穴の周辺地域を巡回してふんの採取を行い、感染状況を調査しています。昨年は「報告会」を行い、その調査結果を町民の皆さんにお知らせしました。

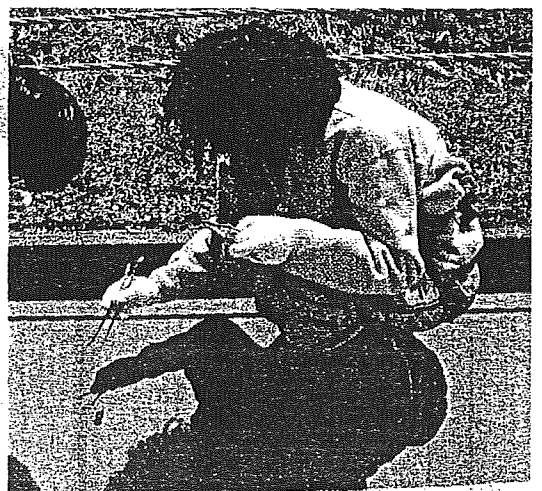
### ～調査研究班より～

同教室(神谷正男教授)に所属する浜崎今日子さんは、調査のため年6回本町を訪れています。巣穴の確認やふんの採取など、1回の調査に2～3週間かかる根気のいる調査です。浜崎さんによると「本調査では小清水町農協や農家の方々にご協力いただき、今年もキツネの巣穴を多数確認することができました。小清水町に生息するキツネの数は以前に比べ、だいぶ減ってきているようです。ふんの採取は、畑の周りなどを歩き行うので、農家の方々にご迷惑をお掛けしています。作業着姿で袋を手に持ち、怪しい格好かもしれませんが、皆さんのご理解をお願いします。」ということです。

同調査への皆さんのご協力をお願いします。



同調査を行っている浜崎さん



キツネの糞便

真冬のベイト散布と道路上のキツネの糞の採取

日以内に投薬すると、虫卵を作る前に成虫を駆虫できます。すでに虫卵排泄している場合も、その後の虫卵排泄を止めることができます。感染の機会があった飼い犬を道外へ移動するときには、駆虫してから行ったほうがよいと考えられますが、そのような対策はまだとられていません。

今後のエキノコックス対策

人への感染防止は虫卵を経口摂取しないことなので、まず手洗いを励行し、山菜や野菜などはよく水洗いし、沢水は飲まず、キツネや野犬との接触をしないように注意します。このようなことは一般衛生としても当然必要です。しかし、多包虫患者が他の人より一般衛生的な事柄を怠っていたという事実はないようで、偶発的に虫卵を摂取したものと考えられます。本人の注意だけでなく、家族全員の注意が必要です。しかし、子供ではこのような衛生的な対処がより困難です。早期診断のための血清診断の受診促進など、道民への十分なエキノコックス症についての啓蒙活動が必要です。エキノコックスに対する検診だけでなく、一般検診や成人病健康診断などでも患者が発見されます。最近では、このような症例が多いのです。

虫卵が人の口に入る経路はいろいろ考えられ、注意していても、偶発的に虫卵が人の口から取り込まれることがあります。これらのことも考慮すると、地域のキツネや犬から虫卵を排泄させないような対策が最も確実であると考えられます。礼文島からはキツネや犬がいなくなり、エキノコックスが撲滅されました。しかし、野生動物保護の観点からも、実際的にも、北海

道からキツネをすべてなくすことは困難です。

私の属する研究室では、1997年から農村地域において駆虫薬入り餌（ベイト）を野外で散布し、その地域に生息する野生のキツネの駆虫を試みてきました。研究当初はキツネの巣穴をできるだけ多く探して、その周辺にベイトを定期的に置きました。この作業は真冬でも継続し、担当した大学院生も大変でした。その後は、道路沿いに均等に、さらに最近ではキツネの通り道を考慮し、道路と防風林の交点に重点的にベイトを散布しました。駆虫効果を評価するために、野外で多数のキツネの糞便を採取し、これらの糞便中に含まれる虫卵の陽性率の推移を調べたところ、環境内への虫卵汚染が抑えられることが示されました。これらの数年間の現地調査・研究には、多数の大学院生・研究生、さらに現地の協力者の多大な援助によってようやく

The complex block contains several elements:

- Table:** A table with columns for '北海道' (Hokkaido) and '札幌市' (Sapporo), listing various organizations and their phone numbers for Echinococcus-related inquiries.
- Diagram:** A circular diagram titled 'エキノコックスの寄生サイクル図' (Echinococcus Parasitism Cycle Diagram) showing the cycle between a dog, a fox, and a human.
- Leaflet:** A leaflet titled 'エキノコックス症の知識予防' (Echinococcus Knowledge Prevention) featuring a fox illustration and numbered sections (1-5) detailing prevention methods.

北海道庁が配布しているエキノコックスのパンフレット

実施できました。また、調査中に小川に落ちたり、自動車が大破したりなど様々なハプニングがありましたが、幸いケガもなく、これらの研究を行うことが出来ました。

このようなベイト散布によるキツネの駆虫の試みは、ドイツでも実施され、環境内のエキノコックス虫卵汚染を低く抑えることに成功しています。今後、広範囲にかつ継続的にベイト散布を実施するためには、費用対効果の評価が必要です。日本では全く患者が出ていない狂牛病に対して、2001年と2002年度で3500億円の対策費が出されたようです。エキノコックス症は感染後十数年して発症する疾病で、今後の患者数の増加（現在では毎年10-20名）、北海道観光、道産品の安全確保、消費者の反応、今後の道外への分布拡大などについても考慮し、効果を評価する必要があります。行政の対応は一般に遅いので、地域住民自身による対策でも小規模では可能と考えられます。改良の余地はありますが、研究段階から実地に移し、ベイト散布の実地における問題点も把握すべき段階と考えられます。

今日の日本において人の寄生虫症はまれで、ほとんど問題がないと考えられがちですが、エキノコックスについてはより問題が深刻になってきています。多包条虫は本来キツネと野ネズミの寄生虫ですが、このままでは北海道だけで患者が毎年数十名



発生するようになることも予想されます。ヨーロッパ諸国のような大陸ではエキノコックスの根絶が困難なため、キツネの感染を低レベルに抑えることが目標となり、ベイト散布を継続する必要があります。しかし、北海道は島であり、周辺から隔離されているという利点を生かして、エキノコックスの根絶についてもチャレンジする価値があると考えます。患者の発生率は少ないので、あまり恐れる必要はありませんが、あなどらないことも必要です。

#### 参考資料

山下次郎 増補神谷正男 増補版「エキノコックス その正体と対策」北海道大学図書刊行会  
札幌1997年

北海道大学獣医学部寄生虫学教室ホームページ  
<http://vpcserv.vetmed.hokudai.ac.jp/>

北海道庁ホームページ

<http://www.pref.hokkaido.jp/hfukusi/hf-hyobo/ekino/>

北海道立衛生研究所ホームページ  
<http://web.iph.pref.hokkaido.jp/>

#### おく・ゆうざぶろう

1976年帯広畜産大学卒業。北海道大学大学院獣医学研究科進学。寄生虫学教室の助手を経て、1990年より助教授。札幌や小樽でキツネのエキノコックス調査やベイト散布を行って、数年分のデータを集積中。その他ペットの感染状況の調査など。1991年にはJICA 専門家としてウルグアイで単包条虫の研究に従事した。

# 幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫

杉山 広<sup>1)</sup>・森嶋康之<sup>1)</sup>・坂本京子<sup>1)</sup>・亀岡洋祐<sup>2)</sup>・川中正憲<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 国立感染症研究所寄生動物部, <sup>2)</sup> 同・遺伝子資源室

## Raccoon roundworm, *Baylisascaris procyonis*, as a cause of larva migrans

Hiromu Sugiyama<sup>1)</sup>, Yasuyuki Morishima<sup>1)</sup>, Kyoko Sakamoto<sup>1)</sup>, Yosuke Kameoka<sup>2)</sup>,  
and Masanori Kawanaka<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Parasitology and <sup>2)</sup> Division of Genetic Resources, National Institute of Infectious Diseases

要約：アライグマを固有宿主とするアライグマ回虫は、ヒトを含む非固有宿主の中樞神経系に侵入して致死的な幼虫移行症を引き起こす。わが国では、動物園・動物展示施設で飼育中のアライグマに依然として本虫の寄生が見られ、これに由来する神経幼虫移行症が最近ウサギで集団発生したことから、十分な注意が必要である。アライグマは野外にも定着して、しかも分布域を広げている。現在まで野生アライグマからアライグマ回虫は検出されていないが、タヌキ回虫陽性の個体が関東地方で見出された。アライグマに由来する回虫卵の同定に当たっては一層正確な鑑別が必要となり検討したところ、少数の虫卵でも同定・鑑別が可能な方法をPCRで確立した。今後もアライグマを対象とした広範な調査・対策を継続し、アライグマ回虫の汚染が広がらないよう監視を続ける必要がある。

### 1. はじめに

アライグマを固有宿主（終宿主）とするアライグマ回虫 *Baylisascaris procyonis* は、ヒトを含む非固有宿主（待機宿主）の中樞神経系に侵入して致死的な幼虫移行症を引き起こす。北米ではアライグマ回虫の寄生がアライグマに普通に見られ、人体感染例も発生していることから、本虫に

