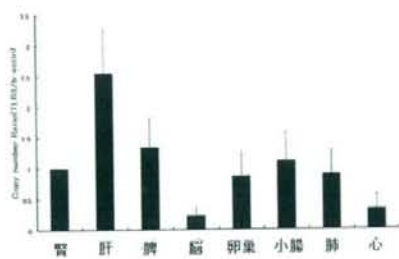
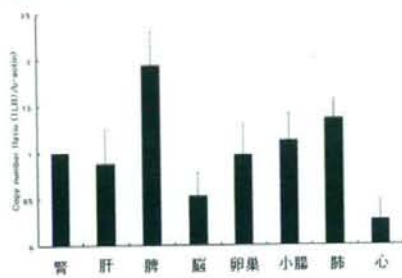


(A) TLR3



(B) TLR7



(C) TLR9

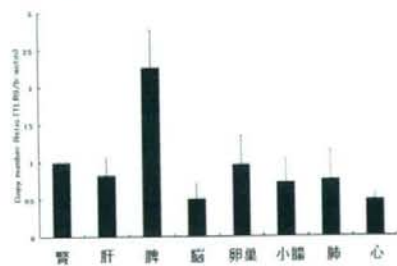


Fig.3 TLRmRNAの臓器別発現 (A)TLR3 (B) TLR7 (C) TLR9

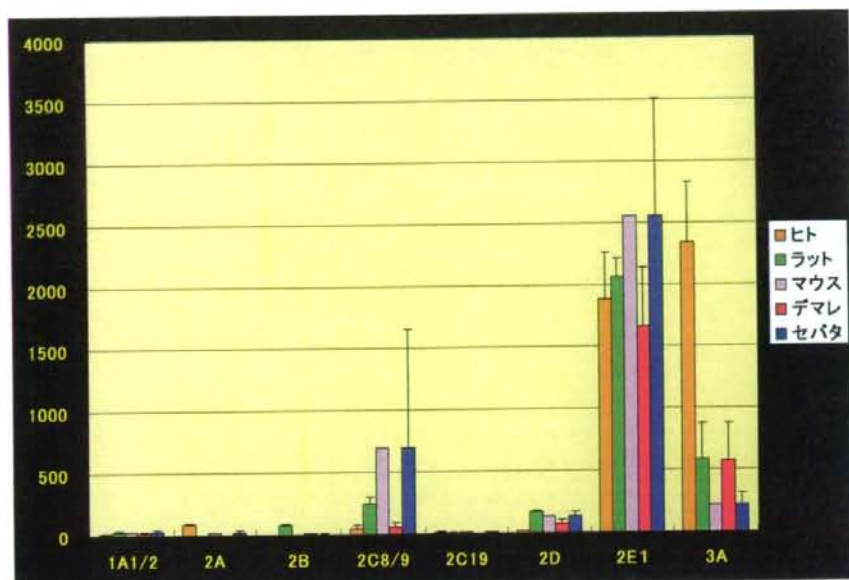


Fig.4 代表的なCYPアイソフォームの活性

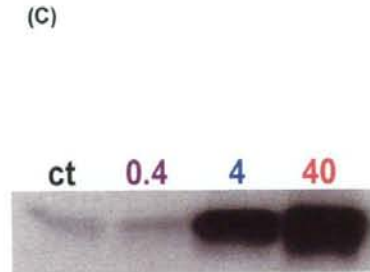
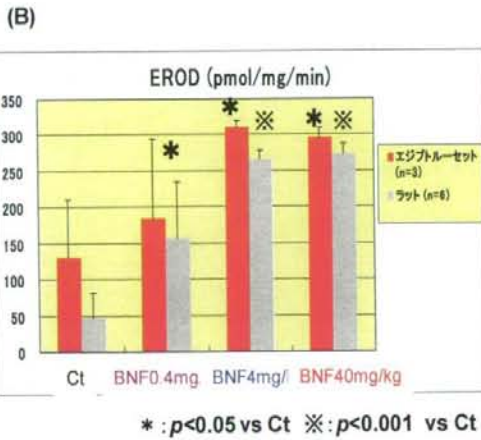
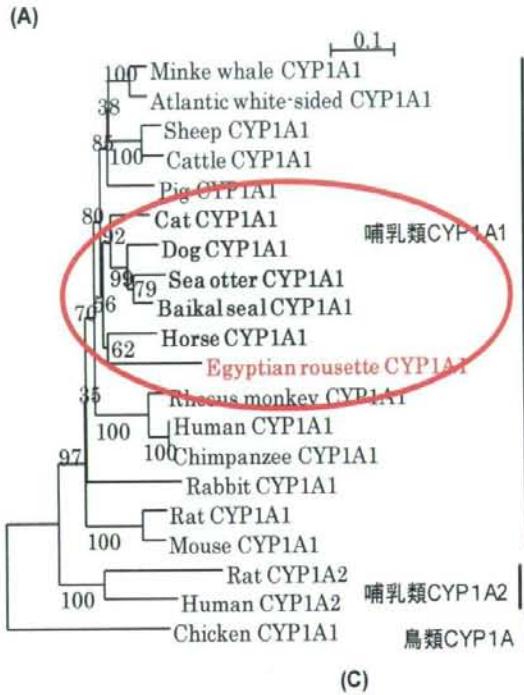


Fig.5 (A)哺乳類CYP1Aの系統解析 (B)BNF投与によるCYP1A活性の誘導 (C)BNF投与によるCYP1Aタンパク質発現

6. 野生動物のエキノコックス症コントロール法に関する研究 地域の資源を活用した汚染環境の修復

分担研究者	神谷 正男	酪農学園大学環境システム学部	環境動物学
研究協力者	金子 正美	酪農学園大学環境システム学部	環境 GIS
	同 星野 弘方	酪農学園大学環境システム学部	環境リモートセンシング
	同 奥 祐三郎	北海道大学大学院獣医学研究科	
	同 J. ラガバ	財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	
	同 小川 巖	エコネットワーク (民間環境保護団体)	
	同 S. ガンゾリク	(合)環境動物フォーラム	
	同 細川 裕俊	(合)環境動物フォーラム	
	同 小林文夫	(合)環境動物フォーラム	
	同 斎藤通彦	(合)環境動物フォーラム	
	同 岡崎 克則	北海道倶知安町風土館	
	同 白木 恵美子	(NPO)ニセコ・羊蹄再発見の会 WAO	
	同 宮原 俊之	財団法人小清水自然を語る会	
	同 荻込 洋一	財団法人小清水自然を語る会	
	同 巖城 隆	財団法人黒寄生虫館	
	同 持田立子	(株)わかもと製薬	

