

golden hamsters, Mongolian gerbils, chinchillas and gibbons that were orally inoculated with cysticerci obtained from naturally infected pigs, have been reported. Gravid proglottids were recovered only from chinchillas and gibbons (Cadigan et al. 1967; Verster 1971, 1974; Maravilla et al. 1998). In *T. s. saginata*, sexually mature tapeworms were recovered from gerbils inoculated with cysticerci obtained from naturally infected cattle (Kamiya et al. 1990). It has also been demonstrated that cysticerci of *T. solium* recovered from SCID mice could develop to maturity in hamsters, although only pregravid tapeworms were obtained (Wang et al. 1999). In the present study, we examined the infectivity and development of *T. s. asiatica* metacystodes from SCID mice in humans and its alternative definitive host, golden hamsters and Mongolian gerbils.

Materials and methods

Parasite

Proglottids of the *T. s. asiatica* adult worm were collected from a Taiwanese aborigine patient after deworming with atabrine (Quinacrine) (Fan et al. 1990b). The worms were stored at 4°C in saline until used.

Development of metacystodes in SCID mice

Eggs were collected from gravid proglottids. Embryophores were removed by incubating the eggs in 10% sodium hypochlorite for 10 min, and the oncospheres were washed five times in sterile saline. Eighteen SCID mice (C.B-17/Icr-scidJcl, female) purchased from a commercial source (CLEA, Tokyo, Japan) were subcutaneously inoculated with 20,000 and 40,000 oncospheres or intraperitoneally with 18,600 oncospheres of *T. s. asiatica* (Table 1). The SCID mice were kept in sterile cages and wood chips were used as bedding. The mice were provided with autoclaved drinking water and commercial pellet food (CLEA, Tokyo, Japan) *ad*

libitum. All the inoculated SCID mice were anesthetized under diethyl ether at 10, 20, 21, 24 and 45 weeks after inoculation and examined the presence and number of metacystodes. To check the evagination rate, cysticerci were incubated in calf bile in 37°C for 1 h. For the morphological observation, evaginated cysticerci were stored in a refrigerator at 4°C in saline overnight, fixed in 70% alcohol, and cleared in glycerin.

Development of tapeworms in human and alternative definitive hosts

Each of three human volunteers (1 female, volunteer A, 30 years old, 2 males, volunteer B and volunteer C, 26 and 51 years old, respectively) swallowed five 45-week-old cysticerci that were obtained from SCID mice. After ingesting the cysticerci, the volunteers checked their feces daily for the presence of proglottids. Fifty-five 3-week-old male golden hamsters were purchased from a commercial breeder (SLC, Shizuoka, Japan) and used for the experiment after 3 weeks acclimatization (Table 2). The hamsters were divided into two groups, designated H1 and H2, and then orally inoculated with 20 and 24 week-old cysticerci, respectively. Eighty-one 5–11 week-old male and female Mongolian gerbils raised in our laboratory, were used for the experiment (Table 2). The gerbils were orally inoculated with 10, 20, 21 and 45 week-old cysticerci and divided into 4 groups, namely G1, G2, G3 and G4. The animals were injected subcutaneously with prednisolone acetate at different schedules as shown in Table 2. They were then orally inoculated with cysticerci of *T. s. asiatica* obtained from SCID mice by stomach tubes and fed commercial pellet food (CLEA, Tokyo, Japan) and water *ad libitum*. Animals were anesthetized with diethyl ether at 2 to 146 days post inoculation and tapeworms were collected from their intestines. After storing the worm in saline at 4°C overnight, the worms were fixed in 70% ethanol, stained with acid-carmin and observed under light microscope.

Table 1 Recovery rates of *T. s. asiatica* metacystodes from eighteen SCID mice subcutaneously inoculated with oncospheres

Oncospheres			SCID mice		Metacystodes recovery		
Source ^a	Inoculation route	Inoculation dose	Number	Age of autopsy (weeks)	Number		Recovery rate (%)
					Average	Range	
A	Subcutaneous	20,000	5	12, 20	133.6	20–218	0.1–1.1
	Intraperitoneal	18,600	5	12, 20	10.8	0–50	0–0.3
B	Subcutaneous	40,000	3	24, 62	153.6	1–450	0.003–1.1
	Subcutaneous	20,000	5	10–45	814.2	174–2,000 ^b	0.9–6.4

^a Source A: eggs collected from worms after deworm treatment in December, 2003 and inoculated into mice on January 9, 2004

^a Source B: eggs collected from worms after deworm treatment in April, 2004 and inoculated in May, 2004

^b The number of recovered metacystodes from 1 of the 5 mice was estimated by the dilution method (2000 metacystodes were recovered) and other samples were counted without dilution

Table 2 Alternative definitive host groups and their treatment

Animals				Cysticerci		Schedule of PA treatment ^c
Group	Number	Age (weeks old)	Sex ^a	Number ^b	Age (weeks old)	
H1	10	6	M	6	20	A
	10	6	M	6	20	B
	11	6	M	6	20	C
	10	6	M	6	20	D
H2	8	6	M	15	24	A
	6	6	M	15	24	D
G1	21	5-7	M, F	20-40	10	A
G2	11	6-9	M, F	6	20	A
	11	6-9	M, F	6	20	C
	10	6-9	M	6	20	D
G3	11	6-12	M	25-40	21	A
G4	17	5-11	M	2	45	E

^aM: male; F: female

^bNumber of cysticerci/animal

^cDosage of PA (prednisolone acetate) was 0.2-0.5 mg per animal. PA treatment schedules are as follows: A: every 7 days from 17-

3 days before infection; B: every 4 days from 6 days before infection; C: every 2 days from 6 days before infection; D: no PA treatment; E: 7 and 0 days before infection and every 14 days from 56 days after infection

Results

Development of metacestodes in SCID mice

Metacestodes were recovered from the subcutaneous tissue inoculation site from subcutaneously inoculated mice, and from the peritoneal cavity of intraperitoneally inoculated mice (Table 1). The recovery rates of metacestodes from intraperitoneally inoculated mice ranged from 0% to 0.3%, while those from subcutaneously inoculated mice ranged from 0.1% to 1.1% (Table 1, parasite source A). The recovery rate of metacestodes from subcutaneously inoculated mice was higher than those from intraperitoneally inoculated mice.

The total length of the evaginated cysticerci increased with age, as well as the average width of the scolex and diameter of the suckers (Table 3). Evagination rate of the recovered cysticerci was 88% for 10 week-old cysticerci, 69% for 24 week-old cysticerci and 100% for 45 week-old cysticerci (Table 3).

Microscopic observation revealed that calcareous corpuscles were few in 10 week-old cysticerci but abundant in 24 and 45 week-old cysticerci (Fig. 1b, 2b). Hooklets (rudimentary hooks) could be observed in 10 (Fig. 1c, d), 24 (Fig. 2c, d) and 45 week-old metaces-

todes (10-48% of the specimens of all ages possess the hooklets). The rostellar region of 10 week-old cysticerci was full of small-granules aggregations (Fig. 1c, d), while the rostellar regions of 24 and 45 week-old cysticerci showed fewer small-granules aggregations (Table 3, Fig. 2c, d).

The recovery rate of tapeworms was 1.2% (3/246) for 20 week-old and 1.4% (3/210) for 24 week-old cysticerci in the golden hamster. The recovery rate of tapeworms were 0% (0/640) for 10 week-old, 1.0% (2/192) for 20 week-old, 0.5% (2/403) for 21 week-old and 5.8% (2/34) for 45 week-old cysticerci in Mongolian gerbils (Table 4).

Development of tapeworms in alternative definitive hosts

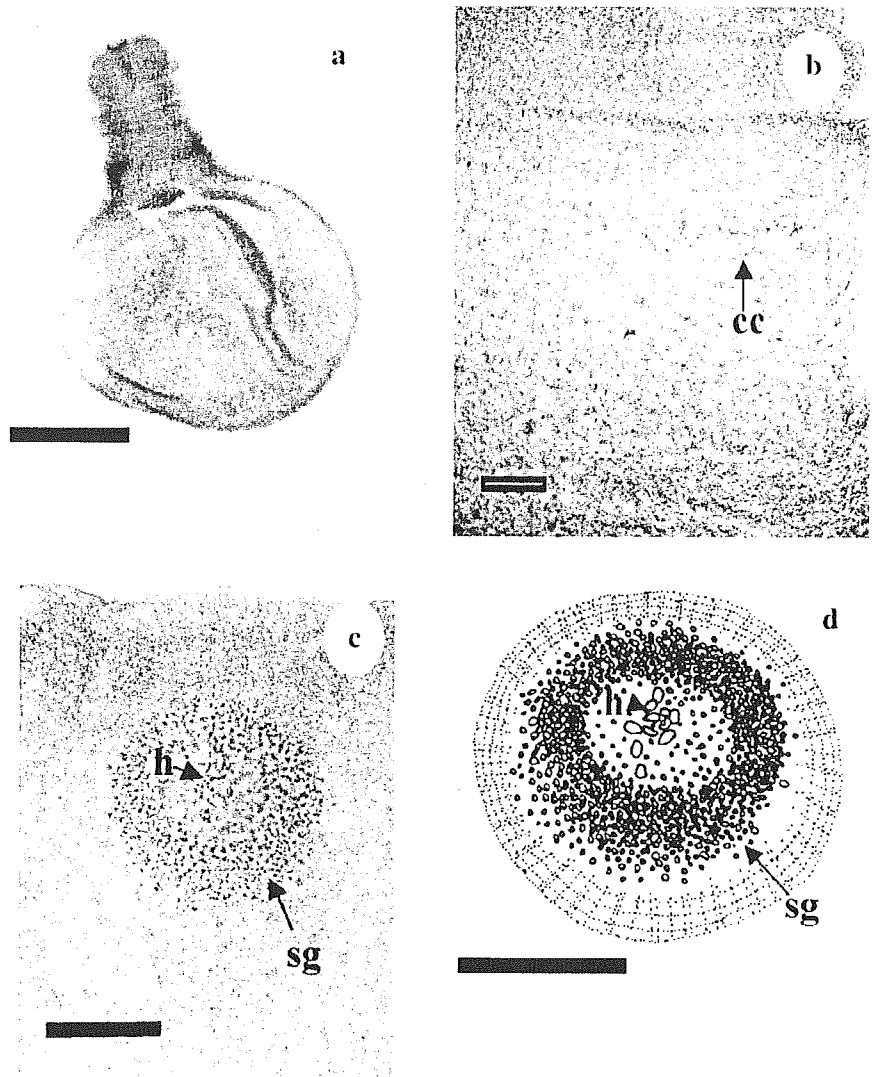
Tapeworms of *T. s. asiatica* were recovered from golden hamsters at days 6, 7, 12, 13 and 14 post-infection. The worms were also recovered from immunosuppressed gerbils at days 2, 7, 25, 36 and 62 post-infection (Table 4). Worms were detected in the anterior part of the small intestine. The length of the six tapeworms recovered from the six hamsters (one worm from each animal) after fixation, ranged from 1 mm to 6 mm, while that of

