

図 6. 水族館で飼育されている 3 ヶ月齢のイワトビペンギンに発生した脚鱗部病変
左上：当該個体，右：病変部.

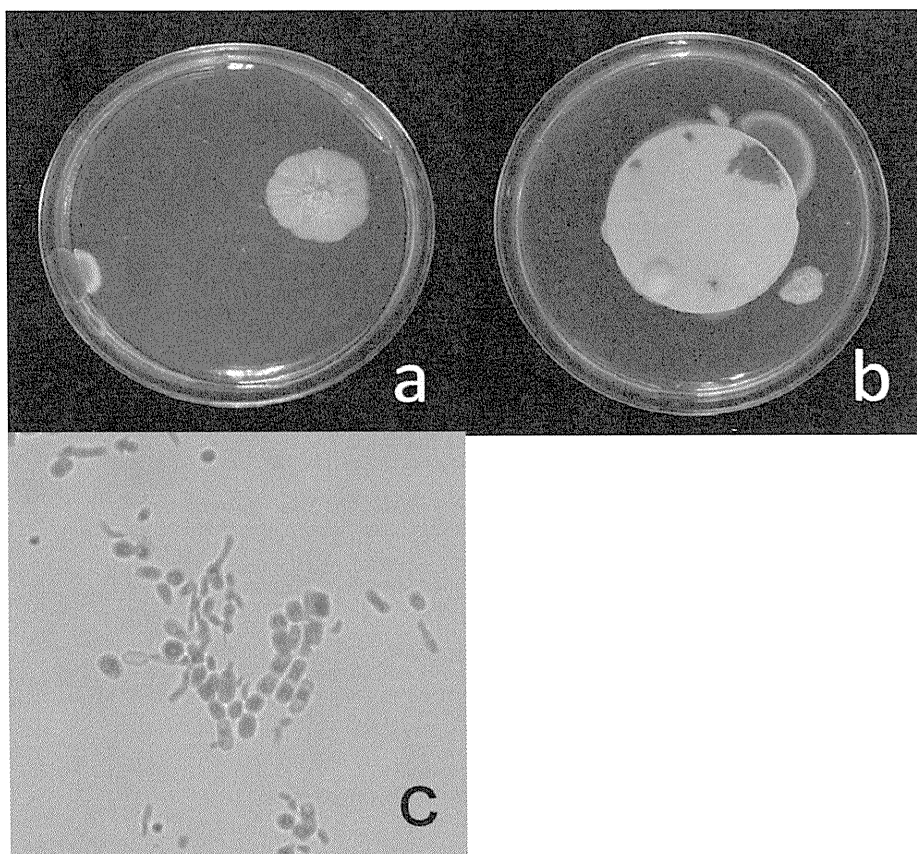


図 7. ペンギンの両足脚鱗部病変および飼育水より分離された *Trichosporon asteroides*
(a)ペンギン脚鱗部 ポテトデキストロース寒天平板培地, 35℃, 28 日 (初代分離).
(b)ペンギン飼育海水 ポテトデキストロース寒天平板培地, 35℃, 28 日 (初代分離).
(c)分節型分生子, ×400.

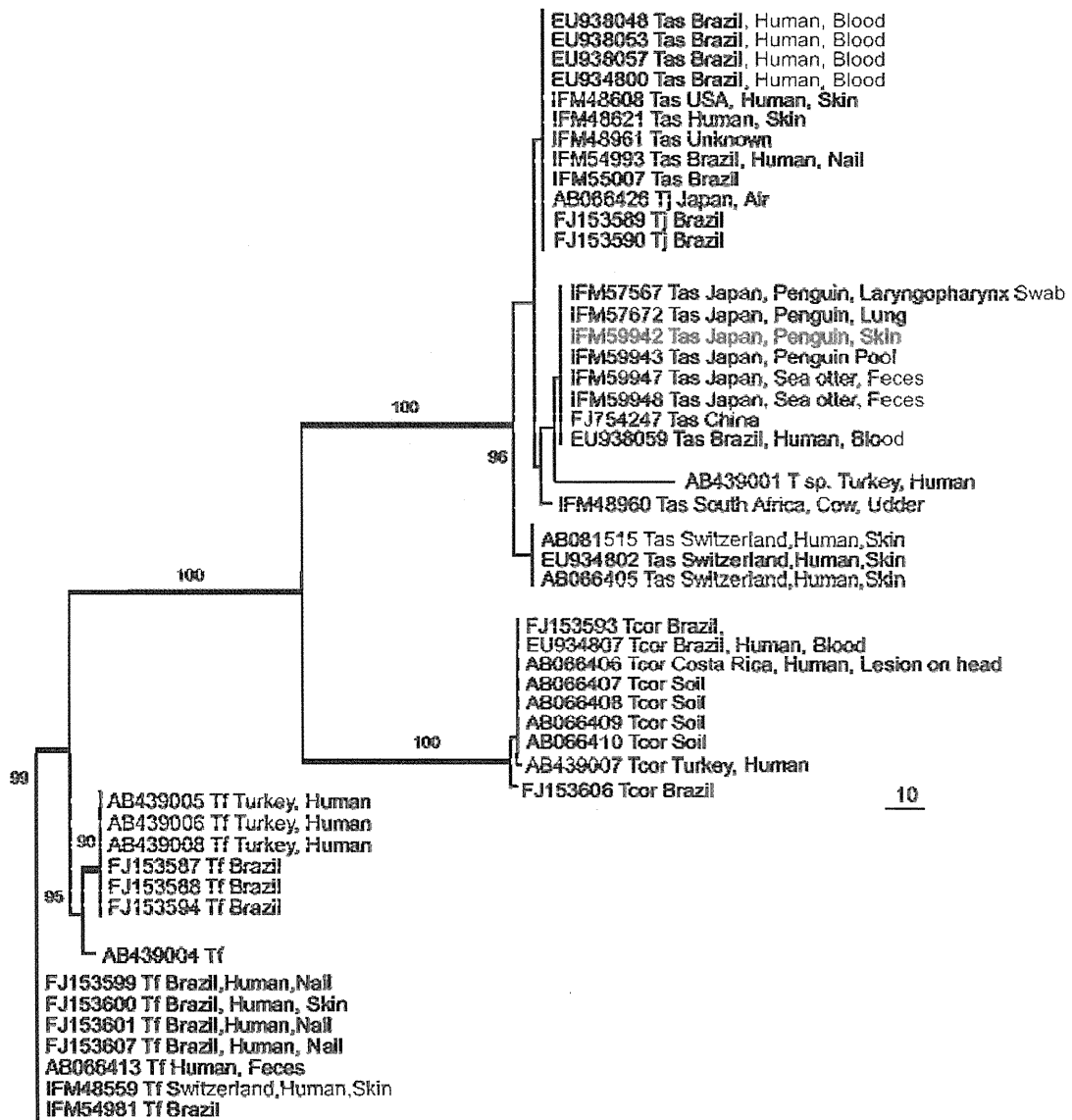


図 8. ペンギンの両足脚鱗部病変より分離された *Trichosporon asteroides* の rRNA 遺伝子 IGS 領域 567 塩基に基づく MP 法による無根系統樹。バーは 10 塩基を示し、データはアクセッション番号、登録菌種、分離国、分離源を示す。