よる幼虫移行症が公衆衛生上の重大な問題となっている[9]。わが国では人体症例の報告はないが、動物園・動物展示施設で飼育中のアライグマに本虫の寄生が見られ[11]、これに由来する神経幼虫移行症がウサギで集団発生した[15, 16]ことから、十分な注意が必要である。本稿では、第133回日本獣医学会学術集会における日本獣医寄生虫学会シンポジウム「人獣共通寄生虫症 III」で発表した講演を基に、アライグマ回虫の生物学、アライグマ回虫による幼虫移行症の症状・診断・治療・予防、およびわが国における疫学の現状について概説する。また虫卵を材料としたアライグマ回虫の同定・鑑別法について、筆者らが現在までに得た成果についても簡単に紹介したい。

### 2. 病原体と生活環（図1）

アライグマ回虫の成虫は円筒形を呈し、体長は雄が9～11cm、雌は20～22cmで、アライグマの小腸に寄生する。雌成虫は1匹あたり1日に12万～18万個の虫卵を産出し、これが糞便に混じて体外へ排出される。虫卵は類円形（長径約72μm×短径約64μm）で蛋白膜が厚く、その表面は縮緬様を呈する（図2Aおよび2C）。体外排出時の虫卵は単細胞卵であるが、適当な温度条件の下11～14日で体長が0.27mm程度の感染幼虫を卵内に認

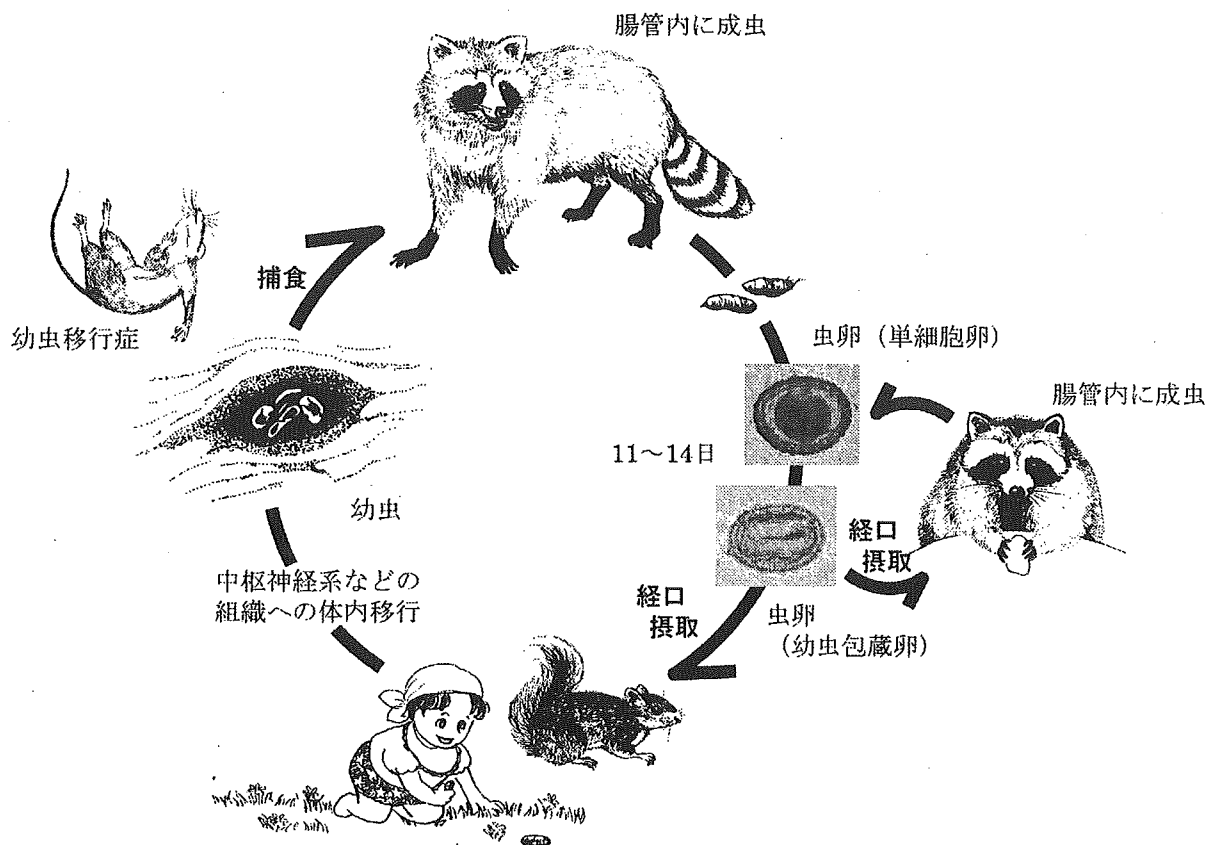


図1 アライグマ回虫の生活環。

める幼虫包蔵卵となり、感染能力を持つようになる。本虫はアライグマに二つの経路で感染する[9]。第一は幼虫包蔵卵を直接経口摂取することで成虫感染に至る経路である。第二は体内にアライグマ回虫の幼虫を宿すネズミなどの小動物を捕食すること、つまりある程度発育した幼虫を摂取することで成虫感染に至る経路である。ヒトはネズミなどの小動物と同様に幼虫包蔵卵を経口摂取してアライグマ回虫を体内に取り込む。体内に侵入した幼虫は、その後体長を2.0mm 近くにまで急速に増大しながら体内各部を移行する。特に中枢神経系に侵入した場合には組織に与える障害が大きく、激しい症状が引き起こされる。このような病気をアライグマ回虫による幼虫移行症と呼ぶ。幼虫移行症はイヌ回虫 *Toxocara canis* やネコ回虫 *T. cati* の感染によっても引き起こされる。しかしながら、これらの幼虫は非固有宿主体内では体長が0.5mm 前後に達すると発育が止まる[11]。すなわちアライグマ回虫による幼虫移行症が重篤となるのは、体内移行中の幼虫が相当の大きさに

まで急速に発育し、中枢神経系への障害が大きいためと考えられる。

### 3. 症 状

ヒトでは摂取した虫卵の数と幼虫の移行部位に依存して、以下の幼虫移行症が観察される[9, 10]。  
 (1) 神経幼虫移行症：好酸球性髄膜脳炎となる。米国では1981年に死亡した症例からアライグマ回虫の幼虫が証明されて以来、本虫を原因とする重度のあるいは致死性の脳炎症例が少なくとも12例確認されている。そのうち10例は6歳以下の小児で、少なくとも5名が死亡しており、生存例でも発育障害や神経系の後遺症を認めている。  
 (2) 眼幼虫移行症：成人を中心に一側性の網膜炎となる。検眼鏡による虫体の検出例や、レーザーを用いた幼虫の殺滅(光凝固)が試みられた症例も報告されているが、視力障害を残し失明に至ることもある。

動物でも激しい神経症状を示し死に至る神経幼虫移行症の症例が報告されている[9]。わが国

でウサギに集団発生した幼虫移行症例では、斜頸・歩様異常・旋回などの神経症状が観察されている [15]。

#### 4. 診断と治療

アライグマ回虫の寄生がアライグマに見られる地域で、アライグマやその糞便と接触した者が、突発性の好酸球性髄膜脳炎を発症した場合に、本虫による幼虫移行症が疑われる。脳脊髄液・末梢血の好酸球増多・特異抗体の上昇、および MRI での深部白質病変を総合して、本虫による神経幼虫移行症と診断される。アライグマ回虫の幼虫が中枢神経系に移行して神経症状が発現すると、抗線虫薬を投与しても治療効果は期待できない。しかしながら、感染後 1～3 日の内に抗線虫薬（アルベンダゾール、20～50mg/kg/日、10日間）を投与すれば、中枢神経系に侵入する前の虫体に作用して発症が抑制されることから、虫卵摂取の危険がある場合は（予防的）投薬が推奨されている [10]。

#### 5. 予 防

糞便に混じて外界へ排出された虫卵は、幼虫包蔵卵として数年にわたり感染能力を保持し、感染源となる。発症後の治療がほとんど期待できないので、虫卵（幼虫包蔵卵）を口に入れないという予防的な措置が何よりも大切である。このため、由来の不明なアライグマやその糞便との接触を避けることが重要である。飼育下にあるアライグマへの対策としては、糞便検査を繰り返し、陽性個体が見つければ抗線虫薬で確実に駆虫し、虫卵による以後の環境汚染を防ぐことが重要となる。薬剤で虫卵を殺滅させることはほとんど不可能なので、陽性例が見つかった施設は器材をすべて煮沸・焼却し、展示場・飼育場は土壌も含めて火炎やスチームで処理して、虫卵による汚染を完全に除去しなければならない。これには相当の困難を伴うので、アライグマの新規導入に際しては何よりも検査を徹底することが重要である [4, 6]。

#### 6. 疫学：わが国での現状

アライグマは本来わが国には生息していなかつ

た動物である。1977年にアライグマを主人公としたテレビアニメが放映されたことから、以後ペットとして輸入される数が急増し、多い時には年間 1,500頭を数える個体が検査を受けることなく輸入されてきた（2000年にアライグマは狂犬病予防法の検査対象動物に追加され、輸入時の係留が必要となり、輸入頭数が激減した）。その結果、諸施設や一般家庭で飼育されたアライグマは現在までに総計 2 万頭を越えると推定され、その一部が逃亡あるいは遺棄されて野外で定着・繁殖している現状がある。野生アライグマが確認された都道府県は 10 年前には 15 であった [11] が、最近では 32 にまで拡大している [7]。このような野生アライグマの糞便材料についても検索を続けているが、幸いにして現在までアライグマ回虫陽性個体は認めていない。

