

動物由来感染症のリスク分析手法等に基づくリスク管理のあり方に関する研究

1 2. 肉食動物に由来する感染症の評価と管理手法の研究

分担研究者: 奥 祐三郎 (北海道大学・大学院獣医学研究科)
 協力研究者: 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 (東京大学・医科学研究所)
 持田立子・林菜臣 (わかもと製薬)
 神谷正男・小林文夫・スミヤ・ガイゾリック・斉藤通彦 (環境動物フォーラム)
 小清水町、倶知安町、ニセコ町、京極町、喜茂別町、蘭越町

肉食獣に由来する感染症としては、狂犬病をはじめ様々な感染症が知られているが、現在の我が国においては、北海道のキツネで高度に流行し、人への病原性が高いことからエキノコックス症が最も重要と考えられる。本寄生虫については、北海道において毎年サーベイランスが実施されており、長年の情報が蓄積されている。本研究では感染症の評価のための第一歩として、患者の発生状況と周辺地域のキツネの感染率について解析を試みた。キツネの感染状況と患者の発生数の推移から、1980年代の全北海道への流行域の拡大、1990年代の都市周辺部も含めたキツネにおける感染率の上昇、飼い犬の症例報告(毎年1-2例)などから、2000年以降の人の年間発生件数平均20例からさらなる患者数の増加と、本州への流行地の飛び火が危惧される。我々は本症の管理手法として感染源対策を試み、様々な情報を蓄積してきた。1997年から2007年までの飼い犬(4768頭)の検査結果から、感染犬の感染リスクを分析し、農村部・都市部、放し飼い・室内飼、散歩の状況等について評価した。現在のキツネにおける流行状況評価のための糞便内抗原検出法と虫卵検出法を比較するために、感染源対策を試みている道内の6町で行われた大規模な調査・検査結果について解析し、糞便内抗原検出法の有効性を示唆した。また、今後のための検査法の改善を試み、また、ワクチンの開発のための基礎データをcDNAライブラリーから発掘している。

1. 北海道における患者の発生状況と周辺地域のキツネの感染率の関連について

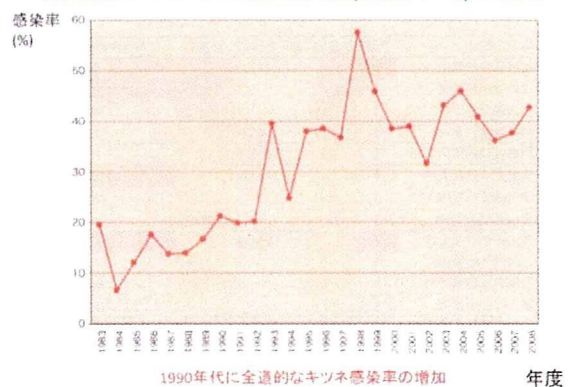
研究目的

北海道における患者の発生数は2009年末で累計576名が報告されているが、これには北海道外で診断された患者は含まれておらず、実際にはさらに少なくとも50名は多いと考えられる。このように600人以上の患者が北海道において感染したが、これらの感染のリスクについてはほとんどわかっていない。感染キツネが患者の周辺に生息し、これらの感染キツネが糞便とともに排泄した虫卵が患者の周辺の環境を汚染していたと予想されるが、これは科学的には証明されていない。キツネの感染状況と患者の発生との関連を知る必要があり、すでに報告されているデータからこの関係を解析することを目的とした。

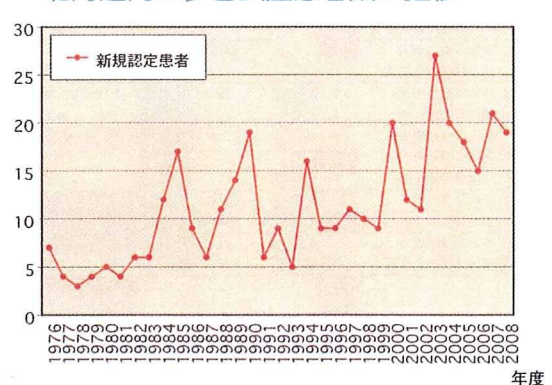
結果と考察

まず全道的なキツネの感染率と患者の発生数の推移から見た。北海道では、1984年頃まではキツネの感染率は10%で安定していた。その後1984年から1994年までキツネの感染率は急増し、それ以降は約40%の感染率とで推移している。これは、おそらく1970年代にエキノコックスの流行地が全北海道に拡大し、各地で定着したエキノコックスのキツネに

北海道のキツネの感染状況(全道平均)の推移



北海道内の多包虫症患者数の推移



おける感染率が、この1984-1994年の間に増加し、その後高度流行状態が維持されているものと考えられる。一方、患者の年間発生数は1980年から1994年まで変動が激しいがほぼ10名程度で横ばい状態であり、1994年以降増加傾向が見られる。患者発生地域については、1983年までほとんどの患者が道東へ集中していたが、過去10年の集計では、全道的に患者発生が見られ、人口当たりで見ると、道南が道東と同様に高い傾向が見られた。この様にエキノコックスの流行地の拡大とともに患者の分布域が拡大

区域	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999	累計
	21	21	22	19	18	25	18	9	13	21	8	
北海道												
札幌市保健所管内	5	7	7	8	8	8	4	1	2	8	3	61
江別保健所管内	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
千歳保健所管内	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3
稚内保健所管内	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
留萌保健所管内	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
岩見沢保健所管内	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
深川保健所管内	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
滝川保健所管内	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
旭川市保健所管内	2	0	3	2	0	0	2	0	2	0	0	11
上川保健所管内	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
富良野保健所管内	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
名寄保健所管内	0	0	0	1	2	0	1	0	1	1	0	6
小樽市保健所管内	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	3
岩内保健所管内	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
俱知安保健所管内	2	2	0	0	0	1	0	1	1	0	0	7
江差保健所管内	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
渡島保健所管内	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
八雲保健所管内	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
市立函館保健所管内	2	4	0	2	1	4	3	2	0	0	1	19
室蘭保健所管内	2	1	2	2	1	3	2	3	0	0	0	16
苫小牧保健所管内	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
浦河保健所管内	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
静内保健所管内	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	4
網走保健所管内	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
北見保健所管内	0	0	0	0	1	2	2	0	2	1	2	10
紋別保健所管内	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
帯広保健所管内	0	2	2	0	0	1	1	0	0	1	0	7
釧路保健所管内	3	0	2	1	3	1	1	0	1	5	2	19
根室保健所管内	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
中標津保健所管内	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1	0	5
保健所数	10	10	11	8	8	11	10	5	7	8	4	28

道央	支庁	保健所管内	患者	計患者	支庁別人口	計人口	キツネの感染率(%)
道央	石狩	札幌保健所管内	61		2321705		30
	石狩	江別保健所管内	1	65		232万	45 (サンプル数が少ない)
	石狩	千歳保健所管内	3				ND
道北	宗谷	稚内保健所管内	2		70675		24
	留萌	留萌保健所管内	2		57306		28
	室蘭	岩見沢保健所管内	0		344230		41
	室蘭	深川保健所管内	1				ND
	室蘭	滝川保健所管内	1	26		100万	ND
	上川	旭川市保健所管内	11		520476		46
	上川	上川保健所管内	1				ND
道南	上川	富良野保健所管内	2				ND
	上川	名寄保健所管内	6				14 (サンプル数が少ない)
	後志	小樽市保健所管内	3		237510		ND
	後志	岩内保健所管内	1				ND
	後志	俱知安保健所管内	7				50
	檜山	江差保健所管内	1		43975		ND
	渡島	渡島保健所管内	1	51	436739	114万	43
道東	渡島	八雲保健所管内	2				30
	渡島	市立函館保健所管内	19				ND
	釧路	室蘭保健所管内	16		421071		ND
	胆振	苫小牧保健所管内	1				32
	日高	浦河保健所管内	0		76912		19 (サンプル数が少ない)
	日高	静内保健所管内	4				ND
	網走	網走保健所管内	3		311017		30
道東	網走	北見保健所管内	10				ND
	網走	紋別保健所管内	2				ND
	十勝	帯広保健所管内	7	49	353923	100万	42
	釧路	釧路保健所管内	19		254757		44
	根室	根室保健所管内	3		82406		42
	根室	中標津保健所管内	5				ND
			10以上			45%以上	
			5以上			30%以上	

し、今後はさらに全道的に患者の発生率が上昇する事が予想されるが、長期間流行地であった道東の年間患者発生率が、10万当たり0.5程度であることから、全道的にこの程度の発生率となるかもしれない。すでに、キツネの感染率の高い道南は道東と同様の発生頻度になっていると考えられる。