Table 3 Evagination rates and morphological measurements of *T. s. asiatica* cysticerci recovered from three SCID mice

Age of metacestodes (weeks)	Morphological observation of cysticerci					Evagination rate ^a
	Number of examined	Total length (µm) (Mean ± SD)	Width of scolex (µm) (Mean ± SD)	Diameter of suckers (µm) (Mean ± SD)	No. of calcareous corpuscles	
10	n=24	1,750 ± 470	590 ± 130	220 ± 60	Few (less than 50)	50/57 (88%)
24	n=30	3,890 ± 800	680 ± 100	290 ± 30	Abundant	34/49 (69%)
45	n=9	5,930 ± 870	710 ± 60	300 ± 40	Abundant	25/25 (100%)

^a Evagination rate of cysticerci was examined in 100% calf bile at 37°C for 1 h

Fig. 1 a-d A 10 week-old cysticerci recovered from a SCID mouse. **a** A whole specimen. *Bar*, 500 μ m. **b** Few calcareous corpuscles (cc). *Bar*, 50 μ m. **c** The rostellum. *Bar*, 50 μ m. Hooklets (h) and small-granules aggregations (sg). *Bar*, 50 μ m. **d** Drawing of the rostellum in the Fig. 1c



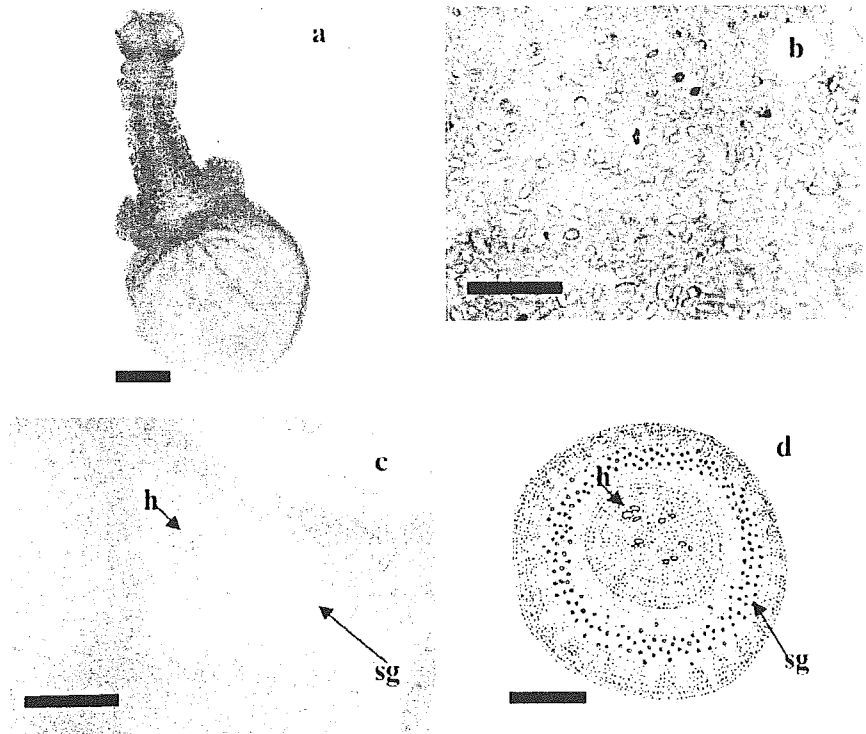
the six tapeworms from the six gerbils ranged from 1 mm to 40 mm (Fig. 4). The tapeworm positive rate of the hamsters inoculated with 20 week-old cysticerci was 7% (3/41) and with 24 week-old cysticerci was 21% (3/14). The tapeworm positive rate of the gerbils inoculated with 10 week-old cysticerci was 0% (0/21), with 20 week-old cysticerci in gerbils, 6% (2/32), with 21 week-old cysticerci, 18% (2/11), and with 45 week-old cysticerci in gerbils, 11% (2/17) (Table 4). Genital primordia were observed in posterior segments of the worms recovered from the gerbils on days 36 and 62 post-infection (Fig. 3). The longest worm (40 mm in total length) with 164 demarcated segments was recovered from a gerbil at 36 DPI.

Development of tapeworms in human

Two out of the three human volunteers who took the cysticerci shed strobilae or segments of *T. s. asiatica* in

their feces. Strobilae with gravid segments but without scolex were found on day 64 (1 strobila), 90 (3 strobilae) and 131 (1 strobila) post-infection from the volunteer A and on day 114 (2 strobilae), 138 (1 strobila) and 194 (1 strobila) post-infection from the volunteer B. Volunteer C did not shed any proglottids and was deemed not infected. The prepatent periods of *T. s. asiatica* infection in the two human volunteers were 64 and 114 days, respectively. The two human volunteers were dewormed using atabrine at days 191 (expulsion of 3 strobilae) and 194 (expulsion of 1 strobila) post-infection, respectively. Gravid segment excretion of volunteer A was found from 81 to 90 (mean number of proglottids per day was 4.3 ranging from 0 to 14) and from 177 to 190 (9 proglottids per day; ranging from 0 to 42) days post-infection. Volunteer B excreted gravid segments from 169 to 191 days (5.3 proglottids per day; ranged from 0 to 33) post-infection. Eggs were detected during and after the period of segment shedding in the feces.

Fig. 2 a-d A 24 week-old metacystode recovered from a SCID mouse. *Bar*, 500 μ m. **a** A whole specimen. *Bar*, 500 μ m. **b** Calcareous corpuscles completely filled the neck region of the metacystode. *Bar*, 50 μ m. **c** The rostellum. *Bar*, 50 μ m. **d** Drawing of the rostellum in the Fig.1b. Hooklets (h) and fewer small-granules aggregations (sg). *Bar*, 50 μ m



Discussion

It has been reported that oral inoculation with eggs of *T. s. asiatica* could not produce successful infection in mice and that only intraperitoneal inoculation of oncospheres hatched in vitro could result in a high recovery rate of metacystodes from SCID mice (Ito et al. 1997a; Ito and Ito 1999). However, our results showed that only a few metacystodes could be recovered from intraperitoneally inoculated animals and the recovery rate was much lower than subcutaneously inoculated ones.

Metacystodes of *T. s. asiatica* had been found to develop to maturity in the liver of experimentally infected pigs, showing hooklets and active movement at

28 DPI (Fan 1988). In SCID mice, *T. s. asiatica* metacystodes had been reported to develop to cysticerci with a total length (after evagination) of 16 and 31 mm, and with suckers diameter of 199 and 252 μ m at 9 and 25 weeks after subcutaneous inoculation, respectively (Wang et al. 2000). We observed a similar increase in the total length of cysticerci, but the diameter of the suckers was larger than those reported by Wang et al. (2000). However, they also reported that the inner hooklets ranged from 11 to 19 and the outer hooklets were small and numerous on the rostellum of the 9 to 31 week-old cysticerci in addition to the numerous calcareous corpuscles in the neck region of the 9 week-old cysticerci (Wang et al. 2000). No further study on the differences

Table 4 Recovery of *T. s. asiatica* tapeworms from Mongolia gerbils and golden hamsters orally inoculated with cysticerci obtained from SCID mice

Animal Group	Cysticerci inoculated		Weeks post-infection at necropsy				Total number ^b (%)	Tapeworms recovery Number ^c (%)
	Age (wk)	Number ^a	< 1 week	1-2 weeks	2-4 weeks	> 4 weeks		
H1	20	6	0/16 ^d	2/12	1/13	-	3/41 (7)	3/246 (1.2)
H2	24	15	1/1	1/1	1/6	0/6	3/14 (21)	3/210 (1.4)
G1	10	20, 40	-	0/21	-	-	0/21 (0)	0/640 (0)
G2	20	6	1/12	1/7	0/13	-	2/32 (6)	2/192(1.0)
G3	21	25-40	0/1	1/3	1/3	0/4	2/11 (18)	2/403 (0.5)
G4	45	2	0/2	0/1	-	2/14	2/17 (11)	2/34 (5.8)

^a Number of inoculated cysticerci/animal

^b Only one worm was detected in each infected host

^c The number of tapeworms recovered from hamsters or gerbils/the number of cysticerci inoculated

^d No. of positive animals/No. of examined

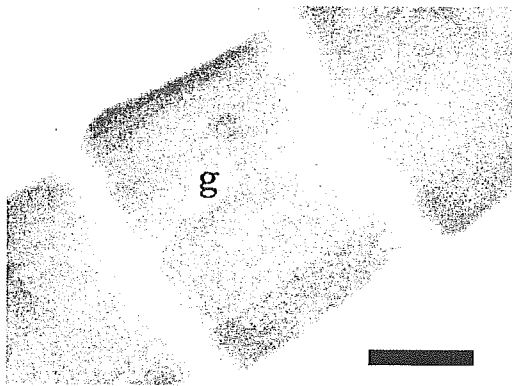


Fig. 3 A tapeworm of *T. s. asiatica* recovered from a gerbil at day 36 post-infection. Genital primordia (g) in posterior segment of the strobila. Bar, 200 μ m

of the number of the hooklets and calcareous corpuscles among the various ages of metacestodes had been published. In our study, the rudimentary hooks, reported to be inner hooklets by Eom and Rim (1993) and Fan et al. (1995), were observed in most but not all the cysticerci of all ages. We observed many small-granules aggregates in place of outer hooklets as reported by Eom and Rim (1993) and Fan et al. (1995) in the rostellar region, with few calcareous corpuscles in the 10 week-old cysticerci. In the 24 week-old cysticerci, we observed only few small-granules aggregates in the rostellar region but abundant calcareous corpuscles. We also demonstrated that the infectivity of the cysticerci recovered from SCID mice varied with age by using the alternative definitive host models. No adult tapeworm could be recovered from the alternative definitive hosts (gerbils) inoculated with 10 week-old cysticerci, but several adult worms were recovered from the gerbils and hamsters orally inoculated with 20, 21, 24 and 45 week-old cysticerci. This could be due to the insufficient development of the 10 week-old cysticerci, whereas the older cysticerci were sufficiently developed to grow to maturity. Since the 45 week-old cysticerci showed the highest recovery rate among the various ages, they were thought to be more mature than other younger cysticerci.

