

geographical distribution is expanding toward Honshu Island, opposite side of the Tsugaru Strait, previously a non-endemic area (Doi et al., 2000a). In pigs, metacestodes do not grow or reproduce well (Uchino and Sato, 1996). However, their relatively high prevalence suggests widespread contamination with infected fox feces around pig farms. Swineherds should be more aware of the risk of *E. multilocularis* and review their way of breeding like management of waste after delivery or abortion, which attracts foxes. On Honshu Island, systematic meat inspection network is being conducted (Kamiya, 2001).

3.3. Human alveolar echinococcosis

Since the first epidemic of human alveolar echinococcosis at Rebun Island, west of the mainland of Hokkaido, most human cases in Japan, have been reported from Hokkaido (Hokkaido Institute of Public Health, 1999; Minagawa, 1997). The Rebun epidemic is estimated to be caused by red foxes introduced from the Kuril Islands, an active epizootic area, in the 1920s. These foxes were eradicated by poachers for commercial purposes in the late 1930s, which is considered to terminate the epidemic at Rebun (Doi et al., 2000b; Minagawa, 1999). A total of 131 cases were officially reported from Rebun between 1936 and 1989. Doi et al. (2000b) estimated that in Rebun, males were more likely to acquire infection incidental to activities outside the house and brought into the house through the soil, grass or fur rather than through contaminated drinking water from a river source.

After the Rebun epidemic, reported cases were restricted to the eastern part of Hokkaido, but since the 1980s human cases have been reported from throughout the island.

As shown in Table 2, recent incidence rates of alveolar echinococcosis (per million year) in Hokkaido, have been 0.9–3.3, comparable to Germany or Switzerland.

Since the introduction of governmental mass screening using ELISA and Western blotting in 1984, a total of 140 cases have been reported, approximately 10 cases annually. The screening rate, the proportion of those screened to the total population of the area, of this program has been somehow low, about 1% (70,000/5,700,000) in Hokkaido, as a whole, but varies by area. For example, in urban Sapporo, the

rate was 0.03% (500/1,810,000), compared to 5.9% (2000/34,000) in Nemuro, a rural district (Minagawa, 1997).

In Hokkaido, the infection risk was reported to be higher among livestock farmers (Ito, 2001) but not among hunters, furriers or taxidermists (Yamamoto et al., 2001). The first case was reported in 1997, among the long-term residents living on the outskirts of Sapporo (Tsukada et al., 2000).

4. Discussions toward prevention and control

In Japan, the epizootic presence of alveolar echinococcosis has been regarded as minimal risk. However, prevalence rates among red foxes have been rising throughout Hokkaido. Especially, we should attend to the establishment of suburban life cycle of *E. multilocularis*, which is suggested by infection in domestic pets in Hokkaido (Oku, 2000), and high infection pressure with *E. multilocularis* eggs in Switzerland (Stieger et al., 2002).

Despite current small number of newly reported human cases in Japan, an epidemic can occur in future due to increased exposure to the eggs through infected hosts. Subsequent economic impact of the epidemic on domestic industries should not be missed. Of important industries in Hokkaido, livestock farming and agriculture, and tourism, accounting for US\$ 7.08 and 5.38 billion, respectively (Hokkaido Government, 2000), could be adversely affected. These effects are estimated to be mainly due to negative images as is the case with foot and mouth disease.

As shown in Table 3, comprehensive public health measures are urgently needed to limit transmission of the *E. multilocularis* infection. Some of these measures are discussed below.

4.1. Consideration for the ecosystem

Complicated life cycle of *E. multilocularis* is being studied temporally and spatially in terms of geology, climate and vegetation (Tackmann et al., 1998; Berke, 2001; Staubach et al., 2001). Land use can variously affect the life cycle of *E. multilocularis*. In China, deforestation provides grasslands, an optimal habitat for rodents, and thus the life cycle was established (Craig et al., 2000). Land use is also suggested to affect the

Table 3
Control measures in terms of public health

Hosts
For wild and domestic hosts
Development of more precise and easier methods to detect infection of hosts (e.g. a coproantigen method using monoclonal antibodies with low cross-reaction to the helminth)
Studies on the ecosystem (e.g. land use to stay away from foxes)
For wild hosts
Development of baiting method for foxes
Systematical surveillance of foxes by the coproantigen ELISA
For domestic pets
Preparation of a system to deworm potentially infected pets
Keeping pets away from contaminated area
A mass-screening program of untied domestic dogs
Humans
Improvement and promotion of the mass-screening program
Development of a more specific serological method for diagnosis
Focusing on those with potentially high risk
Information sharing among the stakeholders
Awareness program to residents in endemic regions
Life cycle of <i>E. multilocularis</i>
Severity of the infection and importance of diagnosis in early stages
Desirable life style to avoid infection
Risk of infection through domestic pets
Registration of patients with alveolar echinococcosis
Understanding of precise infection routes to humans
Development of an effective medicine to patients in early stages
Studies on the spatial and temporal relationship between epidemic among hosts and among humans

density of host population and human exposure to the eggs (Uchino and Sato, 1996). Landscape planning that does not activate the life cycle around us is preferable.

There are many factors affecting fox population, such as distribution of anti-rabies baits (Eckert et al., 2000) and epidemic of scab due to sarcoptic acariasis (Tsukada et al., 1999). Since the life cycle of the parasite is maintained in nature, we have to understand well the ecosystem as a whole. In Europe and Hokkaido, fox population management, which underestimated their high adaptability, little controlled their number (Minagawa, 1997; Toma et al., 1996). It should be noted that at Rebun, fox population could be controlled by humans because the island was surrounded

by sea. Simplistic measures can disrupt the sophisticated balance of the ecosystem. Socially and economically acceptable measures are needed (Kakizawa, 2000) in harmony with the ecosystem where humans, hosts and *E. multilocularis* evolve together.

4.2. Anthelmintic treatment of definitive hosts

Investigation trials aimed at decreasing prevalence of wild foxes by spreading baits containing the anthelmintic Praziquantel have been carried out in Germany (Schelling et al., 1997; Tackmann et al., 2001) and Japan (Oku, 2000). Tackmann et al. (2001) reported that even in low-endemic areas this method succeeded in decreasing the prevalence of foxes infected with *E. multilocularis* for 2 years. Further studies are under way, such as on the long-term efficacy and on the cost-effectiveness. Unlike rabies, *E. multilocularis* has no apparent ill effect on foxes, thus their population numbers seem to change little through baiting. Populations of rodents, in which infection rates are very low, are also not likely to be affected. However, Praziquantel is not ovicidal (Thakur et al., 1979). We should consider a number of live eggs, which can be excreted in the environment after distribution of baits.

At an epizootic village in Alaska, a successful control program by means of monthly treatments of domestic dogs with praziquantel was reported (Rausch et al., 1990). The reduction in prevalence of the larval cestode among voles within the study village suggested reduced risk of infection also among humans. As shown in this program, this method can be applied for control of *E. multilocularis* in other endemic areas where domestic hosts play certain roles in the life cycle of the parasite.

Now exportation of infection from Hokkaido to Honshu Island is concerned, periodic and safe de-worming program for domestic pets should be introduced in Japan, as well as surveillance of domestic dogs with frequent contact with rodents. These programs have been practiced governmentally in the United Kingdom, where all the dogs moving into from epidemic countries are dewormed (Doi et al., 2003).

4.3. Surveillance and screening

In Japan, systematic surveillance of individuals who are in close contact with definitive hosts is a priority,

such as farmers, zoo workers, slaughterers and pet facility workers. Other groups that should be regularly surveyed are children playing with soil and field soldiers of the Japan Self-Defense Forces.

Screening of residents and surveillance of hosts are important. In Japan, patients whose infections were detected by the governmental screening program are reported to have significantly higher 5-year survival rates compared to those diagnosed in hospitals (Uchino and Sato, 1996). The screening program using ELISA (US\$ 4 a person screened) and ultrasonography (US\$ 67 a person with positive ELISA) was estimated to be economically reasonable (Uchino and Sato, 1996). As infection incidence increases, the costs saved increase as well as the efficacy of treatment. If a more specific screening method than current ELISA (Ito, 2001) are to be developed and implemented focused on those at potentially high risk described above, early cases can be diagnosed more efficiently.

Another problem is follow-up of emigrants. Approximately 70,000 residents move out of Hokkaido, annually and it is likely that some cases among them could have been missed. Since 20 years have now passed since the infected foxes have been dispersed throughout Hokkaido, an increase in human cases may be anticipated (Doi et al., 2000a). Emigrants are to be more informed about the long latent period of alveolar echinococcosis and the governmental screening.

4.4. Information sharing

To prepare for future endemic, information sharing and discussion among the stakeholders (government, private industry and citizens) is required. For instance, alveolar echinococcosis registry system in Europe (Kern et al., 2003) is expected to understand the epidemiology of the transnational infection. Even in urban areas in Hokkaido, distribution of correct information on the risk of infection, exposure to eggs, through wild foxes and domestic dogs (Ito, 2001) is warranted to raise awareness among the population.