Tas: *T.asteroides*

Tj: *T.japonicum*

Tcor: *T.coremiiforme*

Tf: *T.faecale*

表 1. 各種消毒薬に対する抵抗性試験結果

消毒薬(濃度%)	実験濃度(赤字:100%発育阻止濃度)					
ビルコン	2%	1%	0.50%	0.25%		
イソプロピルアルコール	50%	25%	12.50%	6.25%		
ヒビテン	1%	0.10%	0.01%			
ピューラックス	2.40%	0.24%	0.02%	0.01%	0.01%	0.00%
イソジン	10%	1%	0.10%	0.02%	0.01%	0.00%
H ₂ O ₂	3%	0.30%	0.03%			
塩化ベンザルコニウム	1%	0.10%	0.00%			

参考資料

鯨類飼育園館長 殿

平成 23 年 5 月

(社) 日本動物園水族館協会
鯨類会議
代表幹事 内田詮三

飼育バンドウイルカに発症した新興真菌感染症について

1. 病名 ロボミコーシス (ラカジオーシス)
2. 起因菌 *Lacazia loboi* (旧名 *Loboa loboi* など)
3. 感染個体
 - (1) ・ 個体名 サム、オス、血統登録番号：1061
・ 飼育館 太地町立くじらの博物館
・ 搬入 2007.12.3 ・ 採材、治療、検査実施 2010.11.21
・ 死亡 2010.12.20
 - (2) ・ 個体名 J-1、メス、血統登録番号：1115
・ 飼育館 神戸市立須磨海浜水族園
・ 搬入 2007.12.17 ・ 採材、治療、検査実施 2011.4.25
・ 生存中
4. 水族館における対応について
本感染症は人獣共通であり、1938年にアマゾン渓谷で発見され、その後、中南米諸国、北米、南アフリカでもヒト症例が報告された。感染源は土壌、植物、淡水、海水である。イルカでは南米スリナムのコビトイルカ (*Sotalia fluviatilis*) フロリダのノースカロライナ、ビスケイ湾等のバンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) でも発見された。特記すべきはオランダでイルカを介してヒトに感染したと思われるイルカトレーナーの症例が報告されていることである。イルカでの症例ではカリフラワー状の結節性皮膚炎を生じる。
従って疑わしき体表異常が認められた場合は下記のように対応して頂くようお願い申し上げます。
 - (1) イルカを取り扱う飼育係、獣医等は直接の皮膚接触を避ける (手袋着用等)。とりわけ外傷がある担当者は注意し、潜伏期は感染源と接触後長いので、疑わしき症例の発生時には担当者氏名をしっかりと記録して置く。飼育関係者の皮膚に何らかの異常を認めた場合、本書面を持参して、直ちに皮膚科医を受診し、ロボミコーシスに感染した可能性のあることを説明する。病獣の隔離、入館者のふれあい体験等は各館の状況に応じて、防疫体制を事前に構築する。
 - (2) 本症の発生は太平洋域では、上記2例が最初と思われる。従って確定診断はかなり困難故、疑わしき例を認めたらイルカ真菌症の国内第一人者である琉球大学農学部佐野文子教授に連絡して頂きたい。
 - (3) 飼育イルカ入手源として重要なイルカ漁学等及び園館自身に風評被害が及ばぬ万全の注意をもって対応する。
 - (4) マスコミには発表しない。

※：佐野文子教授

〒903-0213

沖縄県中頭郡西原町千原 1

琉球大学 農学部 亜熱帯地域農学科

TEL：098-895-8762，携帯：090-9842-6741

E-mail：ayasano@agr.u-ryukyu.ac.jp または aya_grimalkin@yahoo.co.jp

以上、よろしく御高配の程お願い申し上げます。

寄生虫感染に関する研究グループ

「肉食動物に由来する感染症のリスク評価と管理手法の研究」

鳥取大学：奥 祐三郎

12. 肉食動物に由来する感染症のリスク評価と管理手法の研究

分担研究者： 奥 祐三郎（鳥取大学農学部・獣医学科）

協力研究者： 神谷正男・スミヤ・ガンブリグ(酪農学園大学 OIE エキノコックス症リファレンスラボ)

小林文夫・斎藤通彦(環境動物フォーラム)