研究要旨

研究グループ:酪農大(環境動物学研究室、OIE エキノコックス症リファレンスラボ)、環境動物フォーラム(FEA)、北大(奥 COE プロジェクト)、エコネットワーク、(NPO)ニセコ・羊蹄再発見の会:WAO、財団法人小清水自然を語る会、わかもと製薬は、エキノコックス流行地において、主に野生動物(キツネ)を対象に『感染源対策』に関わる研究を行った。住民が主体となって、地域の資源(人材、産物を含む)、いわゆる『内発的発展力』を活用して一部の地域で汚染環境の修復に関する研究、技術開発を実施した。環境修復メニュー(キツネ駆虫剤入りカマボコ;ベイト作成+その散布+評価判定)の中でベイト散布法は、夏期の場合、十分な駆虫効果を得るためには毎月の散布が必要であること、また、非散布地域の境界領域に陽性例が見られることから野生動物を対象としてエキノコックス症感染源対策には、広領域の散布が効率的であることを明らかにした。その他、札幌圏に隣接した野幌森林公園ならびに倶知安町に隣接するニセコ町・京極町での野生動物:キツネから人への感染リスクの実態(ベースライン・データ)を把握し2009年よりベイト散布による感染源対策を開始することとなった。また、北海道の自衛隊演習地で調査が実施された。野幌森林公園においては、積雪期のベイト散布効果が確認され、その後の追跡調査が実施された(2008年2~10月)。また、研究グループにより開発され、犬用エキノコックス症診断薬(スクリーニング用)として認可され、2008年5月より発売されるにいたった『エキット』のキツネ糞便への応用、さらに確定診断用としてLAMP法の反応条件を検討した。

1. 小清水町における感染源対策

1-A. 目的

住民と協力して実施する環境修復メニュー（キツネ駆虫剤入りカマボコ：ペイト作成+その散布+評価判定）の効率化をはかる。

1-B. 方法

（財）小清水自然を語る会、環境動物フォーラムと共同で、小清水町の約 200 平方キロを対象にキツネ糞便採取、ペイト散布ならびに糞便内抗原検査ほかを実施した。キツネ糞便採取は、平成 20 年 8 月に集中して実施した。車 1 台、2 人 1 組で路上の糞便を見つけて採取し、（合）環境動物フォーラムが検査を担当した。（財）小清水自然を語る会のメンバーを中心に地域住民、全国からのボランティアなどが 2 名 1 組の 5 チーム各チーム 1 名が車を運転し、もう 1 名が車からペイトを散布する。散布箇所は 1 チームが 40 カ所を担当する。防風林と道路との交点を中心に畑、キタキツネの巣穴周辺で 1 カ所あたりペイト 10 個（各 50mg プラジクワンテル入り）を散布し、作業時間は 1 回、約 2 時間である。（合）環境動物フォーラムでは、糞便中に含まれるエキノコックス成虫代謝産物（糞便内抗原）を従来のサンドイッチ ELISA 法により検出した。検出される抗原は耐熱性なので、糞便は加熱処理後（殺卵後）、検査に用いた。虫卵検査は砂糖遠心浮遊法で行った。

1-C. 結果

平成 19 年度、ペイト散布が隔月であったことから虫卵陽性率が 9% に上昇したため（キツネ糞便 85 検体のうち、糞便内抗原と虫卵は、それぞれ 19、8 例）、平成 20 年度は、毎月散布とした。その結果、キツネ糞便 95 検体のうち、抗原陽性 6、虫卵陽性 2 例で、抗原・虫卵陽性率は 1%

となった。

1-D. 考察

平成 19～20 年度の結果から、ペイト散布は効果があるものの、2 ヶ月に 1 回の散布で、毎月の散布がより効果的と考えられる。調査地域のキツネ糞便に陽性例が検出されたが、より広域の散布への転換ならびに夏期に集中するペイト散布を再考する必要がある。

2. 倶知安町、その他の地域における感染源対策

2-A. 目的

住民が主体となって実施する環境修復メニュー（キツネ駆虫剤入りカマボコ：ペイト作成+その散布+評価判定）の効率化をはかる。

2-B. 方法

（NPO）ニセコ・羊蹄再発見の会 WAO、環境動物フォーラムと共同で、倶知安町などを対象にキツネ糞便採取、ペイト散布ならびに糞便内抗原検査ほかを実施した。環境動物フォーラムが検査を担当した。検査法は、小清水町の場合と同じであった。

2-C. 結果

倶知安町では、平成 20 年度、キツネ糞便 80 検体のうち、糞便内抗原と虫卵陽性率は、それぞれ 8.7%、1.2% で、抗原・虫卵陽性率は 1.2% であった。

その他の地域における感染源対策

①ニセコ町（平成 21 年度ペイト散布予定）：9、10、11 月キツネ糞便をそれぞれ、85、91、85 検体のうち、糞便内抗原（虫卵）陽性率は、それぞれ 22.2%（14.1%）、28.6%（7.7%）、22.4%（14.1%）であった。

- ② 鹿追町の農家（豚の放牧を予定）の調査（平成 21 年度ペイト散布予定）
- ③ 自衛隊演習地の調査（平成 21 年度ペイト散布予定）
- ④ 野幌森林公園の調査・ペイト散布（平成 20 年 2～10 月）

ペイト散布前の平成 20 年 2～3 月、散布域の陽性率（ELISA と虫卵）は、それぞれ 52、34%であったのに対して、非散布域（対照域）は、31、23%であったが、散布後、6、0%（対照域：33、6%）と陽性率が下がり（虫卵陽性例 0%）、ペイト散布効果が顕著に認められた。その後、散布域では虫卵排出は 7 月まで 0%で推移するが 10 月までに漸増した。

2-D. 考察

小清水町の感染源対策で確認されたように夏期に集中するペイト散布では、毎月散布がより効果的と考えられる。俱知安町と隣接地域で野生動物：キツネから人への感染リスクの実態（ベースライン・データ）が明らかとなり、より広域のペイト散布事業へ展開するための基礎データを収集された。札幌圏に隣接した野幌森林公園は、200 万都市（札幌、江別、北広島）の人口密集地に囲まれた特異な環境にあるが、初めて積雪期（3 月末）のペイト散布を実施した。子ギツネの誕生とそれに伴う雄ギツネの巣穴への餌運び行動の時期と一致しペイト受容を高め駆虫効果が顕著に表れたと考えられる。子ギツネが固形食を食べ始める時期（5 月）までペイト散布を実施することで、感染源として比重の高い若齢個体、とくに子ギツネの浄化→エキノコックス汚染環境の修復が期待される。