References

- Berke, O., 2001. Chropleth mapping of regional count data of *Echinococcus multilocularis* among red foxes in Lower Saxony, Germany. *Prev. Vet. Med.* 52, 119–131.
- Craig, P.S., Giraudoux, P., Shi, D., Bartholomot, B., Barnish, G., Delattre, P., Quere, J.P., Harraga, S., Bao, G., Wang, Y., Lu, F., Ito, A., Vuitton, D.A., 2000. An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu. *Chin. Acta Trop.* 77, 167–177.
- Craig, P.S., Liu, D., Macpherson, C.N.L., Dazhong, S., Reynolds, D., Barnish, G., Gottstein, B., Wang, Z., 1992. A large focus of alveolar echinococcosis in central China. *Lancet* 340, 826–831.
- Deplazes, P., Eckert, J., 1996. Diagnosis of the *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. *Appl. Parasitol.* 37, 245–252.
- Deplazes, P., Eckert, J., 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis—a zoonosis of public health significance. *Vet. Parasitol.* 98, 65–87.
- Deplazes, P., Isabelle, T., Thompson, R.C.A., Eckert, J., 1999. *Echinococcus multilocularis* coproantigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in fox, dog, and cat populations. *J. Parasitol.* 85, 115–121.
- Doi, R., Kanda, E., Nihei, N., Uchida, A., 2000a. Occurrence of alveolar hydatid disease (multilocular echinococcosis) outside of Hokkaido and a proposal for its prevention. *Jpn. J. Public Health* 47, 111–126 (in Japanese).
- Doi, R., Nakao, M., Nihei, N., Kutsumi, H., 2000b. Epidemiology of alveolar hydatid disease (AHD) and estimation of infected period of AHD in Rebun Island, Hokkaido. *Jpn. J. Public Health* 47, 145–152 (in Japanese).
- Doi, R., Matsuda, H., Uchida, A., Kanda, E., Kamiya, H., Konno, K., Tamashiro, H., Nonaka, N., Oku, Y., Kamiya, M., 2003. Possibility of invasion of *Echinococcus multilocularis* into Honshu with pet dogs from Hokkaido and overseas. *Jpn. J. Public Health* 50, 639–649 (in Japanese).
- Eckert, J., 1997. Epidemiology of *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* in central Europe. *Parassitologia* 39, 337–344.
- Eckert, J., Conraths, F.J., Tackmann, K., 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis. *Int. J. Parasitol.* 30, 1283–1294.
- Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.-X., Pawlowski, Z., 2001. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals. World Organization for Animal Health, Paris.
- Gottstein, B., Felleisen, R., 1995. Protective immune mechanisms against the metacestode of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Today* 11, 320–326.
- Hofer, S., Gloor, S., Muller, U., Mathis, A., Heggin, D., Deplazes, P., 2000. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology* 120, 135–142.
- Hokkaido Government, 2000. Hokkaidosei-Yoran. Sapporo, Japan, Hokkaido-tokei-kyokai (in Japanese).
- Hokkaido Institute of Public Health, 1999. *Echinococcus* in Hokkaido. Sapporo, Japan, Hokkaido Inst. Public Health (in Japanese).
- Ito, A., 2001. Echinococcosis: present epidemic state in the world and in Japan, diagnosis, treatment and prevention. Hokkaido Primary Care Kenkyukai Kaiho 19, 29–41 (in Japanese).
- Kakizawa, H., 2000. Ecosystem Management. Thukiji-Shokan, Tokyo, Japan (in Japanese).

- Kamiya, M., 2001. Report on Grants-in-Aid for Scientific Research on Surveillance, Prevention and Control of Echinococcosis (in Japanese).
- Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R.W., Vuitton, D.A., Kern, P., The European Echinococcosis Registry, 2003. European Echinococcosis Registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982–2000. *Emerg. Infect. Diseases* 9, 343–349.
- Kreidl, P., Allerberger, F., Judmaier, G., Auer, H., Aspöck, H., Hall, A.J., 1998. Domestic pets as risk factors for alveolar hydatid disease in Austria. *Am. J. Epidemiol.* 147, 978–981.
- Minagawa, T., 1997. Survey of echinococcosis in Hokkaido and measure against it. *Hokkaido J. Med. Sci.* 72, 569–581 (in Japanese).
- Minagawa, T., 1999. The reconsideration of natural history of echinococcosis at Rebun Island. *Hokkaido J. Med. Sci.* 74, 113–134 (in Japanese).
- Nonaka, N., Tsukada, H., Abe, N., Oku, Y., Kamiya, M., 1998. Monitoring of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes in Shiretoko, Japan, by coproantigen detection. *Parasitology* 117, 193–200.
- Oku, Y., 2000. Tainai de Zoshoku/Tenni suru kiseichu "Echinococcus" no hirogari. *J. Modern Vet. Med.* 48, 5–17 (in Japanese).
- Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D.A., Giraudoux, P., 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox feces collected in the field. *Int. J. Parasitol.* 31, 1579–1588.
- Rausch, R.L., Willson, J.F., Schantz, P.M., 1990. A programme to reduce of infection by *Echinococcus multilocularis*: the use of praziquantel to control the cestode in a village in the hyperendemic region of Alaska. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84, 239–250.
- Sakai, H., Nonaka, N., Yagi, K., Oku, Y., Kamiya, M., 1998. Coproantigen detection in a routine fox survey of *Echinococcus multilocularis* infection in Hokkaido. *Jpn. Parasitol. Int.* 47, 47–51.
- Schelling, U., Frank, W., Will, R., Roming, T., Lucius, R., 1997. Chemotherapy with praziquantel has the potential to reduce the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild foxes (*Vulpes vulpes*). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 179–186.
- Staubach, C., Thulke, H.-H., Tackmann, K., Hugh-Johnes, M., Conraths, F.J., 2001. Geographic information system-aided analysis of factors associated with the spatial distribution of *Echinococcus multilocularis* infections of foxes. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 65, 943–948.
- Stieger, C., Hegglin, D., Schwarzenbach, G., Mathis, A., Deplazes, P., 2002. Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology* 124, 631–640.
- Tackmann, K., Löschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H.-H., Conraths, F.J., 1998. Spatial distribution patterns of *Echinococcus multilocularis* (Leuckart 1863) (Cestoda: Cyclophyllidae: Taeniidae) among red foxes in an endemic focus in Brandenburg, Germany. *Epidemiol. Infect.* 120, 101–109.
- Tackmann, K., Löschner, U., Mix, H., Staubach, C., Thulke, H.-H., Ziller, M., Conraths, F.J., 2001. A field study to control *Echinococcus multilocularis*-infections of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an endemic focus. *Epidemiol. Infect.* 127, 577–587.
- Thakur, A.S., Prezioso, U., Marchevsky, N., 1979. *Echinococcus granulosus*: ovicidal activity of praziquantel and bunamidine hydrochloride. *Exp. Parasitol.* 47, 131–133.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bnet, J.J., Ellis, P., Moutou, F., 1996. *Epidemiologie Appliquee*. AEEMA, Maison-Alfort, France.
- Tsukada, H., Morishima, Y., Nonaka, N., Oku, Y., Kamiya, M., 2000. Preliminary study of the role of red foxes in *Echinococcus multilocularis* in the urban area of Sapporo. *Jpn. Parasitol.* 120, 423–428.
- Tsukada, H., Okada, H., Yamanaka, M., Nonaka, N., Oku, Y., 1999. The spreading of sarcoptic mange among red foxes *Vulpes vulpes* and its impact on the local fox population in Shiretoko peninsula, Hokkaido, Japan. *Mamm. Sci.* 39, 247–256.
- Uchino, J., Sato, N., 1996. Alveolar Echinococcosis. Fuji Shoin, Sapporo, Japan.
- Yamamoto, N., Kishi, R., Katakura, Y., Miyake, H., 2001. Risk factors for human alveolar echinococcosis: a case-control study in Hokkaido. *Jpn. Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 689–696.

北海道の多包性エキノコックス症患者血清の使用による イムノブロット法を用いた市販エキノコックス症血清診断キットの検討

¹⁾北海道立衛生研究所, ²⁾国立感染症研究所寄生動物部, ³⁾北海道大学病院手術部

古屋 宏二¹⁾²⁾ 川中 正憲²⁾ 山野 公明¹⁾
佐藤 直樹³⁾ 本間 寛¹⁾

(平成15年12月3日受付)

(平成16年1月27日受理)

Key words : alveolar hydatidosis, immunoblotting, serodiagnosis

要 旨

北海道の多包性エキノコックス症患者血清材料を用いて、市販エキノコックス症血清診断キット“*Echinococcus* Western Blot IgG”(以下FIA(French immunoblot assay)と略; Ldbio Diagnostics, Lyon, France)の臨床検査的評価を行った。使用した80血清のうち64検体は術前多包性エキノコックス症患者血清、9検体は術後患者血清、7検体は北海道の一次検診でELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)陽性となり感染が疑われた住民の血清であった。

1987年から1993年の間に北海道立衛生研究所で実施したウエスタンブロット血清検査法(Hokkaido Western blot method, 以下HWBと略)による試験では、64例の術前多包性エキノコックス症患者血清のうち53例が陽性、6例が疑陽性であった(陽性例+疑陽性例の割合:92.2%)。53陽性例のうち43例が多バンド形成の完全型、10例が寡バンド形成の不完全型と判定された。

一方、FIAによる試験では、64例の術前多包性エキノコックス症患者血清のうち60例(93.8%)が陽性、4例が陰性であった。60例の陽性例のうち、47例(78.3%)がP3、5例(8.3%)がP4、8例(13.3%)がP5パターンを示した。HWBで完全型と判定された血清のすべてはFIAでP3パターンとなり、高力価抗体血清を示唆する結果となった。