わが国の動物園飼育のアライグマにアライグマ回虫が寄生していることは既に報告されている [11]。現状を把握し対策を立てるために、社団法人日本動物園水族館協会所属の 98 動物園と非所属の 238 動物展示施設とを対象として、アライグマとアライグマ回虫に関するアンケート調査を実施した。その結果、計 82 施設でアライグマが飼育され、飼育総数は 400 頭を越えることが分かった。アライグマ回虫に関しては 46 施設からアライグマの糞便あるいは土壌などの送付を受け、虫体の送付を受けた施設を含めて 7 施設のアライグマに寄生が認められることを明らかにした [5, 8]。この中には「回虫は駆虫済み」とした施設も含まれ、汚染群の清浄化が非常に困難であることが示された。

アライグマはこの他、学校などの施設や家庭でペットとして、また鳥獣商の下でペット用として飼育されている。ペットとしてのアライグマに本虫が寄生していることは既に報告がある [11] が、検索範囲を全国に広げての調査が不可欠で、新たに陽性個体が見つければ駆虫と虫卵対策を進める必要がある。野生アライグマに本虫の感染を広げないためにも、飼育アライグマを対象とした調査・対策を継続しなければならない。

## 7. アライグマから見出したタヌキ回虫：本州での検出例

野生化アライグマの糞便材料を検査している過程で、神奈川県のアライグマから回虫卵が検出された。この個体を安楽殺・剖検し、腸管から検出した成虫を精査したところ、虫体は間唇を欠く、食道後部に膨大部（胃）を認める、交接刺が非常に長い、雄の総排泄孔付近に微細乳頭群を認めない、などの特徴が観察された。タヌキを固有の宿主とするタヌキ回虫 *Toxocara tanuki* と同定した [12]。野生化アライグマのタヌキ回虫感染例は北海道で報告されていた [1, 17] が、本州でも寄生していることが確認された。タヌキ回虫は

マウスで幼虫移行症を引き起こすが、アライグマ回虫のような強い病原性はない [14]。

タヌキ回虫の虫卵は類円形（長径約68 $\mu$ m × 短径約59 $\mu$ m）で蛋白膜が厚く、その表面はゴルフボールのようで深い陥凹を認めた（図2B および 2D）。アライグマ回虫卵の蛋白膜表面は縮緬様であることから、両者の良い鑑別点となる。フォーカスを少し浅くして虫卵を鏡検すれば、この違いはより明瞭となる（図2C および 2D）。しかしながら保存状況が悪い少数の虫卵しか観察できない場合には、形態に基づく虫種判別が容易でないことを経験した。そこで正確な種の鑑別に分子生物学的手法が利用できないか検討した。

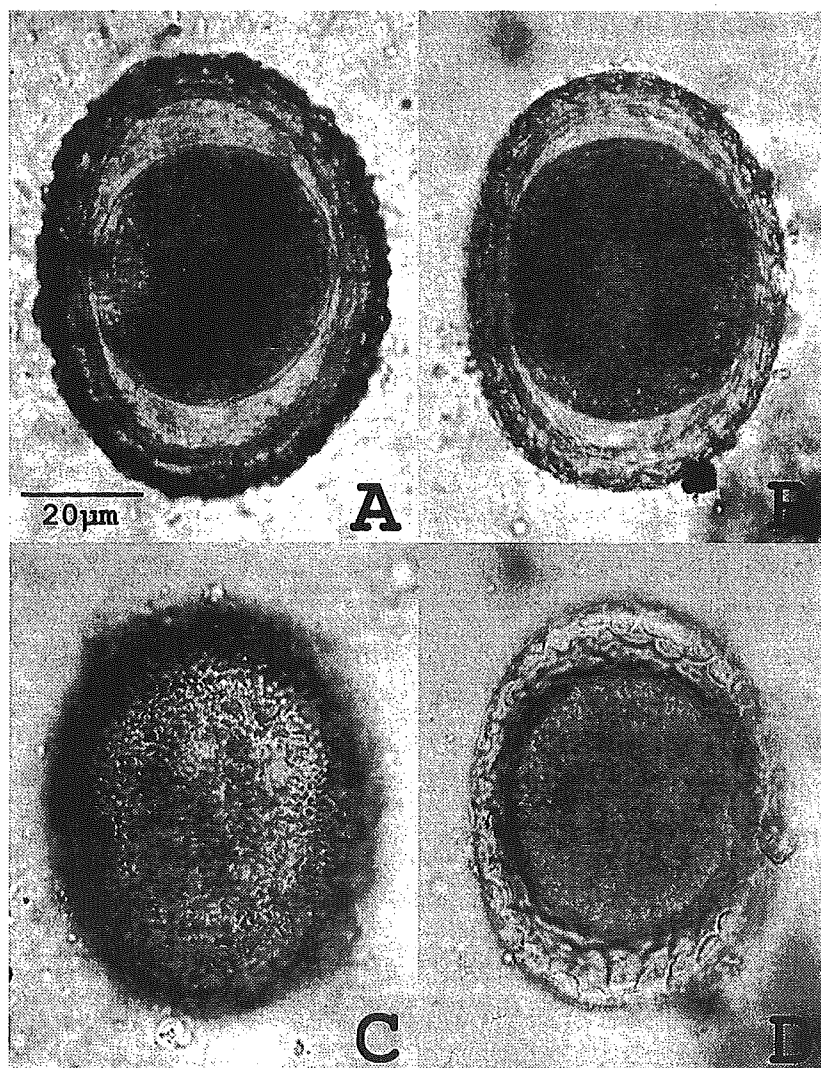


図2 アライグマ回虫卵（AおよびC）およびタヌキ回虫卵（BおよびD）の顕微鏡写真、強拡大像。虫卵はいずれも類円形で蛋白膜が厚い。蛋白膜表面はアライグマ回虫卵では縮緬様であるが、タヌキ回虫卵はゴルフボールのようで深い陥凹を認める。フォーカスを少し浅くして虫卵を鏡検すれば、この違いはより明瞭となる（CおよびD）。

## 8. PCR を応用したアライグマ回虫とタヌキ回虫との虫卵での鑑別

各種蠕虫類の系統関係を明らかにするなどの目的から、リボソーム DNA (rDNA) の塩基配列が決定・登録されており、回虫類においても研究が進展している [13]。そこで rDNA をターゲットに定め、PCR により検討を進めることにした。PCR に用いるテンプレート DNA は、糞便内虫卵から既報に準じて調整した [2]。プライマーには線虫の rDNA に対するコンセンサスなプライマー (NC13 および NC2 [3]) を選び、5.8S rDNA (3' 末端部分) から ITS 2 を経て 28S rDNA (5' 末端部分) に至る領域を増幅させ、配列を解読した (図 3)。

その結果、1 個の虫卵を出発材料としても PCR 増幅・配列解読ができること、虫卵由来の配列は虫体由来のものと完全に一致すること、配列は種内で良く保存されていること、両種の配列は ITS2 で大きく異なること、などが分かった (図 4)。すなわち、虫卵から DNA を調整して PCR 増幅・配列解読を行えば、ITS2 における塩基配

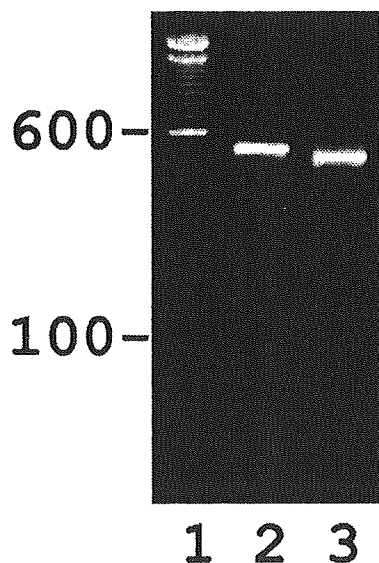


図3 アライグマ回虫卵およびタヌキ回虫卵から DNA を調整し、コンセンサスなプライマー (NC13 および NC2) を用いて PCR 増幅させた産物のアガロース電気泳動・エチジウムブロマイド染色所見。レーン1: 分子量マーカー (NEB, 100bp ラダー)、2: アライグマ回虫卵からの増幅産物、3: タヌキ回虫卵からの増幅産物。いずれも約500bp のバンドを認めた。このバンドをゲルから切出し、配列を解読した。

列からアライグマ回虫と同定でき、タヌキ回虫と鑑別できることが明らかとなった。この方法をイヌ回虫卵などに用いた場合もその塩基配列が解読できている [3] ことから、本法は各種蠕虫の虫卵による種同定・鑑別に幅広く応用されていくものと期待される。

塩基配列の解読に比べてより簡便に実施できる方法についても検討した。わが国ではアライグマ回虫卵との当面の鑑別対象はタヌキ回虫卵であることから、両種の ITS2 に種特異的プライマーを設計し (BpF1 および TtF1, 図 4)、これと前出のプライマー (NC2) とを組み合わせて PCR を試みた。その結果、DNA の由来種とプライマーの標的種とが一致した場合にのみ、予想サイズの産物が増幅されることが分かった (図 5)。すなわち種特異プライマーを用いることにより、1 回の PCR で迅速にアライグマ回虫卵が同定でき、タヌキ回虫卵と鑑別できることが明らかとなった。

以上、アライグマ回虫とアライグマ回虫による幼虫移行症について概説し、虫卵を材料としたアライグマ回虫の同定・鑑別法について紹介した。今後もアライグマ回虫の危険性を啓発し、アライグマを対象とした調査・対策を継続し、アライグマ回虫の汚染が広がらないよう監視していく必要があると考えている。

謝辞: 有益な材料・情報を提供していただいた牧野 敬先生 (神奈川県立自然環境保全センター)、村田浩一先生 (日本大学生物資源科学部)、宮下 実先生 (大阪市天王寺動物公園)、社団法人日本動物園水族館協会、動物園および動物展示施設の関係者各位、自治体の担当職員各位に謝意を表します。

## 文 献

- [1] 浅川満彦, 倉地 徹, 酪農学園大学野生動物生態研究会 1999. 北海道産アライグマの寄生蠕虫類, 野生動物医誌 4: 101-103.
- [2] Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H. and Beveridge, I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths.