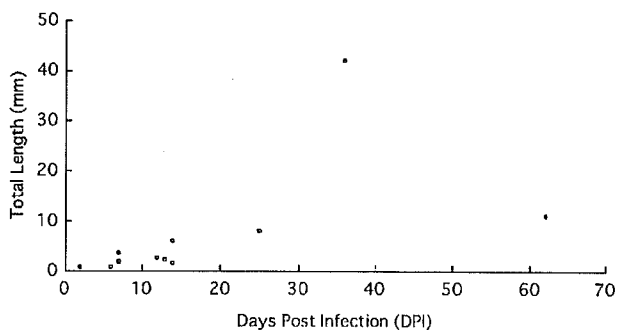


Fig. 4 Length of *T. s. asiatica* adult worm recovered from either gerbils (black circle) or hamsters (white circle) in the period of 2 to 62 days post-infection

However, in our study, animals inoculated with a higher dose of the 21 week-old cysticerci showed lower recovery rate than those inoculated with a lower dose of the 20 week-old cysticerci. It has been reported that golden hamsters inoculated with 20 cysticerci of *T. solium* showed a lower recovery rate than those inoculated with 10 cysticerci (Monroy-Ostria et al. 1993).

Evagination of the cysticerci scolex in vitro by incubation with bile has been used for evaluating the viability of cysticerci (Peniche-Cardena 2002). Fan et al. (2000) showed that the evagination rate of the 9 week-old cysticerci recovered from SCID mice was 77% after incubation in 100% pig bile for 20 min at 37°C. However, the infectivity of those cysticerci has not been demonstrated. In our study, a high evagination rate (88%) was obtained for 10 week-old cysticerci but were found not to be infective to gerbils. Thus, a high evagination rate of the cysticerci does not always indicate high infectivity of the cysticerci in its definitive hosts. However, the presence of abundant calcareous corpuscles in the scolex and the degree of rostellar development could be considered as important criteria for evaluating the infectivity of the cysticerci.

Tapeworm recovery in the positive groups (H1, H2, G2, G3, and G4 groups) was 6.2% (2/32) at 1 to 7 DPI, 20.8% (5/24) at 8 to 14 DPI, 8.5% (3/35) at 15 to 28 DPI and 8.3% (2/24) at 29 to 62 DPI. The recovery rate of the latter phase (29 to 62 DPI) was not lower than that of the earlier phase (1 to 7 DPI). We hypothesize that tapeworms of *T. s. asiatica* could survive in the intestine of their hosts for a long period once they establish in the intestine. To prove the hypothesis, a highly sensitive, reliable and quick detection method such as coproantigen ELISA test is needed to confirm the establishment and survival of the worms in the intestine of the alternative definitive hosts.

It was reported that proglottids were detected in one out of three human volunteers who had ingested 10 week-old cysticerci of *T. s. asiatica* obtained from the liver of an experimentally infected Freisian Holstein calf (Chao et al. 1988). The first gravid proglottid was found on day 122 post-infection (Chao et al. 1988). A Korean male volunteer showed that the first gravid proglottid of *T. s. asiatica* could be recovered from feces 76 days after eating five cysticerci obtained from naturally infected domestic pigs (Eom and Rim 1992). In our study, the first strobila shed with feces was observed at 64 DPI in the female volunteer, and 131 DPI in the male volunteer. Gravid proglottids were first observed at 81 in the former and 177 DPI in the latter. Thus, there is a variation in the prepatent period of human *T. s. asiatica* infection.

In the alternative definitive host infection, genital primordia were observed in the posterior segments of the tapeworms recovered on day 36 and 62 post-infection. It was obvious that *T. s. asiatica* develop better in the human host than in the alternative definitive hosts. However, a longer infection period might be necessary for their development in the alternative definitive hosts. In this study, the alternative definitive host models were

shown to be effective in demonstrating the infectivity of the various ages of *T. s. asiatica* metacystodes.

Acknowledgements We thank the staff of Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University for their technical support and suggestions. This work was supported in part by a Grant-in Aid for Scientific Research from Japan Society for Promotion of Science and by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- Bowles J, McManus DP (1994) Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans. *Am J Trop Med Hyg* 50:33–44
- Cadigan F, Santon JS, Tanticharoenyus P, Chaicumpa V (1967) The Lar Gibbon as definitive and intermediate host of *Taenia solium*. *Med Res* 53:844
- Chao D, Chung WC, Wang MM, Fan PC (1988) Experimental infection in a human subject by a possibly undescribed species of *Taenia* in Taiwan. *J Helminthol* 62:235–242
- Eom KS, Rim HJ (1992) Experimental human infection with Asian *Taenia saginata* metacystodes obtained from naturally infected Korean domestic pigs. *Korean J Parasitol* 30:21–24
- Eom KS, Rim HJ (1993) Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp n. *Korean J Parasitol* 31:1–6
- Eom KS, Rim HJ (2001) Epidemiological understanding of *Taenia* tapeworm infections with special reference to *Taenia asiatica* in Korea. *Korean J Parasitol* 39:267–283
- Eom KS, Jeon HK, Kong Y, Hwang UW, Yang Y, Li X, Xu L, Feng Z, Pawlowski ZS, Rim HJ (2002) Identification of *Taenia asiatica* in China: molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate. *J Parasitol* 88:758–764
- Fan PC (1988) Taiwan *Taenia* and Taeniasis. *Parasitol Today* 4:86–88
- Fan PC (2000) Taeniasis and *Taenia saginata asiatica* in Asia. *Chinese J Parasitol* 13:71–94
- Fan PC, Chung WC, Chan CH, Wong MM, Wu CC, Hsu MC, Huang SH, Chen YA (1987) Studies on taeniasis in Taiwan. 3. Experimental infection of Taiwan *Taenia* in domestic animals. In: *Proceedings of the First Sino-American Symposium*, vol 1, pp 119–125
- Fan PC, Lin CY, Kosman ML, Kosin E (1989) Experimental infection of Indonesia *Taenia* (Samosir strain) in domestic animals. *Int J Parasitol* 19:809–812
- Fan PC, Chung WC, Lin CY, Wu CC (1990a) Experimental infection of Thailand *Taenia* (Chiengmai strain) in domestic animals. *Int J Parasitol* 20:121–123
- Fan PC, Chung WC, Lin CY, Wu CC (1990b) The effect of fasting on the treatment of taeniasis. *Chinese J Parasitol* 3:93–95
- Fan PC, Soh CT, Kosin E (1990c) Pig as a favorable intermediate host of a possible new species of *Taenia* in Asia. *Yonsei Rep Trop Med* 21:39–58
- Fan PC, Lin CY, Chen LM (1992a) Experimental infection of *Taenia saginata* (Burma) in domestic animals with special reference on its morphological characteristics. *Ann Trop Med Parasitol* 86:317–318
- Fan PC, Lin CY, Chung WC (1992b) Experimental infection of Philippine *Taenia* in domestic animals. *Int J Parasitol* 22:235–238
- Fan PC, Lin CY, Chen CC, Chung WC (1995) Morphological description of *Taenia saginata asiatica* (Cyclophyllidae: Taeniidae) from man in Asia. *J Helminthol* 69:299–303
- Fan PC, Wang IC, Chung WC (2000) Determination on evagination and survival of cysticerci of *Taenia saginata asiatica* in bile of pig and normal saline. *Chinese J Parasitol* 13:123–139
- Fan PC, Chung WC, Chen ER (2001) Parasitic infections among the aborigines in Taiwan with special emphasis on *Taeniasis asiatica*. *Kaohsiung J Med Sci* 17:1–15
- Ito A, Ito M (1999) Human *Taenia* in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Parasitol Today* 15:64–67
- Ito A, Chung WC, Chen CC, Ito M, Endo S, Okamoto M, Fan PC (1997a) Human *Taenia* eggs develop into cysticerci in scid mice. *Parasitology* 114:85–88
- Ito A, Ito M, Eom KS, Chung WC, Chen CC, Ma L, Endo S, Fan PC (1997b) In vitro hatched oncospheres of Asian *Taenia* from Korea and Taiwan develop into cysticerci in the peritoneal cavity of female scid (severe combined immunodeficiency) mice. *Int J Parasitol* 27:631–633
- Ito A, Nakao M, Wandra T (2003) Human taeniasis and cysticercosis in Asia. *Lancet* 362:1918–1920
- Kamiya M, Sato H, Kitaoka M, Ishiwata K, Oku Y, Ito M, Gathura P, Cross JH (1990) Laboratory rodent models for the tapeworm-stage of *Taenia saginata* and other related taeniid species. Emerging problems in food borne parasitic zoonosis: impact on agriculture and public health. In: *Proceedings of the 33rd SEAMEO TROPED Regional Seminar*, Chiang Mai, Thailand, vol 22, pp 262–267
- Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Fliesser A (1998) Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol* 84:882–886
- Monroy-Ostria A, Monroy-Ostria TJ, Gomez GJ, Hernandez MO (1993) Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev Lat-Amer Microbiol* 35:91–98
- Oi T (1915) Examination of the eggs of intestinal parasites in central Taiwan. *J Formosan Med Assoc* 154:816–825
- Peniche-Cardena A, Dominguez-Alpizar JL, Sima-Alvarez R, Argaez-Rodriguez F, Fraser A, Craig PS, Rodriguez-Canul R (2002) Chemotherapy of porcine cysticercosis with albendazole sulphoxide. *Vet Parasitol* 108:63–73
- Schmidt GD, Roberts LS (2000) Tapeworm. In: Schmidt GD, Larry S (eds) *Roberts' Foundation of Parasitology*, 6th edn. McGraw-Hill Press, Singapore, pp. 333–338
- Simanjuntak GM, Margono SS, Okamoto M, Ito A (1997) Taeniasis/cysticercosis in Indonesia as an emerging disease. *Parasitol Today* 13:321–323
- Verster A (1971) Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. *J Vet Res* 38:63–64
- Verster A (1974) The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *Onderstepoort J Vet Res* 41:23–28
- Wang IC, Guo JX, Ma YX, Chung WC, Lu SC, Fan PC (1999) Sexual development of *Taenia solium* in hamsters from rodent-derived cysticerci. *J Helminthol* 73:347–350
- Wang IC, Chung WC, Lu SC, Fan PC (2000) Rodent model for long-term maintenance and development of the viable cysticerci of *Taenia saginata asiatica*. *Korean J Parasitol* 38:237–244
- Zhang L, Hao H, Zhang B, Wang H, Wang Y, Li Z, Yang H, Li Y, Wu Y (1999) First discovery of *Taenia saginata asiatica* infection in Yunnan province (In Chinese). *Chin J Parasitol Parasit Dis* 17:95–96

条虫の石灰小体の性状とその機能

長内理大神谷晴夫

抄録 すべての条虫類は、石灰小体と呼ばれるミネラルを多量に含む構造物を持っている。これが条虫の生存・寄生適応に深くかかわっている可能性が強く示唆されている。しかしながら、その機能については分子生物学的な側面からの知見も含め未知の部分が多い。この総説では、これまでの知見を基に、今後、石灰小体に係わるタンパク質や遺伝子発現などの研究がどのように進んでいくか考察した。

弘前医学 56:37-44, 2005

キーワード: 条虫; エキノコックス; 石灰小体; 機能.