患者の住所・居住時期等野情報はプライバシー保護により今回の解析には利用できず、届け出が出された保健所単位の解析であるが、キツネの感染率との比較では、患者数およびキツネの感染率の高さと相関があった地域、相関がなかった地域、逆の結果となった地域等様々であり、届け出が出された保健所単位での解析には限界があることが示唆された。特に、札幌市保健所は北大および札幌大を、また、旭川市は旭大を擁し、この様な大きな病院にはエキノコックス患者の届出件数が多くなることが予想され、届出の出された保健所と患者の居住地が異なることが考えられる。

まとめ

今回の解析では、キツネの感染率と患者の発生率の関連が明瞭に示すことが出来なかったが、患者の居住地とその期間だけでなく、各地域のキツネの個体数の推定も今後の課題と考えられる。

2 犬のエキノコックスの感染リスク

研究目的

人の感染源として重要と考えられる犬の感染状況を調べ、犬の感染機会を知ることを目的とした。

研究方法

犬のエキノコックスの診断は、前年まで一括して環境動物フォーラムにおいて EmA9 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA で行われきたが、昨年、簡易迅速診断キットであるインムノクロマト法「エキット」が販売開始となった。現在、犬の診断は ELISA 法とこのエキットの両方で行われている。2009 年は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 51 例を ELISA 法で検査した。これら両者はスクリーニング法と位置づけられ、確認検査のためには実験動物中央研究所において虫卵検査と DNA 検査が行われている。

1997 年から 2007 年までに環境動物フォーラムへ依頼された、犬 4768 頭の検査結果と、飼い主のアンケート結果についてまとめた。

結果と考察

2009 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からは、陽性例は発見されなかったが、エキットを用いて室内犬の感染例が発見され、担当獣医師から届け出が出された。この札幌市の例は、散歩時にリードから離れた時に感染したと推定された。

1997 年から 2007 年までのデータ集計からは、北海道で飼育されている 4,768 頭中 18 頭 (0.4%) が虫卵を排泄し、4,761 頭中 41 頭 (0.9%) が抗原陽性となった。18 例の虫卵の DNA を検査したところ、全例がエキノ

コックスと確認された。農村部から 1325 頭、都市部から 3290 頭の検査依頼があり、農村部の感染リスクは都市の 2.3 倍であった。18 例の多くが放し飼いであり、3 例のみ室内外であった。また、7 例の飼い主は犬が野ネズミに興味を示していたと答えている。室内犬 3 例の内、2 例は散歩中リードから放し、1 例はリードからは放していないと答えている。

まとめ

集計結果からは、当初から予想されていた農村部における犬の放し飼いは危険であることが確認された。また、最近報告されている室内飼犬の症例は散歩時の感染例が多い。都市でも周辺は飼犬にも感染機会があることが示された。

ほぼ犬については検査体制が整ったと考えられるが、エキットの利用頻度および ELISA 検査の依頼数は少なく、今後のこの体制の維持が課題である。今後さらに飼い主に対する啓蒙活動が必要であり、検査数を増やし、多数の感染例数を検出し、獣医師に対してさらにアピールする必要がある。

3 エキノコックスリスク管理のためのベイト散布の効果(小清水、俱知安、ニセコ、喜茂別、京極、蘭越、鹿追、札幌近郊)

研究目的

感染源対策法を確立するために様々な地域で駆虫薬入りベイト散布を試みている。

研究方法

駆虫薬入りベイト散布をすでに行っている道東の小清水、羊蹄山山麓の俱知安に加えて、今年ベイト散布開始した羊蹄山山麓のニセコ、喜茂別、蘭越、京極において採取されたキツネ糞便の ELISA および虫卵検査を実施した。なお、毎月のベイト散布は地元の住民により実施され、糞便採取も住民により行われた。さらに小規模散布の試みとして、鹿追の小規模養豚業者周辺のベイト散布を行った。

結果と考察

広範囲に5月から11月まで地域住民により毎月散布されている俱知安、京極、ニセコでは、ベイト散

散布している小清水における推移

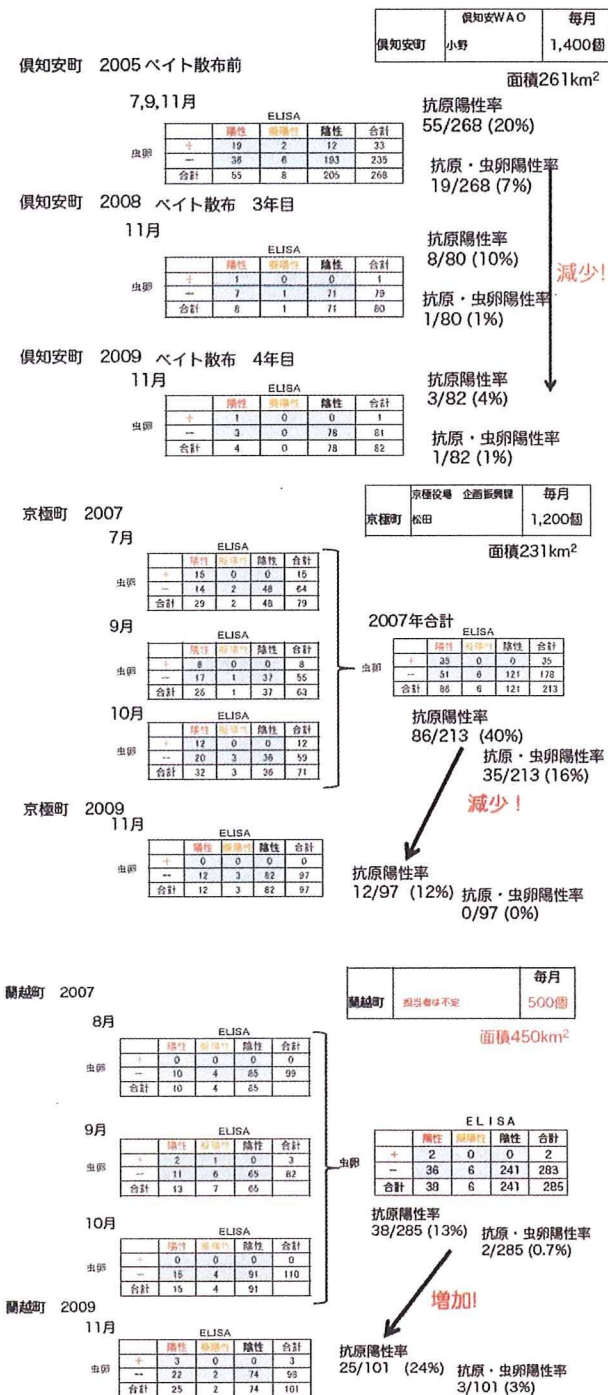
(キツネ糞便採取は7-8月)

ベイト散布1回 2,000個



布によるキツネのエキノコックス感染率低下効果が確

認された。蘭越町では反対に感染率の上昇が見られたが、これは散布したベイト数が少なかったことが原因と考えられる。小規模散布した鹿追では顕著な効果はなく、周辺地域からのキツネの移動による可能性も推察されたが、ベイト散布の継続効果を期待している。なお、小清水では虫卵陽性率は1%に減少しているが、2009年に抗原陽性率が上昇した。この





水色部分 約7000m²

2008年 11月 (ベイト散布前)

虫卵	ELISA			
	陽性	陰性	陽性	陰性
+	18	0	4	22
-	7	1	25	33
合計	25	1	29	55

抗原陽性率
25/55 (45%)
抗原・虫卵陽性率
18/55 (32%)

2009年

5月25日

虫卵	ELISA			
	陽性	陰性	陽性	陰性
+	3	0	1	4
-	6	0	21	29
合計	11	0	22	33

抗原陽性率
11/33 (33%)

1月以降 60個散布

8月1日

虫卵	ELISA			
	陽性	陰性	陽性	陰性
+	0	0	5	5
-	1	1	5	7
合計	1	1	5	7

抗原陽性率
1/7 (14%)

6月以降 100個散布

10月31日

虫卵	ELISA			
	陽性	陰性	陽性	陰性
+	3	0	0	3
-	1	0	14	15
合計	4	0	14	18

抗原陽性率
4/18 (22%)
抗原・虫卵陽性率
3/18 (16%)

効果が足りない!