**5.8S rDNA**

NC13-> Bp 1:TAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAAAATTCG  
 NC13-> Tt 1:.....T....

Bp 61:AACGTACATTGCGCCATCGGGTTCATTCCCGTTGGCACGTCTGGCTGAGGGTTGAA:107  
 Tt 61:....C.....CAG.:107

**ITS2**

**BpF1->**

Bp 108:ATATCGTAAG-A-GTTGCCATTTATGAATTTTCAACATGGCATATCCGATAAGCTATGA-  
 Tt 108:.....G...T.C.A.-.TGC.....T...A.GGA.....AAT.C.....TCC.G  
TtF1->

Bp 165:TCGT--AGACGAATAAAGAAGTACT-ATCATACCTTCTTCAGCATATATGATGCAATA-  
 Tt 162:....GC..AT..CTC.C....T.C.T.CGG..GG.TA.G...-G..GT...-T...T

Bp 221:ACTCGTT-C-TCATTTCCCT-TCAA-TGAG-ATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAAA  
 Tt 217:.A.GA..C.AG...AC...GC...G.CT.T...C..C.-.-TC.CTGTCCTT.T.CTC.T

Bp 276:GAATATATGCATCAAGAAATTATCGTG-TCGCTCTTAAAAGTCGATTCCAGCGTATATTG  
 Tt 275:...G.GGC.A.AATG.CC...GCT...T..CT..ACG.T.-G.CC.....A..CG...

Bp 335:TTATGGATCTAGCAATATG-C-CATA-GTTGGAAAGAAAGATAGG-CG-AT-AATGATGC  
 Tt 334:..G..TT.G.T..TTGG..A.A..A.G.....G...C.-.C..C..CT.G..G..G.A

Bp 389:ATA--TAA-AG--G-----ATTTT:402  
 Tt 393:...CGG..TG.TT.ACATA.....:416

**28S rDNA**

Bp 403:TTGACCTCAGCTCAGTCGTGAATACCCGCTGAATTTAAGCATATAACTA:451 <-NC2  
 Tt 417:.....TC.....:465 <-NC2

図4 アライグマ回虫 (Bp) とタヌキ回虫 (Tt) のリボゾーム DNA (rDNA) の塩基配列の比較。コンセンサスなプライマー (NC13およびNC2) を用いた PCR で、5.8S rDNA (3'末端部分) から ITS2 を経て 28S rDNA (5'末端部分) に至る配列を増幅させた。ドット (.) はタヌキ回虫の塩基がアライグマ回虫のものと同じであることを、ハイフン (-) はその部分の塩基が欠失していることを示す。アライグマ回虫特異プライマー (BpF1)、およびタヌキ回虫特異プライマー (TtF1) の位置を枠で囲んだ。アライグマ回虫の 5.8S rDNA (AJ001501) および ITS2 (AB051231)、タヌキ回虫の 5.8S rDNA (AB027136 [部分長] および AB051230 [全長]) および ITS2 (AB027152) の各配列は、括弧内のアクセッションナンバーで DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている。

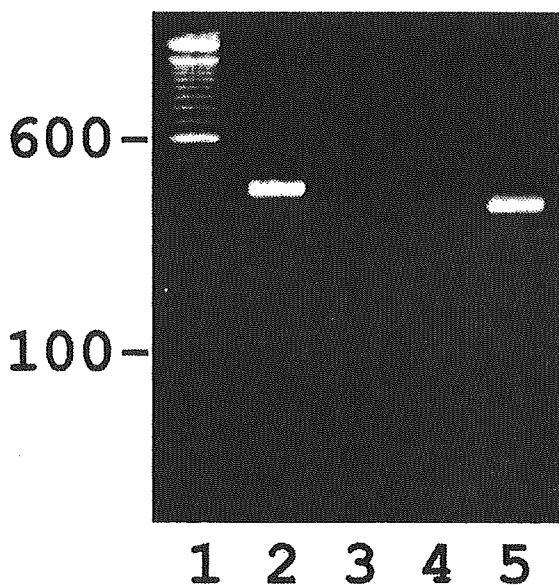


図5 アライグマ回虫卵 (レーン2および3) およびタヌキ回虫卵 (レーン4および5) から調整した DNA を用い、アライグマ回虫特異プライマー (BpF1、レーン2および4) あるいはタヌキ回虫特異プライマー (TtF1、レーン3および5) を、それぞれコンセンサスなプライマー (NC2) と組み合わせて PCR し、その産物をアガロース電気泳動後にエチジウムブロマイド染色した。レーン1は分子量マーカー (NEB, 100bp ラダー)。DNA の由来種とプライマーの標的種とが一致した場合、すなわちアライグマ回虫卵 DNA に対して BpF1 と NC2 とを組み合わせて PCR した場合 (レーン2)、およびタヌキ回虫卵 DNA に対して TtF1 と NC2 とを組み合わせて PCR した場合 (レーン5) に予想サイズの産物が増幅された。一方 DNA の由来種とプライマーの標的種とが異なる場合、すなわちアライグマ回虫卵 DNA に対して TtF1 と NC2 とを組み合わせて PCR した場合 (レーン3)、およびタヌキ回虫卵 DNA に対して BpF1 と NC2 とを組み合わせて PCR した場合 (レーン4) には PCR での増幅は見られなかった。

*Nucleic Acids Res.* 21: 2525-2526.

[3] Jacobs, D.E., Zhu, X., Gasser, R.B. and Chilton, N.B. 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop.* 68: 191-200.

[4] 川中正憲 2003. 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 pp. 18-22. *In*: 平成14年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)「動物展示施設における人と動物の共通感染症対策ガイドライン」作成に関する研究・分担研究報告書(岡部信彦編).

[5] 川中正憲, 坂本京子, 杉山 広 2001. アライグマとアライグマ回虫 (*Baylisascaris procyonis*) に関する全国調査. *Clinic. Parasitol.* 12: 121-125.

[6] 川中正憲, 坂本京子, 杉山 広, 森嶋康之 2002. 動物園, 観光施設でのアライグマ回虫卵汚染問題. 病原微生物検出情報 23: 202-203.

[7] 川中正憲, 杉山 広, 森嶋康之 2002. 感染症の話・アライグマによる幼虫移行症. 感染症週報 4: 16-18.

[8] 川中正憲, 坂本京子, 杉山 広, 森嶋康之 2003. 動物園, 観光施設におけるアライグマ回虫卵汚染問題. 第72回日本寄生虫学会大会プログラム抄録集 109.

[9] Kazacos, K.R. 2001. *Baylisascaris procyonis* and related species. pp. 301-341. *In*: Parasitic Diseases of Wild Mammals, 2nd ed. (Samuel, W.M., Pybus, M.J. and Kocan, A.A. eds.), Iowa State Univ. Press, Ames.

[10] Kazacos, K.R., Gavin, P.J., Shulman, S.T., Tan, T.Q., Gerber, S.I., Kennedy, W.A., Murray, W.J. and Mascola, L. 2002. Raccoon roundworm encephalitis: Chicago, Illinois, and Los Angeles, California, 2000. *MMWR* 50: 1153-1155.

[11] 宮下 実 1993. アライグマ回虫 *Baylisascaris procyonis* の幼虫移行症に関する研究. 生活

衛生 37: 137-151.

[12] 森嶋康之, 杉山 広, 坂本京子, 川中正憲, 牧野 敬 2002. 神奈川県で捕獲された野生化アライグマから検出された回虫について. 第71回日本寄生虫学会大会プログラム抄録集 152.

[13] Nadler, S.A. and Hudspeth, D.S. 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* 86: 380-393.

[14] 岡本 敬 1986. *Toxocara tanuki* Yamaguti, 1941 による実験的幼虫移行症の研究. 寄生虫誌 35: 355-364.

[15] Sato, H., Furuoka, H. and Kamiya, H. 2002. First outbreak of *Baylisascaris procyonis* larva migrans in rabbits in Japan. *Parasitol. Int.* 51: 105-108.

[16] Sato, H., Kamiya, H. and Furuoka, H. 2003. Epidemiological aspects of the first outbreak of *Baylisascaris procyonis* larva migrans in rabbits in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 453-457.

[17] 八木欣平, 浅川満彦, 大山 徹, 岡本宗裕 1999. 北海道のアライグマから検出された回虫の 5.8S rDNA および ITS-2 rDNA の塩基配列決定による寄生虫種の同定. 北海道衛研報 49: 159-162.

キーワード: アライグマ、*Baylisascaris procyonis*、PCR、人獣共通寄生虫症

連絡責任者: 杉山 広、162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1、Tel: 03-5285-1111ext2734、Fax: 03-5285-1173、

E-mail: hsugi@nih.go.jp

Correspondence: H. Suguyama, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.