3. 犬用簡易迅速キット『エキット』のキツネ糞便への応用

3-A. 目的

イヌ用『エキット』は、人へのリスク（感染源＝虫卵）による被害が発生する前に早めに対処（＝警告→駆虫）する目的で開発された。糞便内のエキノコックス成虫由来抗原を検出する簡便・迅速な診断キットである。原理的には、イヌ以外の終宿主動物（キツネ、タヌキ、ネコ）に適用可能と考えられるが、動物種によって糞便組成が異なるため、とくに主な感染源動物であるキツネ糞便に適用可能かどうかを確認するため、従来の診断法と比較する。

3-C. 結果

今回、小樽、小清水から採集したキツネ糞便 245 検体（内 ELISA 陽性検体 35）で検討したところ、判定異常・不能を示す 26 検体が認められた（3 種類：基準ラインの異常：基準ラインが極端に現れにくく、サンプル特異的に繰り返される①、判定ラインの異常：判定ライン上に別の何か吸着し、判定ライン部分が白抜け（無色透明）になる②、もしくは白～灰色のくっきりしたラインが現れる③）。野外糞便に対してのエキット（無処置）の精度（ELISA 結果との比較）は、判定不能 10.6%（26/245）、感度 78.1%（25/32）、特異度 83.6%（153/183）、一致率 82.6%（181/219）であった。現段階では『エキット』を野外採取キツネ糞便に適用は困難である。

4. LAMP 法の検討

4-A. 目的

イヌ簡易診断キット『エキット』は、スクリーニング用で、確定診断としては、虫体の同定やエキノコックスに特異的なプライマーを用いた PCR 法が必要である。しかし、PCR 法は正確な温度コントロール

のできるサーマルサイクラーなどの装置が必要になる。そこで、2000年に報告された新しい遺伝子増幅法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は PCR 法よりも迅速・簡易な遺伝子増幅法として注目されている。主に野生動物 (キツネ) を対象に現在、検討されている『感染源対策』が、専門家・専門機関・実施母体が不足しているなかで住民が主体となって実施するためには、環境修復メニュー『ベイト作成+その散布法+効果判定法』のうち『効果判定法』をより正確、かつ安価な診断法の開発が期待される。今回、LAMP 法の開発へ向けて反応条件の確立を目的とした。

4-C. 結果

エキノкокスの遺伝子を QIAamp DNA Mini Kit を使用して抽出し、LAMP 法で増幅させた。温度と時間 (63°C30分, 65°C40分・45分・60分, 65°C30分・40分・45分・60分) 設定し、虫卵1個の遺伝子量 8pg 以下の遺伝子量で増幅できる最適な条件を決めた。また、エキノкокス属の特異性を確認するため、近縁種 (猫条虫 *Taenia taeniaeformis*, 有鉤条虫 *T. solium*, 胞状条虫 *T. hydatigena*, 豆状条虫 *T. pisiformis*, タイワンテニア *T. asiatica*, 肥頭条虫 *T. crassiceps*, 瓜実条虫 (犬条虫) *Dipylidium caninum*, 広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum*) の遺伝子も同様に抽出し、実験に供した。プライマー配列の物理化学的性質やプラ

イマー間の相互作用を予測する作業には (株) 栄研化学ウェブ上で提供する専用設計ソフト (<http://primerexplorer.jp>) を使用した。

65°C 60分 でエキノкокス属 DNA 500 fg (虫卵 1/16 相当) の検出が可能となった。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

1. Lagapa, JTG., Oku, Y. and Kamiya, M. *Taenia taeniaeformis*: Colonic hyperplasia in heavily infected rats. *Experimental Parasitology*, 2008; 120: 417-420.

2. Lagapa, JTG., Oku, Y. and Kamiya, M. Gastroenteropathy in rodents with hepatic *Taenia taeniaeformis* larvae infection: mechanism of pathogenesis. *Journal of Rakuno Gakuen University*. 2008; 33(1): 139-150.

3. Nonaka N., Kamiya M., Oku, Y. A vague understanding of the biology and epidemiology of echinococcosis by dog owners in Hokkaido, an endemic island for *Echinococcus multilocularis* in Japan. *J Vet Med Sci*. 2009 Jan;71(1):105-7.

4. Nonaka, N., Hirokawa, H., Inoue, T., Nakao, R., Ganzorig, S.,

- Kobayashi, F., Inagaki, M., Egoshi, K., Kamiya, M. and Oku, Y.
The first instance of a cat excreting *Echinococcus multilocularis* eggs in Japan. *Parasitol Int.* 2008; 57(4): 519-520.
5. Nonaka, N., Oka, M., Kamiya, M., Oku, Y. A latex agglutination test for the detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigen in the definitive hosts. *Vet Parasitol.* 2008; 152(3-4): 278-283.
6. Nonaka, N., Kamiya, M., Kobayashi, F., Ganzorig, S., Ando, S., Yagi, K., Iwaki, T., Inoue, T. and Oku, Y. *Echinococcus multilocularis* infection in pet dogs in Japan. *Vectot-Borne and Zoonotic Diseases Parasitology.* 2009 [Epub ahead of print]
7. 神谷正男
犬エキノコックス症の検査法. 感染症検査実習マニュアル(獣医師高度技術研修対策事業), 日本獣医師会. 2008; 117-122.
8. Kamiya, M.
Echinococcosis/Hydatidosis. OIE Manual of Diagnostic Tests Vaccines for Terrestrial Animals(mammals, birds and bees) (6th ed.), 2008; Vol. 1. 175-189.
9. 神谷正男
生物学者小伝 13 (エキノコックス学) 事始め: 山下次郎・大林正士博士. モーリー. 2008; No. 18, 68-81.
10. Lagapa, JTG. and Kamiya, M. Epidemiology and control of alveolar echinococcosis in a suburban park of Sapporo City, Japan. First International Conference on infections diseases Dynamics. (Asilomar, Ca. U.S.A.) EPIDEMICS, 2008; P2.16.
11. Kamiya, M.
Control and prevention of zoonotic alveolar echinococcosis in Japan : A collaborative approach. First International Conference on infections diseases Dynamics. (Asilomar, Ca. U.S.A.) EPIDEMICS, 2008; P2.17.
12. Kamiya, M.
Control measures against parasitic zoonosis (echinococcosis) in wild in Japan. From laboratory model to its field application. "Current environmental conditions, problems and its solution in the northern hemisphere" Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan. 2009; 2.
13. Hoshino, B., Ganzorig, S. and Kamiya, M.
Evaluation of pasture degradation using satellite imagery and GIS

technique. "Current environmental conditions, problems and its solution in the northern hemisphere" Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan. 2009; 3.