小清水町、俱知安町、ニセコ町、京極町、喜茂別町、蘭越町

巖城 隆（目黒寄生虫館）

党 志勝（日本予防医学協会）

野中成晃（宮崎大学農学部・獣医学科）

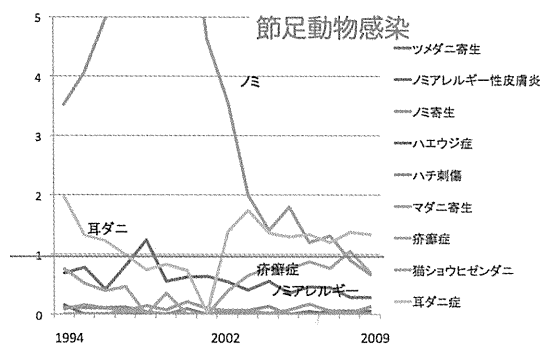
研究要旨 人と肉食動物の共通の寄生虫性蠕虫種は多く、国内の動物病院におけるアンケート調査ではそれらの感染率は近年減少傾向を示しているが、ノミ、犬回虫、猫回虫、犬条虫、マンソン裂頭条虫などはまだ残っている。しかし、これらの動物病院ですべての患畜が寄生虫検査されているわけではなく、また糞便検査の検出感度も低いため、実際の寄生虫感染率はかなり高いことが推測された。我々の2011年の鳥取における75頭の猫の剖検調査では、多くのペットが寄生虫感染していることを示した。キツネなどの野生肉食獣での寄生虫感染率はペットよりかなり高い。一部の寄生虫は肉食動物から人へ直接感染する種も含まれ、特に、我が国では、北海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。我々は小清水、ニセコ、喜茂別、京極、俱知安および蘭越町において駆虫薬入りベイト散布による感染源対策を継続し、地元住民と協力してこの効果を検証している。2011年度におけるベイト散布によっても、キツネにおけるエキノコックスの流行はすべての地域で顕著に抑えられることが示された。この事業の全道への普及および継続が課題であるが、今後北海道行政による積極的な関与が必要と考えられる。国内において、ペットおよびキツネのエキノコックス症の診断は、EmA9抗体を用いた糞便抗原検出法で行っているが、ザンビアの540頭の犬の糞便検査を実施したところ、43頭が抗原陽性、また37頭が虫卵(テニア科)陽性であったが、その後の虫卵のDNA検査によりエキノコックスである確証は得られず、この糞便抗原陽性は胞状条虫や多頭条虫感染の交差反応であると考えられた。国内ではこれらの条虫の感染はほとんど見られないため、EmA9抗体を用いた糞便抗原検出法の陽性結果はほぼ多包条虫によるものと判断できるが、胞状条虫や多頭条虫の流行地域では有効な診断方法とはならないと考えられる。なお、我々は駆虫薬入りのベイト散布だけでなく、エキノコックス対策としてワクチン開発が重要と考え、テトラスパニン(TSP)の粘膜ワクチン効果について基礎データを集めているが、TSP3の有効性が示唆された。また、中間宿主レベルの病原性について、抵抗力/感受性の機構を探るべく、抵抗力/感受性マウスの交配実験によるQTL解析を行ない、これに関連すると予想される2つの遺伝子座を特定した。さらに、これらの感染マウスの病変部のマイクロアレイ解析により、これらの分子基盤の解明を試みているが、両マウスでほとんど同様の反応が発現し、これまでの解析では抵抗力/感受性関連分子の結論は出せなかった。

1. 肉食動物と人の共通寄生虫について

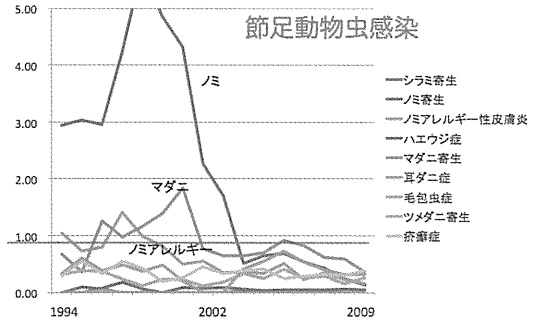
肉食動物、すなわち、野生肉食獣および家畜肉食獣(犬・猫)と、人の共通寄生虫(蠕虫)としては様々な蠕虫が含まれることを昨年の報告書に記載した。

今回は、国内におけるこれら流行状況を評価するために、臨床獣医師のアンケート調査による犬・猫の寄生虫症の診断症例の推移(多摩獣医臨床疾病統計1994-2009)のデータを元に、脊椎動物、蠕虫、原虫に大別し、各寄生

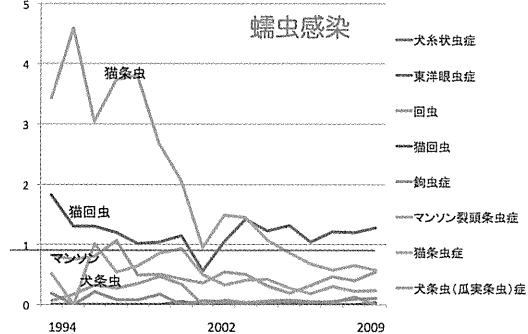
猫の疾病の推移1944(3,292例)-2009(5,390例)



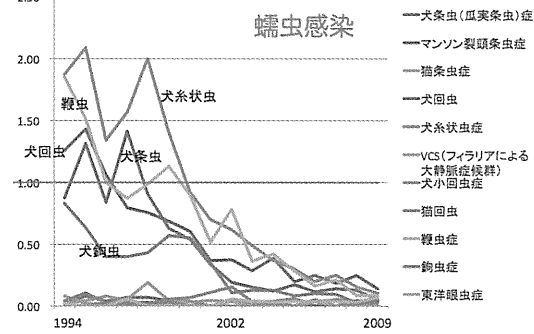
犬の疾病の推移1944(4,696例)-2009(11,529例)



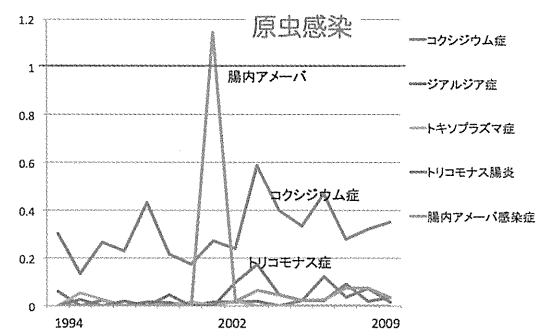
猫の疾病の推移1944(3,292例)-2009(5,390例)



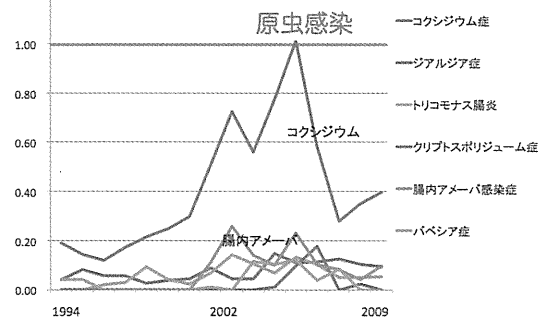
犬の疾病の推移1944(4,696例)-2009(11,529例)



猫の疾病の推移1944(3,292例)-2009(5,390例)



犬の疾病の推移1944(4,696例)-2009(11,529例)