Tel: +81-3-5285-1111ext2734,

Fax: +81-3-5285-1173,

E-mail: hsugi@nih.go.jp

# テニア科条虫類の遺伝子同定法開発の試み

野中成晃、江越健太郎、奥祐三郎、神谷正男

北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座寄生虫学教室

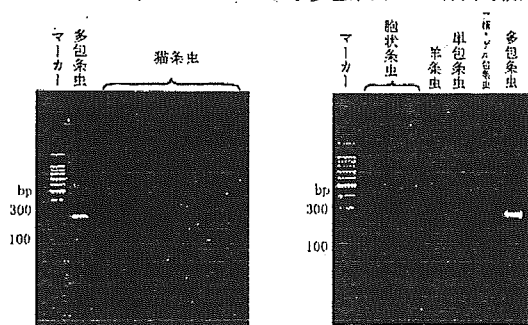
Development of DNA identification system for diagnosis of taeniid cestode infections

Nariaki Nonaka, Kentaro Egoshi, Yuzaburo Oku, Masao Kamiya, Lab. of Parasitology, Dept. of Disease Control, Graduate School of Vet. Med., Hokkaido University

重要な人獣共通寄生虫である多包条虫が含まれるテニア科条虫類は、虫卵が形態的に類似しているため虫卵検査による種の同定ができない。そのため、遺伝子を利用したテニア科条虫類の同定法の開発を試みた。

候補遺伝子として、ミトコンドリアのCOI領域を選定し、*Echinococcus* 属3種8株および *Taenia* 属7種22株を用いて、扁形動物で増幅するプライマーセット (PR-A, PR-B) (Okamoto, et al., 1995) を利用してダイレクトPCRを試みた。その結果、虫種・株によらず約450bpの増幅産物を得られた。そこで、用いた条虫全ての塩基配列を決定し、その配列をもとに多包条虫特異的なプライマー E.mSP-1A, E.mSP-1B を構築し、PCRで検証した。その結果、全ての多包条虫 (5株) で増幅を確認し、他のテニア科条虫では増幅は認められなかった (図1)。また、得られた塩基配

図1. E. mSP1-A, E. mSP1-B による多包条虫DNAの特異的検出

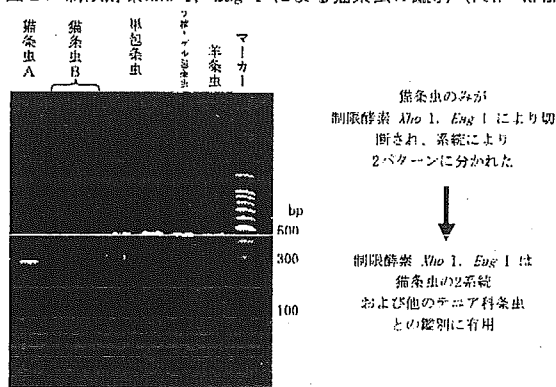


多包条虫のみ、単一バンドが認められた (約250 bp)  
同属の単包条虫、フォーゲル包条虫でもバンドは認められなかった

列をもとに種特異的にPCR産物を切断する制限酵素を検索し、多包条虫、猫条虫 (2系統)、胞状条虫、*Taenia crassiceps* を特定しうる制限酵素を選定した。この中で、猫から検出される頻度の高い猫条虫の2系統に対する制限酵素 *Eag* I, *Xho* I を選出し、PCR-RFLPを試みた。*Eag* I により一つの系統は約260bpと約200bpに切断され、*Xho* I により他の系統は約280bpと約170bpに切

断された (図2)。他のテニア科条虫では全く切断されず、猫条虫の系統鑑別も含めた特異的同定法として有用であることが示唆された。

図2. 制限酵素 *Xho* I, *Eag* I による猫条虫の鑑別 (PCR-RFLP)



以上の結果から多包条虫と猫条虫が他のテニア科条虫種とDNAで鑑別可能であることが示唆された。

Key words: *Echinococcus*, *Taenia*, DNA

## 引用文献

Okamoto, M et al. : Phylogenetic relationships within *Taenia taeniaeformis* variants and other taeniid cestodes inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. *Parasitol Res*, 81, 451-458, 1995

連絡先責任者：野中成晃、060-0818 札幌市北区北18条西9丁目北海道大学大学院獣医学研究科、  
E-mail: nnonaka@vetmed.hokudai.ac.jp  
Correspondence: N. Nonaka, Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0818

# ペットにおけるエキノコックス感染状況調査 (1997~2002年)

神谷正男<sup>1</sup>、野中成晃<sup>1</sup>、奥祐三郎<sup>1</sup>、安東聡子<sup>1</sup>、立花 徹<sup>2</sup>、玉井 聡<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座寄生虫学教室、<sup>2</sup>北海道小動物獣医師会

Survey on companion animals for *Echinococcus multilocularis* infection (1997~2002)

Masao Kamiya<sup>1</sup>, Nariaki Nonaka<sup>1</sup>, Yuzaburo Oku<sup>1</sup>, Satoko Ando<sup>1</sup>, Toru Tachibana<sup>2</sup>,

Satoshi Tamai<sup>2</sup> <sup>1</sup>Lab. of Parasitology, Dept. of Disease Control, Graduate School of

Vet. Med., Hokkaido University, <sup>2</sup>Hokkaido Small Animal Veterinary Association

多包条虫は終宿主（キツネや犬）から排泄される虫卵が人への感染源となる。現在、北海道全域でキツネの高率感染が認められ、キツネと人との行動圏の重なりにより人やペットの感染リスクが増しており、ペットが人への感染源となることも予想される。

我々は1997年より北海道および本州のペット（主に犬・猫）におけるエキノコックス感染状況調査を糞便内抗原および虫卵（テニア科条虫卵）検査によって実施してきた。2002年12月までに道内では、犬1,650頭の検査を行い、抗原陽性18頭、虫卵陽性6頭を確認した（表）。虫卵陽性犬はすべて抗原陽性であった。また、虫卵陽性犬の内4頭については虫卵のDNA判定を行い、すべて多包条虫卵であったことが確かめられている。2002年12月には札幌市内の飼い犬から陽性例が確認され、初めての室内飼育犬虫卵陽性例となった。この他、2000年3月の有珠山噴火時の避難住民の放逐犬（>116頭）から放逐後に感染したと思われる糞便内抗原陽性犬2頭を確認している。猫については170頭を検査し、抗原陽性4頭、虫卵陽性6頭を検出しているが、多包条虫卵の排出は認められていない。道外の犬および猫についてはそれぞれ64頭および2頭の検査を行い、犬2頭が抗原および虫卵陽性を示した。このうちの1頭は北海道からの転出犬であることが確かめられたが、もう1頭については北海道からの転出犬であるのかどうかは確認できなかった。北海道および本州を含め、これまでに確認された抗原陽性犬全22頭の内、駆虫後の再検査を行ったものは14頭で、抗原および虫卵ともにすべて陰転している。そのうち、駆虫後の再感染に対する追跡検査の依頼のあった

表 飼犬・猫のエキノコックス感染状況調査 (1997. 8~2002. 12に検査依頼を受けたもの)

犬	地域	検査頭数	抗原陽性	虫卵陽性	両方陽性	DNA陽性
	北海道	>1,766*	20	6	6	4/4
本州	60	2	2	2	1/1	

\*：有珠山噴火時の放逐犬（>116頭）を含む

猫	地域	検査頭数	抗原陽性	虫卵陽性	両方陽性	DNA陽性
	北海道	170	4	6	1	0/1
本州	2	0	0	0		

ものが3頭あり、2頭が陽転（再感染）した。

感染機会の少ない室内犬の感染例、および駆虫後の再感染例が確認されたことは、北海道でのペットへの高い感染圧を示すものである。アンケート調査では、市部よりも郡部での飼育および放し飼いが犬の抗原陽性率を高めていることが示唆され、ペットの飼育管理と感染予防の重要性を啓蒙する必要がある。

keywords: *Echinococcus*, Dog, Cat

連絡先責任者：野中成晃、060-0818 札幌市北区北18条西9丁目北海道大学大学院獣医学研究科、E-mail: nnonaka@vetmed.hokudai.ac.jp

Correspondence: N. Nonaka, Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0818

# 北海道のエキノコックス感染源対策—駆虫薬入りベイト散布法の検討—

奥祐三郎、巖城隆、野中成晃、金井祐太、水野文子、神谷正男  
北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室

Control measure against the definitive hosts of *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido.  
Yuzaburo Oku, Takashi Iwaki, Nariaki Nonaka, Yuta Kanai, Ayako Kanai, Masao Kamiya  
Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

1980年代には北海道のエキノコックス（多包条虫）が道東から全道に拡大したことが認識され、1990年代には終宿主であるキツネにおけるエキノコックス感染率が上昇した。近年、野生動物における流行状況は極めて憂慮せざるを得ない状況にあり、今後の患者数の増加が危惧される。エキノコックス虫卵で汚染された環境内での衛生教育だけでは住民の健康は維持できない。我々は、安全な環境を取り戻すために、エキノコックスの主たる終宿主である野生のキツネの駆虫を試みてきた。すなわち、道東のパイロット地区において駆虫薬（プラジクアンテル）入りの餌（ベイト）の散布を行ってきた。