14. Ganzorig, S., Hoshino, B. and Kamiya, M.

Migration patterns of Tibetan antelopes based on satellite tracking. "Current environmental conditions, problems and its solution in the northern hemisphere" Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan. 2009; 4.

15. Kamiya, M.

Water and food under pressure by pathogens such as *Cryptosporidium* and *Echinococcus*. 加藤勲 教授退職記念論文集(酪農学園大学環境システム学部). 2009; 103-123.

学会および講演

1. 奥祐三郎、野中成晃、林 臣菜、梶山博文、持田立子、高倉 彰、神谷正男

犬の糞便を用いたエキノコックス抗原簡易検査キットの評価 日本小動物獣医学会(北海道) 2008. 9. 12-13 洞爺パークホテル天翔

2. 奥 祐三郎、李 爽、山下理宇、渡辺純一、野中成晃、神谷正男

多包条虫の網羅的cDNAライブラリー

の in silico 解析、特にプロテアーゼ類について 第146回日本獣医学会学術集会 2008. 9. 24-26 日本獣医学会(宮崎市)

3. 野中成晃、奥 祐三郎、林 臣菜、佐藤匡美、持田立子、高倉 彰、神谷正男

犬エキノコックス症の糞便内抗原簡易検査キット「エキット」の評価と感染源対策への応用 第146回日本獣医学会学術集会 2008. 9. 24-26 日本獣医学会(宮崎市)

4. 神谷正男

エキノコックス症の感染源対策. 平成 20 年度動物由来感染症対策(狂犬病を含む)厚生労働省技術研修会, 2008. 10. 31 北里大学薬学部

5. 神谷正男, 野中成晃, 林臣菜, 持田立子, 高倉彰, S. ガンゾリグ, ラガバ, JTG, 小林文夫, 奥 祐三郎 犬エキノコックス症の分便内抗原簡易検出キット「エキット」の評価と感染源対策への評価. 第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会 2008. 11. 1 北里大学薬学部

11. 1 北里大学薬学部

6. 神谷正男

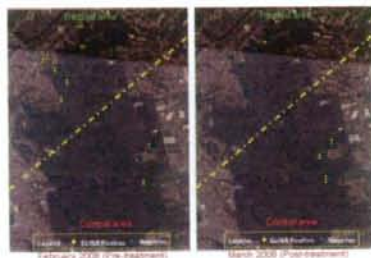
水系感染症, 寄生虫, 原虫対策 (1)・(2). JICA 研修会「フランス語圏乾燥地域村落飲料水管理」コース, 2008. 11. 28 酪農学園大学

7. Kamiya, M.

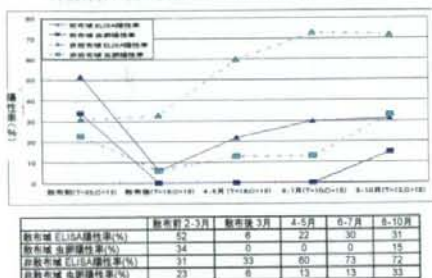
Control and prevention of zoonotic alveolar echinococcosis in Japan :

- A collaborative approach.
 First International Conference on infections diseases Dynamics. December 1-3. 2008. Asilomar, Ca. U. S. A.
8. Lagapa, JTG. and Kamiya, M. Epidemiology and control of alveolar echinococcosis in a suburban park of Sapporo City, Japan. First International Conference on infections diseases Dynamics. December 1-3. 2008. Asilomar, Ca. U. S. A.
9. Kamiya, M. Control measures against parasitic zoonosis (echinococcosis) in wild in Japan. From laboratory model to its field application. "Current environmental conditions, problems and its solution in the northern hemisphere". 2009. 1. 26 Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.
10. Hoshino, B., Ganzorig, S. and Kamiya, M, Evaluation of pasture degradation using satellite imagery and GIS technique. "Current environmental conditions, problems and its solution in the northern hemisphere" 2009. 1. 26 Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.
11. Ganzorig, S., Hoshino, B. and Kamiya, M. Migration patterns of Tibetan antelopes based on satellite tracking. "Current environmental conditions, problems and its solution in the northern hemisphere" 2009. 1. 26 Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.
12. Kamiya, M. Control measures against parasitic zoonosis (echinococcosis) in wildlife in Japan. "Innovational technologies for the study of biological and ecological phenomena in conditions of increasing human pressure on environment" 2009. 1. 28 Taraz innovation and Humanitarian University, Taraz, Kazakhstan.
16. Hoshino, B., Ganzorig, S. and Kamiya, M. Evaluation of pasture degradation using satellite imagery and GIS technique. "Innovational technologies for the study of biological and ecological phenomena in conditions of increasing human pressure on environment" 2009. 1. 28 Taraz

innovation and Humanitarian
University, Taraz, Kazakhstan.
17. Ganzorig, S. and Hoshino, B.
Migration patterns of Tibetan
antelopes based on satellite
tracking. "Innovational
technologies for the study of
biological and ecological
phenomenons in conditions of
increasing human pressure on
environment" 2009. 1. 28 Taraz
innovation and Humanitarian
University, Taraz, Kazakhstan.