反対に、HWBで不完全型あるいは疑陽性と判定された血清のほとんどはP4あるいはP5のような他のパターンとなり、低力価抗体血清を示唆する結果となった。

極端に低力価の抗体を示す症例の病理学的解釈はさておき、FIAの使用はHWBで判定が苦慮される疑陽性例について血清学的に判定を容易にするなど、FIAは高感度で有用な試験法であると考えられた。

〔感染症誌 78:320~326, 2004〕

序 文

多包性エキノコックス症は北海道に特有の地方病であり、*Echinococcus multilocularis*の感染によ

る重篤な寄生虫疾患である¹⁾。本症の診断について、北海道では、1998年度末まで、画像検査(US(ultrasonography), CT(computed tomography)等)と血清検査により先ず暫定的に診断し、最終的な判定は外科的摘出病巣についての病理組織所見により行われていた。けれども、1999年4月1日に施行された感染症新法“感染症の予防および

別刷請求先: (〒162-8640) 東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所寄生動物部

古屋 宏二

感染症学雑誌 第78巻 第4号

感染症の患者に対する医療に関する法律⁷⁾で、本症は四類に規定され、報告基準は、“診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、病原体診断や血清学的診断がなされたもの”となった。病理組織所見がなくとも届出が可能になったこと、また、本症の検診（マスキリング）が道内全域で現在も実施されている⁸⁾ことから、血清検査が以前にも増して重要になってきた。

道内の多包性エキノコックス症の血清検査について、これまで、自家製抗原の製造・調製が可能な二三の研究・検査機関でのみ検査が実施されてきたが、最近、同症の患者が多いとされるヨーロッパからの市販キット⁹⁾が入手可能となり、一般の臨床衛生検査所でも検査ができる状況になってきた。そこで、ごく最近販売された、多包性エキノコックス症のみならず単包性エキノコックス症 (*E. granulosus* の感染によるエキノコックス症) も診断可能とするフランス製の高感度イムプロットアッセイキット (FIA) について、北海道の患者血清材料を用いた場合の感度と免疫染色パターンを調べ、北海道立衛生研究所が1987年から1993年の間に実施したHWBによって得られた結果と比較検討し、臨床検査的評価を行ったので報告する。

材料と方法

1. 血清材料

本研究に用いた血清材料の80検体は主に1985年から1993年の間に血清学的研究(厚生科学研究費)のために収集された。80血清のうち73血清は病巣を外科的に摘出後多包性エキノコックス症と病理組織学的に診断された患者から採取された。残りの7血清はELISA法による一次検診で血清学的に要観察者となった住民からのもので、HWBで不完全型の陽性パターンを示した(後述)。多包性エキノコックス症患者の73血清のうち64血清が術前血清、9血清が術後3年以上経過した患者からの血清であった。

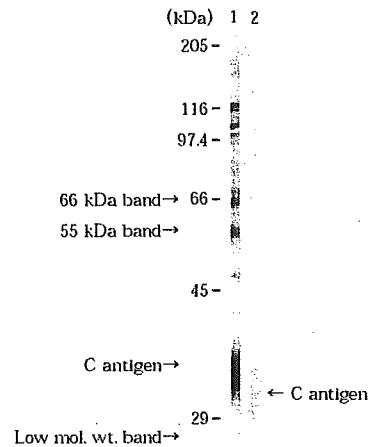
2. HWBによる抗体検査

HWBによる検査術式と免疫染色パターンを含めた血清学的データについては既に報告されている^{10)~8)}。本研究には、それらの既報の血清学的

平成16年4月20日

Fig. 1 Representative positive patterns obtained by HWB using AH patients' sera

Lane 1 shows the complete type pattern, indicated multiple bands at various positions of 29-205 kDa. Lane 2 shows the incomplete type pattern, revealed a smeary band (which was named C antigen, a polysaccharide antigen) at low positions of 30-35 kDa.



データをHWB-抗体検査結果として用いた。HWB用抗原はコトナラットで継代されていた*E. multilocularis* 幼虫の抽出粗抗原が使われた。血清検体の最終希釈濃度は1:200であった。

3. FIAによる抗体検査

FIAによる抗体検査と免疫染色パターンの分類は添付の解説書に従って行った。血清検体の最終希釈濃度は1:25であった。

成績

1. HWBによる検査成績

患者術前血清64例のうち、HWB陽性が53例、疑陽性が6例、陰性が5例であった。HWB陽性53例のうち、43例が完全型、10例が不完全型の免疫染色パターンを示した。Fig. 1にHWBによる代表的な免疫染色パターンを示す(レーン1:完全型パターン, レーン2:不完全型パターン)。不完全型患者術後血清の9例と一次検診で要観察者とされた住民からの血清の7例はすべて不完全型の陽性パターンを示した。以上の結果をTable 1にまとめた。

Table 1 Comparison between HWB test results and FIA test results using sera from AH patients in Hokkaido and also sera from persons who were serologically positive in AH mass screening in Hokkaido

HWB test Results	The number of samples	FIA test Results			
		Positive *1			Negative
		P3	P4	P5	
Preoperative sera from AH patients					
Positive *2					
"Complete type"	43	43	0	0	0
"Incomplete type"	10	2	3	5	0
Quasi-positive *3	6	1	2	2	1
Negative	5	1	0	1	3
Postoperative sera *4 from AH patients					
"Incomplete type" pattern	9	0	9	0	0
Sera from persons who were positive in mass screening					
"Incomplete type" pattern	7	0	5	2	0
Total	80	47	19	10	4

*1 FIA-positive staining patterns were classified into five types: P1, P2, P3, P4 and P5, which were originally revealed by sera from French patients infected with *Echinococcus*. P1 and P2 are defined as specific to *E. granulosus*, P3 is defined as specific to *E. multilocularis*, and P4 and P5 are defined as specific to *E. granulosus* or *E. multilocularis*. Representative examples of P3, P4 and P5 are shown in Fig. 2. Sera showing P1 and P2 were not found in the serum specimens from AH patients in Hokkaido. The final concentration of tested sera was a 1 : 25 dilution.

*2 HWB-positive staining patterns were classified into two types: the complete type pattern and the incomplete type pattern, which were clearly revealed when HWB was applied to sera from AH patients in Hokkaido, as shown in Fig. 1. The final concentration of tested sera was a 1 : 200 dilution.

*3 Atypical or vague patterns were judged as quasi-positive.

*4 Serum samples taken from patients over three years after the surgical removal of echinococcal lesions.

2. FIA による検査成績

FIA による検査では、HWB—完全型患者術前血清 43 例の全例が P3 パターンを示した。HWB—不完全型患者術前血清 10 例のうち、2 例が P3、3 例が P4、5 例が P5 パターンを示した。HWB—疑陽性患者術前血清 6 例については、1 例が P3、2 例が P4、2 例が P5 パターン、1 例が陰性パターンを示した。HWB—陰性患者術前患者血清 5 例のうち、2 例が陽性パターン (P3 と P4 パターン)、残り 3 例は陰性であった。HWB—不完全型患者術後血清 9 例の全例が P4 パターンを示した。一次検診・要観察者 (HWB—不完全型) の血清 7 例のうち、5 例が P4、2 例が P5 パターンを示した。以上の結果を Table 1 にまとめた。また、主な検体の染色パターンを Fig. 2 に示す。

考 察

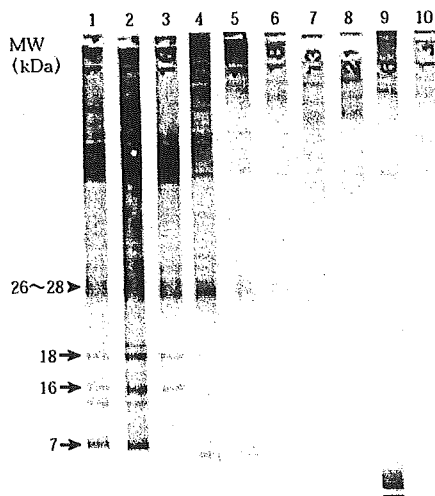
HWB による検査では、陽性パターンとして完全型パターンと不完全型パターンの 2 種類が認め

られている⁶⁾⁷⁾。完全型パターンは 55kDa および 66kDa バンドを中心とする多バンド形成を特徴としており、多数のバンドの形成が主に 29~205 kDa の分子サイズ域で認められる (Fig. 1 のレーン 1)。特に、55kDa および 66kDa 分子サイズの二つの明瞭なバンドが診断に有用なバンドである。不完全型パターンは 30~35kDa 領域に見られるスメア様バンド (C 抗原: 多糖類抗原で、Em2 多糖類抗原とほとんど同一の抗原性—B. Gottstein 博士の私信⁸⁾) を主とした寡バンド形成を特徴とする (Fig. 1 のレーン 2)。多バンド形成でも、55kDa および 66kDa バンドを欠くか、バンド形成が弱く不明瞭な場合を疑陽性パターンとして陽性パターンから区別している。

HWB で検出される 55kDa および 66kDa バンドは他の高分子サイズ抗原バンドに比し特異性が非常に高く、免疫染色性が強いバンドである⁹⁾。分子サイズ、免疫化学的性状 (55 と 66kDa のバンド

Fig. 2 Representative positive patterns obtained by FIA using AH patients' sera and suspected persons' sera

Lanes 1-3 show pattern P3 of preoperative and "complete type"-showing sera from AH patients. Lanes 4 and 5 show pattern P5 of preoperative and "incomplete type"-showing sera from AH patients. Lane 6 shows pattern P4 of a postoperative and "incomplete type"-showing serum from AH patients. Lanes 7 and 8 show pattern P4 of mass screening-positive and "incomplete type"-showing sera from suspected persons. Lanes 9 and 10 show negative patterns of preoperative and HWB-negative sera from AH patients.