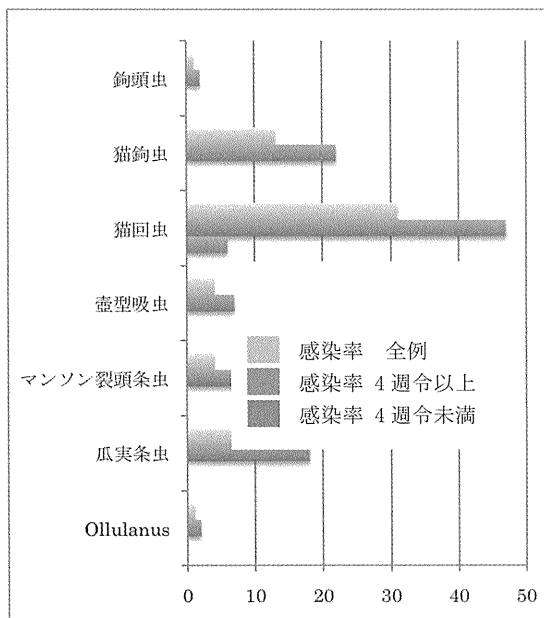
虫種毎の推移を図にまとめた。このアンケート結果はそのまま寄生虫の感染状況を示すものではないが、ノミ、猫条虫、犬糸状虫、犬条虫、犬回虫、犬鞭虫、マンソン裂頭条虫の症例が激減もしくはやや減少していることが伺われる。これらの内、ノミ(ネコノミ?)、犬糸状虫、犬条虫、犬回虫は人獣共通寄生虫である。犬回虫と同様ヒトに幼虫移行症を引き起こす猫回虫に関しては余り減少していないと思われる。猫の20%以上は現在でも放し飼いになっているので(2001年ペットフード工業界調査)、今後とも注意すべきである。これらのデータはあくまで担当獣医師の診断に

よるもので、患畜全頭について糞便検査や血液検査が行われているわけではない。したがって、実際の寄生虫感染率はこれよりもかなり高いと予想された。

我々は2011年4月から鳥取市の猫について解剖により寄生虫感染状況を調査している。これまでの75頭の検査において、猫回虫(30%)、猫鉤虫(13%)、瓜実条虫(11%)の感染率が10%以上であることが示された。人獣共通寄生虫としては、猫回虫、瓜実条虫、さらにマンソン裂頭条虫が含まれていた。しかし、この検査した75頭の内30頭は4週齢未満の個体で有るため、これらを除外すると(4週齢

以上)寄生虫感染率はかなり高くなる(図)。

以上のことから、地域差も考慮する必要が有るが、ペット由来の寄生虫病に対して今後とも注意すべきであることが示された。



なお、2011年に肉食獣ではないが鳥取県(倉吉市)の27頭のヌートリア *Myocastor coypus* の寄生虫を調べたところ、人に皮膚炎 (Nutria itch) を引き起こす、糞線虫 *Strongyloides myopotami* が全頭の小腸から検出された。ヌートリアは日本各地に見られ、肝蛭の保虫宿主としても知られているが、この糞線虫についても住民およびハンターに注意喚起すべきと考えられる。

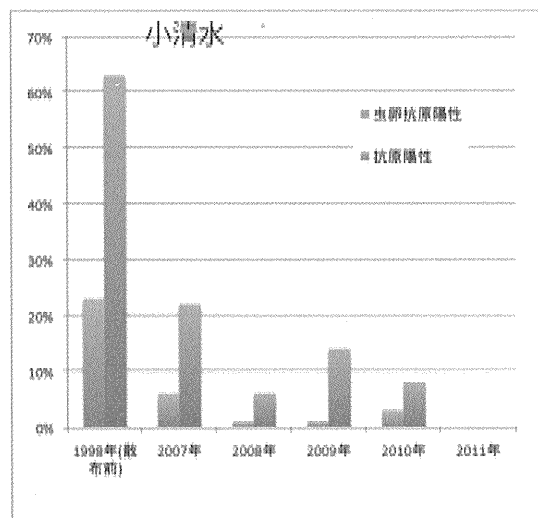
2. プラジカンテル入りのベイト散布によるエキノコックス感染源対策

前年に引き続き、小清水町および羊蹄山山麓5町についてプラジカンテル入りのベイト散布によるエキノコックス感染源対策を実施した。

小清水町

小清水町では1997年からベイト散布を開始し、2005年からは住民によるベイト散布がほぼ全町(200ポイント)で行われた。2007年は2ヶ月に一度のベイト散布で、2008年および

2009年は1ヶ月に一度であった。2010年は夏までは毎月散布で、その後は2ヶ月に一度散布とし、再度二倍量散布し省力化を図った。2011年度はエキノコックスの抗原の陽性率も、虫卵陽性率もゼロに抑えられた。今後も、省力化に向けて、2ヶ月に一度の散布とし、1回のベイト散布数は倍量として継続したい。



ニセコ周辺におけるベイト散布効果

ニセコ周辺ではまず、倶知安町がベイト散布を開始しその後、京極、蘭越、喜茂別、ニセコにおいてベイト散布を行った。



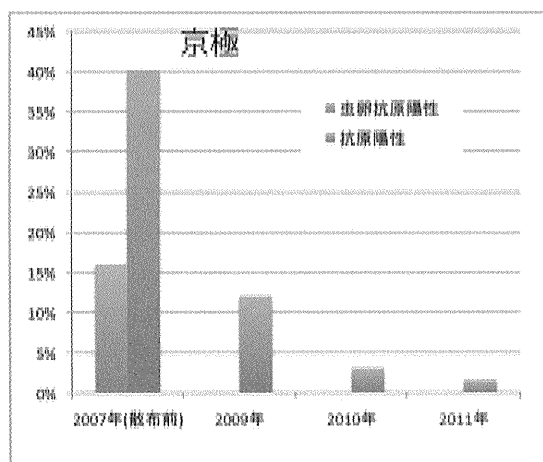
倶知安町

倶知安町では2006年から5-11月まで毎月、約1,400個のベイト散布を町周辺に行った。ベイト散布後は、2006年から顕著に減少し、2010年まで虫卵陽性率は減少しているが、

2009年から2010年にかけて抗原陽性率が上昇している。2011年度の検査は現在行っているため、本報告書には記載できない。

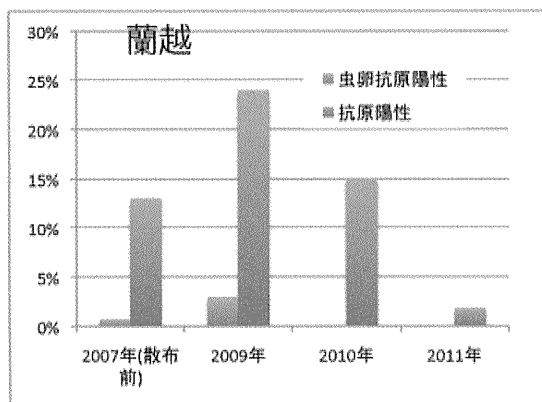
京極町

京極町では2007年にベイト散布前の調査を行い、2008年から5-11月まで毎月、約1,200個のベイト散布をほぼ全町に実施しているが、2010年まで顕著にキツネの感染状況抑えられ、2011年度もさらに抑えられている。