REVIEW

PROPERTIES AND FUNCTIONS OF CESTODE CALCAREOUS CORPUSCLES

Arihiro Osanai and Haruo Kamiya

Abstract All cestodes contain mineral concretions termed calcareous corpuscles and these concretions are likely to be involved in the parasite survival in host environment. Nevertheless, the precise function of calcareous corpuscles is still unclear and has not been studied from the view of biochemistry and molecular biology. This review intends to summarize the published literatures about the properties, formation and function of calcareous corpuscles and to discuss how the biochemical and molecular biological approaches on calcareous corpuscles will be concerned in the host-parasite relationship.

Hirosaki Med. J. 56:37-44, 2005

Key words: cestode; *Echinococcus* spp.; calcareous corpuscles; function.

1. 緒言

石灰小体 (Calcareous corpuscles) は、条虫を特徴付ける構造物である。古くは、18世紀にすでに石灰小体に関する記述があるが¹⁾、実際に生物学的な研究が始まったのは1950年以降で、構成成分、形態、形成過程、化学的性状などについての報告がなされてきた。しかし、石灰小体が、条虫の寄生・生存にいかなる役割を果たしているのか、つまりその機能についてはほとんど明らかに

されていない。今後、エキノコックス症など難治性幼条虫症の駆虫薬開発のために、条虫の巧みな寄生戦略を解析し、その機能を明らかにする過程は避けて通れない。この総説においては、これまでの石灰小体に関わる情報を整理し、また最近少しずつ報告されるようになってきた石灰小体とタンパク質との係わりについてまとめ、さらに石灰小体という条虫特有な構造を標的とした駆虫薬の開発の可能性を探りたい。なお、石灰小体の生理学的研究に関しては、簡潔にかつ網羅的にまとめ

Department of Parasitology, Hirosaki
University School of Medicine
Correspondence: H. Kamiya
Received for publication, January 20, 2005
Accepted for publication, January 31, 2005

弘前大学医学部医学科寄生虫学講座
別刷請求先: 神谷晴夫
平成17年1月20日受付
平成17年1月31日受理

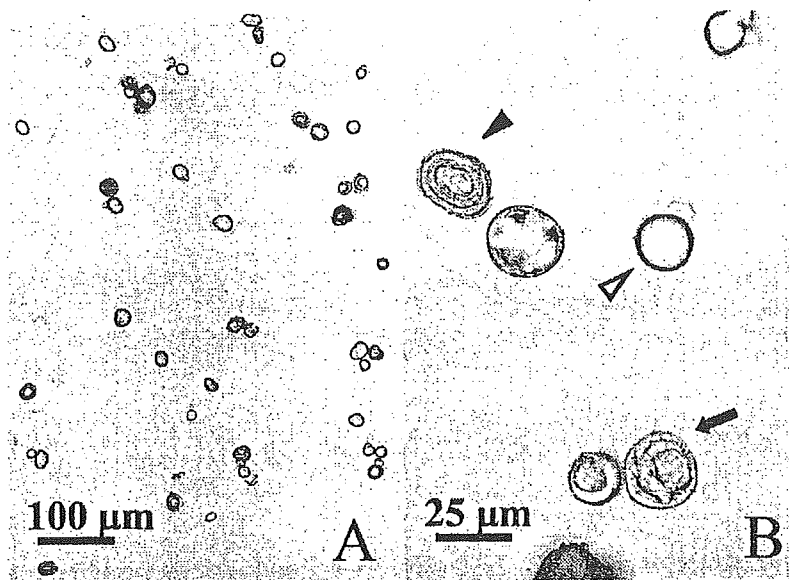


図1 多包虫より精製された石灰小体。
 (A)さまざまな大きさや形状の石灰小体が見られる。
 (B)層状の膜構造が見られるもの(▲)、形成途中と思われるもの(1)、内部が層状ではなく空洞様に見えるもの(△)などさまざまな構造の石灰小体が見られる。

られた総説があるのでそちらも参考にさせていただきたい¹⁾。

2. 石灰小体の性状

2-1 石灰小体の大きさや形

石灰小体の大きさについては、異なる条虫種間で、あるいは同じ種の中であっても、地域や宿主の違いなどにより変異があるとされるが、一般的に7~34 μmである²⁾。ただし、有鉤囊虫(*Cysticercus cellulosae*)の石灰小体は小さく1.5~6 μmであり、これは後述するその形成過程の違いにも関連があると考えられる³⁾。

形状については、球形または卵形であるが、すべてが平滑な表面ではなく、でこぼこや突起があるものもある^{2,4,5)}(図1)。

2-2 石灰小体の形成過程

石灰小体の形成については、幾種類かの条虫について詳細に研究されている。これまで報告のある条虫では有機物を介して石灰成分が条虫細胞内に蓄積・沈着し、細胞内部に多重の膜構造が形成されると同時に、細胞としての機能が失われていく、というプロセスで形成される⁴⁻⁹⁾。例外として、排泄管の内腔で細胞を介さずに石灰小体の形成が起こる有鉤囊虫があり³⁾、前述のように大きさが小さいことから虫体内で異なる機能を果たし

ている可能性が考えられる。

2-3 石灰小体を構成する成分

石灰小体の構成成分について本格的な検討が行われ始めたのは、1960年代初頭で、ネコ条虫 *Taenia taeniaeformis* の成虫ならびにその幼虫形である帯状囊虫を用いて詳細に検討されている^{2,10-14)}。その後、*Mesocestoides corti* を用いて、石灰小体が形成される際に使われる無機成分の由来についても詳細に検討されているが¹⁵⁻¹⁷⁾、この項では主としてネコ条虫を用いた研究について述べ、次項で *M. corti* を用いた仕事について触れる。

2-3-1 無機成分

ネコ条虫の石灰小体内無機成分の同定では、石灰小体をアルカリ処理、もしくは400度以上に加熱することにより、有機物を除去した後、X線結晶学的に成分の分析が行われ、カルシウム、マグネシウム、リン、炭酸が主要構成成分として示されている¹⁰⁻¹²⁾。各無機成分の割合は、全無機成分を100とした場合、帯状囊虫ではカルシウム成分が25、マグネシウム成分が22、リン酸成分が4、炭酸成分が32、残りはそれ以外の成分、一方、成虫ではカルシウムが28、マグネシウムが17、リン酸成分が11、炭酸成分が28で残りはそれ以外の成分とされている¹⁰⁾。この中では、リン酸含有量が幼虫と成虫で大きく異なっている。

これは、後に機能の項で述べるように、石灰小体に蓄えられたリン酸が幼虫の発育の際に利用されている、という説を支持する結果である。von Brandら²⁾は、このあと種々の糸虫類の石灰小体についてリン酸含有量を調べているが、ネコ糸虫の成虫の場合、感染したネコの個体によって石灰小体のリン酸含有量が異なるという結果があり、石灰小体の構成成分に宿主の栄養状態との関連が強く示唆されている。

ただし、石灰小体の無機成分については種間で少しずつ異なっている。例えば、大複殖門糸虫 *Diplogonoporus grandis* では、カルシウムに富んだ石灰小体と鉄に富んだ石灰小体があることが、X線解析によって示されているし¹⁸⁾、*Trilocularia acanthiaevulgaris* ではカルシウムに富んでいるがマグネシウムはなく、硫黄が含まれるという報告もある¹⁹⁾。ただし、それぞれの金属が存在する意義についてはこれからの課題であり、また、各糸虫においてすべての石灰小体が同じ金属イオン組成を持つのか、別の金属イオン組成を持つ石灰小体が混在するのも検討する必要がある。

2-3-2 有機成分

ネコ糸虫石灰小体の有機成分に関しては、ガラス製ホモジナイザーを用いて機械的に組織を破碎した後、遠心とろ過を繰り返して精製した石灰小体を用い、常法にしたがって各成分の含量が検討されている¹⁴⁾。炭水化物に関しては、ムコ多糖類は確認されるがグリコーゲン様の糖質は確認されていない。ただし、水溶性の多糖類は石灰小体の調製過程で失われた可能性があり実際にどのような多糖類が含まれるかは検討されていない¹⁴⁾。

脂質については、680mgの石灰小体から477 μ Bの脂質が抽出されたという記述があり、含有量0.07%という数字は、糸虫全体の比率に比べ小さい。また、その内訳では、通常細胞を構成する脂質二重膜の主構成成分であるリン脂質が全脂質の19%であり、虫体細胞における50%に比べて少ない。これは、石灰小体が細胞膜で囲まれていないことに起因すると考えられている¹⁴⁾。

タンパク質については、窒素含量にして0.29~0.61%であり、これもまた微量である。アミノ酸組成を調べると、虫体の細胞の組成とよく似ているが、カルシウムと相互作用し骨を形成する基盤

となるコラーゲンに含まれるヒドロキシプロリンが検出されず、コラーゲンは存在しないとされている。最近、筆者らは多包虫の石灰小体に存在するタンパク質を酸によって抽出し、さらに濃縮したサンプルを用いてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、バンドパターンを調べた。その結果、包虫組織全体から抽出したタンパク質を電気泳動した場合と異なり、特に分子量、64kDa、16kDa、10kDa、8.5kDa付近に特に濃いバンドが検出された(長内ら、投稿準備中、図2)。これらのタンパク質の機能については、現在進展しているアミノ酸配列の解析や、分子生物学的手法により明らかになっていくと期待される。