小清水では2009年に採取された糞便数が急増し、キツネの個体数が増加が示唆され、ベイト散布の強化が必要と考えられた。この様なキツネ個体数の増加は有害鳥獣駆除数の全道的な増加からも示唆されている。

まとめ

羊蹄山麓5町での試みはほぼ成功したと考えられ、毎月のベイト散布個数は、100km²当たり、1000個が妥当と考えられた。キツネ個体数が増加し、散布領域が広い小清水町では、さらにベイト数を増やす必要が有ると考えられた。

4 リスク評価法の検討

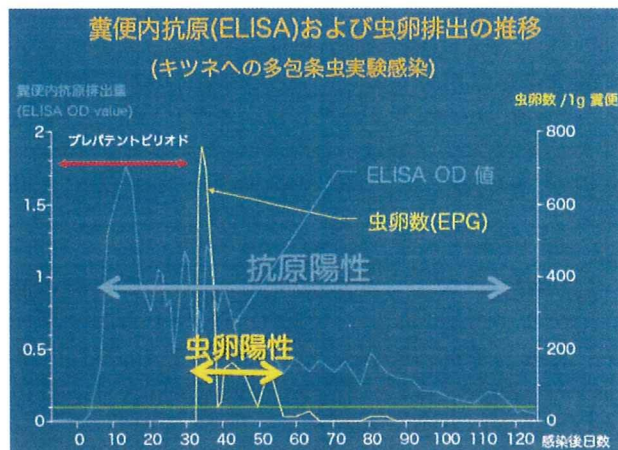
4-1 キツネのエキノコックス感染状況評価法としての虫卵検査と糞便内抗原検出法の比較

研究目的

現在まで集まった、データからキツネにおけるエキノコックス感染状況評価法を選択することを目的とした。

結果および考察

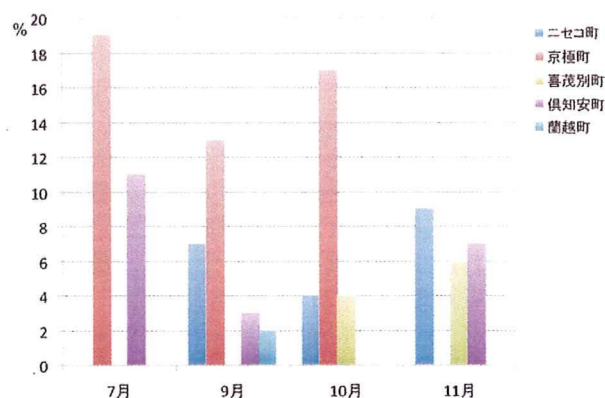
現在まで我々は、キツネの感染状況評価のために、抗原陽性かつ虫卵陽性の糞便の率を最も信頼できる評価法として用いてきたが、虫卵陽性となる期間は感染期間の一部のみであることから、抗原陽性例について今までの結果を再検討した。駆虫薬入りベイト散布を開始した1998年の小清水では虫卵陽性糞便が全く採取できない時期でも、抗原陽性の



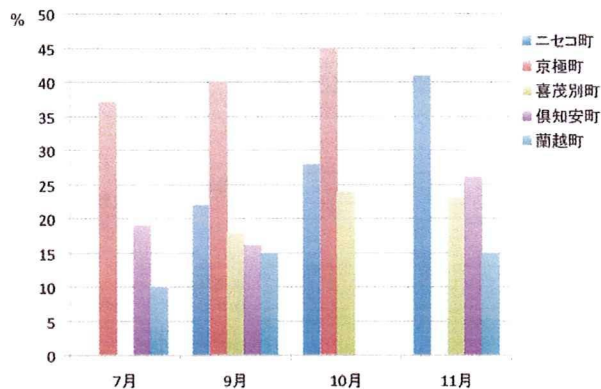
糞便の割合が20%もあったため、これらは偽陽性反応の可能性が高いと考えた。しかし、ベイト散布を継続するにつれて、これらの抗原陽性反応はほとんどなくなり、0となった年もあった。したかつて、偽陽性反応と考えたのは間違いであったことが示唆された。

今回は羊蹄山麓での事前評価年における結果を集計したところ、以下のような結果が得られた。虫卵陽性率は短期間で大きく変動し、一定しないことが示された。これは、実験感染犬およびキツネの結

抗原・虫卵陽性率の月間変動(ベイト散布前)



抗原陽性率の月間変動(ベイト散布前)



果(糞便内虫卵数は急激に変動する)からも容易に想像できることであった。一方、抗原陽性率は7月か

ら12月にかけての緩やかな上昇を示唆しており、これは多包条虫の疫学の数学モデルとも合致している。まとめ

以上のことからキツネのエキノコックス感染状況評価にELISA法による糞便抗原検出法が有用であることが示唆された。

4-2 Reverse Line Blot による *Taenia* 属および *Echinococcus* 属の同時複数種鑑別法の開発

研究目的
終宿主(キツネ・犬など)のエキノコックスの確認検査で用いるDNA検査のために、エキノコックスを含むテニア科虫卵の同時複数種同定を行うためのReverse Line Blotを確立を目指し、今回はその基礎としてDot Blotを試みた。

方法

Reverse Line Blot法は全テニア科条虫に共通のプライマーでPCRを行い、この増副産物を多種の種特異的プローブと反応させ、一度に複数種を鑑別できる方法である。我々は様々な *Taenia* 属および *Echinococcus* 属の虫体由来DNAを用い、各種の特異的プローブを考案し、Dot Blotを行った。

結果

それぞれの種に対して考案した特異的なプローブが、実際に種特異的であることが確認され、これらがDot blotで利用可能であることを確認した。一部、予備的にReverse Line Blotを実施したところ、良好な成績を得ている。今後は虫卵を用いた確認を行う予定である。

4-3 キツネ糞便への「エキット」適用のための改善

研究目的
コントロール効果確認のためにはキツネの糞便の野外採取とその検査が重要であり、今後キツネ糞便への「エキット」による糞便内抗原検査の応用が必要と考えられる。しかし、「エキット」は犬の糞便に最適化されており、現在キツネの糞便について検討している。

研究方法および結果

まず、キツネの糞便性状との違いが顕著であること(一般に乾燥し、果実や昆虫などの大型の固形分が多い)、さらに、偽陽性反応や偽陰性反応が多いことが判明した。これを改善するために、2009年度は「エキット」の糞便希釈液およびその添加物などを検討し、最終的に、0.2 M リン酸緩衝液 (NaCl 0.87%、BSA 2.5%、アミノ酸 5%、ホルマリン 1% 添加、pH6.4) が最もよい結果を示した。しかし、迅速性について問題が残り、現在これらについて検討中である。乾燥糞便に対してもこの希釈液を滴下することにより、エキット専用の糞便採取容器を用いた糞便採取が可能となったが、この容器を用いると偽陽性反応や偽陰性反応が多くなった。

まとめ

キツネ糞便への「エキット」適用のために改善を試み、特異度と感度がほぼ同等となったが、迅速性

が失われる結果となり、今後のさらなる改善が必要と考えられた。

Frequently found cDNAs in larvae	Adult Larva	Total	
EmAgB8/1 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	0	431	431
EmAgB8/2 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	0	85	85
EmAgB8/3-2 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	0	78	79
EmAgB8/4 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	0	42	42
Antigen EG19 [<i>Echinococcus granulosus</i>] Cysticercus cellulosae-specific antigenic polypeptide [<i>Taenia solium</i>]	0	39	39
EmAgB8/3-1 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	32	38	70
Tetraspanin TSP8	0	28	28
Antigenic protein EpC1 (epC1) [<i>Echinococcus multilocularis</i>] calcium-binding protein	5	22	27
Tetraspanin TSP5 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	6	22	28
Antigen Ts5 protein [<i>Taenia solium</i>], Ribosomal Protein L5 [<i>Homo sapiens</i>]	1	19	20
Tetraspanin TSP6 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	11	17	28
Antigen II/3, Radoxin, Moesin, Ezrin, Band 4.1-like protein, tegument protein, FERM domain [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	27	14	41
Antigen Ts6 protein [<i>Taenia solium</i>], Ribosomal Protein S3a [<i>Taenia asiatica</i>]	2	14	16
Tetraspanin TSP4 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	1	14	15
Antigen Ts3 protein [<i>Taenia solium</i>], Ribosomal Protein L18a	3	12	15
Calcium-binding protein (ANTIGEN SM20) [<i>Schistosoma japonicum</i>]	1	9	10
Antigen, calcium-binding Protein [<i>Taenia asiatica</i>] tegumental calcium-binding EF-hand Protein [<i>Fasciola gigantica</i>]	0	8	8