野幌森林公園の調査・ペイト散布(2008年2~10月)

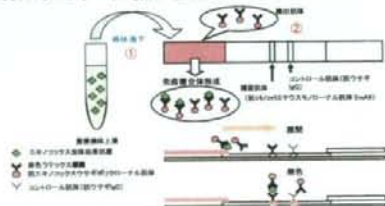


キットのキツネ糞便への応用



測定原理

糞便を検体希釈液で希釈後、反応シートに滴下し、30分後に赤色ラインの出現の有無を肉眼により判定する。
 ①検体中にエキノコックス虫体由来抗原が存在すると、反応シート中の赤色ラテックス標識抗エキノコックス抗体と結合し、免疫複合体が形成される。
 ②この免疫複合体が反応シート上を展開し、判定部位に固相化された抗体(抗エキノコックスマウスモノクローナル抗体)に捕捉され赤色判定ラインを形成する。



キット[®] について

製品概要

測定原理	イムノクロマト法	貯 法	室温保存
使用目的	犬の糞便中のエキノコックス虫体由来抗原の検出	有効期間	製造後18ヵ月
判定時間	30分	包装単位	5テスト用

<特長>

糞便を用いた院内検査が可能
 1ステップ操作、30分で目視判定
 早期の感染をスクリーニング
 確認検査は実験動物中央研究所で無料で実施
 (ELISA, 虫卵, PCR)

1. 管理用抗原による最小検出濃度の比較

管理用エキノコックス虫体由来抗原 (*E. multilocularis* の卵・分泌抗原) を参照陽性便懸濁液で懸濁した。

タンパク質濃度 0 0.5 1 2 4 8 16 32 ng/ml



キット判定: - + + + + + + +
 ELISA OD: 0.021 0.301 0.493 0.974 1.517 2.129 2.790 3.045 (cut off 値 0.261)

最小検出濃度: 糞便内抗原検出ELISA法と同値

キット:キツネ糞便(野外採取)への応用

スクリーニング	サンプル数	判定結果		ELISA結果との比較		計	合計
		+	-	+	-		
小塚(凍結)	14(4)	1	3	9	0/4	0/5	5
小塚(凍結)	83(8)	3	0	1	1/4	0/40	8/44
小塚(凍結)	82(8)	0	0	0	2/3	0/79	1/80
ニセコ(凍結)	88(16)	0	0	2	4	4/10	17/88
合計	247(28)	4	3	14	28	7/32	30/183

(+) ELISA陽性結果

判定基準:(±) (±) (±) (±)

基準ラインの出現、基準ラインが明確に現れれば(+)、サンプル稀薄時に限り(±)と判定される(±)
 基準ラインの出現、基準ラインに影の部分が観察し、判定ライン部分の色が自然に赤色透明になる(±)
 ±は白～灰色の心形ラインが現れる(±)

野外糞便に対してのキット(無配置)の精度(ELISA結果との比較)は、
 判定不能 10.6% (26/245)、感度 78.1% (25/32)、特異度 83.6% (153/183)、一致率 82.6% (181/219)

LAMP法の検討



エキノコックス属 DNA 500 fg(虫卵1/16検出)検出可能

- 1. *E. multilocularis*
- 2. *E. multilocularis*
- 3. *E. multilocularis*
- 4. *E. multilocularis*
- 5. *E. multilocularis*
- 6. *E. multilocularis*
- 7. *E. multilocularis*
- 8. *E. multilocularis*
- 9. *E. multilocularis*
- 10. *E. multilocularis*
- 11. *E. multilocularis*
- 12. *E. multilocularis*
- 13. *E. multilocularis*
- 14. *E. multilocularis*
- 15. *E. multilocularis*
- 16. *E. multilocularis*
- 17. *E. multilocularis*
- 18. *E. multilocularis*
- 19. *E. multilocularis*
- 20. *E. multilocularis*

7. エキノコックスの診断法についての研究

研究分担者: 奥 祐三郎 (北海道大学・大学院獣医学研究科)

研究協力者: 巖城 隆 (目黒寄生虫館)

野中成晃 (宮崎大学農学部・獣医学科)

松本淳 (日本大学生物資源科学部・獣医学科)

渡辺純一・李 爽・山下理宇 (東京大学・医科学研究所)

杉本千尋 (北海道大学・人獣共通リサーチセンター)

原雄一郎 (北海道大学・大学院情報科学研究科)

持田立子・林菜臣 (わかもと製薬)

研究要旨

現在まで、犬のエキノコックス症の診断法としては、サンドイッチ ELISA をスクリーニング法として用い、ELISA 陽性例について虫卵の DNA 検査による確認検査が行われてきた。しかし、獣医師が ELISA の結果を得るまで時間を要し、臨床現場で利用できる簡易迅速診断キットが望まれていた。我々はわかもと製薬と共同でインムノクロマト法を応用し、犬の診断キットとしてエキットを開発した。本キットは 2008 年 5 月から販売開始され、2008 年 12 月に本法使用による第一例目が発見された。2008 年の北海道の獣医師から環境動物フォーラムへ依頼された検体(犬 137 検体、猫 19 検体)からは陽性例は発見されなかった。

我々は、エキットの感度と特異度を確認するために、実験感染犬および札幌・関東の飼育犬の糞便を用い、エキット、サンドイッチ ELISA、虫卵検査の結果を比較した。エキットは現在の ELISA とほぼ同等の特異度・感度で、現在の ELISA の代用可能と考えられた。なお、野外で採取したキツネ糞便(245 検体)へのエキットの応用を試みたところ、本キットをそのままキツネ糞便に利用することは困難と考えられた。現在、同時に多種のテニア科虫卵(エキノコックスを含む)の同定を行うための Reverse Line Blot を検討している。犬についてはスクリーニングテストとしてエキットで可能となり、今後、確認検査のためのテニア科虫卵の鑑別は Reverse Line Blot で可能となるものと期待できる。

診断に加えて、我々はエキノコックスの幼虫および成虫の cDNA ライブラリを作成し、それらの遺伝子解析を行っている。現在、糞便抗原検出のために使用されている EmA9 抗体と反応する抗原について特定されておらず、成虫に特異的に大量に発現する分泌性の糖タンパクと予想される。このような特徴から、cDNA ライブラリ内の候補蛋白を選定した。なお、この cDNA ライブラリは成虫のワクチン候補選定にも有用と考えられ、将来、駆虫薬入りペイト散布との併用が期待される。

1. エキットの検討

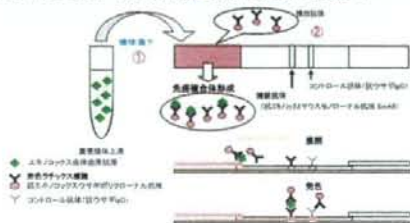
研究目的

昨年まで犬のエキノコックス症の診断法としては、糞便を検査材料としたサンドイッチ ELISA(モノクローナル抗体 EmA9 を用いた)をスクリーニング法として、さらに虫卵検査および虫卵の DNA 検査による確認検査が行われてきた。サンドイッチ ELISA 検査は環境動物フォーラムにおいて一括して行われているが、検査依頼した獣医師が検査結果を得るまでに一週間ほど要し、臨床現場で利用できる簡易迅速診断キットが望まれていた。我々はわかもと製薬と共同でインムノクロマト法を応用し、エキットを開発した。本キットは 2008 年 5 月から販売開始された。本法は犬のスクリーニング検査として位置づけられ、確定診断(虫卵検査および虫卵の DNA 検査)については実験動物中央研究所において無料で行われている。