間交差反応性；66kDaバンドの抗原不安定性状等），幼虫組織内局在部位（未分化幼虫胚層部）からFroschらのリコンビナント抗原“EM10”の天然抗原（55kDa抗原および65kDa抗原）^{10）}に相応するものと考えられている⁷⁾⁹⁾。

一方，FIAの場合，5種類の陽性パターン（P1, P2, P3, P4, P5）があり，P1およびP2パターンが*E. granulosus*感染，P3パターンが*E. multilocularis*感染，P4およびP5が*Echinococcus*感染に特異的なパターンと記されている⁵⁾。P3パターンにおいては，18kDaバンドと16kDaバンドの両方または何れかのバンド並びに26~28kDaバンドが必ず見られ，多くは他のバンドも形成されるパターンと定義されている。これら陽性パターンの主たる

構成バンドは26~28kDaバンド，18kDaバンドおよび7kDaバンドである。また，P3パターンを構成する最も重要なバンドである18kDaバンドは，分子サイズと非常に高い種特異性から，ItoらのEm18抗原¹¹⁾に相応する抗原バンドと考えられている⁵⁾。実際，フランス製キットとEm18-ウエスタンブロット法による多包性エキノコックス症患者血清を用いたブラインド検査でも非常によく似た検査結果が得られている¹²⁾。また，SakoらによるN末端アミノ酸配列解析¹³⁾によると，リコンビナントEm18はEM10（上記Froschらのリコンビナント抗原）の断片であり，EM10およびEmII/3-10（Mullerらのリコンビナント抗原¹⁴⁾—VogelらのEmII/3リコンビナント抗原¹⁵⁾の短鎖化抗原で，EM10との間にシークエンスホモロジー）と抗原的関連性をもつとしている。

次に感度について術前血清（64例）を用いた成績と比較すると，疑陽性例を含めた陽性率の比較では，HWB（陽性53例+疑陽性6例の割合：92.2%）とFIA（陽性60例の割合：93.8%）ではほぼ同程度の感度となる。しかしながら，厳密に陽性例のみでの比較となるとFIAの感度の方が明らかに高い。HWB—疑陽性血清の6例のうち5例，陰性血清の5例のうち2例がFIAによる検査で陽性と判定できたためである。

これらのHWB疑陽性（あるいは陰性）一，FIA陽性と判定された7例（2例がP3, 2例がP4, 3例がP5パターン）の染色度合いは1例（HWBで多バンド形成となったが55および66kDaバンドを欠くので疑陽性と判定）を除き完全型血清のものより明らかに薄い色調であり，抗体量が少ないことを推察させた。不完全型と完全型血清との間の抗体量を比較した前の研究⁷⁾でも，不完全型血清（FIAによる検査では80%がP4あるいはP5パターンに分布—Table 1）に含まれる抗体量は完全型血清（FIAによる検査では100%がP3パターンに分布—Table 1）より明らかに少ないと結論されている。

この様に，HWBで不完全型，疑陽性，陰性の例では抗体量が非常に少なく，限界域での検査となるが，FIAは，その多くをP4あるいはP5パター

平成16年4月20日

ンとして、また、少ないがP3パターンとして判定することができた。この様な判定の明瞭化の理由として、FIAの反応液中血清検体の最終希釈濃度が1:25であったことを挙げることができる。即ち、HWB検査より4倍濃い血清の使用が反応液中抗体含量を上げ、FIA検査での結果を明瞭化したと考えられた。

また、抗体の非常に少ない量でも26~28kDaバンドおよび7kDaバンドが明瞭に抗原として反応したことは、これら二つのバンドの抗体検出感度が他のバンドに較べて高いことを示唆している。これらのバンドに種特異性が高い18kDaバンドを加えた三抗原バンドを判定基準にすることにより、低希釈濃度(1:25)での血清検体の使用を可能にし、判定が容易になり、結果的に感度を上げることができたと考えられる。

北海道では、エキノコックス症のためのELISAによる一次住民検診(マスキング)が1982年から実施されている¹⁶⁾。この検診で要観察者となったがUS検査により陰性と判定された住民の血清(HWB—不完全型陽性血清)について、フランス製キットで検査した場合、これらの血清はP4とP5パターンに分類されることが判明した(Table 1)。上述のごとく、P4およびP5パターンは、種(species)ではなく属(genus)に特異的なパターンと説明されている。①北海道居住者に*E. granulosus*感染によるエキノコックス症患者は、これまで、報告されていない¹⁷⁾、②上記要観察者血清と似た結果が術後3年以上経過し、且つ不完全型を示した患者からの血清にも認められた(P4パターンのみ; Table 1)、③完全型陽性者と不完全型陽性者の地理的分布状況は北海道のエキノコックス症の流行推移と密接に関連している¹⁾、などを考えるなら、上記住民のHWB—不完全型陽性結果は過去の*E. multilocularis*感染歴を意味するかもしれない。

少数例ではあるが、有鉤囊虫症ではP4パターンの26~28kDaバンドやP3パターンの16および18kDaバンドに交差反応が現れ、マンソン住血吸虫症では7kDaバンドで交差反応が出現する可能性があることが、既にFIAの使用で指摘されてい

る⁹⁾。自己免疫疾患でも26~28kDaバンドに交差反応した例が認められているので⁹⁾、微弱な単独バンド免疫染色例ではエキノコックス以外の他寄生虫感染、自己免疫疾患も考慮される必要があると思われる。

文 献

- 1) Kimura H, Furuya K, Kawase S, Sato C, Yamano K, Takahashi K, et al.: Recent epidemiologic trends in alveolar echinococcosis prevalence in humans and animals in Hokkaido. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 117-220.
- 2) 感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律(平成10年10月2日法律第114号)。
- 3) 佐藤直樹, 内野純一, 小笠原和広, 藤堂 省, 古屋宏二: 肝エキノコックス症の病態と予防—とくに職業との関連において—。日本職業・災害医学会会誌 2003; 51: 17-23.
- 4) Gottstein B, Jacquier P, Bresson-Hadni S, Eckert J: Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{Pr} antigen. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 373-6.
- 5) Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Houin R, Piarroux R: Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: Confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western blot. *J Clin Microbiol* 2001; 38: 3718-21.
- 6) Furuya K, Sasaki S, Hónma H, Kumagai M, Sato N, Takahashi M, et al.: Serologic investigations of human alveolar hydatid disease by Western blotting and indirect histo-immunoperoxidase techniques. *Jpn J Parasitol* 1989; 38: 184-93.
- 7) Furuya K, Sato N, Uchino J: VI. Immunodiagnosis. 2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting (HWB) test. In: Uchino J, Sato N, ed. *Alveolar Echinococcosis of the Liver*. Hokkaido University Medical Library Series, Vol. 30. Kokoku Printing, Sapporo, 1993; p. 75-91.
- 8) 古屋宏二, 佐藤直樹, 川中正憲, 高橋健一, 澤田幸治, 本間 寛, 他: 北海道のエキノコックス症患者肝病巣についての免疫組織化学的検討。道衛研所報 2001; 51: 1-6.
- 9) 古屋宏二, 佐藤直樹, 木村浩男: エキノコックス症。臨床病理(特集 検査微生物学(II) ウイルスと原虫・寄生虫感染症の検査診断 2. 蠕虫性疾患) 1998; 108: 220-5.
- 10) Frosch PM, Frosch M, Pfister T, Schaad V, Bitter-

- Suermann D : Cloning and characterization of an immunodominant major surface antigen of *Echinococcus multilocularis*. Mol Biochem Parasitol 1991 ; 48 : 121—30.
- 11) Ito A, Nakao M, Kutsumi H, Lightowlers MW, Itoh M, Sato S : Serodiagnosis of alveolar hydatid disease by Western blotting. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993 ; 87 : 170—2.
 - 12) Ito A, Xiao N, Liance M, Sato MO, Sako Y, Mamuti W, *et al.* : Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with affinity-purified Em18 and an ELISA with recombinant Em18 for differential diagnosis of alveolar echinococcosis : results of a blind test. J Clin Microbiol 2002 ; 41 : 61—5.
 - 13) Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Gottstein B, Lightowlers MW, *et al.* : Alveolar echinococcosis : characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 2760—5.
 - 14) Vogel M, Gottstein B, Muller N, Seebeck T : Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. Mol Biochem Parasitol 1988 ; 31 : 117—25.
 - 15) Muller N, Gottstein B, Vogel M, Flury K, Seebeck T : Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol Biochem Parasitol 1989 ; 36 : 151—9.
 - 16) Sato N, Uchino J, Suzuki K, Kamiyama T, Takahashi M, Shimamura T, *et al.* : IX. Mass screening. In : Uchino J, Sato N, ed. Alveolar Echinococcosis of the Liver. Hokkaido University Medical Library Series, Vol. 30. Kokoku Printing, Sapporo, 1993 ; p. 121—9.
 - 17) Furuya K, Kawanaka M, Sato N, Honma H, Tamura M : Has *Echinococcus granulosus* settled in Hokkaido? Jpn J Infect Dis 2000 ; 53 : 176—7.