5 リスク管理法の基礎的研究

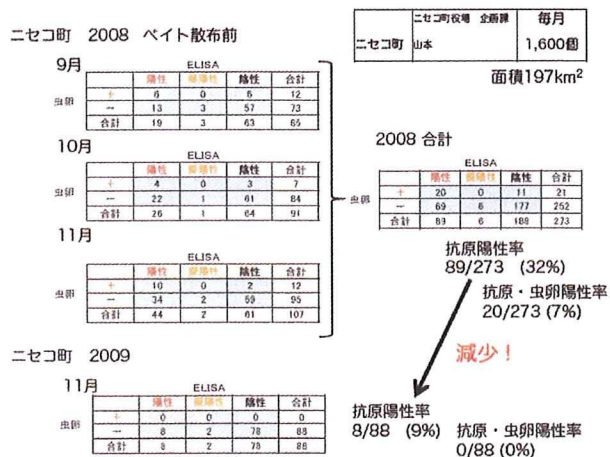
cDNA ライブラリーからのワクチン標的抗原およ

Frequently found cDNAs in adults	Adult Larva	Total	
Ag5 precursor [<i>Echinococcus granulosus</i>] trypsin-2	80	7	87
Antigen TSES33 [<i>Taenia solium</i>], Diagnostic antigen GP50b precursor [<i>Taenia solium</i>] 1	60	0	60
Antigen TSES38 [<i>Taenia solium</i>] 2 lysosome, Diagnostic Antigen GP50 [<i>Taenia solium</i>]	42	0	42
EmAgB8/3-1	32	38	70
Antigen II/3, Radoxin, Moesin, Ezrin, Band 4.1-like protein, tegument protein, FERM domain [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	27	14	41
Tetraspanin TSP1 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	26	8	34
Antigen TSES38 [<i>Taenia solium</i>] 1	21	1	22
M123 [<i>Echinococcus granulosus</i>] cytoplasm	16	0	16
M9 [<i>Echinococcus granulosus</i>] cytoplasm	16	0	16
Tetraspanin TSP6 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	11	17	28
M4 [<i>Echinococcus granulosus</i>] cytoplasm	9	0	9
Antigen TSES33 [<i>Taenia solium</i>] 2	7	0	7
Antigen Ts4 protein [<i>Taenia solium</i>], BAX inhibitor (BI)-1 like	6	6	12
Antigen TSES38 [<i>Taenia solium</i>] 1-2 outside lysosome	6	0	6
Tetraspanin TSP5 [<i>Echinococcus multilocularis</i>]	6	22	28
Antigen TSES33 [<i>Taenia solium</i>] 5	5	0	5
Antigenic protein EpC1 (epC1) [<i>Echinococcus multilocularis</i>] calcium-binding protein	5	22	27

び診断用抗原の選定

研究目的

現在我々は感染源対策として駆虫薬入りのベイトを用いているが、これらの駆虫効果は短期間のみで、頻回(毎月)の散布が必要で有る。ワクチンを開発できれば散布回数をかなり減少させることが可能とな



るので、ワクチン開発が期待される。

研究方法

我々の網羅的な cDNA ライブラリーから、AntigenB が主要な抗原であることが示唆され、感染動物および患者の抗体を刺激することは知られているが、免疫抑制効果があり、防御抗原としては適さないと考えた。中間宿主に対するワクチン候補としてテトラスパニン類について調べたところ、中間宿主レベルでは防御効果があることが示唆された。現在経粘膜ワクチンの開発を試みている。多包条虫だけでなく単包条虫についても成虫に対するワクチン開発が世界的に注目されているが、成虫の cDNA ライブラリーからは様々な成虫特異的な蛋白や糖蛋白が発見されている。前述の EmA9 の認識する糖蛋白の抗原解析も進展すると思われる。この糖蛋白は、o-glycosylation が主要であることが最近判明した。この特徴からは Antigen TSE33 の一部と予想される。今後確認する必要がある。

まとめ

様々な抗原が我々の成虫および幼虫の cDNA ライブラリーから発見された。テトラスパニンは中間宿主に対する効果が確認されたが、今後は終宿主への応用が必要である。

研究発表

論文発表

- 1) Hülsmeyer AJ, Deplazes P, Naem S, Nonaka N, Hennet T, Köhler P. 2010 An *Echinococcus multilocularis* coproantigen is a surface glycoprotein with unique O-glycosylation. *Glycobiology*. 20(1):127-35.
- 2) Dang Z, Yagi K, Oku Y, Kouguchi H, Kajino K, Watanabe J, Matsumoto J, Nakao R, Wakaguri H,

- Toyoda A, Sugimoto C. 2009. Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis. *Vaccine*. 27(52):7339-45.
- 3) Kouguchi H, Matsumoto J, Katoh Y, Suzuki T, Oku Y, Yagi K. 2009. *Echinococcus multilocularis*: Two-dimensional Western blotting method for the identification and expression analysis of immunogenic proteins in infected dogs. *Exp Parasitol*. 124(2):238-43.
- 4) Nonaka N, Sano T, Inoue T, Teresa Armua M, Fukui D, Katakura K, Oku Y. 2009. Multiplex PCR system for identifying the carnivore origins of faeces for an epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. *Parasitol Res*. 106(1):75-83
- 5) Dang Z, Watanabe J, Kajino K, Oku Y, Matsumoto J, Yagi K, Kouguchi H, Sugimoto C. 2009 Molecular cloning and characterization of a T24-like protein in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol*. 168:117-119.
- 6) Lagapa JT, Oku Y, Kaneko M, Ganzorig S, Ono T, Nonaka N, Kobayashi F, Kamiya M. 2009 Monitoring of environmental contamination by *Echinococcus multilocularis* in an urban fringe forest park in Hokkaido, Japan. *Environ Health Prev Med*; 14(5):299-303.
- 7) Nonaka N, Kamiya M, Oku Y. 2009 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*;71(1):105-1077.
- 8) Nonaka N, Kamiya M, Kobayashi F, Ganzorig S, Ando S, Yagi K, Iwaki T, Inoue T, Oku Y. 2009 *Echinococcus multilocularis* infection in pet dogs in Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 9(2):201-206.

学会および講演

- 1) Oku, Y., Armua-Fernandez M. T., Yagi, K., Hara, Y., Watanabe, H., Li. S., Yamashita, R., Wakaguri, H., Suzuki, Y., Toyoda, A., Watanabe, J., Kamiya, M. *In silico* analyses of full-length rich cDNA libraries of larval and adult *Echinococcus multilocularis* (Preliminary results). Workshop on "Recent advances in the biology and biochemistry of Echinococcus infections", in the context of the XXIII World Congress of Hydatidosis. Uruguay, 2009, Dec., 9-11
- 2) Mizukami, C., Spiliotis M., Gottstein, B.,

Katakura, K., Oku, Y. RNA interference (RNAi) methods for protozoa and primary cells of *Echinococcus multilocularis*. The XXIII World Congress of Hydatidosis. Uruguay, 2009, Dec., 9-11

3) Mochida, R., Hayashi, O., Kajiyama, H., Sato, M., Suzuki, H., Hayashimoto, N., Takakura, A., Ganzorig, S., Kobayashi, F., Nonaka, N., Oku, Y., Kamiya, M. Rapid detection of *Echinococcus multilocularis* Coproantigen by Lateral-Flow Immunoassay. The XXIII World Congress of Hydatidosis. Uruguay, 2009, Dec., 9-11

4) Armua-Fernandez, M. T., Nonaka, N., Sakurai, T., Gosttstein, B., Deplazes, P., Katakura, K., Oku, Y. DNA dot blot assay for the differentiation of Taeniid cestodes in canids. The XXIII World Congress of Hydatidosis. Uruguay, 2009, Dec., 9-11

5) 奥祐三郎、八木欣平、原雄一郎、渡辺日出海、李爽、山下理宇、若栗浩幸、鈴木穰、豊田敦、渡辺純一 幼虫および成虫の多包条虫 cDNA ライブラリーに多く見られた cDNA の *in silico* 解析、特に AntigenB と LSU rRNA について 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009 年 10 月 3 日帯広畜産大学

6) 入江隆夫 1 林臣菜 2 持田立子) 片倉 賢 1 奥祐三郎 エキノコックス症迅速診断キット「エキット」のキツネ糞便への適用 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009 年 10 月 3 日帯広畜産大学

7) Armua-Fernandez, M. T., Nonaka, N., Sakurai, T., Katakura, K., Oku, Y. Discrimination of taeniid cestodes in canids by using species-specific oligonucleotide probes 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009 年 10 月 3 日帯広畜産大学

8) 奥祐三郎、八木欣平、原雄一郎、渡辺日出海、李爽、山下理宇、若栗浩幸、鈴木穰、豊田敦、渡辺純一 多包条虫(幼虫・成虫)の cDNA ライブラリーの *in silico* 解析 特に Spliced Leader を有する遺伝子について 第 148 回日本獣医学会学出集会 鳥取市 2009 年 9 月 25-27 日

9) Armua-Fernandez, M. T., Nonaka, N., Sakurai, T., Gosttstein, B., Deplazes, P., Katakura, K., Oku, Y. Identification and differentiation of canine taeniid cestodes by using species-specific oligonucleotide probes 第 148 回日本獣医学会学出集会 鳥取市 2009 年 9 月 25-27 日

10) 奥祐三郎 人と動物の共通感染症: エキノコックス症の問題解決に向けて(特別講演) 第 32 回 日本骨・関節感染症学会 2009 年 6 月 19 日 札幌

知的所有権の出願・登録
なし

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「動物由来感染症のリスク分析手法等に基づくリスク管理のあり方に関する研究」班
分担研究報告書