測定原理

糞便を検体希釈液で希釈後、反応シートに滴下し、30分後に紫色ラインの出現の有無を肉眼により判定する。
 ① 検体中にエキノコックス虫体由来抗原が存在すると、反応シート中の紫色ラテックス標識抗エキノコックスモノクローナル抗体と結合し、免疫複合体が形成される。
 ② この免疫複合体が反応シート上を覆い、判定部位に immobilized された抗体(抗エキノコックスマウスモノクローナル抗体)に捕捉され紫色判定ラインを形成する。



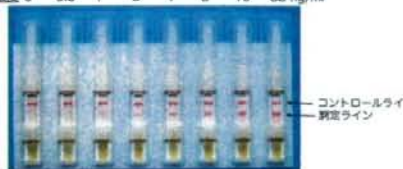
結果

まず、エキットの感度を調べるために、多包条虫成虫由来抗原(排出・分泌抗原)を用いて最小検出濃度を調べたところ、0.5-1ng/ml で、現在行われている ELISA と同様の感度であった。

1. 管理用抗原による最小検出濃度の比較

管理用エキノコックス虫体由来抗原 (*E. multilocularis* の抽出・分泌抗原) を参照陽性使用液で感度試験した。

タンパク質濃度 0 0.5 1 2 4 8 16 32 ng/ml

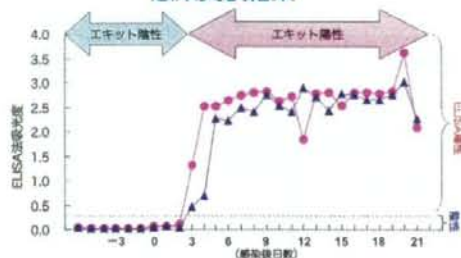


エキット判定
 ELISA OD
 - + + + + + + +
 0.021 0.201 0.493 0.974 1.947 2.778 2.968 2.968 (cut off 値 0.281)

最小検出濃度：糞便内抗原抽出 ELISA 法と同等

次に、実験感染犬から経時的に採取した糞便への実験応用および札幌・関東の飼育犬の糞便を用いた臨床応用を実施し、エキット、ELISA、虫卵検査の結果を比較した。100 万個の原頭節を投与した 2 頭の実験感染犬では感染後 5 日までに陽性となり、虫卵検査では検出不可能な感染初期においてすでに検出可能であることが示された。

感染実験結果



感染犬小腸からの回収虫体数 Dog1: 22.9万匹 Dog2: 25.2万匹
 (感染後21日に剖検・虫体を回収)

また、今回使用した犬の糞便 367 例からは ELISA および陽性の例は全く検出されなかったが、4 例においてエキットで陽性となった(一致率 98.9%)。

犬の臨床的検討

飼犬糞便：367検体（札幌市由来169例、本州由来198例）

犬糞便内抗原ELISA法との比較

		ELISA法	
		+	-
エキット	+	0	4
	-	0	363

特異性：98.9% 一致率：98.9% n=367

※エキノコックス陽性検体は検出されなかった

キツネ糞便へのエキットの応用を検討するために、ELISA との比較を行ったところ、不一致の検体が多かった。

野外採取糞便(キツネ)への応用

スクリーニング	サンプル数	判定不能				ELISA結果との比較			合計	
		1	2	3	計	ELISA陽性 一致率	ELISA陰性 一致率	ELISA結果 不一致		
小樽(凍結)	11(4)	1	1	3	5	0/4	0/3	0/9	5	
小樽(凍結)	33(8)	3	2	1	6	1/4	5/8	6/44	15	
小樽(凍結)	33(8)	0	0	0	0	2/3	6/78	11/85	15	
ニセコ(加熱)	32(18)	2	0	2	4	4/19	17/58	6/3	21/81	25
合計	117(128)	6	3	14	23	7/32	30/192	1/4	33/219	64

()はELISA陽性数

判定不能・不一致の種類

虫卵ラインの真実・基礎ラインが検体中に埋れにくく、サンプル特有的に検出される(1)
判定ラインの真実・判定ライン以上の割合が低く、判定ライン部分が白濁(黄色透明)になる(2)
もし(1)は白→黄色のつきついたラインが認められる(3)

野外糞便に対してのエキット(無処置)の精度(ELISA結果との比較)は、
判定不能 10.6% (26/245)、感度 78.1% (25/32)、特異度 83.6%
(153/183)、一致率 82.5% (181/219)

→現在の条件では野外採取キツネ糞便には応用困難

2008年の北海道の獣医師から環境動物フォーラムへ依頼された検体(犬 137 検体、猫 19 検体)を調べたが、陽性例はなかった。なお、今後ベイト散布を予定している北海道のニセコ、喜茂別、鹿追において採取されたキツネ糞便(計 939 検体)の ELISA および虫卵検査を実施し、事前評価を行った。

ニセコにおけるキツネ糞便調査(2008年)

9月

		ELISA				
		陽性	偽陽性	陰性	合計	
虫卵	12/85	+	6	0	6	12
抗原	19/85	-	13	3	57	73
合計			19	3	63	

10月

		ELISA				
		陽性	偽陽性	陰性	合計	
虫卵	7/91	+	4	0	3	7
抗原	26/91	-	22	1	61	84
合計			26	1	64	

11月

		ELISA				
		陽性	偽陽性	陰性	合計	
虫卵	12/85	+	10	0	2	12
抗原	19/85	-	34	2	59	95
合計			44	2	61	

考察

実験感染犬および臨床応用の結果から、エキットは ELISA とほぼ同等の特異度・感度であるが、1%程度偽陽性があり、ELISA と同様確認検査のサポート体制の必要性が再認識された。現在実験動物中央研究所において、サポート体制が確立されている。