Laboratory Evaluation of Commercial Immunoblot Assay Kit for Serodiagnosis of
Echinococcus Infections Using Sera from Patients with Alveolar Hydatidosis in Hokkaido

Koji FURUYA¹⁾²⁾, Masanori KAWANAKA³⁾, Kimiaki YAMANO¹⁾,
Naoki SATO³⁾ & Hiroshi HONMA¹⁾
¹⁾Hokkaido Institute of Public Health
²⁾National Institute of Infectious Diseases
³⁾Hokkaido University Hospital

Using serum specimens from patients with alveolar hydatidosis (AH) in Hokkaido, we assessed the usefulness of "Echinococcus Western Blot IgG" (the French immuoblot assay, FIA), which has recently been launched from Ldbio Diagnostics (Lyon, France) as new commercial immunoblot assay kit of immunodiagnosis of *Echinococcus* infections. Eighty serum specimens were used for the present study : 64 preoperative sera and nine postoperative sera, which were taken from AH patients in Hokkaido, and seven sera from persons who were ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) - positive in mass screening which was conducted for checking on *Echinococcus* infections in Hokkaido since 1982.

When the 64 preoperative sera were examined by the Western blotting method (the Hokkaido method of Western blotting, HWB) which had been carried out at Hokkaido Institute of Public Health between 1987 and 1993, it was found that 53 cases were positive and six cases were quasi-positive, i. e. the rate of the positive cases including quasi-positive cases was 92.2%.

From immunostaining patterns, HWB-positive sera could be grouped in two types : the complete type, which showed a pattern of multiple bands containing the 55 and 66 kDa bands, and the incomplete type, which showed patterns of only few bands containing the AH-specific polysaccharide antigen named C antigen. Forty-three of the 53 HWB-positive sera were of the complete type and the residue was of the incomplete type.

On the other hand, when the 64 preoperative sera were examined by FIA, 60 sera (93.8%) were judged to be positive and the others as negative sera. On the basis of the interpretation of immunostaining patterns described in the instruction manual, 47 (78.3%) of the 60 positive sera were regarded as pattern P3, five (8.3%) as pattern P4, and eight (13.3%) as pattern P5. All of the complete-type sera were regarded as P3, indicating high antibody titers. Contrarily, most of the incomplete-type or quasi-positive sera resulted in other patterns such as P4 and P5, indicating low antibody titers. Of 5 HWB-negative sera, two were FIA-positive (which showed P3 and P5 patterns respectively), however their immunoreactions were significantly low.

Therefore, apart from interpretation of pathological conditions of cases with exceedingly low antibody titers, FIA may be able to give a serologically clear interpretation to HWB-quasi-positive cases, indicating that it is a highly sensitive and useful method for immunodiagnosis of *Echinococcus* infections.

(J.J.A. Jn.C. J.L. 78: 320~326, 2004)

犬のエキノコックス症

奥祐三郎¹、野中成晃¹、八木欣平²、神谷正男¹

¹北大・獣医・寄生虫、²北海道衛研・感染病理

Canine Echinococcosis

Yuzaburo OKU¹, Nariaki NONAKA¹, Kinpei YAGI², Masao KAMIYA¹

¹Dept. Parasitology, Hokkaido Univ., ²Hokkaido Institute Public Health

感染リスクの高まり

多包条虫 *Echinococcus multilocularis* は北半球に広く分布する人獣共通寄生虫で、最近の北海道のキツネの感染率は約40%で、全道的に感染リスクが高まっている。自然界ではキツネと野ネズミの野生動物間の感染環が主であるが、人と共に生活している犬もエキノコックスの終宿主となり、飼い犬が感染すると、飼い主や住民の感染源として危険である。すでに、北海道では飼い犬・野犬から多数のエキノコックス感染例が知られており、本州へ運ばれた犬においてもエキノコックス感染例が発見された。人、家畜及び物産の交流とともにエキノコックス流行地が拡大する危険性がある。

感染状況と飼育環境

濃厚汚染地で患者数が特に多いアラスカのセントローレンス島や中国の一部の地域では、犬が人への感染源として重要である。最近の北海道では感染キツネが都市周辺でも高率に見られるようになり、野ネズミが感染し、その感染ネズミを飼い犬が食べる機会がある。

北海道における1966年から2002年までの終宿主動物の調査結果をまとめると、キツネ18.7%、イヌ1.0%、検査頭数の少ないネコとタヌキはそれぞれ5.5%、1.2%の感染率である(1)。世界中でもキツネの感染率は高いが、通常犬の感染率は低い。

世界における多包条虫の犬における感染状況

表 世界各地における犬の多包条虫感染状況

国	地 域	年代	感染率
アラスカ	セントローレンス島	1951	12%
ロシア	ヤクーツク	1966	18% (55/307)
中 国	ガンスー	1992	10.3% (6/58)
中 国	スーチュワン	1991	14.3% (4/28)
中 国	スーチュワン	1999	12.1 -25.0%
ドイツ	バーデン-ヴュルテンブルグ	1998	0% (0/145)
スイス	南東スイス	1999	0.30% (2/660)
スイス	フライブルグ (野犬)	1996-97	12% (5/41)
スイス	東部	1995	0.22% (2/452)
米 国	ミネソタ (農家の犬)	1997	2.4% (3/123)

は、上の表に示したように10%以上の地域もあるが、1%以下の地域もある。10%以上の地域は特に濃厚な汚染地域で、犬の放し飼いが普通で、犬と野ネズミの接点の多い地域もしくは、野犬のデータである。人の生活圏にも中間宿主となる野ネズミが生息し、犬が放し飼いにされたときなどに捕食し、多包条虫に感染するものと考えられる。北海道の飼い犬のエキノコックス検査依頼主へのアンケート調査においては、約1/4の飼い犬がネズミに興味を示すと回答している。

1983年以降の北海道(自治体)における野犬取

容所の犬の剖検調査では19頭の犬から多包条虫が検出され、そのうち14頭は野犬、4頭は飼い犬、1頭は由来不明で、これらの4頭の飼い犬はすべて放し飼いにされていた個体である。我々へ検査依頼された飼い犬の中では、10頭が多包条虫虫卵陽性犬が発見され、ラブラドル・レトリバーが3頭で、少し他の品種より高い傾向が認められた。また、陽性犬のほとんどは室外飼育で、しばしば放し飼いをされている犬であった。糞便性状は正常で、軟便は一例のみに見られ、感染していても症状を示さないことが確認された。これら以外に、2例下痢で動物病院へ来院した犬において、便中に成虫が発見された例もあった。最近一年間(2003.4.1~2004.3.1)の道内の犬・猫の我々の糞便検査結果では、検査頭数1,140中、抗原陽性頭数6、抗原・虫卵ともに陽性の頭数4、虫卵DNA陽性頭数3であった。野ネズミの生息する都市周辺部や農村部で放し飼いされる犬が感染の機会が多いが、都市市街地で室内飼育でまれに郊外で放している犬でも感染が認められた。我々の今までの調査で経歴の判明している感染犬としては、拾った犬(その後室内飼)、大きな敷地や牧場内で放し飼いの犬、主に室内飼育で毎日の散歩やまれに郊外に連れて行く犬、緊急避難時に放されしばらく野犬状態の犬であった。

感染後の経過

子犬への感染実験では、投与された原頭節の内44%~87%が定着し、犬は高感受性であることが示唆された。感染後の犬における感染後の経過は糞便内寄生虫抗原の推移により推測できる。便内抗原のOD値は感染後1週間ほどで顕著に上昇し、20-40日後に減少しはじめ、2-3ヶ月までにほとんど陰転する。これらのことから寄生期間はあまり長くなく、2-3ヶ月でほとんどの虫体が排除されるものと考えられる。虫卵排泄の推移は、感染後26日から虫卵が陽転し、虫卵排泄が開始し、その後排泄虫卵数の日間変動は顕著であるが、虫卵数は減少し、2-3ヶ月でほとんど検出されなくなる(2)。寄生期間は3ヶ月前後と予想されるが、小数の虫体が長期間残存する例もある。6万個の原頭節を実験的に投与した犬では、6ヶ月間

に1千万個の虫卵を排泄したと算出された。感染初期の虫卵数の日間変動は、寄生虫の発育がほぼシンクロしており、ほぼ同時に受胎片節の脱落と再生が起るため、糞便内虫卵数の変動が起ると予想される。

終宿主の犬やキツネにおいて、成虫はその頭節で小腸粘膜に吸着するのみで、固有層に侵入したりせず、病原性は弱く、ほとんど臨床症状を示さない。犬の感染実験において、無症状で、普通の硬い便に加えて粘液の塊を排泄する程度なので、下痢便を排泄することはまれと考えられる。下痢の症例で、成虫が糞便とともに排泄された症例もあるが、小形の虫体なので、顕微鏡で観察しないと鑑別は不可能である。病理組織学的な観察では正常か、軽度のカタル性の炎症がある程度である。野外で採取されたキツネの糞便でも、正常便から虫卵が多数検出されることから、キツネは感染しても下痢などの症状は通常示さないものと推察される。中間宿主のエゾヤチネズミが非常に多数の原頭節を保有することもあるので、飼い犬が一度に百万個以上の原頭節を摂取する可能性があり、このような重度の感染時にはカタル性の腸炎を引き起こすことも考えられる。