蘭越町

2007年にベイト散布前調査をおこない、2009年にはベイト散布されたがこれは非常に少数であったため、2010年には5-11月まで毎月、約1,500個のベイト散布をほぼ全町に実施しているが、2009年度より減少傾向があるが、蘭越町は他の町の2倍ほどの広さがあり、面積当たりのベイト数が少ないためか、顕著な効果とは言えなかった。2011年度はベ

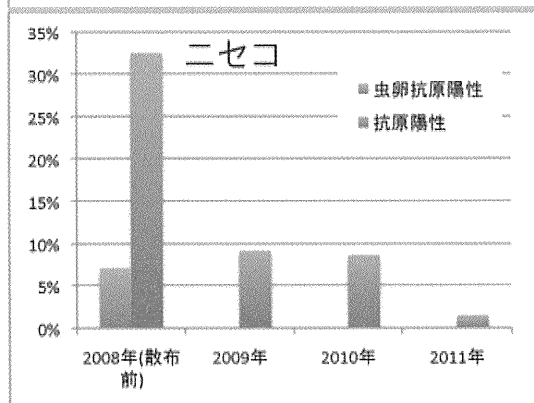
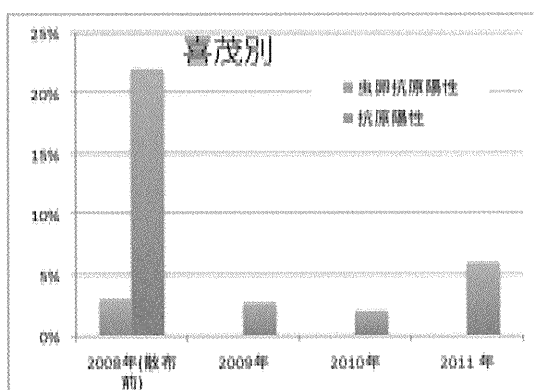


イトの散布数を増やしたところ、顕著な効果が見られた。

喜茂別町およびニセコ町

両町とも2008年にベイト散布前の調査を行い、2009年から5-11月まで毎月、約1,200個もしくは1,100個のベイト散布をほぼ全町に実施している。

2011年の検査では喜茂別町では虫卵は検出されなかったが、抗原陽性率が少し増加していた。一方、ニセコ町では感染率がさらに抑えられていた。



以上のように、個々の地域で試行錯誤が必要であるが、駆虫薬入りベイトの散布によるキツネの駆虫は可能と思われる。今後、この方法の普及に向けた活動が重要と考えられる。なお、町の大きさにより、ベイト散布数や検査するキツネ糞便数に差はあるものの、例えば約250km²の地域では、年間100万円ほどの予算があり、ベイト散布要員が確保されればこの事業は可能である。しかし、各町村だけの負担では全道展開へ拡大普及が困難と考え

られる。今後は、北海道の積極的な支援が必要である。

3. EmA9 抗体を用いた糞便抗原検出法の海外応用

国内において、ペットおよびキツネのエキノコックスの診断は EmA9 抗体を用いた糞便抗原検出法で行っているが、ザンビアの 540 頭の犬の糞便検査を実施したところ、43 頭が抗原陽性、また 37 頭が虫卵(テニア科)陽性で有った。しかし、その後の虫卵の DNA 検査によりエキノコックスである確証は得られず、この糞便抗原陽性が胞状条虫や多頭条虫感染の交差反応であると考えられた。国内ではこれらの条虫の感染はほとんど見られないため、EmA9 抗体を用いた糞便抗原検出法の陽性結果はほぼ多包条虫によるものと判断できるが、胞状条虫や多頭条虫の流行地域では有効な診断方法とは言えない。

TABLE 2. Comparison of the results of coproantigen ELISA and faecal examination for taeniid eggs

Results of coproantigen examination	Results of faecal examination for taeniid eggs		
	Positive	Negative	Total
Positive	37	6	43
Suspicious	5	1	6
Negative	29	462	491
Total	71	469	540

4. 粘膜免疫法の検討

我々は駆虫薬以外の対策法を各発すべくワクチン開発を目指している。多包条虫完全長 cDNA ライブラリーから、7 種類のテトラスパニン(TSP)関連遺伝子を *in silico* 解析により選出し、細胞外に突出する大きいループ領域を *E. coli* TOP10 を用いて蛋白質を発現させた。HisTrap により蛋白質の精製を行い、抗原に対する抗体応答を確認後、エキノコックス感染実験した。マウスに 200 個の虫卵を投与し、4 週目にマウスの剖検をし、肝臓でのシスト数をカウントしてワクチン効果を評価した。

まず、免疫組織染色法で、TSP1 と TSP3 のシスト、原頭節、成虫ならびに虫卵における

局在を調べたところ、TSP1 と TSP3 はエキノコックスの各段階に特定の部位に局在していることが示唆された。

粘膜ワクチンとしての効果を評価するために、TSP1 と TSP3 を抗原とし、粘膜(経鼻)ワクチン実験を行なった。PBS コントロール群より、TSP1 は 37%、TSP3 は 62%のシスト減少率を示し、TSP1+TSP3 のグループ(29%)は TSP1 或は TSP3 一方のみの効果より低かった。

TSP3 は皮下免疫と粘膜免疫の両方で高い予防効果が得られたことから、エキノコックス症のワクチン開発にとっても有望な抗原であることが予想された。したがって、さらに TSP3 について皮下ワクチンと粘膜(経鼻)ワクチンに対する抗体反応を調べた。皮下と粘膜免疫の両方とも高い IgG 抗体反応が見られ、皮下と粘膜免疫両方とも高い IgG1 と IgG2a サブクラス抗体反応を惹起し、Th2/Th1 バランスの指標としての IgG1/IgG2a 値では、免疫後 2 週目から 3 週目になって皮下免疫群の値は Th1 傾向になり、粘膜免疫群は Th2 傾向になった。また、粘膜免疫群の気管の IgA が極めて高く、腸 IgA は低かった。

アジュバントを検討するためにヨーネ菌の fibronectin-attachment protein (FAP) を試用した。FAP は宿主腸上皮細胞への接着と侵入に不可欠であり、粘膜免疫にも緊密な関係があることが報告されている。FAP と他のタンパク質を混合して使用すると、アジュバント効果があることが知られているが、FAP と他のタンパク質を融合させた場合の効果は不明である。本研究では TSP3 と FAP を融合蛋白質として発現させ、これを用いて BALB/c マウスに経鼻免疫した。TSP3-FAP グループは TSP3+CpG グループより、高い血清 IgG 抗体価と高い粘膜(鼻腔, 肝臓, 肺, 脾臓, 腸等) IgA 抗体価が得られた。これら免疫反応の結果より、TSP-FAP 融合蛋白質は抗多包虫ワクチン開発における有望な方法であることが示唆された。