2-4 *Mesocestoides corti* について

これまでは、ネコ糸虫を用いた研究を中心に石灰小体の構造・構成成分について述べてきたが最後に *Mesocestoides corti* を用いて行われた実験について簡単に触れる。基本的な構造や構成成分は変わらないが、重要な点は、*M. corti* の幼虫型テトラチリジウムを感染させたマウスの飲み水に、プローブとしてストロンチウムを添加すると、石灰小体の成分にストロンチウムが検出されることである¹⁶⁾。これは、*in vitro* で培地に加えた場合にも同様で、他に砒素、ベリリウム、カドミウム、鉛、ウランなどをプローブとして用いた場合も同様に石灰小体に取り込まれる¹⁷⁾。このことは、糸虫が石灰小体の形成に必要な金属を、宿主もしくは環境中から取り込んでいることを示唆する非常に興味深い実験結果である。これと関連して、当研究室でも多包虫を感染させたマウスでは血清中のカルシウム濃度が高いという知見を得ており(塩谷ら、未発表)、エキノコックス虫体が宿主に働きかけてカルシウムを供給させ取り込みを促進している可能性を推測させる。

3. 石灰小体の機能の考察

これまで述べたように、石灰小体は特徴的な構成をしており、また一部の吸虫、線虫に類似の構造物が見いだされるものの、すべての糸虫に必須の構造物であり、糸虫の生存に重要な役割を果たしていることが予想される。しかし石灰小体の機能に関する研究は、構成成分が解明されてから50年近く経った現在でもほとんど皆無に等しい。

(A) 12.5%ゲルを用いたSDS-PAGE (B) トリス-トリシンSDS-PAGE

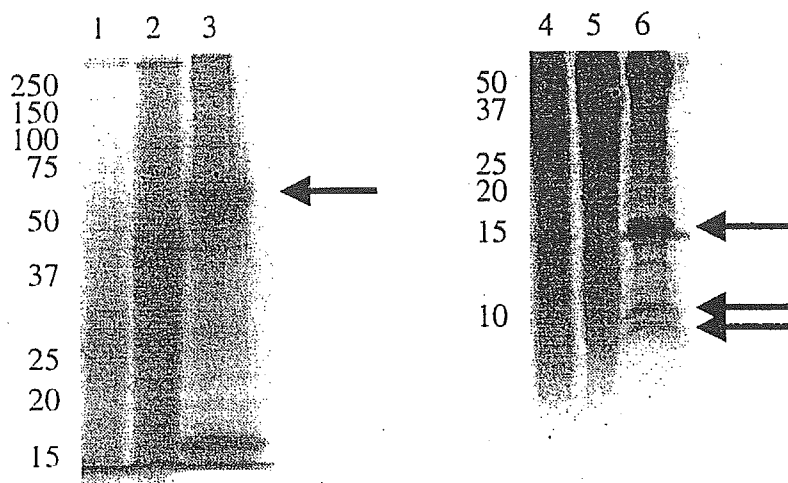


図2 多包虫石灰小体に存在するタンパク質、
 レーン1, 4 包虫由来のタンパク質
 レーン2, 5 原頭節由来のタンパク質
 レーン3, 6 石灰小体由来のタンパク質
 石灰小体に特徴的なタンパク質(←)が存在する。

ただし、その機能については間接的な実験によって、いくつかの推測がなされている。ここでは、石灰小体の機能を示唆する研究について、筆者らのグループの知見も含めて考察したい。

石灰小体の性状と同様、機能についてもネコ条虫を用いた研究が行われている¹⁰⁾。さまざまな培養系でネコ条虫の成虫、幼虫を培養し、その中で、石灰小体の数がいかに変動するかが検討されている。幼虫形については、培地のpHと酸素濃度について、弱酸性・弱アルカリ性、通常酸素濃度・低酸素を組み合わせた培養を行なったところ、弱アルカリ性より弱酸性、通常酸素濃度より低酸素濃度の方が石灰小体の消費が速いことが明らかにされている。この結果より、石灰小体が酸の中和に使われており、また、低酸素濃度で消費量が速いことは、嫌気的なエネルギー産生で生じたコハク酸や酢酸などの酸を中和するのに、石灰小体が使われている可能性が考えられる。さらに、ネコ条虫に感染したマウスにRI標識したリン酸を投与すると、それらが石灰小体に取り込まれるという知見もある¹¹⁾。これらをまとめると、石灰小体は、幼虫の発育期などでATPが必要な時期にリン酸を迅速に供給するための格納庫であり、また宿主に侵入する際の胃酸の攻撃や、低酸素に

適応して嫌気的なエネルギー産生時に生成されるコハク酸などの中和をおこなうという機能が推測される。さらに、これらはいずれも条虫が宿主環境に適応するために重要な現象であり、石灰小体が条虫の生存に重要な役割を果たしていることを強く示唆する知見である。

上記の知見に加えて、2価金属イオンのキレート剤であるヒノキチオール(β -thujaplicin)を多包虫原頭節の*in vitro*培養系に作用させると、石灰小体に作用をすることを観察し、それと同時に多包虫原頭節の死亡率が増加することも示されている(神谷ら、未発表)。これも、石灰小体が虫体の生存に必須な2価金属イオンを供給する役割を果たしていることを示唆する知見として興味深い。また、補体によるエキノコックス虫体の溶解作用が報告されているが¹²⁾、石灰小体には補体活性化作用があり、虫体の生存戦略の観点から注目される。

4. エキノコックスと石灰小体

エキノコックス(*Echinococcus* spp.)は重要な動物由来寄生虫症である包虫症を惹起する。代表的なものとして、多包(条)虫(*Echinococcus multilocularis*)と単包(条)虫(*Echinococcus*

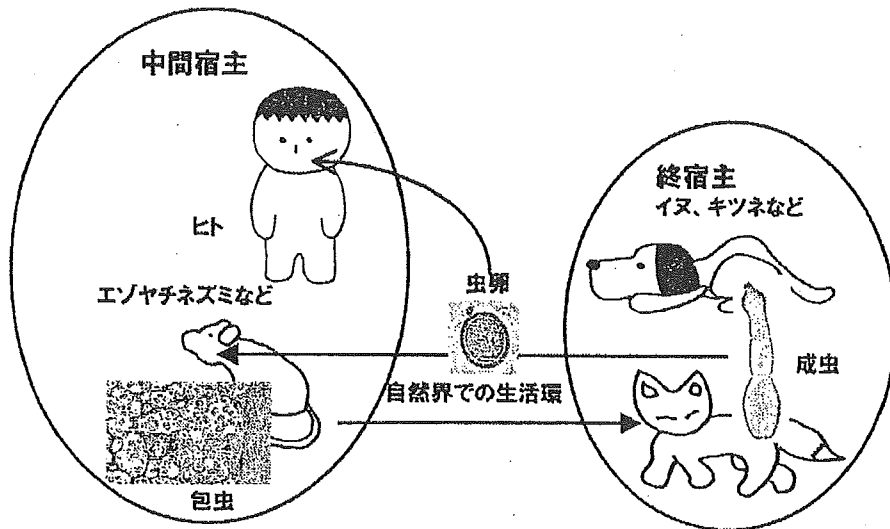


図3 多包(糸)虫の生活環。
日本では北海道において、主に終宿主としてキタキツネと中間宿主としてエゾヤチネズミの間で生活環が保たれている。

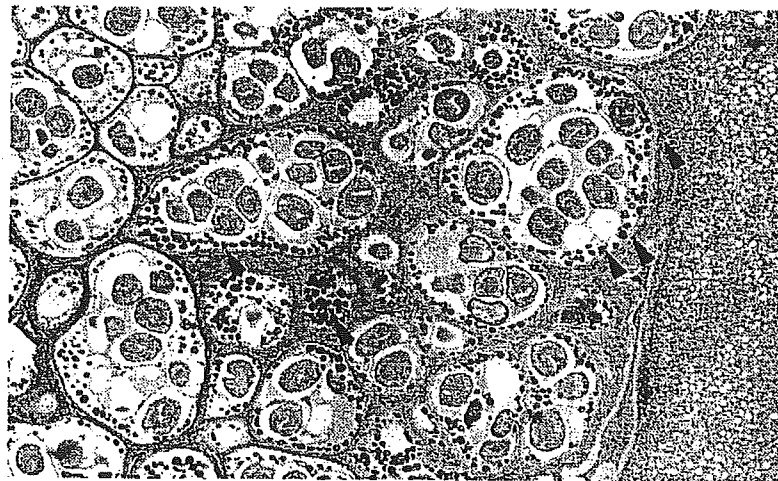


図4 多包虫により侵されたスナネズミ肝病巣の組織切片(H-E染色)。
石灰小体(▲)が多数見受けられる。

granulosus)がある。ここでは、特に国内においても多発する多包虫症についてのみ述べる。多包条虫はキツネやイヌなどを終宿主、自然界に生息しているエゾヤチネズミ *Clethrionomys rufocanus bedfordiae*などを中間宿主として生活環が成立している(図3)。キツネやイヌの糞便中に排出された虫卵を、ヒトが何らかの形で経口摂取することにより感染がおこる。中間宿主であるヒトでは、成虫ではなく包虫化、つまり幼虫の状態を増殖を続け、極端な例では肝臓の大半を占めるまでに発育する場合もある。現任、治療は外科的な病巣の切

除に依存しており、有効な化学療法剤の開発が待たれている寄生虫症の一つである^{20,21)}。

このエキノコックスの増殖、分化において石灰小体はいかに関わっているのだろうか？石灰小体は、胚芽層、繁殖胞ならびに原頭節で認められるが(図4)、形成は胚芽層ならびに繁殖胞で起こる⁸⁾。胚芽層ならびに繁殖胞に存在する石灰小体は大きさが30 μ mと大きく(図1)、原頭節に存在するものはそれに比して小さい^{2,6,22)}。エキノコックスの石灰小体に関しては生理学的な研究がされており、多包虫原頭節の*in vitro*培養を続けると、ネコ

条虫の場合と同様、石灰小体が縮小する。これは片節形成を伴って成虫になる場合でも、包虫化する場合でも共に見られる現象である²³⁾。以上を考えると、エキノコックスにおいても発育期の栄養の供給源としてはたらいっている可能性が強く示唆される。