一方、野外で採取したキツネ糞便へのエキットの応用は、糞便性状の違い(乾燥し、果実や昆虫などの大型の固形分が多い)から、エキットに付属する採便容器の使用は困難であり、また偽陽性反応や偽陰性反応が多いことから(38/219)、犬糞便用のエキットをそのままキツネ糞便に利用することは困難と考えられた。現在、検体の遠心、糞便の懸濁に使用する緩衝液の pH とイオン強度の検討、IgG の添加などを試みている。

結論

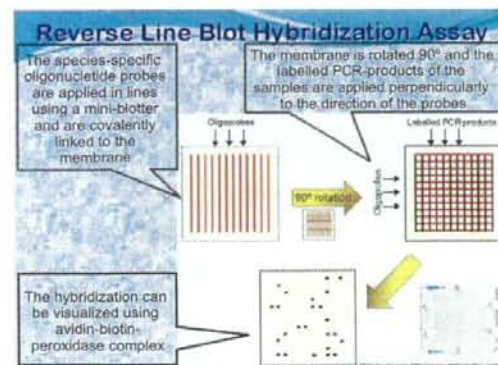
2008年5月エキットが販売開始された。これは犬のスクリーニング検査として位置づけられ、確定診断として虫卵および虫卵の DNA 検査が実施できるシステムのサポートにより、犬のエキノコックス診断については容易に可能となった。確定診断については実験動物中央研究所において行われているので、陽性犬が発見さ

れた場合は詳細について把握可能となっている。今後、感染犬が見つかった時の獣医師や飼い主へのサポートについては、自治体による感染犬の飼い主や診断した獣医師への聞き取り調査が必要と考えられる。今回の症例については、エキット陽性のみの段階で、獣医師が保健センターに相談した。このように最終的な確認検査終了前に、獣医師が対策法について行政に相談できることが望ましいと考えられる。

2. 虫卵の種鑑別のための Reverse Line Blot の検討

目的

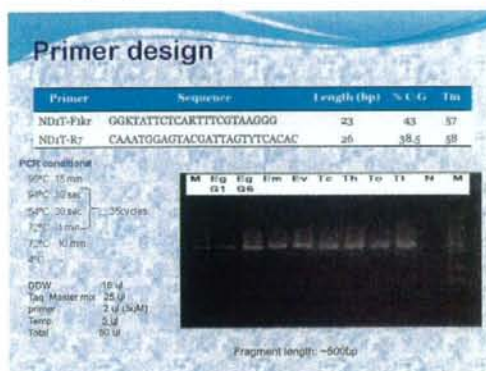
エキノコックスを含むテニア科虫卵は形態的に類似するため、種鑑別のためには遺伝子による鑑別が必要である。様々な種を一括して鑑別するため Reverse Line Blot を検討している。この方法は全テニア科条虫に共通のプライマーで PCR を行い、増副産物を多種の種特異的のプロープと反応させ、一度に種を鑑別する方法である。混合感染しても鑑別できる。



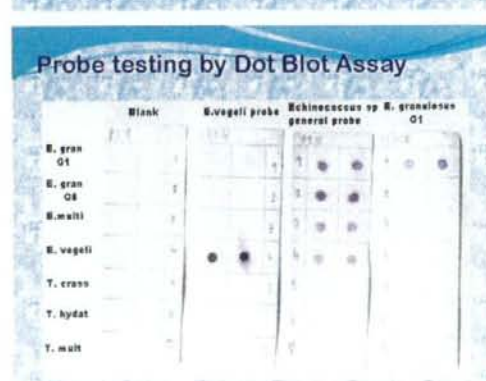
結果

まず、ミトコンドリアの Genebank 上の塩基配列について、様々なテニア科条虫の登録状況から、COI(Cytchrom oxygenase subunit 1)と ND1(NADH dehydrogenase 1)遺伝子について、5'末端および3'末端 common primer のデザイン、

さらに、種特異的なプロープと共通のプロープのデザインを試みた。



COI については変異がやや少なく、種特異的なプロープのデザインが困難なため、現在 ND1 について各種のプロープを作成し、dot Blot 法によって、条件の設定について検討を加えている。



考察・結論

現在様々な条件で行っているが、最終的には、

温度および時間を一定にし、様々なプローブを反応させる必要がある。野外サンプルの虫卵を用いて、Reverse Line Blot を実施したい。なお、問題点としては種特異的のプローブに対応する遺伝子内に種内変異があり、検出できないことがあるので、現在様々な分離株の塩基配列を調べ、特異的のプローブによる検出感度についても検討する必要がある。

3. モノクロナール抗体 EmA9 の認識する抗原について(cDNA ライブラリの解析)

目的

現在サンドイッチ ELISA およびエキットのエキノコックス特異的抗原の検出にモノクロナール抗体 EmA9 を用いているが、本抗体が認識する抗原については糖であることが知られ、O-link および N-link している糖鎖が重要と考えられているが、蛋白の情報が全くない。現在、当研究室は幼虫および成虫の cDNA ライブラリーを作成し、それぞれ約 1 万のクローンを得て、遺伝子解析を行っている。本抗原は幼虫には発現せず、成虫に特異的で、成虫による産生量が多く、体表から分泌されているものと予想されている。

結果

成虫と幼虫の主要な cDNA はかなり異なっており、成虫には成虫特異的に 39 種の Solute carrier family があった。7 種の Solute carrier family のクローン数は多く、大量に体表に発現していることが予想される。なお、この family はアミノ酸やグルコース、イオンの取り込みに関連し、膜に関連して存在していることがよく知られている。糖タンパクであることも一部知られており、この family が EmA9 認識抗原候補として有力であると考えられた。

考察・結論

成虫に特異的に発現し、かつ大量に発現していると予想される蛋白が多く、主に細胞質に分布し、細胞膜に露出しているものとしては、Solute carrier family が有力な候補となるものと推察された。今度、RNA 干渉により、個々の Solute carrier family 発現を阻害して、EmA9 との反応性について検討し、また異種動物の培養細胞での発現も考えている。

健康危険情報

2008 年 12 月末にエキットで陽性反応となった北見市(北海道)の飼い犬の症例について、虫卵を分離し遺伝子検査を行ったところ、虫卵が多包条虫であることが確認され、担当獣医師により本感染犬について届け出が出された。室内飼の犬で毎日近くの河原まで散歩に連れて行っているそうである。

研究発表

原著

1. Nonaka N, Kamiya M, Oku Y. A vague understanding of the biology and epidemiology of echinococcosis by dog owners in Hokkaido, an endemic island for *Echinococcus multilocularis* in Japan. J Vet Med Sci. 2009 Jan;71(1):105-7.
2. Nonaka N, Kamiya M, Kobayashi F, Ganzorig S, Ando S, Yagi K, Iwaki T, Inoue T, Oku Y. *Echinococcus multilocularis* Infection in Pet Dogs in Japan. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008 Oct 22. [Epub ahead of print]
3. Nonaka N, Hirokawa H, Inoue T, Nakao R, Ganzorig S, Kobayashi F, Inagaki M, Egoshi K, Kamiya M, Oku Y. The first instance of a cat excreting *Echinococcus multilocularis* eggs in Japan. Parasitol Int. 2008

Dec:57(4):519-20.