結論:

1. 免疫染色の結果より、TSP は多包条虫の各発育段階での発現を示し、特定の部位に局在している事を明らかにしました。特に原頭節、

成虫の表面に局在、宿主免疫系に暴露（ばくろ）され、免疫原性を有することが示唆されました。

2. TSP3 は皮下免疫と経鼻免疫による高い防御効果があり、ヒト向うワクチンの開発における極めて重要な抗原ということが示唆されました。

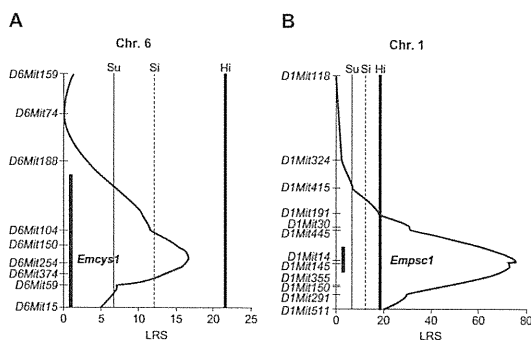
3. TSP3 は免疫群マウスにおいて高い全身・局所抗体反応を誘導したことが認められ、抗エキノコックス症に関与している免疫学の研究における有力な分子ということが示唆された。

4. FAP と TSP3 を融合すると、免疫した BALB/c マウスにおける高い血清と粘膜抗体反応を誘導させ、将来ヒト向け安全な粘膜ワクチンの開発における有望な方法であることが示唆された。

5. 感受性/抵抗性マウスの QTL 解析

近交系マウスにおいて多包条虫の虫卵を投与した際に、肝臓へのシストの定着数およびシスト内の原頭節形成数に系統差がみられる。遺伝的な背景の差が感受性を決定していることが予想される。そこで我々は、感受性/抵抗性に関与する遺伝子座を同定する目的で、エキノコックスへの感受性が高い DBA/2 (以下 D2) と比較的抵抗性である C57BL/6 (以下 B6) のバッククロス個体を用いて、肝臓へのシスト定着数およびシスト内の原頭節数を表現型とした QTL 解析を試みた。

B6 と D2 の F1 個体を D2 に戻し交配して得たバッククロス 114 個体 (6 週齢) に多包条虫卵 2,000 個を摂取させ、16 週間後に肝臓シスト 1g に含まれる原頭節数を算出し量的形質とした。QTL 解析は 10 ~ 20 cM 間隔で設定したマイクロサテライトマーカーと QTL 解析ソフト MapManager QTXb20 を用いて行った。



各バッククロス個体におけるシスト 1g あたりに含まれる原頭節数も定着シスト数同様連続的な値をとったことから、この表現型にも複数の遺伝子座が関与していることが示唆された。これを量的形質として QTL 解析を行ったところ、シストの定着数は第 6 染色体上のマーカー D6Mit188-15 の近傍に、原頭節形成数は第 1 染色体上のマーカー D1Mit14-145 の近傍に highly significant な LRS 値を持つ QTL が検出された。

6. 感染マウスの病変部のマイクロアレイ解析による感受性/抵抗性関連遺伝の解析

前述の感受性/抵抗性マウスの病変部のマイクロアレイ解析により、これらの分子基盤の解明を試みているが、ほとんど同様の反応が両マウスで発現し、現在までの解析では抵抗性/感受性関連分子の結論は出せなかった。

すなわち、感染後 4 週、8 週、16 週の肝臓病巣部の mRNA の増減について比較したところ、両マウスとも Th2 および M2 型マクロファージの活性化を示唆した。特に、病理組織観察で顕著に見られたマクロファージ、多核巨細胞、好酸球、線維芽細胞の増加に関連した分子、特に多くのケモカインを含む mRNA の顕著な増加が見られた。抵抗性マウスでは寄生虫の変性が顕著であったが、感受性マウスと比較して炎症が顕著であったわけでない。しかし、両マウスでは好酸球の分布状況が異なり、抵抗性マウスでは虫体に接して多くの好酸球が分布していることが観察されたが、増加する mRNA にはあまり差は見られなかった。

7. EmA9 認識抗原の解析

前述したように国内では EmA9 モノクロー抗体を用いて、エキノコックスの糞便内抗原検出を行っているが、この EmA9 認識抗原は糖蛋白であり、エキノコックス独特の糖付加を行っていることが知られているが、コアとなる蛋白が不明である。現在、我々は近縁種である有鉤条虫の成虫が大量に分泌する糖蛋白に相同性の高い分子群を標的として、RNAi を用いて解析中であるが、まだ結論は出ていない。

研究発表

論文発表.

- 1) Dang Z, Yagi K, Oku Y, Kouguchi H, Kajino K, Matsumoto J, Nakao R, Wakaguri H, Toyoda A, Yin H, Sugimoto C. A pilot study on developing mucosal vaccine against alveolar echinococcosis (AE) using recombinant tetraspanin 3: vaccine efficiency and immunology. *PLoS NTDS* (in press)2012
- 1) Nonaka N, Nakamura S, Inoue T, Oku Y, Katakura K, Matsumoto J, Mathis A, Chembesofu M, Phiri IG. Coprological survey of alimentary tract parasites in dogs from Zambia and evaluation of a coproantigen assay for canine echinococcosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011 Oct;105(7):521-31.
- 2) Nakao R, Kameda Y, Kouguchi H, Matsumoto J, Dang Z, Simon AY, Torigoe D, Sasaki N, Oku Y, Sugimoto C, Agui T, Yagi K. Identification of genetic loci affecting the establishment and development of *Echinococcus multilocularis* larvae in mice. *Int J Parasitol.* 2011 Sep;41(11):1121-8.
- 3) Kobayashi, T., Kanai, Y., Oku, Y., Matoba, Y., Katakura, K., Asakawa, M., Morphological and molecular characterization of sylvatic isolates of *Trichinella* T9 obtained from feral raccoons (*Procyon lotor*) *Nematological Reseach* 2011 July 41 (1) 27-29
- 4) Kouguchi H, Matsumoto J, Yamano K, Katoh Y, Oku Y, Suzuki T, Yagi K. *Echinococcus multilocularis*: purification and characterization of glycoprotein antigens with serodiagnostic potential for canine infection. *Exp Parasitol.* 2011 May;128(1):50-6.
- 5) Armua-Fernandez MT, Nonaka N, Sakurai T, Nakamura S, Gottstein B, Deplazes P, Phiri IG, Katakura K, Oku Y. Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of Taeniid cestode eggs in canids. *Parasitol Int.* 2011 Jan;60(1):84-9.