当初（1998-2000）はキツネの営巣穴を調査し、その周辺にベイトを設置し、その効果を野外で採取したキツネの糞便を用いて感染状況を判定して、その有効性を示してきた（Tsukada et al., 2002）。

2001年及び2002年についてはベイト散布法の簡易化のために、ベイト散布方法を変更し、自動車を用いて道路沿いにベイトを散布することとし、2001年には道路沿いを50m間隔で5-7および11月に、2002年には道路と防風林の交点に4月から11月まで毎月散布した。いずれも、散布地区全体では40個/平方キロメートルとした。野生のキツネに対する駆虫効果は野外で採取したキツネの糞便（毎月各区で80個以上採取）を用いて判定した。散布区の大きさは1998-2000年には約

100km<sup>2</sup>、2001-2002年には約200km<sup>2</sup>、その周辺のほぼ同じ広さの地域を非散布区とした。

2001年4月から11月において糞便の虫卵陽性率は非散布区では2.5%から20.5%に上昇したが、散布区では11.7%から4.9%へと減少した(図)。さらに2002年(4月、7月、10月のみ調査)では、両者の差が維持され、特に散布区において2002年7月及び10月では0-1.2%と有意に減少した(散布区では19.5-8.0%)。

以上のことから、キツネの繁殖巣を探索することなく、ベイトの散布を簡易に道路と防風林の交点に限定し、ほぼ均一に散布することにより、野生のキツネの感染率を抑える効果があることが示唆された。

Key words: *Echinococcus multilocularis*, foxes, Praziquantel, baits, Control

引用文献

Tsukada H et al.: Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distribute around box breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology*, 125, 119-129, 2002.

連絡責任者：奥祐三郎 060-0818 札幌市北区北18条西9丁目、E-mail:oku@vetemed.hokudai.ac.jp  
Correspondence: Y.Oku, Kita-18, Nishi-9 Kita-ku, Sapporo, 060-0818

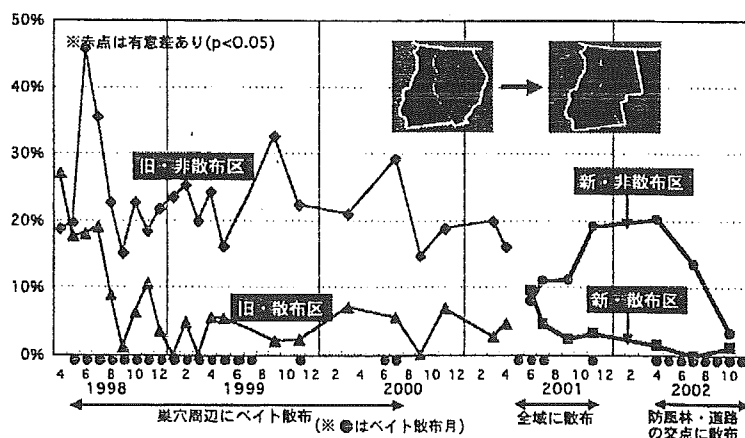


図 1998-2002年のキツネ糞便の虫卵陽性率

# 都市周辺部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-

井上貴史<sup>1</sup>、大出 武<sup>2</sup>、金井祐太<sup>1</sup>、巖城 隆<sup>1</sup>、水野文子<sup>1</sup>、野中成晃<sup>1</sup>、奥祐三郎<sup>1</sup>、神谷正男<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座寄生虫学教室、<sup>2</sup>北海道猟友会小樽支部

Control of *Echinococcus multilocularis* infection in the definitive hosts at the outskirts  
of urban area: a mass-deworming trial of wild foxes in Otaru, Hokkaido, Japan

Takashi Inoue<sup>1</sup>, Takeshi Ode<sup>2</sup>, Yuta Kanai<sup>1</sup>, Takashi Iwaki<sup>1</sup>, Ayako Mizuno<sup>1</sup>, Nariaki Nonaka<sup>1</sup>,  
Yuzaburo Oku<sup>1</sup>, Masao Kamiya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Parasitology, Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary  
Medicine, Hokkaido University <sup>2</sup>Hunters Association of Otaru, Hokkaido

農村部における多包条虫症の感染源対策として駆虫薬（プラジカンテル）入りベイトの野外撒布が実施され、野生キツネへの駆虫効果が報告されている。今回は都市周辺部でのベイト散布を試みるとともに、個々のキツネによるベイト摂取の確認のため、バイオマーカーとしてテトラサイクリン（TC）をベイトに添加し、ベイト摂取と寄生虫感染の関係を調べた。調査期間は2001年と2002年の4～10月で、5～7月に2回小樽市の市街地周辺部の道路沿いに自動車からベイトを撒布した（撒布密度：約30個／km<sup>2</sup>）。駆虫効果の判定は有害鳥獣駆除により捕獲されたキツネの剖検（2001年）と直腸便の糞便内抗原検査（2002年）によって行った。

2001年および2002年の撒布区域でのキツネの多包条虫感染率はそれぞれ、18.5%（剖検）、22.2%（糞便内抗原検査）であり、ベイト撒布前の調査地域における感染率（1999年：56.7%、2000年：62.6%）に比べ低い値となった。しかし、感染率の年次変動等の影響も考えられ、この感染率の低下がベイト撒布の影響のみによるものとは断定できなかった。

ベイト散布後に捕獲されたキツネ87検体中15検体（17.2%）の犬歯からTCが検出され、これらのキツネのベイト摂取が確認された。TC陽性15検体中14検体からは多包条虫の感染は認められず、撒布したベイトの摂食による野生キツネの駆虫が示唆された。

今後、キツネのベイト摂取率の向上と撒布効果

の正確な評価のため、ベイト撒布回数・撒布方法、バイオマーカーなどを改善する必要がある。

Key words: *Echinococcus*, fox, control,

## 引用文献

Yimam AE, et al. :Prevalence and intensity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) and racoon dogs (*Nyctereutes procyonoides albus*) in Otaru city, Hokkaido, Japan. Japanese Journal of Veterinary Research 49, 287-296, 2002.

連絡先責任者：井上貴史、060-0818 札幌市北区北18条西9丁目北海道大学大学院獣医学研究科、  
E-mail: takashii@vetmed.hokudai.ac.jp

Correspondence: T. Inoue, Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0818

## Specific Identification of a Taeniid Cestode from Snow Leopard, *Uncia uncia* Schreber, 1776 (Felidae) in Mongolia

Sumiya Ganzorig<sup>\*,\*\*</sup>, Yuzaburo Oku<sup>\*\*</sup>, Munchiro Okamoto<sup>\*\*\*</sup>, and Masao Kamiya<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Zoology, Faculty of Biology, National University of Mongolia, Ulaanbaatar 210646, Mongolia

<sup>\*\*</sup>Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan e-mail: sganzorig@yahoo.com

<sup>\*\*\*</sup>Department of Laboratory Animal Sciences, Tottori University, Tottori 680-8533, Japan

### Abstract

An unknown taeniid cestode, resembling *Taenia hydatigena*, was recovered from a snow leopard, *Uncia uncia* in Mongolia. Morphology and nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene (mt DNA COI) of the cestode found was examined. The cestode is differed from *T. hydatigena* both morphologically and genetically. The differences between two species were in the gross length, different number of testes, presence of vaginal sphincter and in egg size. The nucleotide sequence of this cestode differed from that of *T. hydatigena* at 34 of the 384 (8.6%) nucleotide positions examined. The present cestode is very close to *T. kottlani* in morphology and size of rostellar hooks. However, the adult stages of the latter species are unknown, and further comparison was unfeasible.

**Key words:** Mongolia, snow leopard, *Taenia*, taxonomy, mt DNA, cestode, Taeniidae

### Introduction

The snow leopard, *Uncia uncia* Schreber, 1776 (Felidae) is an endangered species within Mongolia and throughout its range. It is listed in the IUCN Red Data Book, Mongolian Red Book and included in CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Fauna and Flora) on Appendix I. The helminth fauna of this carnivore is almost unknown. Only two species of nematode, namely *Toxascaris leonina* and *Toxocara cati* were reported from this host in Russia (Mozgovoi, 1953) and India (Maity *et al.*, 1994), respectively.

In 1986, we were able to obtain a digestive tract from one snow leopard that was shot under special permission to the Academy of Sciences of Mongolia. During dissection, the cestodes resembling *Taenia hydatigena* Pallas, 1766 in terms of rostellar hook lengths, hook shape and number were recovered from the small intestine of a snow leopard (Ganzorig & Amarsanaa, unpublished). However, a more recent examination has revealed that the specimens are differing from *T. hydatigena* in the number of morphological traits.

The specific identification of taeniid cestodes based on morphological characters only is often inadequate. Because of the characters of *Taenia* species are subject to variations which necessitate

the use of more than one character for specific identification (Edwards & Herbert, 1981). Identification based on hook morphology and measurements are difficult because of overlap in the hook lengths between different species. That based on the gross morphology of the strobila and segments are invalid because of distortion due to poor fixation (Verster, 1969; Beveridge & Gregory, 1976; Edwards & Herbert, 1981). Beveridge & Gregory (1976) found that gross strobilar morphology and anatomy of the mature proglottid were reliable methods of differentiating 4 species of *Taenia* in suitably relaxed, fixed and stained specimens. Identification of taeniid cestodes requires well-relaxed and subsequently fixed complete cestodes with mature segments and scoleces.