1 3. 食品・水系感染を介する蠕虫類の疫学研究

研究分担者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
同	川上 泰	麻布大学生命・環境科学部
同	梅原梓里	麻布大学生命・環境科学部
同	平 健介	麻布大学獣医学部
同	吉川 亮	長崎県環境保健研究センター研究部保健科
同	伊藤 誠	愛知医科大学医学部
同	銭 宝珍	中国・浙江医学科学院生物行程研究所
同	A. ラングシルジ	タイ王国・シーナカリンウイロート大学理学部
同	T.S. シン	インド・シッキムマニパール医科大学微生物学部

研究要旨：吸虫，条虫，線虫という多様な動物種から構成される蠕虫は，水系・食品を介した感染経路をもって，動物だけではなく人を宿主に寄生し，思いがけない病害を宿主に与えることがある。このような寄生蠕虫の例として肺吸虫とアニサキスを取り上げ，これら寄生蠕虫の感染リスクに関連した検討を行った。まず肺吸虫については，感染源に適用すべきリスク除去の条件を検討した。また輸入症例の発生リスクも危惧されることから，海外流行地の研究協力者に要請して人体症例由来の肺吸虫材料を入手し，病原種の同定と遺伝的解析に取り組んだ。アニサキスに関しては，本症のリスク要因が同胞種解析により特定できるかを検討した。

1. 肺吸虫症に関する研究

1-1. 肺吸虫の感染リスクを除去するための条件検討

A. 研究目的

我が国に長期在住するアジア系の外国人（タイ人・中国人など）が，淡水産・汽水産のカニを食材に出身地固有の料理を作り，加熱なしで賞味して肺吸虫に感染するという事例が，続け

て報告されてきた。飲食を共にした日本人も感染しており，食習慣に起因する新たな肺吸虫症として，注意の必要が出てきた。これらの事例の中には，市販の食用サワガニが原因となった事例を認めた。そして市販のサワガニについて実際に検査が行われたところ，検体の約 20%が人体感染性肺吸虫（ウエステルマンと宮崎の両

種)に汚染されていることが証明された。このような状況下で肺吸虫症の発生を防ぎ、出身地固有の料理を楽しむ方法としては、加熱によるサワガニの前処理が有効と思われた。そこで、ウェステルマン肺吸虫陽性のサワガニを用いて、メタセルカリアの温度感受性(抵抗性)を調べ、肺吸虫の感染予防に資する条件を検討した。

B. 研究方法

ウェステルマン肺吸虫陽性のサワガニは、三重県伊賀市の本虫流行地で採集した。カニを研究室に持ち帰り、活発に運動するカニ(20匹)を選んでポリエチレン製のネットに入れ、ウォーターバスに満たした水道水(55℃)に浸漬して加熱処理した。処理後は、ネットごとカニを氷水(0℃)に浸漬して急速に冷却した。そして、ネットから取り出したカニを解剖用はさみで細切り、多量の水道水で洗浄、洗浄水を静置した後、実体顕微鏡下に沈渣を精査して、メタセルカリアを分離・回収した。得られたメタセルカリアは2群に分け、マウス(ddY系, 雄, 各群5頭)への感染試験と形態観察に用いた。試験マウスは感染後19-28日に剖検し、体腔・全身の骨格筋・横隔膜・肝・肺から虫体の回収を試みた。未処理サワガニからもメタセルカリアを分離して、同様の検討を行った。

C. 研究結果

1. マウスへの感染試験

I. 加熱サワガニ由来メタセルカリアのマウスへの感染試験

虫体は全く検出されなかった(表1)。

表1. 処理サワガニ由来メタセルカリアを用いたマウスへの感染試験

群	サワガニ処理		回収虫体数 (1頭平均)			回収率 (%)
	温度 (℃)	時間 (分)	体腔	筋	合計	
1	55	10	0	0	0	0
2	NT	NT	1	4.8	5.8	58

NT: 未処理

II. 未処理サワガニ由来メタセルカリアのマウスへの感染試験

いずれのマウスからも虫体が回収された(表1)。回収数はマウス1頭あたり平均5.8虫体(マウス1頭あたり5-8虫体)であった。回収数を臓器・組織別に見ると、骨格筋が最も多く、マウス1頭あたり平均4.8虫体(マウス1頭あたり4-7虫体)、次いで体腔から平均1虫体(マウス1頭あたり0-2虫体)が回収された。横隔膜・肝・肺は陰性であった。

2. 形態所見

I. 未処理メタセルカリア(正常メタセルカリア)の形態

メタセルカリアはほぼ球形を呈し、やや厚い内嚢内に、虫体が体を縮めた形で包囊されていた。嚢内の幼虫は、体全体を回転させる、あるいは体肉の一部を波動させる、など活発に運動した。幼虫は、体の中央部にI字状に伸びる排泄嚢を有した。排泄嚢は排泄顆粒を充満し、光を透過せずに黒色を呈した。排泄嚢の両側には、数度にわたり蛇行しながら進展する腸管を明瞭に認めた。

II. 加熱処理サワガニ由来メタセルカリアの形態

一部のメタセルカリアは既に脱嚢し、内嚢を認めなかった。被嚢していたメタセルカリアでも、ほぼ全てで内嚢の壁に欠損(穴の形成)を認めた。更にこの欠損部から虫体の一部分(あるいは大部分)を、嚢外に脱出させたものもあった。幼虫は被嚢の状態にかかわらず、いずれも運動性を欠いていた。排泄嚢は、膨化して容積を増大したものと、逆に収縮して容積を減じたものの両者を認めた。腸管は、多くの虫体で崩壊し、構造が良く観察できなかった。以上のように幼虫の変性・崩壊は顕著で、形態学的には総て死滅していると判定した。感染性も消失していると判定された。

D. 考察

肺吸虫の感染源となるカニを加熱すれば、そ

の体内に寄生するメタセルカリアが感染能力を消失することは、ウェステルマン肺吸虫（3倍体型）陽性のモクズガニを用いた検討で、既に明らかにされている。すなわち、安藤（1915）は55℃で10分間、下野ら（1957）および津田（1959）は55℃で20分間、モクズガニを加熱すれば、カニ体内のメタセルカリアは運動性を消失し、形態学的にも死滅したとの判定が可能と報告した。しかし肺吸虫の感染源として、モクズガニと同様に重要なサワガニでは、検討が行われてこなかった。そこで我々は、この条件、特に55℃で10分間の加熱処理をサワガニに施し、その体内に寄生するメタセルカリアの温度感受性（抵抗性）について検討した。その結果、この条件でメタセルカリア内の幼虫は運動性を完全に消失した。しかも変性・崩壊が顕著で、総てが死滅したと判断された。マウスを用いた感染試験でも、加熱処理メタセルカリアを投与したマウスからは、虫体は全く回収されず、形態所見に基づく判定結果が正しいことを確認した。以上の結果から、サワガニを55℃で10分間加熱すれば、処理した陽性サワガニを喫食しても、ウェステルマン肺吸虫には感染しないとの結論が得られた。

中川（1917）は、モクズガニを55℃で5分間処理すれば、カニ体内のウェステルマン肺吸虫（3倍体型）メタセルカリアは死滅すると報告している。しかし彼は同一の論文で、カニ体内より分離したメタセルカリアを死滅させるには、55℃で10分間の加熱処理が必要と記述している。分離メタセルカリアよりも、カニ体内のメタセルカリアの方が短い時間で死滅するとの彼の報告には、疑問が持たれた。

我々が対象とするサワガニは、モクズガニに比べて体格が随分と小さい。そこで、サワガニに関して更に検討し、例えば上の55℃で5分間という短い加熱処理でも、肺吸虫の感染予防に有効なのか、検討して結論を出す必要があると思われた。更に加熱以外の前処理、例えば冷凍処理などについても、肺吸虫の感染予防に有効なのか、検討したいと考えている。

E. 結論

食用として販売されているサワガニは、人体感染性肺吸虫が多数寄生して非常に危険であるが、サワガニを加熱（55℃で10分間）して摂食すれば、ウェステルマン肺吸虫の感染は予防できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Sugiyama, H.**, Umehara, A., Morishima, Y., Yamasaki, H. and Kawanaka, M. Detection of *Paragonimus metacercariae* in Japanese freshwater crabs, *Geothelphusa dehaani*, bought at retail fish markets in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases 62: 324-325, 2009.

2. 学会発表

1. **杉山 広**, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩. 食品媒介寄生蠕虫症：アニサキス症・肺吸虫症を例として. 第30回衛生微生物技術協議会総会・研究会, 堺, 2009年7月.
2. **杉山 広**. 食習慣を背景に発生する我が国の肺吸虫症. 第20回日本臨床寄生虫学会, 吹田, 2009年6月.