- 6) 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 多包虫感染コットラットの腹腔内シスト塊由来 cDNA ライブラリーに含まれていた宿主由来 cDNA の解析 獣医寄生虫学会誌 2011 Mar; 9(2) 132

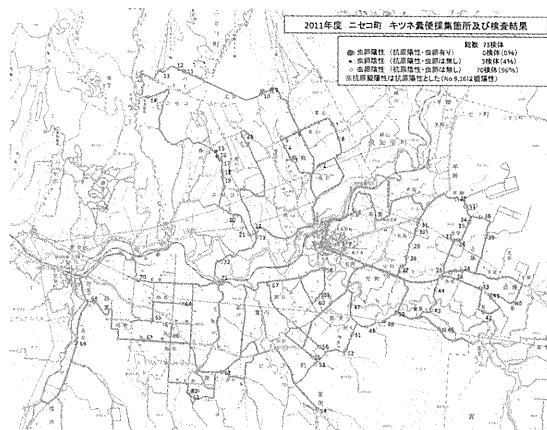
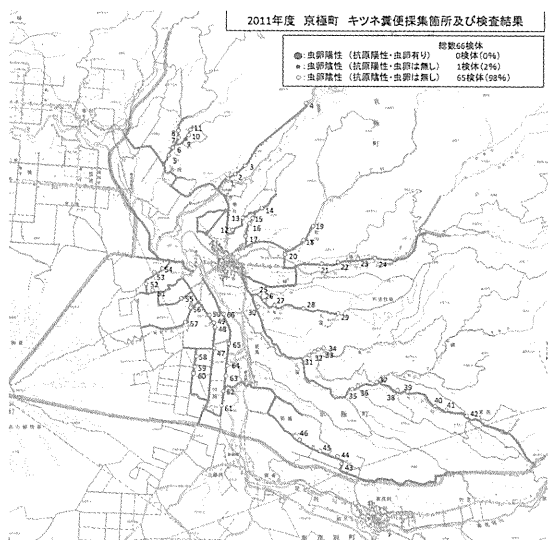
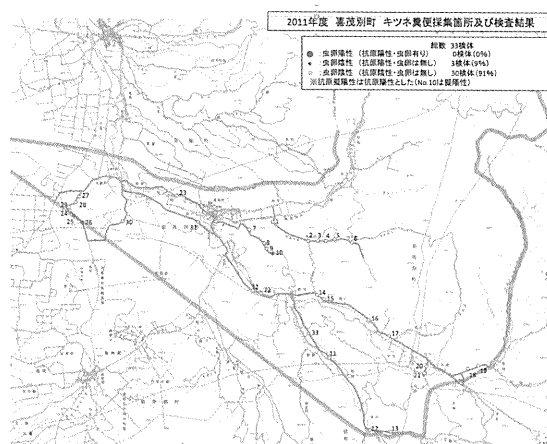
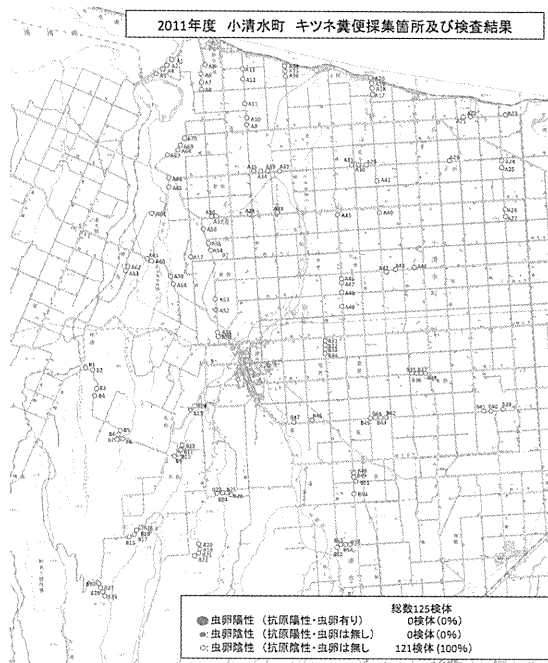
口頭発表

- 1) 奥祐三郎、巖城 隆、小林文夫・斎藤通彦、神谷正男・スミヤ・ガンゾリグ、小清水町、倶知安町、ニセコ町、京極町、喜茂別町、蘭越町の有志 北海道西部におけるプラジカンテル入りベイト散布によるエキノコックス感染源対策の試み 第67回日本寄生虫学会西日本支部大会 2011.10.07-08 金沢市
- 2) 党志勝、八木欣平、孝口裕一、杉本千尋、奥祐三郎 Tetraspanin を用いた抗多包虫症粘膜ワクチンの開発 第67回日本寄生虫学会 西日本支部大会 2011.10.07-08 金沢市
- 3) 党志勝、八木欣平、孝口裕一、杉本千尋、奥祐三郎 Tetraspanin を用いた抗多包虫症ネンマクワクチンの開発(その2)(防御に関する免疫応答の検討) 第16回分子寄生虫ワークショップ 2011.10.21-23 神戸市
- 4) 亀田 弥生、中尾 亮、孝口 裕一、松本 淳、党 志勝、Simon, Ayo Yilal、鳥越 大輔、佐々木 宣哉、杉本 千尋、奥 祐三郎、八木 欣平、安居院 高志 エキノコックス感受性/抵抗性に関する遺伝子座のQTL 解析(その2) 北海道実験動物研究会・日本実験動物技術者協会北海道支部合同学術集会2011 2011.7.9 札幌市
- 5) 中尾亮、亀田弥生、孝口裕一、松本淳、党志勝、Simon, Ayo Yila、鳥越大輔、佐々木宣哉、杉本千尋、奥祐三郎、安居院高志、八木欣平 エキノコックス症モデルマウスを用いた虫体発育に対する宿主抵抗性の解析 第71回日本寄生虫学会東日本支部会 2011.10.1 三鷹市

知的所有権の出願・登録

なし

2011年度のキツネ糞便採取と検査結果



寄生虫感染に関する研究グループ

「アニキサス、肺吸虫等に関する研究」

- ・ 食品・水系感染を介する蠕虫類の疫学研究

国立感染症研究所：杉山 広

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・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