4. Nonaka N, Oka M, Kamiya M, Oku Y. A latex agglutination test for the detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigen in the definitive hosts. *Vet Parasitol.* 2008 Apr 15;152(3-4):278-83.

5. Katoh Y, Kouguchi H, Matsumoto J, Goto A, Suzuki T, Oku Y, Yagi K. Characterization of emY162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*.

Biochim Biophys Acta. 2008 Jan;1780(1):1-6.

6. Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo N, Kido Y, Yamamoto N, Yagi K, Miyoshi H, Nonaka N, Katakura K, Kita K, Oku Y. Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of alveolar echinococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jan;52(1):164-70.

学会および講演

1. 奥 祐三郎 北海道で蔓延するエキノコックス症とその対策 わが国の寄生虫感染症の疫学と制御 2008. 3. 22 日本大学生物資源科学部・本館3階

2. 奥祐三郎、野中成晃、林 臣菜、梶山博文、持田立子、高倉 彰、神谷正男 犬の糞便を用いたエキノコックス抗原簡易検査キットの評価 日本小動物獣医学会(北海道)

2008. 9. 12-13 洞爺パークホテル天翔

3. 中村星太、野中成晃、Phiri Isaac G.K、Chembesofu Mwelwa、井上貴史、松本 淳、片倉 賢、奥 祐三郎 ザンビアの牛から検出された単包条虫の genotype について 第146回

日本獣医学会学術集会 2008. 9. 24-26 日本獣医学会(宮崎市)

4. 奥 祐三郎、李 爽、山下理宇、渡辺純一、野中成晃、神谷正男 多包条虫の網羅的 cDNA ライブラリーの in silico 解析、特にプロテアーゼ類について 第146回日本獣医学会学術集会 2008. 9. 24-26 日本獣医学会(宮崎市)

5. 野中成晃、奥 祐三郎、林 臣菜、佐藤匡美、持田立子、高倉 彰、神谷正男 犬エキノコックス症の糞便内抗原簡易検査キット「エキジット」の評価と感染源対策への応用 第146回日本獣医学会学術集会 2008. 9. 24-26 日本獣医学会(宮崎市)

6. Oku, Y. Control of echinococcus and molecular biology Parasite Vector Genomics II in Sapporo 2008. 10. 21-22 創成科学共同研究機構 大会議室(5F)

7. 神谷正男、野中成晃、林臣菜、持田立子、高倉彰、S. ガンゾリグ、J. ラガバ、小林文夫、奥祐三郎 犬エキノコックス症の糞便内抗原簡易検査キット「エキジット」の評価と感染源対策への応用 第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会 2008. 11. 1 北里大学薬学部コンベンションホール

8. 金井祐太、井上貴史、野中成晃、片倉賢、間野勉、奥祐三郎 北海道の野生動物に見られるトリヒナ症の流行状況とトリヒナの分類 第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会 2008. 11. 1 北里大学薬学部コンベンションホール

9. 奥 祐三郎 エキノコックスの生態と感染の仕組み エキノコックス症を知ろう 正しい知識があれば怖くない!! 2008. 11. 7 倶知安町保健福祉会館

幼虫のcDNAライブラリー解析結果 (クローン数の多い遺伝子順)

	総計	4035
	遺伝子	クローン数
1	Antigen B8/1	258
2	Echinodermata Metallothionein, Family 4??	151
3	Large Subunit Ribosomal RNA	141
4	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase [Schistosoma mansoni]	62
5	Antigen B8/2	52
6	Citrate Synthase Precursor	33
7	Heat Shock Protein 90 alpha [Taenia asiatica]	32
8	MPRRGCGRCCSCCCDDCCDDCCCITPCCCRCKRCC	31
9	Glutathione S-Transferase Mu	30
10	Antigen B8/3 2	27
11	Fatty acid-binding Protein homolog 1 (EgFABP1) (EgDf1)	27
12	MSIAGYPRSGAFQRLLFSLSVYVLVIRRLGPSEPQHIIIMRPY	27
13	Polyubiquitin C [Mus musculus]	25
14	EG19 antigen Cysticercus cellulosae-specific antigenic polypeptide	20
15	Ubiquitin-conjugating enzyme, E2	20
16	Antigen B8/4	19
17	Ribosomal Protein L36-like Protein [Schistosoma mansoni]	19
18	Antigen B8/3 1	17
19	Dynein light chain LC8-type 2 [Bos taurus]	17
20	Tetraspanin TSP1 [Echinococcus multilocularis]	17
21	Ferritin heavy chain	16
22	Ribosomal Protein L44e	16
23	Ribosomal Protein P2 Acidic	16
24	MWDSRGVIAVLLCIIVFENYQQRCSGCLINVQWEHKLNLTIEDCK KDICKTKTPEATTTTTTTPETTTTPTTTTTTTTTPTTTTTTSETTAPTTT TPPTSTTTQETTTTPPTTTTTTTTTPTTTTTTSETTAPTTTTTPPTSTTTQET TPTTTTTTTTTPTTTTTTSETTTTPKPTVTTKKTTKSTRTPKVTKPTV TTKKTTKSTRTPQATKPTVTTTRSTPSTRTPPEVTKPTATTKKT KST	16
25	14-3-3 zeta	15
26	Polyadenylate-Binding Protein [Aedes aegypti] RRM3つ	15
27	MCKLGCGRCAYGYPGYFCDDCYGYDCNNFCCVVTPCYSTKACV GGCCYGDRCRCKRYC	15
28	Cytochrome c Oxidase Subunit 1	14
29	Dynein-like 1	14
30	Ubiquitin C (3)	14
31	MQGAPFCKSLITDNQVINQAIIVNLPHSQACFLSIFFKSDPRVSLQ VA	14