1-2. インドにおける肺吸虫感染のリスク要因の決定：人体寄生種の同定

A. 研究目的

上述のように、我が国に長期在住するアジア系の外国人が、淡水産・汽水産のカニを食材に出身地固有の料理を作り、加熱なしで賞味して肺吸虫に感染するという事例が、続けて報告されている。感染者の出身を調べると、韓国、中国、タイなど、我が国との交流が深い東アジア・東南アジアの国からの者が多い。一方で南アジ

アの大国であるインドは、近年の IT 産業の国際化に伴い、我が国においても在留者数が急増している。インドには肺吸虫が分布し、肺吸虫症患者も発生している。このため、インド人の食習慣に関連した肺吸虫症が、我が国で発生する事態も危惧される。我々は既に、インドからの肺吸虫材料として、中間宿主カニ由来のメタセルカリアを入手し、形態観察と塩基配列の解読から、これらはヒロクチ肺吸虫とスクリアビン肺吸虫の 2 種であることを明らかにした。この 2 種類の肺吸虫は、人体寄生種としての報告がある。その後、現地の共同研究者から、患者由来の肺吸虫卵が提供された。これを用いて、インドにおける人体感染種の同定を試みた。

B. 研究方法

インド東北部のマニプール州とナガランド州において、患者の喀痰から肺吸虫卵が検出された。現地の共同研究者から、アルコール固定された虫卵の提供を受けたので、形態観察と塩基配列の解読・解析を行い、人体肺吸虫症の原因種を同定した。

C. 研究結果

1. マニプール州の患者由来虫卵に関する検討

I. 虫卵の形態

虫卵 (35 個を観察・計測) は黄金色で卵形を呈し、縦径は 89–100 μm (平均 92 μm)、横径は 47–58 μm (平均 50 μm) であった。無蓋端部における卵殻の肥厚は、認めたものが 13 個 (37%)、認めないものは 22 個 (63%) であった。卵殻における最大幅部の位置は、中央部が 28 個 (80%)、蓋端側が 6 個 (17%)、無蓋端側が 1 個 (3%) であった。このような虫卵の形態学的特徴は、既報のヒロクチ肺吸虫 *Paragonimus heterotremus* (タイ産) の所見と良く一致した。

II. 虫卵を出発材料とした配列の解読・解析

虫卵 1 個ずつから DNA を抽出し、リボソーム DNA の ITS2 領域を標的に PCR を試みたところ、いずれの DNA 試料からも、予想サイズのバンド (約 520 bp) が増幅された。配列を解読して検

索したところ、複数の患者に由来する複数の虫卵由来の配列は、相互に完全に一致した。この配列は、メタセルカリアを出発材料に解読・登録した同地方産ヒロクチ肺吸虫の配列 (アクセッション番号: AB308377) とも、完全に一致した。この結果から、患者由来の虫卵をヒロクチ肺吸虫と同定した。今回得た虫卵由来の配列は、インド・マニプール州のヒロクチ肺吸虫に関する情報として登録し、アクセッション番号: AB308378 を得た。

この配列情報を用いて近隣結合法および最節約法により、系統関係に関する検討を行った。その結果、タイ・中国・インド (マニプール州) のヒロクチ肺吸虫は一つのクレードを構成するが、インド産はタイ産・中国産との間に、種内多型を反映する相違を持つことが確認された。

2. ナガランド州の患者由来虫卵に関する検討

形態学的特徴および塩基配列に関する所見は、マニプール州の患者由来の虫卵を出発材料とした成績と一致した。虫卵由来の塩基配列を、インド・ナガランド州のヒロクチ肺吸虫に関する情報として登録し、アクセッション番号: AB466558 を得た。

D. 考察

インドの肺吸虫としては、まずウェステルマン肺吸虫 *P. westermani* が良く知られている。本虫は、オランダ・アムステルダム動物園で死亡したベンガルタイガー由来の虫体に対して、今から約 130 年前に命名された (Kerbert, 1878)。インドでは、それ以前に *P. compactus* が記載され (Cobbolt, 1859)、その後には *P. edwardsi* が報告された (Gulati, 1926)。しかしながら、これらは無視され、もっぱらウェステルマン肺吸虫が人獣に寄生し病害を与えていると考えられてきた。一方で我々は、インド東北部のマニプール州に分布する肺吸虫をメタセルカリアについて検索し、これらはウェステルマン肺吸虫ではなく、スクリアビン肺吸虫とヒロクチ肺吸虫の 2 種類であることを確認・報告した (Singh et al., 2006; 2007)。今回の検討により、このうちのヒロクチ肺吸虫が

人体寄生種として、マニプール州だけではなく隣接のナガランド州でも、人に対して病害を与えている事実が明らかとなった。

ヒロクチ肺吸虫は、中国南部から東南アジアを経て、インド北東部（マニプール州・ナガランド州）にまで分布した。特にタイでは分布する8種の肺吸虫のうち、唯一の人体寄生種として重要視されている。今後は、本虫による肺吸虫症の病態を明らかにすると共に、インドにおける肺吸虫症の侵淫状況を明かにしたいと考えている。

E. 結論

インド東北部のマニプール州とナガランド州において、肺吸虫症の原因虫種がヒロクチ肺吸虫であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Singh, S.T., **Sugiyama, H.**, Umehara, A., Hiese, S. and Khato, K. *Paragonimus heterotremus* infection in Nagaland: a new focus of paragonimiasis in India. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27: 123-127, 2009.

2. 学会発表

1. **Sugiyama, H.** and Rangsiruji, A. How many kinds of *Paragonimus westermani* are there? The 6th seminar on food- and water-borne parasitic zoonoses, Bangkok, December, 2009.
2. Singh, S.T., Devi, Kh.R. and **Sugiyama, H.** Paragonimiasis haemoptysis in children on the Indian Subcontinent. The 6th seminar on food- and water-borne

parasitic zoonoses, Bangkok, December, 2009

3. Singh, S.T., **Sugiyama, H.**, Rangsiruji, A., Devi, Kh.R. and Singh, L.D. Experimental infection of laboratory animals with *Paragonimus heterotremus* metacercariae occurring in Manipur, India. Joint International Tropical Medicine Meeting 2009, Bangkok, December 2009.

2. アニサキス症に関する研究

2-1. 同胞種解析に基づくアニサキスの人体感染リスク特定の試み

A. 研究目的

我が国では魚介類の生食に起因して、年間に2,000例以上のアニサキス症例が発生している。本症の主要な病原虫は *Anisakis simplex* であるが、本虫はアイソザイムや塩基配列の解析結果に基づき、*A. simplex sensu stricto* (*s. str.*, = 狭義の *A. simplex*), *A. pegreffii*, *A. simplex C* の3種類の同胞種に分類することが、国際的にも一般的となってきた。そこで我が国の人体症例由来の虫体について、同胞種レベルで解析したところ、*A. simplex C* は全く認めず、また *A. pegreffii* は極めて少なく、殆ど総てが *A. simplex s. str.* であることが分かった。一方、魚介類由来の主な虫体は、北海道では *A. simplex s. str.*、九州では *A. pegreffii* であった。また本州では、両種が魚に混合寄生していた（魚からも *A. simplex C* は陰性）。この知見から、九州では地元産の魚ではなく、他所から搬入された魚を原因としてアニサキス (*A. simplex s. str.*) に人が感染すると考えられた。しかしながら、*A. pegreffii* による人体症例が極めて少ない理由は、明らかでなかった。そこで、福岡、千葉、新潟のサバを対象に、内臓および筋肉を検索して、同胞種間で虫体の検出部位に差

異があることを明らかにし、人体症例由来の虫体が専ら *A. simplex* s. str. である理由について考察した。

B. 研究方法

検索対象のサバは、東シナ海で漁獲され福岡で水揚げされた 7 尾、太平洋で漁獲され千葉で水揚げされた 6 尾、日本海で漁獲され新潟で水揚げされた 16 尾で、各々地元の鮮魚店から購入・入手した。これらのサバは研究室に搬入後、速やかに 3 枚に下ろし、頭部、尾部、背骨を除き、内臓と筋肉に分けた。先ず目視で内臓・筋肉の表面に寄生する虫体を回収した。その後、内臓・筋肉を適切な大きさ・厚さに細切し、2 枚のガラス板で圧平して、実体顕微鏡下に虫体を探した。検出虫体は、光学顕微鏡下に胃の形態・尾突起の有無を観察して *Anisakis* I 型と確認し、更に常法に従って個体別に DNA を抽出した。そして、リボソーム DNA・ITS 領域およびミトコンドリア DNA・*cox1* 遺伝子を対象とした PCR-RFLP を行い、同胞種レベルで種同定を試みた。

C. 研究結果

福岡産のサバ 7 尾（総て *Anisakis* 虫体陽性）からは 872 匹の *Anisakis* I 型幼虫を得た。同胞種レベルでの検討の結果、870 匹は *A. pegreffii*, 2 匹が *A. simplex* s. str. と同定された。千葉産のサバ 6 尾（総て *Anisakis* 虫体陽性）からは 76 匹の *Anisakis* I 型幼虫を得た。検討の結果、67 匹は *A. simplex* s. str., 9 匹が *A. pegreffii* と同定された。新潟産のサバ 11 尾（検索は 16 尾）からは 32 匹の *Anisakis* I 型幼虫を得た。検討の結果、16 匹は *A. simplex* s. str., 16 匹が *A. pegreffii* と同定された。

虫種別に虫体の検出部位を見ると、*A. simplex* s. str. と同定された 85 匹は、20 匹 (24%) が筋肉から、また 65 匹 (76%) が内臓から検出された。*A. pegreffii* と同定された 895 匹は、総て内臓から検出された (表 2)。

表 2. サバにおける *Anisakis* の検出部位

サバの由来	As			Ap		
	内臓	筋肉	計	内臓	筋肉	計
福岡	2	0	2	870	0	870
新潟	13	3	16	16	0	16
千葉	50	17	67	9	0	9
合計	65	20	85	895	0	895

As: *A. simplex* s. str.