To date, the nucleotide sequences of the mitochondrial DNA cytochrome *c* oxidase subunit I (mt DNA COI) gene were used to distinguish and resolve phylogenetic relationships in the strain variation of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* (Bowles *et al.*, 1995); between species of Taeniidae (Okamoto *et al.*, 1995). Using this approach, it has been indicated that the Asian *Taenia* recently described as *Taenia asiatica*, is closely related to *T. saginata* and taxonomic classification as a subspecies or strain of *T. saginata*

is more appropriate than formal designation as a new species (Bowles & McManus, 1994).

In this study we used both morphological and DNA approach for exact determination of the snow leopard's cestode.

### Materials and Methods

**Parasite specimens.** Helminths were collected from one snow leopard that was shot on 30th December 1986, by special permission to the Academy of Sciences of Mongolia, in Mt. Burhanbuidai uul of Govi Altai Province, Mongolia (intestines and other internal organs were provided to us by Mr. G. Amarsanaa, Institute of Biology, Academy of Sciences, Mongolia). The esophagus, stomach, small and large intestines were dissected. In total, 81 specimens of nematode and 62 specimens of cestodes were collected from small intestine. Nematodes were identified as *Toxascaris leonina*. The cestodes are consisted of 5 matured and 57 young unmaturing specimens. Voucher specimens deposited in Helminthological Collection of the Department of Zoology of the National University of Mongolia and at the Laboratory of Parasitology of the Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan.

**Microscopical study.** All the cestodes were fixed and preserved in 70% alcohol. Four matured cestodes were stained with aceto-carmin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene, and mounted in Canada balsam. Rostellum of 15 cestodes was mounted in Hoyer's medium. All measurements were made with aid of an Olympus video micrometer (Model VM-30). At the time of dissection, helminths recovered were largely contracted; the cestodes are mostly poorly stained. Moreover, numerous calcareous bodies have been intensively stained with aceto-carmin making observation of internal organs difficult. Measurements and examination of internal organs were done using phase-contrast microscopy.

**DNA study.** Nucleotide sequence of the mitochondrial COI gene of the specimens was examined. Total DNA was extracted from alcohol fixed specimens using the Easy-DNA isolation kit (Invitrogen). PCR amplifications were performed according to manufacturer's instructions. The oligonucleotide primers used (pr-A 5' TGGTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA 3' and pr-B 5' AGAAAGAACGTAATGAAAATGAGC

AAC 3') were that of Okamoto *et al.* (1995). PCR products were purified with QIAquick-spin PCR purification Kit (Amicon, USA) and CENTRI-SEP Columns (Princeton Separations, Inc.). PCR products were sequenced using a Dye terminator cycle sequencing kit and a model 373A DNA sequencer (Applied Biosystems). DNA-sequence data were aligned using the CLUSTAL V and the phylogenetic tree was constructed with the neighbor-joining and maximum-likelihood methods (Saitou & Nei, 1987) using sequence data on other taeniid cestodes (Okamoto *et al.*, 1995).

### Results

#### *Taenia* sp. (Taeniidae: Cestoda)

**Morphological description.** Mature cestodes with gravid segments 32.6 to 39 cm long, consisted of 250-285 segments. Scolex 0.723-0.884 mm in diameter, that of rostellum 0.401-0.408 mm. Suckers 0.253x0.209 mm in diameter. Rostellum armed with 30-35 hooks arranged in two rows (Fig. 1). Large hooks 0.190-0.209 mm (0.200±0.001) in length with its blade and handle 0.096-0.102; and 0.112-0.123 mm long, respectively. Small hooks with bifid guard, measured 0.127-0.144 mm (0.133±0.001) in length. Blade and handle were 0.076-0.080 and 0.070-0.83 mm long, respectively. Segments are wider than long. Mature segments 2.0-2.2 mm long by 5.9-7.1 mm wide. That of gravid segments 2.8-3.9x5.8-6.2 mm. There are 400-480 testes, 0.052-0.068 mm in size, its number larger in aporal part, 220-280 vs 179-200 in poral part. Testes are does not connect posteriorly and distributed between ventral excretory canals only. Cirrus sac 0.287-0.359 mm long by 0.085-0.090 mm wide. Vagina posterior to bursa sac, with a copulative part 0.281 mm long. Vagina has a well-developed sphincter, 34 to 58 µm in diameter. Mature uterus possessed 8-10 primary lateral branches. Eggs 0.027-0.032 mm in diameter. Embryonal hooks 0.006-0.007 mm in length.

**DNA sequence.** The nucleotide sequence of the mitochondrial COI gene (Fig. 2) is differed from that of the *T. hydatigena* (in Okamoto *et al.*, 1995) at 34 of the 384 nucleotide positions examined. None of that nucleotide changes causes a coding change i.e. changes that do not affect the amino acid sequences. The maximum-likelihood tree inferred for taeniid cestodes showed that genetically, the present species is close to *T.*



*hydatigena* (Fig. 3).

### Discussion

Morphologically, in terms of hook size and shape, the present cestode species is close to *T. kotlani* Murai, Gubanyi & Sugar, 1993 and *T. hydatigena*. The former species was first described

*parenchymatosa*. But, *T. parenchymatosa* has very distinct type of the large hook that is with very prominent handle (Murai *et al.*, 1993). Thus, the present cestode is close to *T. kotlani* and *T. hydatigena* in means of the hook dimensions and shape, and to *T. parenchymatosa* in the anatomy of the mature and gravid segments. The results of the present study showed that the snow leopard's

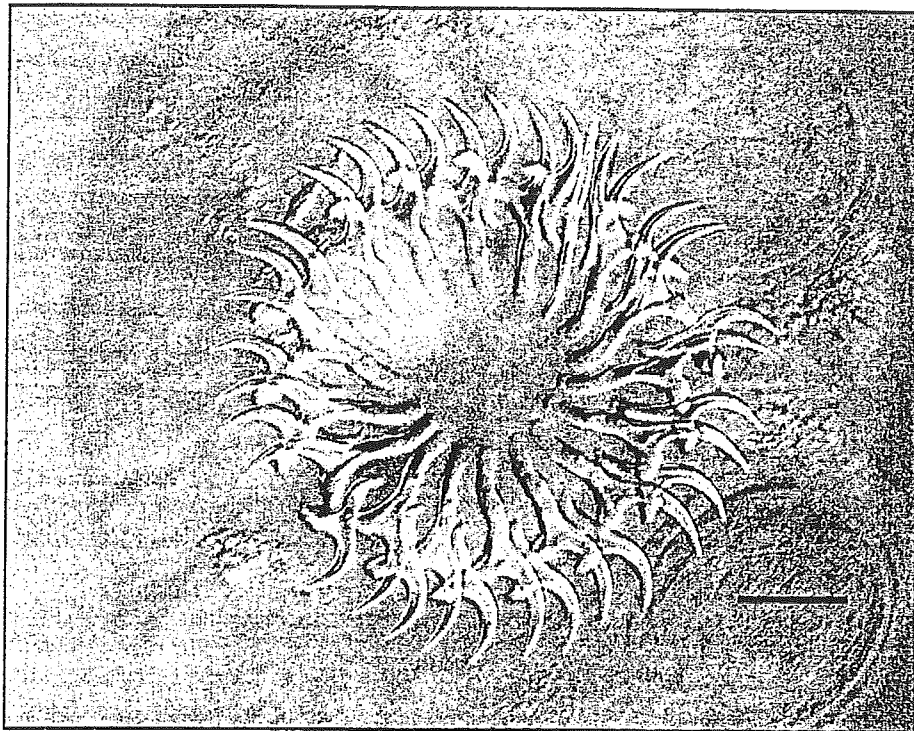


Fig. 1. Scolex and rostellar hooks of the snow leopard's cestode (scale bar = 0.10 mm)

based on metacestodes recovered from lungs and abdominal cavity of ibex, *Capra sibirica* Pallas, 1776 in Mongolia (Murai *et al.*, 1993). The descriptions of the latter species largely complicated, considering large ranges of main characters (see Verster, 1969; Loos-Frank, 2000) one may suppose that more than one species is involved. Of the description available on this species, the present cestode has close similarities with the cestode described as *T. hydatigena* reported by Sawada & Shogaki (1975) from wild dog in Nepal. However, the present cestode can be distinguished from the *T. hydatigena* by the possessing vaginal sphincter, less number of testes (400-480 vs 600-700), and in smaller eggs (0.027-0.032 mm versus 0.038-0.039 mm). Also, differences are in gross length of the cestodes, which is about 40 cm in present cestode and 50-250 cm in *T. hydatigena* (see Edwards & Herbert, 1981). Other *Taenia* species with the same hook dimensions or internal characters included only *T.*

cestode is distinguishable based on morphological characters, from both *T. hydatigena* and *T. parenchymatosa*, at adult stage. However, we have not full confidence in that our specimens are belong to *T. kotlani*, because, the adult stages of *T. kotlani* are unknown. Only, direct comparison of the DNA sequences from the *T. kotlani* and the present material could solve this question.

The level of nucleotide variation in the COI gene within the genus *Taenia* is about 6.3-15.6% (McManus & Bowles, 1994). Although, these are 4.6-9.3% between several strains of *Echinococcus granulosus* (Bowles *et al.*, 1992). In the present study, a value of 8.6% sequence variation was observed between the snow leopard's cestode and *T. hydatigena*. The mitochondrial COI gene sequence data supported the morphological differences between two species.