犬に感染した場合、多包条虫に対する血清中のIgG、IgM、IgAなどの顕著な上昇があるが、感染防御における抗体の意義はまだ不明で、再感染防御も顕著ではない。

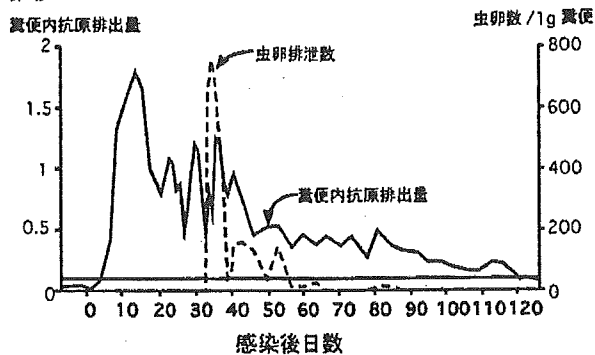
診断

エキノコックスの終宿主のための診断法がいくつか行われてきた。剖検による検査、虫卵検査、血清診断、アレコリンを用いた試験的駆虫などであるが、デメリットが多く、新たな診断法が必要とされていた。

我々はモノクロナール抗体EmA9を用い、糞便内のエキノコックス抗原をサンドイッチELISAで検出する方法を開発してきた。この方法は、糞便を加熱し殺卵後検査できることから安全で、感染後10日までに陽性となり早期診断可能で、虫卵が検出できない時期の診断も可能な方法で高感度であり、現在の感染の証明する診断法である(3)。

キツネの剖検検査(139頭、80頭虫体陽性)と

エキノコックス感染後における糞便内の抗原と虫卵数の推移



糞便の抗原検出法との相関から、感度92.5%、特異度96.6%であり、一方、虫卵検査は感度46.3%、特異度100%（この調査ではテニア科条虫としては多包条虫のみ検出された。）であった。さらに未感染犬として本州（千葉・神奈川）の飼い犬（605頭）の糞便を用いた結果で、平均+3SDを擬陽性カットオフ値、平均+5SDを陽性カットオフ値とした場合、擬陽性反応率1.8%、偽陽性反応率0%であった。以上の事から、このサンドイッチELISAによりスクリーニングを実施し、感染犬に対する迅速な対応を行い。最終的にはPCRによりエキノコックスDNAの特異的検出もしくは片節検出により確定診断を行っている。

感染犬が発見された時の対応

感染症新法が1999年4月より施行され、エキノコックス症は第4類感染症に含まれるようになり、患者数の全数把握のため、エキノコックス症と診断した場合は医師に届け出義務が課せられるようになった。一方、犬やキツネについての届け出義務はないが、虫卵を排泄するので、人への感

染予防の観点からは迅速な届け出が必要であり、新たな改訂が行われる予定である。

前述したように、時折飼い犬においてエキノコックス感染例が発見されるため、北海道小動物獣医師会と北大寄生虫学教室の共同でエキノコックス対応マニュアルを作成した(4)。犬へのプラジカンテル投与によりほぼ完全に駆虫されるが、虫卵を排泄するため、注意が必要であり、住民のその後の定期的な血清検査が必要となる。

キーワード：多包条虫、飼い犬、診断、対策、ガイドライン

- (1) 奥祐三郎 (2000) 体内で増殖・転移する寄生虫“エキノコックス”の拡がり, *mvm*, (48), 5-17.
- (2) 八木欣平・伊東拓也 (1999) 感染実験による多包条虫の生物学的性状の解析 北海道のエキノコックス 北海道衛生研究所 札幌 51-63
- (3) 奥祐三郎 (2002) 北海道における多包条虫の現状、終宿主診断と感染源対策, 北海道獣医師会雑誌46 (9), 1-13.
- (4) 北海道小動物獣医師会 (2003) エキノコックス対応マニュアル 北海道獣医師会雑誌47 (4), 42-47

連絡責任者：奥祐三郎、060-0818 札幌市北区北18条西9丁目 北海道大学・獣医学研究科・寄生虫学、

E-mail:oku@vetmed.hokudai.ac.jp

Correspondence: Yuzaburou Oku, Nishi-9 chome, Kita-12-jou, Sappori, Hokkaido060-0818, Dept. Parasitology, Hokkaido Univ., E-mail:oku@vetmed.hokudai.ac.jp

札幌市北東部における多包条虫媒介動物調査

奥祐三郎、劉俊佑、野中成晃、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

Epizootiology of *Echinococcus multilocularis* in the northeastern region of Sapporo

Yuzaburo Oku, C. Liu, Nariaki Nonaka, Masao Kamiya

Laboratory of Parasitology, Department of Disease Control, School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University

多包条虫は人に多包虫症を引き起こす人獣共通寄生虫で、その自然界における生活環は終宿主のキツネと中間宿主の野ネズミにより構成される。北海道ではキツネにおける感染率の増加、キツネのヒト生活圏への侵入、飼いイヌ・ネコへの感染などにより、ヒトへの感染リスクが増加することが危惧されている。本研究は今後の都市キツネに対する対策のための基礎データを得るため、札幌市辺縁部の多包条虫媒介動物における多包条虫流行の現状を明らかにし、媒介動物の生息する環境を調べた。札幌市の北東部は川や市街地により周辺からのキツネの侵入が制限されており、その地域内で繁殖・生息するキツネの多包条虫の動物疫学を解明するためには適した地域である。

本研究では、札幌市北東部およびその周辺におけるキツネの活動の拠点としての営巣地の位置を特定し、多包条虫の流行状況を知るためにキツネを捕獲・剖検を行なった。さらに、これらのキツネの生息地において採集したキツネの糞便を用いて糞便内抗原と虫卵検査を行ない、流行状況解明の一助とした。さらに野ネズミからの多包条虫伝播の機会を知るため、営巣地の周辺におけるエゾヤチネズミの分布を調べ、多包虫感染状況を調査した。

2003年5月から9月まで、札幌市北東部およびその周辺（江別市、当別町）において捕獲された25頭のキツネを剖検した。これらは捕獲場所から9グループに分けられた。当別の畑、川岸の荒地、および山間地では3グループ（G-I）、7頭捕獲されたが、感染ギツネは発見されなかった。札幌市北東部（A, C-F）と江別市（C）では6グループ（A-F）、18頭が捕獲された。このうち4グループ（A, B, C, E）、6頭（感染率33%）から感染ギツネが発見された。調査地域ではキツネ営巣地を3ヶ所発見し、それらは牧草地にある未使用の倉庫の床下、畑地内の廃屋および小さな沼と川

に挟まれた小さな林にあった。キツネ捕獲地・営巣地は川岸、畑地、山間地で、営巣地または捕獲地から最も近い民家までの距離は0.08~0.8km、民家の密集している住宅地までの距離は0.7~2.3kmであった。捕獲地域周辺の畑、倉庫、道路沿いでキツネの糞便（15個）が採集され、抗原および虫卵陽性糞便（2個）が見つかった。このうちの1個の陽性糞便は貢献において感染ギツネがみつからなかったグループ（F）の活動地域で発見されたものであった。キツネ営巣地周辺においてエゾヤチネズミの生息（延べトラップ数320、8ヶ所）調査を行ない、畑の端、荒地の笹叢や雑草地からエゾヤチネズミ16匹が（6ヶ所/8ヶ所）捕獲されたが、多包虫に感染したエゾヤチネズミは発見されなかった。以上のように札幌市北東部で、多包条虫感染ギツネとエゾヤチネズミの生息が確認され、多包条虫がこの地域内で定着していることが示唆された。

今回調査を行なった札幌市の北東部は地理的に隣接した地域から河川で隔離されており、キツネの行動範囲はこの地域内に制限されていると考えられる。したがって、札幌市北東部は駆虫薬入りのベイトを撒くことにより、効率的にキツネの多包条虫の感染率を低下させ、市民の健康を守ることができると考えられた。

Key words: *Echinococcus*, Urban, fox

連絡先 奥祐三郎 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寄生虫学教室

E-mail: oku@vetmed.hokudai.ac.jp

Correspondence: Y. Oku, Laboratory of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 060-0818

Transmission Electron Microscopy of *Schistosoma mansoni* Cercariae Treated with Hinokitiol (β -thujaplicin), a Compound for Potential Skin Application against Cercarial Penetration

MOHAMMOD MOINUDDIN CHISTY, MAHFUZA NARGIS, TAKASHI INABA,¹ KUNIO ISHITA,²
ARIHIRO OSANAI and HARUO KAMIYA

Department of Parasitology, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki
036-8562,

¹Department of Medical Technology, Hirosaki University School of Health
Sciences, Hirosaki 036-8564, and

²Institute for Animal Experiments, Hirosaki University School of Medicine,
Hirosaki 036-8562

CHISTY, M.M., NARGIS, M., INABA, T., ISHITA, K., OSANAI, A. and KAMIYA, H.
Transmission Electron Microscopy of Schistosoma mansoni Cercariae Treated with Hinokitiol (β -thujaplicin), a compound for Potential Skin Application against Cercarial Penetration. Tohoku J. Exp. Med., 2004, 202 (1), 63-67 — Since skin is the only route of entry of the parasite in schistosomiasis patients, intervention at the level of skin penetration should control the infection. Several compounds were screened for their ability to protect against cercarial penetration. Hinokitiol (β -thujaplicin) was found to have a significant cercaricidal effect in vitro, although there is no information on its cercaricidal mechanisms. To study the kinetics of morphological changes in *Schistosoma mansoni* associated with exposure to hinokitiol in vitro, cercariae were incubated in media containing hinokitiol at different concentrations and examined by transmission electron microscopy (TEM). TEM revealed that ultrastructural changes occurred by 15 minutes post exposure, at a concentration of 25 μ g/ml. Degenerative changes involving both tegument and deeper parenchymal structures were progressive with duration of exposure at the concentration of 50 μ g/ml. These structural changes may account for the inability of hinokitiol-treated cercariae to infect the host. ——— hinokitiol; *Schistosoma mansoni*; cercariae; transmission electron microscopy

© 2004 Tohoku University Medical Press

Received September 11, 2003; revision accepted for publication November 11, 2003.