Ap: *A. pegreffii*

D. 考察

本検討の結果、可食部の筋肉から検出される *Anisakis* は、専ら *A. simplex* s. str. であることが分かった。*A. pegreffii* は筋肉からは全く検出されなかった。すなわち、魚からの主要検出部位が同胞種間で異なることを原因として、人体感染の原因虫が専ら *A. simplex* s. str. となっていると考えられた。同様の知見は、鈴木ら (2010) も示している。彼らは更に、*A. simplex* s. str. に比べて極めて少数の *A. pegreffii* が、サバの筋肉から検出されたことも報告している。この知見は、*A. pegreffii* による人体症例が稀に見付かる事実と矛盾しない。

以上のように、同胞種レベルでの種同定は、*Anisakis* 感染の原因となるリスク種の特異性やその理由の推察に有用であった。このような情報を適切に活用すれば、*Anisakis* 症の発生予防に有効な啓発活動が展開できるものと期待された。

E. 結論

福岡、新潟、千葉のサバを検索したところ、可食部位である魚の筋肉からは *A. simplex sensu stricto* が検出された。筋肉を好寄生部位とすることで、本虫を原因とした *Anisakis* 症が発生していると考えられた。*A. pegreffii* は *Anisakis* 症の原因虫としての余り重要でないが、その理由は、主要検出部位が内臓に限られるからと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 梅原 梓里, 荒木 潤, 川上 泰, 内田 明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析: 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. 獣医寄生虫学会誌, 8:52, 2009.

2. 学会発表

1. 杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩. 食品媒介寄生蠕虫症: アニサキス症・肺吸虫症を例として. 第30回衛生微生物技術協議会総会・研究会, 堺, 2009年7月.
2. 梅原 梓里, 荒木 潤, 川上 泰 3 内田 明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析: 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. 第147回日本獣医学会学術集会, 宇都宮, 2009年4月.
3. 梅原 梓里, 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 荒木 潤, 川上 泰, 黄 鴻堅, 内田明彦. 台湾でタチウオから検出されたアニサキス幼虫の分子同定. 第78回日本寄生虫学会大会, 東京, 2009年3月.
4. 杉山 広. アニサキス症をはじめとする食品媒介寄生蠕虫症について. 平成20年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2009年2月.

平成 21 年厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「動物由来感染症のリスク分析手法に基づくリスク管理のあり方に関する研究」班
分担研究報告書

1 4. アライグマ回虫症及びエキノコックス症の実態調査と対策に関する研究

分担研究者	川中正憲	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
同	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
同	山崎 浩	国立感染症研究所寄生動物部
同	古屋宏二	国立感染症研究所寄生動物部
同	山本徳栄	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
同	近真理奈	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
同	木村政明	青森県十和田食肉衛生検査所
同	原田邦弘	青森県十和田食肉衛生検査所
同	立崎 元	青森県十和田食肉衛生検査所
同	田中成子	青森県十和田食肉衛生検査所
同	佐藤 宏	山口大学農学部獣医寄生虫病学研究室
同	松井高峯	帯広畜産大学基礎獣医学研究部門
同	余 森海	中国疾病予防センター寄生虫病研究所

研究要旨：

本分担研究者の課題の一つは、ヒトで重篤な神経障害を引き起こすアライグマ回虫のリスク管理のあり方に関することである。今年度は、昨年度に引き続き特に関東地域と九州地域で急増している野生アライグマを対象に、アライグマ回虫及びその他腸管内寄生虫の実態調査を継続した。また、「愛がん」目的で飼育されているアライグマの糞便検査と飼い主へのアンケート調査を実施した。もう一つの本分担研究者の課題として、エキノコックス症のリスク管理のあり方に関することがある。1999 年の 8 月と 10 月に青森県十和田食肉衛生検査所に搬入された豚 3 頭が、肝多包虫症と診断された。それ以後、2007 年に至るまで同検査所からは日常業務を遂行するなかでの多包虫感染豚の検出は報告されていない。そこで、エキノコックスを監視する立場から、2005～2008 年における同検査所での豚の肝臓病変に関するエキノコックスの検出状況を解析した。また、2005 年 6 月に、埼玉県で放浪犬からエキノコックス感染が見出されたことから、この地域での犬、猫の腸管寄生虫の保有状況の調査を実施した。更に、「中国青海省におけるエキノコックス症の動物疫学的調査」を日中の共同調査事業として継続実施し、得られた終宿主及び中間宿主の材料について解析を加えた。

(1) アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視体制の構築

(1)-1. ペットとして飼育されているアライグマに関する調査

A. 研究目的

2005年に施行された「外来生物法」にもとづいて環境省に届け出された国内の

飼育アライグマは第1表に示す通りである。動物園などの展示施設に関しては既に基本的な調査を実施しているため、今年度は「愛がん」目的で特別に許可を受けている127ヶ所のアライグマ219頭に関して飼い主へのアンケートを実施しアライグマ回虫検査協力を促した。

第1表 外来生物法にもとづくアライグマの飼養届け出 (2009.6 環境省)

飼養頭数 (目的)	1	2	3-5	6-10	11-20	21以上	件数	(頭数)
(1) 学術研究	2	0	3	1	1	0	7	(40)
(2) 展示	18	17	35	16	10	3	99	(585)
(3) 教育	1	1	0	0	0	0	2	(3)
(4) 生業の維持	0	0	0	1	1	0	2	(25)
(5) 愛がん	98	16	8	4	0	1	127	(219)
(6) その他	6	1	2	2	0	0	11	(31)
計	125	35	48	24	12	4	248	(903)

B. 研究方法

環境省外来生物課の協力により届出リストに従って「愛がん」目的で飼育している者に対して次のような内容のアンケート調査を実施した。即ち(1)アライグマの入手方法、(2)アライグマ回虫の危険性認識の有無、(3)糞便検査実施経験の有無などである。そして、検査を希望する飼養者宛に採便管を送り、提供されたサンプルをホルマリン・エーテル法により糞便検査を実施した。また、「恐ろしいアライグマ回虫の幼虫移行症」という解説パンフレットを同封して、この問題への啓発に努めた。

C. 研究結果

アンケートの調査対象数は127件であったが回答を得られたのは97件(76.3%)で、その結果は次の通りであった。(1)ペット商を通じて購入:19(19.5%)、ペットだったものを知り合いから譲渡:9(9.2%)、野外か自宅で捕獲されたもの:17(17.5%)、その他(動物園、警察、愛護団体等により委託):15(15.4%)、記入なし:39(40.2%)、(2)アライグマ回虫の危険性認識有り:23(23.7%)、認識無し:39(40.2%)、記入なし:35(36.0%)、(3)糞便検査を既に実施:21(21.6%)、実施経験なし:39(40.2%)、記入なし:37(38.1%)。

採便管を送付し実際にサンプルを返

送・提供してきた者は 35 件 39 頭分であつ

検査の結果は、全てのサンプルについてアライグマ回虫卵陰性であった。

D. 考察と結論

外来生物法では「愛がん」目的の飼育に関しては、法施行前から飼育していたアライグマについてのみ一定の要件を満たすことにより特別に飼育が認められている。法律の施行後は、新たな「愛がん」目的での飼育は禁止されている。今回の調査時において、法律施行に伴って「届出」されたものの、少なくないアライグマが老齢のため既に死亡していた。検査対象となった 127 件のうち、何らかの回答が得られた 97 件について、26 件が死亡、実際にサンプルが提供されて陰性が確認されたものが 35 件、そして既に糞便検査で陰性が確認されているとしてサンプル提供を拒んだものが 5 件であった。

外来生物法の施行に先立って 1999 年に狂犬病予防法が改正され、アライグマの輸入に実際上の規制が加えられた。その結果、輸入アライグマを「ペット」として商取引する事が激減した。今回のアンケート調査の結果では、「アライグマ入手方法」に関する回答で、ペット商を通じて購入したかペットを譲渡されたとする者が合わせて約 30%であった。それ以外のケースは、日本国内で野外捕獲され何らかのルートを通じて「愛がん」用になったものであった。また、アライグマ回虫の危険性の認識について「有った」と回答したものが、24%に過ぎず、今回の調査を通じての啓発は意義があったと思われる。