In this study, we provisionally identified the snow leopard's cestode as *T. kotlani*? Murai, Gubanyi & Sugar, 1993.

```

TspUncia      —ATTCTTCCTGGGXTGGAATTATTAGTCATATATGTTTAAGAA
Thydatigena   TGTTTTAATTCTTCCTGGATTGGAATTATTAGTCATATATGTTTGAGAA
                ***** * *****
TspUncia      TAAGTATGAGTCCTGATGCTTTTGGGTTTATGGATTGTTATTTGCTATG
Thydatigena   TAAGCATGAGTCCTGATGCTTTTGGATTCTATGGATTATTATTTGCTATG
                **** ***** * *****
TspUncia      TTTTCGATAGTTTGTTTAGGTAGAAGTGTGTGAGGACATCATATGXTAC
Thydatigena   TTTTCAATAGTCTGTTTGGGTAGAAGTGTGTGGGGTCATCATATGTTTAC
                ***** ***** ***** * *****
TspUncia      TGTGGGTGATGTTAAGACTGCTGTTTTTTTAGTTCCGTTACTATGA
Thydatigena   TGTGGATTAGATGTTAAGACTGCTGTTTTTTTAGTTCTGTCACTATGA
                ***** * *****
TspUncia      TTATAGGTGTCCTACTGGTATAAAGGTATTTACTTGACTATAATGCCTT
Thydatigena   TTATAGGTGTCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGTTATATATGCCTT
                ***** ***** *****
TspUncia      TTAAATCTCATGTGAATAAGAGTGATCCTGTTGTTTGGTGAATTGTCTC
Thydatigena   TTAAACTCTCATGTGAATAAGAGTGATCCTGTTGTTTGGTGAATTGTTTC
                ***** ***** *****
TspUncia      TTTTATAGTTTTATTACTTTXGGGGGGTCACTGGCATTGTGTTATCAG
Thydatigena   TTTTATAGTTTTGTTTACTTTTGGTGGGGTTACTGGTATTGTGTTGTCAG
                ***** ***** * *****
TspUncia      CATGTGTGTTAGATAAAGTTCTGCATGATACTTGGTTTGTG
Thydatigena   CATGTGTATTAGATAAAGTTCTTCATGATACCTGGTTTGTG
                ***** *****
    
```

Fig. 2. CLUSTAL V multiple sequence alignment of the mitochondrial COI gene from *Taenia* sp. and *T. hydatigena*. TspUncia - *Taenia* sp. from snow leopard

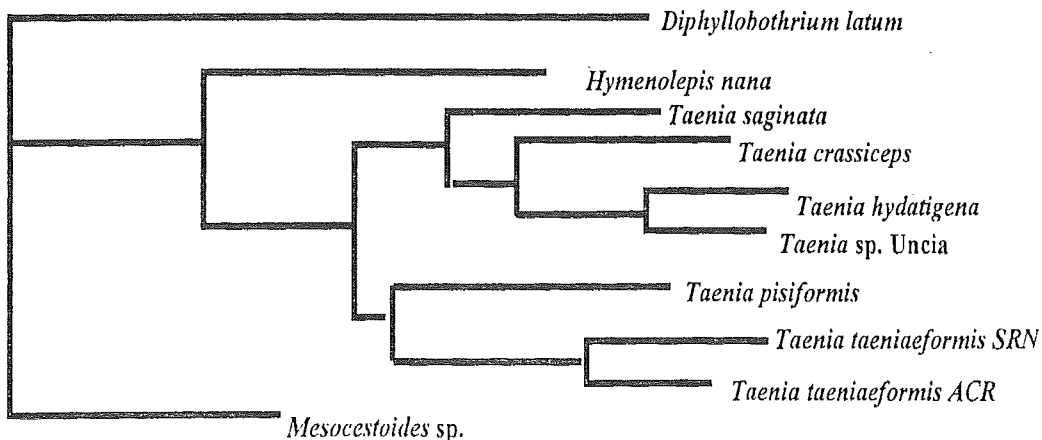


Fig. 3. Phylogenetic tree of cestodes constructed from maximum-likelihood analysis of the mt DNA COI gene nucleotide sequences

### Acknowledgements

We express our sincere thanks to Mr. G. Amarsanaa (Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences) for providing the material. Thanks are due to anonymous reviewers for their critical reading of the manuscript.

### References

- Beveridge, I. & Gregory, G. G. 1976. The identification of *Taenia* species from Australian carnivores. *Aust. Vet. J.* 47: 46.
- Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 165-174.
- Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. 1995. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus*. *Parasitology*, 11: 317-328.
- Bowles, J. & McManus, D. P. 1994. Asian (Taiwan) *Taenia*: species or strain? *Parasitol. Today*, 10: 273-275.
- Edwards, G. T. & Herbert, I. V. 1981. Some quantitative characters used in the identification of *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. multiceps* adult worms, and *T. multiceps* metacestodes. *J. Helminthol.* 55: 1-7.
- Maity, B., Charaborty, G. & Pradham, K. K. 1994. Toxocariasis in snow leopard (*Panthera uncia*). *Indian Vet. J.* 71: 499-501.
- Mozgovoi, A. A. 1953. [*Ascaridata of animals and Man and diseases caused by them.*] Moscow: Izdatelstvo AN SSSR, 351 pp. (in Russian).
- Murai, E., Gubanyi, A. & Sugar, L. 1993. Examination of taeniid metacestodes from the Far East, with the description of *Taenia kotlani* sp. n. (Cestoda: Taeniidae). *Parasitol. Hung.* 26: 27-49.
- Okamoto, M., Bessho, Y., Kamiya, M., Kurosawa, T. & Horii, T. 1995. Phylogenetic relationships within *Taenia taeniaeformis* variants and other taeniid cestodes inferred from the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I gene. *Parasitol. Res.* 81: 451-458.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sawada, I. & Shogaki, Y. 1975. On the cestode *Taenia hydatigena* from the wild dog in Nepal. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 3: 247-249.
- Verster, A. 1969. A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus, 1758. *Onderstepoort J. Vet.* 36: 3-58.

(Accepted: February 2003)

Hirofumi Ishikawa · Yukio Ohga · Rikuo Doi

## A model for the transmission of *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan

Received: 29 July 2003 / Accepted: 15 August 2003 / Published online: 17 October 2003  
© Springer-Verlag is a part of Springer Science + Business Media 2003

**Abstract** A mathematical model for *Echinococcus multilocularis* transmission would be useful for estimating its prevalence and determining control strategies. We propose a mathematical model which quantitatively describes the transmission of *E. multilocularis* in Hokkaido, Japan. The model takes into account the influence of the dynamics of both the definitive and the intermediate host populations, which show large scale seasonal variation as they are wild animals. The simulations based on the model clarify the mechanism of seasonal transmission of *E. multilocularis* quantitatively, notwithstanding a lack of seasonal prevalence data. At present, human alveolar echinococcosis is prevalent throughout the mainland of Hokkaido. The risk of being infected in the human population has been investigated by analyzing the seasonal fluctuation in parasite egg dispersion in the environment. This is necessary for the planning of more suitable preventive measures against *E. multilocularis*.

A mathematical model can help in studying estimates of prevalence and the effects of control measures under various assumptions. A simple mathematical model was constructed by Roberts and Aubert (1995) to evaluate the effect of control by the addition of praziquantel to bait in France.

On the main island of Hokkaido, Japan, the first case of human alveolar echinococcosis (HAE) was reported in 1965 at Nemuro, in eastern Hokkaido (Yamamoto et al. 1966). Nowadays, HAE has spread throughout the mainland of Hokkaido (Anonymous 1995, Doi 1995). *E. multilocularis* maintains its transmission cycle in two hosts; the definitive hosts are canines, while the intermediate hosts are mainly rodents and ungulates. In Hokkaido, the major definitive host is the red fox (*Vulpes vulpes*), and the major intermediate host, the gray-sided vole (*Clethrionomys rufocanus*) (Ohbayashi 1996). The intermediate hosts are infected by ingesting parasite eggs voided in the feces of infected definitive hosts, while the definitive hosts are infected by preying on voles that have hydatid cysts. Humans are infected by the accidental ingestion of parasite eggs.

The transmission of *E. multilocularis* is influenced by the dynamics of both the definitive and intermediate host populations, which vary greatly between seasons (Saitoh et al. 1998). Seasonal forcing was accounted for in the model to more precisely analyze the prevalence of *E. multilocularis* in the host population. The ecological and epidemiological parameters used in the model were determined on the basis of field surveys in Hokkaido.

We carried out simulations of the model to study the seasonal transition in the prevalence of *E. multilocularis* in the population of foxes in Nemuro and Abashiri provinces, eastern Hokkaido. We also investigated the risk of being infected with HAE in the human population through simulations of the model, assuming that the risk would depend on the abundance of parasite eggs in the environment. Consideration of the mechanism of seasonal transmission can be helpful in designing strategies for the control of *E. multilocularis*.

### Introduction

We propose a mathematical model to describe the transmission of *Echinococcus multilocularis* quantitatively.

H. Ishikawa (✉) · Y. Ohga  
Department of Environmental and Mathematical Sciences,  
Faculty of Environmental Science and Technology,  
Okayama University,  
700-8530 Okayama,  
Tsushimanaka, Japan  
E-mail: ishikawa@ems.okayama-u.ac.jp  
Tel.: +81-86-2518826  
Fax: +81-86-2518837

Y. Ohga  
Horiba Ltd.,  
601-8510 Kyoto, Japan

R. Doi  
Department of Hygiene, School of Medicine,  
Yokohama City University,  
236-0004 Yokohama, Japan