5. 石灰小体の機能に関与するタンパク質

これまで述べたように、石灰小体の研究は結晶学的解析を用いた構成成分の研究、顕微鏡を用いた形態学的な研究に限られていたが、最近になって、石灰小体に何らかの係わりを持つタンパク質が同定され始めている。単包虫症患者血清を用いたcDNAライブラリーのスクリーニングによってEF-handと呼ばれるカルシウム結合モチーフを持ったタンパク質のcDNAが単離され、組み換えタンパク質を用いて作製された抗体で、単包虫の原頭節の切片に対し免疫染色をおこなったところ、石灰小体が染色された²⁴⁾。このタンパク質についてはアミノ酸の部分配列のみ示されているが、16個のEF-handモチーフを持ち、実際にSDS-PAGE後、⁴⁵Caを用いた実験において、カルシウムに結合することが示されている²⁴⁾。このタンパク質については、患者血清を用いたスクリーニングでとられてきたと言う点も興味深く、生理的な機能が明らかになることが期待される。また、マンソン裂頭条虫の幼虫（マンソン孤虫、*Sparganum mansoni*）抽出物からも、疎水性相互作用を利用したクロマトグラフィーによってカルシウムに結合する10kDaのタンパク質が精製され、前述の実験と同様、抗体を作製して幼虫内の石灰小体に局在することが見いだされている²⁴⁾。

さらに、マンソン孤虫の石灰小体をFicollを用いて精製し、これと同幼虫抽出物とを反応させて、結合するタンパク質の存在を調べる実験も行われている²⁴⁾。これによって、マンソン孤虫の抽出物の中に、石灰小体と結合するタンパク質が複数存在すること、さらにマンソン孤虫以外でも、有鉤囊虫やウェステルマン肺吸虫（*Paragonimus westermanii*）などの抽出物の中にもマンソン孤虫由来の石灰小体に結合するタンパク質が存在することが明らかになった²⁴⁾。このように種を越えて石灰小体に結合するタンパク質が存在することは

系統発生的に石灰小体が普遍的に何らかの重要な機能を果たしていることを推測させる。

筆者らは、多包虫の石灰小体ならびに原頭節抽出物を用いて同様の実験を行い、確かに原頭節には石灰小体に結合するタンパク質が存在することを示している（投稿準備中）。

最近になって、単包虫でEgA31というタンパク質が石灰小体にも存在することが報告された²⁷⁾。このタンパク質が、単包虫の中でどのような機能を果たしているかは興味深い。

多包虫の石灰小体には、2-3-2の項で述べたように、特異的なタンパク質が存在する（投稿準備中；図2）。これらのタンパク質は、石灰小体に存在する全タンパク質に対する割合が非常に高く何らかの役割を担う可能性が推測されるが、実際どのような機能を持つタンパク質か、現在アミノ酸配列解析などによって解析が進んでいる。

これまで、石灰小体はタンパク質のかかわりからの研究・議論がされることは少なかった。それは「タンパク質含有量は少ない」という結果が、生化学的な研究を遅らせた原因かもしれない。しかし、このように石灰小体に局在するタンパク質が発見されてきており、これらのタンパク質の性状を分子生物学的に詳細に調べることは、新たな石灰小体関連タンパク質の探索とあわせて、重要な発展的課題となってくるととらえている。

6. 今後の方向性

エキノコックスには効果的な既存の殺虫薬はない。その一因として包虫の最外層がクチクラ成分で構成され、構造的に薬剤が包虫の内部に浸透しないことによるとも考えられている²⁰⁾。ただ、アルベンダゾール（albendazole）などのベンズイミダゾール系薬剤は包虫病巣を縮小させる²⁸⁾。エキノコックスは、不顕性感染時期を経て発症するが、その時には病巣が大きくなっており、唯一の完治法としての外科的手術による侵襲も大きい。このような背景から、病巣を効果的に小さくする、あるいは完全に死滅させる抗エキノコックス薬の開発が切望される。化学療法剤の開発では、まず、標的分子を定めることが望まれる。したがって、石灰小体の機能に必須なタンパク質を同定できれば、そのタンパク質の阻

害剤が抗エキノコックス薬の候補となる可能性は高い。現在では、コンピューターを用いたSBDD (Structure Based Drug Design) によって、タンパク質の3次元構造から薬剤の設計をおこなう技術が進展し、活用されている²⁹⁾。また、タンパク質がある程度しぼられ、またそのタンパク質の遺伝子クローニングができればRNAi (RNA interference, RNA干渉法) を用いて、求めるタンパク質の遺伝子の発現を抑え、そのタンパク質の生体内での機能を予想することも可能である。エキノコックスの場合、RNAiに関しては方法論が確立していないが、住血吸虫や線虫などですでに報告があり³⁰⁻³⁴⁾、この系はエキノコックスにも応用可能であろう。

石灰小体の機能の解明は、宿主-寄生虫相互関係という観点から生物学的にとらえても非常に興味深いし、治療という視点から医学的にとらえてもとても魅力的である。今後、石灰小体の研究が、分子レベルで進展することを大いに期待したい。

本総説は、2003年第2回弘前医学会優秀発表賞受賞対象の研究を敷衍し考察した。

文 献

- 1) Vargas-Parada L, Laclette JP. Role of calcareous corpuscles in cestode physiology: A review. *Rev Latinoam Microbiol* 1999;41:303-7.
- 2) von Brand T, Nylen MU, Martin GN, Churchwell FK, Stites E. Cestode calcareous corpuscles: Phosphate relationships, crystallization patterns and variations in size and shape. *Exp Parasitol* 1969;25:291-310.
- 3) Vargas-Parada L, Merchant MT, Willms K, Laclette JP. Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Res* 1999;85:88-92.
- 4) Pawlowski ID, Yap KW, Thompson RCA. Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid cestodes. *Parasitol Res* 1988;74:293-6.
- 5) Smith SA, Richards KS. Ultrastructure and microanalyses of the calcareous corpuscles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 1993;79:245-50.
- 6) McCullough S, Fairweather, I. The structure, composition, formation and possible functions of calcareous corpuscles in *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson 1867 (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitol Res* 1987;74:175-82.
- 7) Yamane Y, Bylund G, Abe K, Osaki Y, Hirai K, Torii M. X-ray microanalysis of calcareous corpuscles and trace element content in diphyllbothriid cestodes. *Parasitol Res* 1988;74:498-500.
- 8) Ohnishi K, Kutsuni H. Possible formation of calcareous corpuscles by the brood capsule in secondary hepatic metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Res* 1991;77:600-1.
- 9) Chowdhury N, De Rycke PH. Structure, formation and functions of calcareous corpuscles in *Hymenolepis microstoma*. *Z parasitenk* 1977;53:159-69.
- 10) von Brand T, Mercado TI, Nylen MU, Scott DB. Observations on function, composition, and structure of cestode calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1960;9:205-14.
- 11) Scott DB, Nylen MU, von Brand T, Pugh MH. The mineralogical composition of the calcareous corpuscles of *Taenia taeniaeformis*. *Exp Parasitol* 1962;12:445-58.
- 12) von Brand T, Weinbach EC. Incorporation of phosphate into the soft tissues and calcareous corpuscles of larval *Taenia taeniaeformis*. *Comp Biochem Physiol* 1965;14:11-20.
- 13) Nieland ML, von Brand T. Electron Microscopy of cestode calcareous corpuscle formation. *Exp Parasitol* 1969;24:279-89.
- 14) von Brand T, Nylen MU. Organic matrix of Cestode calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1970;28:566-76.
- 15) Kegley LM, Brown BW, Berntzen AK. *Mesocestoides corti*: Inorganic components in calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1969;25:85-92.

- 16) Kegley LM, Baldwin J, Brown BW, Berntzen AK. *Mesocostoides corti*: Environmental cation concentration in calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 1970;27:88-94.
- 17) Baldwin JL, Berntzen AK, Brown BW. *Mesocostoides corti*: Cation concentration in calcareous corpuscles of tetrathyridia grown *in vitro*. *Exp Parasitol* 1978;44:190-6.
- 18) Ishii AI. Fe-rich corpuscles in *Diplogonoporus grandis* detected using X-ray microanalysis. *Z parasitenk* 1984;70:199-202.
- 19) 神谷晴夫, 神谷正男, 大林正上. 多包虫感染に対する宿主抵抗性因子の解析 2. 補体による多包虫・多包条虫に対する溶解作用とその作用機序. *寄生虫学雑誌* 1980;29:169-79.
- 20) 山下次郎. エキノコックス—その正体と対策. 増補版. 北海道: 北海道大学図書刊行会; 1997. p.56-158.
- 21) Thompson RCA, Lymbery AJ. Echinococcus and hydatid disease UK: CAB INTERNATIONAL; 1995. p1-47.
- 22) Sakamoto T, Kotani T. Studies on echinococcosis XX. Preliminary observations on the *in vivo* cultivation of larval tissue of *Echinococcus multilocularis* in culture-chamber of porous membrane. *Jpn J Vet res* 1967;15:165-9.
- 23) 坂本司. エキノコックスのすべて—包虫学ダイジェスト. 岩手: 雀籠書房; 1997. p.52-5.
- 24) Rodrigues JJS, Ferreira HB, Farias SE, Zaha A. A protein with novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:451-6.
- 25) Chung YB, Kong Y, Cho SY, Yang HJ. Purification and localization of a 10kDa calcareous corpuscle binding protein of *Spirometra mansoni* plerocercoid. *Parasitol Res* 2003;89:235-7.
- 26) Yang HJ. Separation of calcareous corpuscles from plerocercoids of *Spirometra mansoni* and their binding proteins. *Parasitol Res* 2000;86:781-2.
- 27) Saboulard D, Lahmár S, Petavy AF, Bosquet G. The Echinococcus granulosus antigen EgA31: localization during development and immunogenic properties. *Parasite Immunol* 2003;25:489-501.
- 28) Stettler M, Rossignol JF, Fink R, Walker M, Gottstein B, Merli M, Theurillat R, et al. Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. *Int J Parasitol* 2004;34:615-24.
- 29) Anderson AC. The process of structure-based drug design. *Chem Biol* 2003;10:787-97.
- 30) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
- 31) Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15502-7.
- 32) Hussein AS, Kichenin K, Selkirk ME. Suppression of secreted acetylcholinesterase expression in *Nippostrongylus brasiliensis* by RNA interference. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:91-4.
- 33) Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, Yoshino TP. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol* 2003;128:205-15.
- 34) Skelly PJ, Da'dara A, Harn DA. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int J Parasitol* 2003;33:363-9.