Address for reprints: Haruo Kamiya, Department of Parasitology, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki 036-8562, Japan.

e-mail: hkamiya@cc.hirosaki-u.ac.jp

Schistosomiasis is a life threatening tropical disease of humans. Non-immune travelers visiting endemic areas are at high risk of acquiring this disease and disseminating the parasite to non-endemic areas (Stone 1995). Since skin is the only route of entry for this parasite into humans, intervention that prevents entry of cercariae into the skin should control the infection (Stirewalt and Dorsey 1974). Several compounds were screened for their ability to confer protection against cercarial penetration following skin application. Among these, a few compounds (diethyl boramide, niclosamide, cederol, β -thujaplicin and diethyl toluamide) showed significant cercaricidal effects in vitro (Naples et al. 1992; Abu-Elyazeed et al. 1993; Nargis et al. 1997; Salafsky et al. 1998). β -thujaplicin is a tropolone-related compound found in the heartwood of several cupressaceous plants such as western red cedar (*Thuja plicata*), eastern white cedar (*Thuja occidentalis*) and hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) (Nozoe 1936; Erdtmann and Gripenberg 1948). It is known to be effective as an antimicrobial agent (Katsumura et al. 1948; Kobori and Tanabe 1993, 1994), and is being used as an anti-bacterial hand washing solution (Kobori and Tanabe 1994). However, a review of literature reveals no ultrastructural information of hinokitiol-treated cercariae. The aim of this study, therefore, was to evaluate the in vitro effects of hinokitiol on cercariae of *Schistosoma mansoni* at the level of ultrastructure.

MATERIALS AND METHODS

A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was maintained in our laboratory by passage through Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, and *Biomphalaria glabrata*. Cercariae were obtained from the infected snails and used for experiments within 1 hour of shedding.

Synthesized hinokitiol powder of 100% purity was obtained from Takasago International Co. Tokyo. Hinokitiol powder dissolved (200 μ g/ml) in water and serial dilutions were prepared from 25 to 50 μ g/ml in distilled water (Nargis et al.

1997). Four ml of each dilution was transferred to each culture tube. Control tubes received an equal amount of water. Approximately 400 cercariae of *S. mansoni* were placed in each test tube. Samples were collected at 5, 15, 30, 60 and 120 minutes after exposure to hinokitiol at each concentration and processed for transmission electron microscopy (TEM).

Cercariae collected from each tube were transferred to a fresh tube containing 10 ml of RPMI 1640 medium plus 10% foetal calf serum (JRH Bioscience, Kansas) and concentrated into a pellet by centrifugation at 300 g for 10 minutes. The pellet was washed with the same medium, then fixed overnight at 4°C in a fixative containing 3% glutaraldehyde and 1% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PH 7.4). After 1 hour post-fixation in 1% osmium tetroxide the pellets were dehydrated through a series of ethanol and embedded in epoxy resin. Methylene blue stained sections were examined light microscopically and ultrathin sections were examined in a transmission electron microscope (JEOL, Tokyo) after staining with uranyl acetate and lead citrate.

RESULTS AND DISCUSSION

Cercariae exposed to hinokitiol at concentrations of 25 μ g/ml or more showed progressive morphological changes (Figs. 1 and 2), observed earliest at 15 minutes post exposure. Gross changes were observed, including cercarial tail loss in about 50% of cercariae at 15 minutes, and 90% by 30 minutes after exposure. These observations were consistent with the report by Nargis et al. (1997), which showed that hinokitiol at the concentration of 25 μ g/ml significantly affected the cercarial movement and swimming activity. Epon embedded thin sections were observed light microscopically and showed progressive degeneration of the acetabular glands (Fig. 1C), thinning of the tegument causing external protrusion with focal loss of spine (Figs. 1D and 1E), edematous swellings and other degenerative changes (Fig. 1F). Control cercariae exhibited normal morphology (Figs. 1A and 1B).

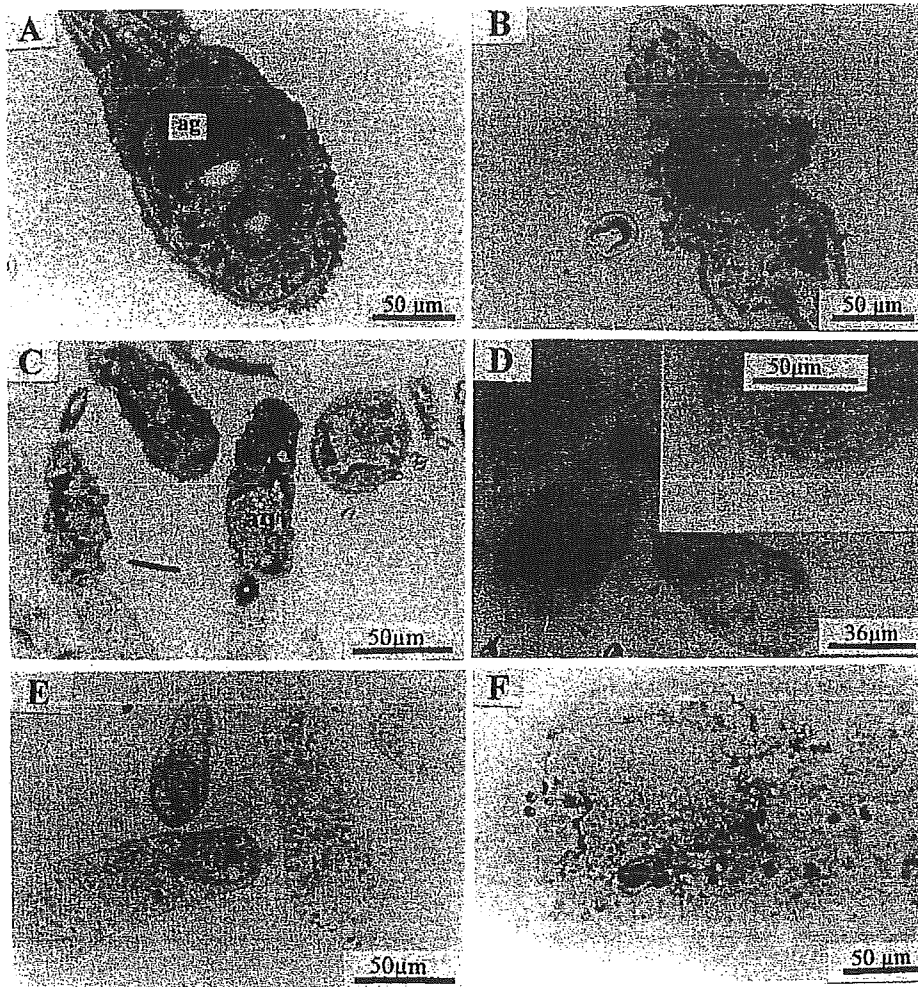


Fig. 1. Kinetics of morphological changes observed in cercariae of *Schistosoma mansoni* treated with hinokitiol (25 µg/ml). A) Control cercaria at 30 minutes; B) Hinokitiol-treated cercariae at 5 minutes; C) at 15 minutes, partial degeneration of the acetabular glands; D) at 30 minutes, complete degeneration of the acetabular glands with external protrusion (arrow head, inset); E) at 60 minutes; F) at 120 minutes post exposure, severe edema leading to rupture of the cercariae. ag, acetabular glands. Epon embedded Methylene blue stain.

Ultrastructural changes were evident as early as 15 minutes post exposure to hinokitiol, and became more severe with increased duration of exposure. Early degenerative changes included accumulation of membranous bodies (Fig. 2B), migration of cytoplasmic granules into the tegument (Fig. 2C) and loss of external glycocalyx resulting extreme thinning of the tegument (Figs. 2C, 2D and 2E), diffuse edematous changes in the parenchyma and focal lysis of the tegument causing expulsion of sub-tegumental materials

(Fig. 2D). These changes were noted in all of the parasites examined, although to a varying degree. Changes progressed in severity with increased duration of exposure (Figs. 2E and 2F).