結論として、現在わが国で届け出の上

た。糞便

「愛がん」目的で飼育されている残りアライグマのうち約半数（66 件、52%）に関して、アライグマ回虫が陰性であることを確認した。未確認の約 61 件についてはなお今後の問題として残されている。これらのアライグマは、老齢化しつつも今後数年間は「愛がん」目的の飼育が継続されると思われるので注意が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

(1)-2. 野生アライグマに関するアライグマ回虫症の監視

A. 研究目的

外来生物法に基づく野生アライグマの駆除作業が全国的に行われている。このような中で、アライグマ回虫症の有効な監視方法を検討する前提として、関東、関西、九州地域で急増している野生アライグマを対象に、アライグマ回虫及びその他腸管内寄生虫の実態調査を継続している。

B. 研究方法

神奈川県は、首都圏にあつて早くから野生アライグマ問題が先鋭化している地域であることから、この調査を開始して以来 11 カ年間にわたりアライグマの生息状況をフォローすると共に、駆除業者からの直接サンプル送付による糞便検査を実施してきた。今年度は 153 件の糞便が感染研に

送付された。糞便検査の方法はホルマリン・エーテル法を用いた。回虫卵が検出されたときは、アライグマ回虫とそれ以外のタヌキ回虫等との区別するために、形態鑑別と共に PCR 法による遺伝子解析を併用した。

埼玉県においては、アライグマの増加が近年非常に目立つ状況になっている。野生アライグマの捕獲数で見ると、平成 16 年度は 31 頭であったのに平成 19 年度は 935 頭を数え、20 年度は 1,346 頭、今年度は 1,756 頭になった。今年度は主として埼玉県中部地域（東松山環境管理事務所）で捕獲されたアライグマ 377 頭から直腸便を採取した。糞便検査は、直接薄層塗抹法、ホルマリン・エーテル法（MGL 法）、シヨ糖遠心浮遊法（シヨ糖法）を併用し、顕微

鏡で寄生虫卵、原虫類等の検索を行い、必要に応じて便の薄層塗沫標本にコーン染色、ギムザ染色を施して精査した。

兵庫県においてもアライグマの増加は激しい。捕獲数は平成 16 年には 94 頭であったものが平成 18 年は 2,059 頭、平成 19 年には 2,612 頭にもなっている。本年度は 169 頭の凍結腸管材料について消化管寄生虫の精査を実施した。

九州・四国地方では、既に 4 箇所の動物園のアライグマからアライグマ回虫が検出されているが、野生アライグマの寄生虫検査に関してまだ少数に止まっている。今年度は、長崎県から 18 頭、佐賀県から 36 頭、四国から 10 頭の凍結腸管材料について検査を実施した。

C. 研究結果

表 神奈川県野生アライグマ糞便検査数(2000年～2009年)

捕獲場所	捕 獲 年											総計(地区別)
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
鎌倉市	8	26	140	80	104	46	73	133	42	33	27	712
横浜市			5	4	4	19	20	71	39	7		169
横須賀市				9		4	96	1				110
藤沢市		3	38	22	5	5	9	19	6	12	16	135
逗子市			5	8		5	23	49	20	43	44	197
三浦市				5		2		5	39	40	66	157
平塚市										3		3
相模原市		1	8									9
茅ヶ崎市								7				7
茅ヶ崎市				5			1					6
城山町			2									2
津久井町		2										2
寒川町		1										1
小田原市			1									1
不明				6				3				9
総計(年別)	8	33	199	139	113	81	222	288	146	138	153	1520

上の表に示すように、今年度の神奈川県内

で捕獲したアライグマの検査数は 153 例

で、1例のタヌキ回虫を検出したがアライグマ回虫卵は検出されなかった。1999年以來の神奈川県でのアライグマ糞便の検査数は1520にのぼった。今年度の埼玉県での糞便検査は377検体について実施され、そのうち、20検体に原虫類と蠕虫類の虫卵及び虫体が認められ、陽性率は5.3%であったがアライグマ回虫卵は検出されなかった。兵庫県に関しては、何らかの寄生虫を見出したアライグマは67頭(39.6%)であったがアライグマ回虫は検出されなかった。長崎県、佐賀県及び四国由来の野生アライグマの腸管検査でもアライグマ回虫の検出はなかった。

D. 考察と結論

2000年を画して全国的に野生アライグマの増加が顕在化し農業上の被害も広がった。そして、2006年6月の「外来生物法」施行により「アライグマ防除実施計画」が各県で策定されて、農業被害への対策と生物多様性の維持・回復を目的として野生アライグマの駆除が実施されるようになった。皮肉なことに「外来生物法」の施行後、それまで「愛がん」目的で飼育されていた少なくないアライグマが野外へ放逐され、全国的な野生アライグマの分布域の拡大という様相を呈している。駆除計画の実施に当たり、アライグマ由来の感染症に対して効果的に対応することが必要になる。しかしながら、アライグマ由来の感染症への対応は、必ずしも組織的には実施されている状況にはない。アライグマ回虫に関しては、もし感染獣が出現したときは、家屋天井裏での生息や駆除作業の過程で健康上の被害を及ぼす恐れがある。従って、

当該地域でのアライグマ群に関して、アライグマ回虫の感染があるかどうかの監視作業を実施することが必要になってきた。現在の段階では、幸いにして国内の野生アライグマからアライグマ回虫の検出例は無い。現時点では、野生コロニー全てのチェックを終了したとは考えられないので、今しばらくは、全国的な野生アライグマに関する監視作業を継続する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

(2) エキノコックス症の国内流行地域拡大防止対策に関する研究

(2)-1. 青森県のと畜場に搬入された豚からのエキノコックス(多包虫)の検出

A. 研究目的

平成10年の8月と10月に青森県十和田食肉衛生検査所に搬入された豚3頭が、肝多包虫症と診断された。それ以後、平成19年に至るまで同検査所からは日常業務を遂行するなかでの多包虫感染豚の検出は報告されていない。同食肉衛生検査所では毎年80万頭を超える豚の検査が行われている。そこで、エキノコックスを監視する立場から、平成17～20年における同検査所での豚の肝臓病変に関するエキノコックスの検出状況を解析した。

B. 研究方法

平成 11 年から平成 16 年度までは、十和田食検の日常業務が遂行される中でのエキノコックス感染豚の検出報告は無い。平成 17 年度に至り、厚生労働省新興・再興感染症研究事業の分担研究として「青森県のエキノコックス調査と監視体制の構築」を実施する事となり、次の措置がとられた。1) 各検査員に北海道における豚のエキノコックス感染肝の肉眼写真及び判定基準を配布して検体採材を行う。2) 採材された肝臓の白色結節病変について、HE 染色及び PAS 染色を施し病理組織学的な検索を実施する。3) 病理学的な診断と共に遺伝子同定も実施する。このプログラムにもとづいて実施された平成 17～20 年度の検査により、肝臓にエキノコックス感染を疑わせる白色結節病変を認めた個体は、年度毎に 27、44、25、13 の計 109 頭であ

った。これら肝臓の白色結節病変について、H-E 染色及び PAS 染色を施し病理組織学的な検索を実施した。

C. 研究結果

これらの病変について病理組織学的な検索を実施した結果、平成 17～19 年度では何れもエキノコックスは認められず、白色結節はリンパ濾胞、肉芽腫性炎、間質性肝炎、肝嚢胞、寄生虫性肝炎等と診断された。そして、平成 20 年度において、採材された肝臓組織 13 例のうち 6 例にエキノコックスが検出されたのである。この 6 例は全て北海道産であった。北海道の食肉衛生検査所での豚のエキノコックス検出率は、最近 25 年間の全道平均で 0.1% である。十和田食検での 4 ヶ年間検査総数が 5,294 頭であることから、ここでの検出率もほぼ 0.1% となる。

十和田食肉衛生検査所での豚のエキノコックス検査

	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	計
全検査数	745,508	740,169	752,390	771,668	3,009,735
(北海道産)	1	904	1,254	3,135	5,294
肝の白色結節	27	44	25	13	109
(エキノコックス)	0	0	0	6	6

D. 考察と結論

わが国における人エキノコックス症の大部分は、多包条虫の土着が認められる北海道での発生である（現在までに約 500 症例）。北海道以外の都府県で発生した多包虫症例は約 80 で、青森県からの報告がその 1/4 を占め、しかもそのうち 9 症例は県内での感染の可能性が高い。これは、北

海道・青森両県間の人的・物的交流の緊密さに起因すると考えられるが、その具体的な要因については解明されていない。このような状況の中で、平成 10 年に十和田食検で同県産とされる豚からエキノコックスを検出したことから、青森県での多包虫虫定着が強く疑われたのである。しかしながら、これらの感染豚はいずれも青森県内