テニア科条虫卵の同定法、特に虫卵 DNA の抽出と CO I 遺伝子の利用

加藤有香, 野中成晃, 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

Identification of taeniid cestode eggs - extraction of egg DNA and use of CO I gene

Yuka Kato, Nariaki Nonaka, Yuzaburo Oku, Masao Kamiya

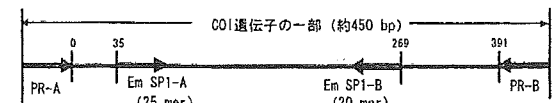
Laboratory of Parasitology, Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University

エキノコックスを含むテニア科条虫は主に食肉類を終宿主とするが、糞便検査において虫卵の形態から種を同定することは困難である。我々は、糞便内抗原および虫卵の検出によりエキノコックスの終宿主診断を行っているが、その補足診断法として、虫卵 DNA の利用によるテニア科条虫種の同定法を検討した。

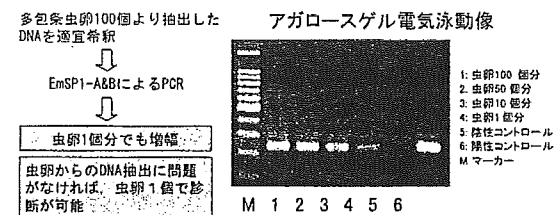
まず、猫条虫卵および豆状条虫卵を用いて糞便材料からの虫卵分離および DNA 抽出法について検討した。虫卵分離については、糞便の蔗糖浮遊液に対するナイロンメッシュ濾過法（ポアサイズ 40 μ m で濾過、20 μ m で捕捉）が効率的であった。DNA 抽出は市販の QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いることで、従来必要であった幼虫被殻の破壊処理（KOH 処理、SDS 添加後煮沸処理、または凍結・融解処理）を省略することができた。70 $^{\circ}$ C 12時間および -80 $^{\circ}$ C 冷凍による殺卵処理虫卵では DNA 抽出材料の PCR（扁形動物共通プライマー PRA, PRB による増幅）で同程度の増幅が確認できたが、1%ホルマリン固定した虫卵では増幅が認められなかった。

これと平行して、エキノコックス属3種12株（系統または分離株）（多包条虫7株、単包条虫4株、フォーゲル包条虫1株）およびテニア属5種23株（猫条虫12株、胞状条虫3株、豆状条虫2株、肥頭条虫5株、羊条虫1株）、合計35株の虫体を用いて CO I 領域の塩基配列を決定した。得られた配列とすでに報告されている各種テニア科条虫種の配列とを比較解析して、多包条虫特異プライマー EmSP1-A & B を構築した（図 A）。各種テニア科条虫の抽出 DNA に対して EmSP1-A & B を用いた PCR を行ったところ、多包条虫でのみ増幅像が得られ、EmSP1-A & B の種特異性が確認された。このプライマーの感度を評価するため、70 $^{\circ}$ C 12時間加熱した多包条虫卵を用いて PCR を行ったところ、虫卵1個分の DNA テンプレート

A. 多包条虫特異プライマー EmSP1-A & B



B. EmSP1-A & B の検出感度



で増幅像が確認できた（図 B）。また、適当な制限酵素を用いた COI 領域の PCR-RFLP により、猫条虫 (Eag I、Xho I)、胞状条虫 (SexA I)、肥頭条虫 (Sfc I)、豆状条虫 (Nsi I)、羊条虫 (Msl I) および多包条虫以外の包条虫3種 (EcoR I、Hph I) が同定できる可能性が示された。

Key words: *Echinococcus*, egg, DNA

引用文献

Okamoto, M *et al.*: Phylogenetic relationships within *Taenia taeniiformis* 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 北海道大学獣医学研究科寄生虫学教室,

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

Correspondance: N. Nonaka, laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary medicine, Hokkaido University, Kita-ku Kita 18 Nishi 9, Sapporo, 060-0818, Japan

関東地方におけるイヌおよびネコの寄生虫疫学調査

今野兼次郎¹、畑 英一¹、野中成晃²、奥祐三郎²、伊藤琢也³、酒井健夫³、神谷正男²

¹群馬大学大学院医学系研究科附属動物実験施設

²北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室

³日本大学生物資源科学部獣医衛生学教室

A survey of gastrointestinal parasites in dogs and cats in Kanto district

Kenjiro Konno¹, Hidekazu Hata¹, Nariaki Nonaka², Yuzaburo Oku²,

Takuya Ito³, Takeo Sakai³, Masao Kamiya²

¹Institute of Experimental Animal Research, Gunma University Graduate School of Medicine

²Laboratory of Parasitology, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University,

³Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health,

Nihon University School of Veterinary Medicine

感染症法が平成16年11月に改正されたが、これに伴い獣医師その他の獣医療関係者は、感染症の予防に關し国及び地方公共団体が講ずる施策に協力するとともに、その予防に寄与するよう努めなければならない、と記載されており、獣医師による届け出義務に關しても記載されている。北海道で問題となっているエキノコックス症も四類感染症に指定されているが、北海道以外への感染拡大が懸念されており、イヌやネコが終宿主になり得るなどの点を考慮すると、今後本州の開業獣医師がエキノコックス症を確認する可能性がある。そこで我々は、本州の動物病院に来院したイヌおよびネコの糞便を用いて、エキノコックスを含む消化管内寄生虫の首都圏における感染状況を調査した。

埼玉、東京、千葉および群馬県の動物病院19ヶ所に来院したイヌおよびネコの糞便を回収し、比重1.27のショ糖液を用いて遠心浮遊法にて糞便検査を実施した。エキノコックス感染の確定診断は多包条虫に特異的な抗体を用いたサンドイッチELISA法にて糞便内抗原検査を実施した。さらには、飼い主へのアンケート調査も併せて実施した。

検査結果は図1に示した通り、イヌでは279検体中24検体、8.6%から、一方のネコは96検体中5検体、5.2%から寄生虫卵あるいはシストが確認された。なおELISA法によるエキノコックスの糞便内抗原検出は全ての検体で陰性であった。また、今回の調査の目的の一つであるエキノコックスに関するアンケート結果は図2の通りであるが、飼いイヌあるいはネコがネズミを捕食するのを目撃した事があるか質問したところ、共に90%程度が目撃した事がないとの回答であった。また、北海道あるいは海外への渡航歴の有無に關しては、今回の調査ではイヌ、ネコそれぞれ5頭と1頭、およびイヌ2頭のみが渡航歴があった。今回の調査ではエキノコックス感染は認められなかったが、エキノコックスに感染したイヌが年間300-400頭余り、北海道外へ移動しており、エキノコックス汚染国からも数百頭のイヌが無検疫のまま輸入されている、との土井らの報

告があることなどから、今後もエキノコックスモニタリングを継続すると共に、調査範囲を拡大する必要があると考えられる。

図1 動物病院に来院したイヌおよびネコの糞便検査結果

動物種	頭数	陽性数	陽性率 (%)
イヌ	279	24	8.6
ネコ	96	5	5.2
不明	10	0	0
	385	29	7.5

<イヌ>

感染寄生虫種	陽性数	陽性率 (%)
イヌ鞭虫	15*	5.4
<i>Isospora</i> spp.	4	1.4
イヌ回虫	3*	1.1
イヌ鉤虫	3	1.1
	25*	8.6

<ネコ>

感染寄生虫種	陽性数	陽性率 (%)
ネコ回虫	5	5.2

ELISA法による多包条虫糞便内抗原の検出は全ての検体で陰性

*糞便検体1頭を含む

図2 糞便検査とアンケート結果

<イヌ>

ネズミ捕食行動目録	頭数
ある	3
ない	254
不明	0
未記入	22
	279

<ネコ>

ネズミ捕食行動目録	頭数
ある	5
ない	84
不明	0
未記入	7
	96

北海道渡航歴	頭数	海外渡航歴	頭数
あり	5	あり	2
なし	229	なし	241
不明あるいは未記入	45	不明あるいは未記入	36
	279		279

北海道渡航歴	頭数	海外渡航歴	頭数
あり	1	あり	0
なし	80	なし	86
不明あるいは未記入	15	不明あるいは未記入	10
	96		96

Key words: *Echinococcus*, dog, cat

連絡責任者：今野兼次郎、群馬大学大学院医学系研究科附属動物実験施設、371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22、E-mail:kenjirok@showa.gunma-u.ac.jp
Correspondence: K. Konno, Institute of Experimental Animal Research, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22, Showamachi, Maebashi city, Gunma 371-8511

虫卵感染で継代を行っている2系統（根室株およびヨーロッパ株）の多包条虫の性格について

八木欣平¹、奥祐三郎²、澤田幸治¹

¹北海道立衛生研究所, ²北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室

Biological and genetic characteristics of Japanese and European isolates of *Echinococcus multilocularis* maintained by experimental egg infection

Kinpei Yagi¹, Yuzaburo Oku², Yukiharu Sawada¹

¹Hokkaido Institute of Public Health, ²Hokkaido University

エキノкокクス属条虫は、ヒトに感染した場合、放置すれば致命的な経過をとることから、危険な寄生虫として認識されている。本属条虫の単包条虫 *Echinococcus granulosus* については、宿主への感染性、発育が異なるストレインが存在し、これらのものは遺伝子配列にも相違があることが知られている^{1,2)}。一方、北海道で流行している多包条虫 *E. multilocularis* は、ヨーロッパで分離されたものとアラスカで分離されたものに差異があるという報告があるが、現在のところ別のストレインとして認知するかどうかについては一定の見解がない^{3,4)}。我々は、1987年に根室市のエゾヤチネズミから分離した多包条虫(根室株)を、イヌ-コトナラットを用いて継代を行っているが、1988年にオーストリアのヒト患者から分離、二次包虫症で継代されてきた多包条虫(ヨーロッパ株)についても、同様に虫卵を介した継代に戻すことができた(図)。この両者の遺伝子型の検討では、ミトコンドリア12S rRNA gene, U1 snRNA gene および単包条虫のストレイン間で変異が報告されている ActII 遺伝子領域⁵⁾のうち、12S rRNA gene の314塩基中の一塩基の変異のみを観察した。形態については成虫、原頭節、虫卵の観察を行っているが、現在までのところ顕著な差異は認めていない。イヌおよびコトナラットへの感染性は、両株とも良好であったが、同数の虫卵を投与した場合、ヨーロッパ株を感染したコトナラットが比較的早期に死亡することが観察された。これまでの観察結果からは、病原性や、わずかな遺伝子配列の相違があるものの、ヨーロッパ株と根室株多包条虫の間に、ストレインと呼べるような明確な差があるかどうかは、明らかにすることはできなかった。