Topically applied hinokitiol may not efficiently diffuse into the host skin and nor alter the host immune response against migrating schistosomes, although in vitro experiments suggested an immunosuppressive effect (Inamori et al. 1993). This study demonstrated that hinokitiol has a damaging effect in vitro on *S. mansoni*

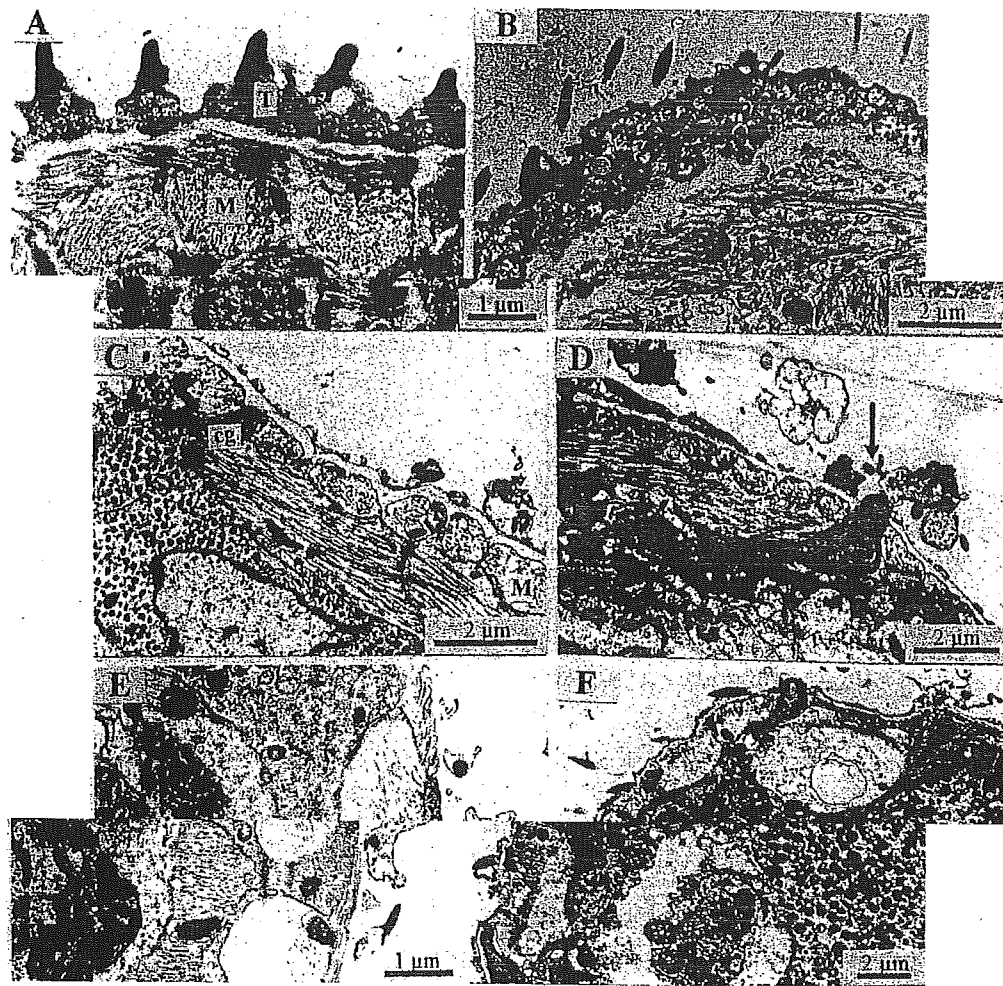


Fig. 2. Kinetics of ultrastructural changes in the cercariae of *Schistosoma mansoni* exposed to hinokitiol ($25 \mu\text{g/ml}$). A) at 120 minutes, Control cercaria, showing intact corrugated tegument (T), compact muscle layer (M) without cellular swelling or edema; B) at 15 minutes, hinokitiol-treated cercariae accumulation of membranous bodies in the tegument; C&D) at 30 minutes, migration of cytoplasmic granules (cg) towards the tegument and thinning of the tegument with degenerative changes causing focal breach of continuity of the tegument (arrow); E) at 60 minutes, edematous swelling of the muscle layer and deeper parenchyma; F) at 120 minutes, severe degeneration leading to membrane rupture.

cercariae in a concentration and time dependent manner. The minimum concentration ($25 \mu\text{g/ml}$) required to produce demonstrable degenerative changes (Figs. 1 and 2) is lower than the concentrations reported for a variety of bacteria and fungi, where effective concentrations of hinokitiol were 100 or $50 \mu\text{g/ml}$ (Kobori and Tanabe 1993; Okabe et al. 1989). In previous experiments we have reported that hinokitiol ($50 \mu\text{g/ml}$) treated-cercariae showed defective motility and infectivity (<1% adult worm recovery in mice vs. >60% in

vehicle controls (Nargis et al. 1997). Based on the results from the present study, degenerative structural alterations prevented the cercariae from penetrating the host skin.

Apart from anti-microbial effects, various bioactivities of hinokitiol have been reported, such as repellent activity for ticks, inhibitory effect on the germination of plant seeds and the growth of roots of several plants, cytotoxic effect on tumor cells, and lymphocyte blastogenesis (Okabe et al. 1988; Inomori et al. 1991, 1993).

The mechanism underlying broad range bioactivities and the target(s) is still unrevealed. In vitro cytotoxic and immunosuppressive effects of hinokitiol have been reported; namely it prevents ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes of mice (Baba et al. 1998), and influenza virus-induced apoptosis, replication and release from the infected Madin-Darby canine kidney cells (Miyamoto et al. 1998).

Hinokitiol is generally considered safe to host skin even at high concentrations, as it might not be absorbed through the host skin (Nargis et al. 1997). Furthermore, hinokitiol applied to the skin did not alter the migration of epidermal Langerhans' cells to regional lymph node of guinea pigs infected with *S. mansoni* (Chisty, M.M. et al.; unpublished data). Intervention may be achieved by application of hinokitiol with an appropriate base that may help it persist on the skin surface and make it more resistant to removal by contact with water.

Acknowledgments

This work was financially supported in part by grants from Aomori Industrial Promotion Program and US-Japan Medical Cooperation Program.

References

- Abu-Elyazeed, R.R., Podgore, J.K., Mansour N.S. & Kilpatrick, M.E. (1993) Field trial of 1% niclosamide as a topical antipenetrant to *Schistosoma mansoni* cercariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 403-409.
- Baba, T., Nakano, H., Tamai, K., Sawamura, D., Hanada, K., Hashimoto, I. & Arima, Y. (1998) Inhibitory effect of beta-thujaplicin on ultraviolet B-induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 24-28.
- Erdtmann, H. & Gripenberg, J. (1948) Antibiotic substances from the heart wood of *Thuja plicata* Don. *Nature*, **161**, 719.
- Inamori, Y., Nishiguchi, K., Matsuo, N., Tsjibo, H., Baba, K. & Ishida, N. (1991) Phytogrowth-inhibitory activities of tropolone and hinokitiol. *Chem. Pharmacol. Bull.*, **39**, 2378-2381.
- Inamori, Y., Tsjibo, H., Ohishi, H., Ishii, F., Mizugaki, M., Aso, H. & Ishida, N. (1993) Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biol. Pharmacol. Bull.*, **16**, 521-523.
- Katsumura, S., Tamura, K., Hatori, S. & Maeda, S. (1948) Über die bakterizide und entwicklungschemmenende Wirkung von 1-Rhodinsäure, d-Citronellensäure und Hinokitiol im Vergleich mit Caprinsäure und den ihr naheverwandten Fettsäuren. *Tohoku J. Exp. Med.*, **49**, 357-364.
- Kobori, K. & Tanabe, T. (1993) Antimicrobial activity of Hinokitiol for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. 1st report. *Igaku kensa*, **42**, 1639-1642. (In Japanese)
- Kobori, K. & Tanabe, T. (1994) Antimicrobial activity of Hinokitiol for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. 3rd report. *Igaku kensa*, **43**, 21-25. (In Japanese)
- Miyamoto, D., Kusagawa, Y., Endo, N., Sometani, A., Takeo, S., Suzuki, T., Arima, Y., Nakajima, K., & Suzuki, Y. (1998) Thujaplicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses. *Antiviral Res.*, **39**, 89-100.
- Naples, J.M., Shijff, C.J. & Rosler, K.H. (1992) *Schistosoma mansoni*: cercaricidal effects of cedarwood oil and various of its components. *J. Trop. Med. Hyg.*, **95**, 390-396.
- Nargis, M., Sato, H., Ozaki, T., Inaba, T., Chisty, M. & Kamiya, H. (1997) Cercaricidal effect of hinokitiol on *Schistosoma mansoni*. *Hirosaki Med. J.*, **49**, 49-57.
- Nozoe, T. (1936) Über die Farbstoffe im Holzteile des "hinoki" baumes. 1. Hinkitin and Hinokitiol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **11**, 295-298.
- Okabe, T., Saito, K. & Otomo, Y. (1988) Physicochemical properties of a wood oil constituent, Hinokitiol, and its antimicrobial action. *Fudo Kemikaru*, **2**, 45-52. (In Japanese)
- Okabe, T., Saito, K. & Otomo, Y. (1989) Antibiotic effect of hinokitiol and its use as a preservative. *Jpn. Food Sci.*, **28**, 49-58. (In Japanese)
- Salafsky, B., Ramaswamy, K., He, Y., Anderson, G.L., Nowicki, D.K., & Shibuya, T. (1998) Evaluation of N, N-Diethyl-m-Toluamide (DEET) as a topical agent for preventing skin penetration by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 828-834.
- Stirewalt, M.A. & Dorsey, C.H. (1974) *Schistosoma mansoni*: Cercarial penetration of host epidermis at the ultrastructural level. *Exp. Parasitol.*, **35**, 1-15.
- Stone, R. (1995) Global warming. If the mercury soars, so many health hazards. *Science*, **267**, 957-958.