Key words: *Echinococcus multilocularis*,

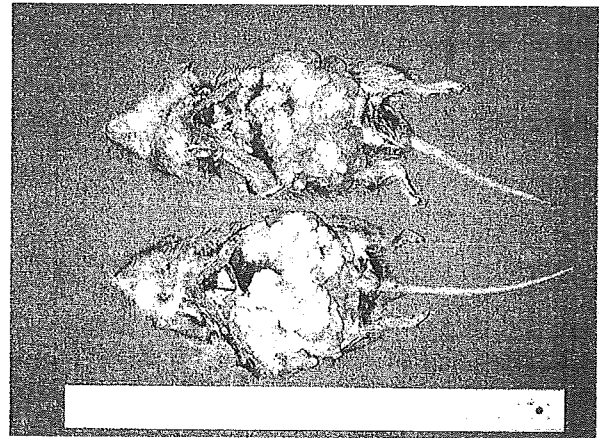


図 虫卵投与後3ヶ月目のコトナラットの肝臓に形成された多包虫病巣。根室株(上)、ヨーロッパ株(下)

strain, experimental infection

引用文献

- 1) Thompson RCA: *Echinococcus* and Hydatid Disease, CAB International, Wallingford, 1995, p.1
- 2) Limbery AJ: *Echinococcus* and Hydatid Disease, CAB International, Wallingford, 1995, p.51
- 3) Bowles J, et al.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54(2), 165 (1992)
- 4) Rinder H, et al.: *J. Parasitol.*, 83(6), 1045 (1997)
- 5) Haag KL, et al.: *Parasitol.*, 118, 63 (1999)

連絡先責任者: 八木欣平、北海道立衛生研究所, 1060-0819 札幌市北区北19条西12丁目、
E-mail: kinpei@iph.pref.hokkaido.jp
Correspondence: K.Yagi, Hokkaido Institute of Public Health, N-19, W-2 Sapporo Hokkaido 060-0819

飼い犬のエキノコックス感染とその診断

野中成晃

獣医畜産新報 J V M, Vol.58 No.4, 2005年4月号

特集 人と動物の共通感染症最前線 2

341-342 頁

飼い犬のエキノコックス感染とその診断

野中成晃

要約

2004年10月から獣医師によるエキノコックス感染犬の届け出が義務づけられた。これまでの調査の結果（検査希望者を対象）、北海道では飼い犬の0.4～0.7%がエキノコックスに感染していることがわかり、また北海道から本州へ移動した犬からも感染例が見つかった。この状況を考えると、獣医師、特に北海道の臨床家がエキノコックス感染犬に遭遇する機会は少なくなく、本稿では、日本における飼い犬のエキノコックス感染状況とその診断および届け出基準について概説する。

はじめに

北海道に蔓延する人獣共通寄生虫、エキノコックス（多包条虫）は成虫がキツネや犬などの犬科動物（終宿主）に、幼虫が齧歯類（中間宿主）に寄生する（図1）。人への感染は終宿主糞便中に排泄される虫卵の摂取によって起こり、放置すると死に至る。北海道では、過去10年間のキツネの感染率は40%前後を推移し、人とキツネの行動圏の重なりにより人とペットへの感染リスクが増している（図1）。人と密接に関係する飼い犬の感染は人の感染源として無視できない。このような状況の中、感染症法の改正に伴って2004年10月から獣医師によるエキノコックス感染犬の届け出制が施行され、2005年1月には早くも初の届け出がなされた。本稿では、日本における飼い犬の感

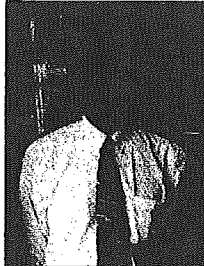
染状況およびその診断と届け出基準について概説する。

1. 飼い犬のエキノコックス感染状況

北海道大学と環境動物フォーラム (<http://www.k3.dion.ne.jp/~fea/>) では1997年より獣医師を通して飼い犬のエキノコックス検査を実施してきた。検査は糞便を材料とし、虫卵および糞便内抗原検査をまず行い、陽性または擬陽性となったものについては飼い主に駆虫を依頼し、駆虫前後の糞便を再検査する；また、虫卵が検出された場合にはさらに虫卵DNA検査（PCR）を行うというものである。

2004年6月までに北海道の飼い犬3,688頭および本州の飼い犬152頭の検査を実施し、それぞれ15～24頭（感染率0.4～0.7%）および1～2頭の感染例が検出された。感染頭数に幅があるのは、感染していた可能性が強いが確定判定ができなかったものを含めたためである。これらの犬の飼育方法を分析すると、普段放し飼いの犬や散歩時に放される犬での感染率が高く、ネズミを食べる機会に依存している。記憶に新しいところでは、2002年12月に新聞等で「札幌市の室内飼育犬の感染」が報道され各所で議論された。この犬は外出時に放されることがよくあり、そこでネズミを食べて感染したものと思われる。1997年以降、このように普段室内で飼育されている犬の感染例が上

Nariaki NONAKA：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（〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目）



巧みに生きている「寄生虫」に人生を学べ！とこの世界へ入り、エキノコックスと関わって早20年。北大・獣医・寄生虫学教室のチームプロジェクトとして進んできたエキノコックス対策ですが、まだまだ課題は山積みです。「昨日より今日、今日より明日」の精神で、寄生虫の専門家として貢献できることを日々模索しています。

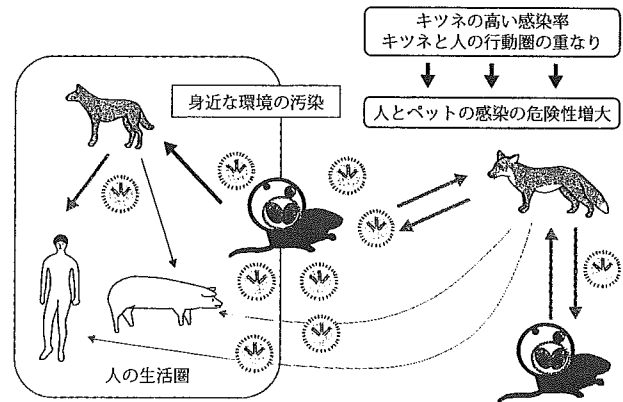


図1 人の生活圏の虫卵汚染

表1 エキノコックス感染犬の届け出基準

1. 病原体の検出	虫体またはその一部（片節）の確認
2. 病原体の遺伝子の検出※	PCR法による遺伝子の検出
3. 病原体の抗原の検出	ELISA法による成虫由来抗原の検出 (駆虫治療の結果、成虫由来抗原が不検出になったものに限る)

※虫卵はテニア科条虫では形態上区別できないので遺伝子の検出を試みる。

記調査期間で3例、2005年1月の届出制施行後の1例、1997年酪農学園大学で報告された1例の計5例が確認されており、これら感染機会の少ない室内飼育犬の感染例は飼い犬への感染圧の高まりを示している。同時に、室内飼育犬は人との接触がより密接なため、人への感染源としての危険度が高いことは言うまでもない。ただし、室外飼育犬の感染例も放し飼いと密接に関連しており、犬の感染は飼育場所ではなくあくまでもネズミを食べる機会に依存することを理解してほしい。また、15頭の感染確定例のうち6頭は札幌市など市部から検出されており、都市部においても感染例があることも認識する必要がある。1997年以降の飼い犬の感染については、上記以外に、2000年の有珠山噴火時に避難住民が放逐した犬から2頭の抗原陽性例が、北海道行政がキツネの剖検調査（感染率の定点観測）時に同時に行っている犬の剖検（毎年10～20頭程度；主に捕獲犬）で1997年に1頭の感染例が報告されている。

上記調査では本州からも感染犬が検出されており、虫卵のDNA検査で1頭の感染が確定している。この犬は北海道から移動したもので、北海道で感染したものと思われる。さらに、2003～4年に国立感染症研究所が行った、フェリーによって北海道から移動した犬の調査では、検査希望者の飼い犬69頭中2頭で抗原陽性例が報告されている。犬以外では青森県の豚で感染例が報告されているが、野生動物からは報告がなく、本州にエキノコックスが定着している証拠は今のところ得られていない。

2. 飼い犬のエキノコックス診断と届け出基準

エキノコックス感染犬の届け出制に対して厚生労働省が作成したガイドライン (<http://www.mhlw.go.jp/topics/2004/10/tp1001-4.html>) では3つの届け出基準を設けている(表1)。第一は病原体の検出で、虫体または片節を確認した場合、届け出の対象となる。虫卵の検出は、エキノ

コックスと他のテニア科条虫(猫条虫、胞状条虫や豆状条虫など)の虫卵が形態的に区別できないため、虫卵の検出のみでは届け出対象とならない(遺伝子診断が必要)。第二は遺伝子の検出であるが、現在エキノコックスの遺伝子検査をルーチンで行っている検査機関はなく、研究あるいは公共サービスの一環として専門機関が請け負っているのが現状である。したがって、遺伝子検査は、虫体や虫卵が検出されるなどエキノコックス感染が強く疑われる場合にかぎり確定診断のために行われている。第三は抗原の検出で、エキノコックス成虫の排泄分泌物が犬の糞便中に出てくるものを捉える方法である。本法は虫卵排出前(エキノコックスは幼虫が犬に感染してから虫卵を排出するまで約1か月を要する)の検査でも感染を検出できるため有用性の高い診断法であるが、一定の確率で偽陽性反応が検出される。北海道大学が開発した抗原検出法(環境動物フォーラムにより実施)では、0.2～0.5%の確率で偽陽性反応が検出されている。ところが、飼い犬の感染率も0.4～0.7%(偽陽性率のほぼ2倍程度)と低いため、抗原検査における陽性反応のほぼ2/3は真陽性(感染)、1/3は偽陽性(非感染)となる。したがって、抗原の検出のみ(虫卵陰性)では確定診断することはできず、駆虫治療の結果、抗原が不検出になったものに限って届け出義務が発生することになる。

おわりに

北海道の登録犬は約23万頭であり、未登録犬を含めると推定30～50万頭の犬が北海道で飼育されている。したがって、相当数の飼い犬がエキノコックスに感染していると考えられ、その中には北海道外へ移動する犬も含まれるであろう。北海道で人の感染リスクを減らすために、さらには本州への拡散を防止するために、飼い主、獣医師および行政がこれらの状況を十分に認識して、ペットの適切な飼育管理と感染予防にあたらなければならない。