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	柴田勝優	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	吉川 亮	長崎県環境保健研究センター研究部保健科
同	小野陽子	藪添動物病院
同	銭 珍宝	中国・浙江省医学科学院
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，時に思いがけない病害を与える。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方策として，サワガニの加熱条件を改めて検討した。また，伴侶猫の肺吸虫感染事例について検討し，肺吸虫感染のリスク管理を進める上で必要な課題を考察した。アニサキスに関しては暖海域の魚種を検索して，本邦では希少種のアニサキス *Anisakis typica* が多数検出される事実を示し，アニサキス感染のリスク解析の観点からも，本種の病害性検討の必要性を指摘した。

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加熱条件の再検討

A. 研究目的

肺吸虫は，人体症例の報告が続くことから，我が国では極めて重要な動物由来の食品媒介寄生蠕虫と認識されている。本邦での年間の患者数は 40 名以上と推定される。動物の感染事例も報告がある。人獣に共通して重視される感染源・原因食品は，第 2 中間宿主のサワガニである。サワガニは食用の目的でも販売されているが，例えば東京で販売された宮崎県産のサワガ

ニを検査したところ，9 割近くの個体から，肺吸虫のメタセルカリアが検出されることもあった。従って，サワガニを用いた料理を楽しむなら，肺吸虫症例の発生を防ぐ方法の確立が必要であると考えられた。このような考えのもとで検討を進めたところ，サワガニの 55℃・10 分間加熱により，ウェステルマン肺吸虫の感染が予防されることを，一昨年度の検討で明らかにした。それ以降も検討を進めたところ，より短時間の熱処理で感染を予防する温度条件が明らかになったので，検討結果を報告する。

B. 研究方法

ウエステルマン肺吸虫(2倍体型)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℃あるいは75℃)に浸漬して加熱処理した。処理後のカニはネットごと氷水(0℃)に浸漬し、急速に冷却した。その後、ネットから取り出したカニを解剖用はさみで細切し、多量の水道水で洗浄、静置後に沈渣を得て実体顕微鏡下で精査し、メタセルカリアを分離・回収した。このようしにて回収されたメタセルカリアをマウス(ddY系, 雄, 各群5頭)への感染試験に使用した。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、感染予防に有効な加熱処理条件を明らかにした。

C. 研究結果

1. 55℃・5分間の処理

55℃・10分間の処理と同様に、虫体は全く検出されなかった(表1)。

表1. 加熱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	55	5	0	0	0	0
3	55	2	0.6	0.6	1.2	12
4	75	2	0	0	0	0
5*	NT	NT	1	4.8	5.8	58

*: 平成21年度の検討結果; NT: 未処理

2. 55℃・2分間の処理

試験マウス5頭のうち、2頭から虫体が回収された。回収数は試験マウス1頭あたり平均1.2虫体、陽性マウス1頭あたり平均3虫体であつ

た(2頭の陽性マウスから共に1頭あたり3虫体を回収)。虫体の回収部位は、両マウス共に骨格筋と体腔で、陽性マウス1頭あたり平均各1.5虫体であった。横隔膜・肝・肺は陰性であった。

3. 75℃・2分間の処理

虫体は全く検出されなかった(表1)。

なお、未処理サワガニ由来のメタセルカリアを用いた感染試験では、いずれのマウスからも虫体が回収された。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1頭あたり平均4.8虫体、体腔が平均1虫体で、他は陰性であった(表1)。

D. 考察

カニの加熱でカニ体内のメタセルカリアが感染能力を消失することは、ウエステルマン肺吸虫(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。加熱の条件として安藤(1915)は、55℃・10分間が有効と報告した。そこで一昨年度に我々は、この条件

(55℃・10分間)でサワガニを加熱処理し、サワガニ体内にメタセルカリアとして寄生するウエステルマン肺吸虫(2倍体型)の感染性が、完全に消失することを明らかにした。

モクズガニに比べて、サワガニは体格が相当に小さい。そこで、サワガニの加熱温度・時間を改めて検討した。その結果、55℃・5分間あるいは75℃・2分間というより短時間の加熱で、肺吸虫の感染が確実に予防できることが明らかになった。しかしながら、55℃で2分間という低い温度・短時間の加熱処理では、肺吸虫の感染を完全に予防できなかった。肺吸虫感染のリスク除去を確実なものとするには、設定温度・設定時間を共に遵守することが必要である。なお加熱以外の方法、例えばカニの冷凍処理などが肺吸虫の感染予防に有効なのか、現在、検討を進めている。

E. 結論

食用として販売されているサワガニは、人体に感染する肺吸虫が多数寄生して非常に危険である。しかしカニを加熱（55℃・5分間あるいは75℃・2分間）して摂食すれば、ウェステルマン肺吸虫の感染予防に有効であることをマウスの感染実験で証明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 杉山 広, 森嶋康之, 山崎 浩, 春日文子 食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出(続報) 病原微生物検出情報 32, 172-173, 2011.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。

1-2. 和歌山県における猫の宮崎肺吸虫症例：肺吸虫の感染リスク管理についての考察

A. 研究目的

我が国にはウェステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の3種類の肺吸虫が、北海道を除く各地、特に本州中部以西に広く分布する。このうち前2種、すなわちウェステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫が人体寄生種である。サワガニは両種に共通する第2中間宿主であり、人および動物への感染源として重要な役割を果たす。サワガニはまた、大平肺吸虫の第2中間宿主でもある。なおウェステルマン肺吸虫は、染色体構成により2倍体型と3倍体型の2型に大別される。患者に発現する病態像は、型別毎に異なる。また宮崎肺吸虫は新種記載以降、我が国に固有の種と考えられてきたが、最近では中

国原産のスクリアビン肺吸虫の亜種とする学説が有力となっている。

犬や猫などの伴侶動物は、いずれの肺吸虫種に対しても好適な終宿主となることが、実験的に証明されている。しかしながら我が国では、肺吸虫感染の人体症例報告を数多く認めるにもかかわらず、動物症例の報告数は決して多くない。そこで本項では、我々が経験した伴侶猫の肺吸虫感染事例について報告する。併せて、肺吸虫感染のリスク管理を進める上で、必要ではないかと気付いた点についても述べてみたい。

B. 研究方法

症例は日本猫（雑種）、メス、1歳齢で、2011年4月に和歌山県橋本市の獣医科医院で、避妊を目的に卵巣子宮摘出術が実施された。術前の検査（血液・臨床）では異常を認めなかったが、術後に抜管した気管チューブに血痰が付着し、鏡検により肺吸虫卵を検出した。この虫卵を出発材料に、原因種の分子同定を試みた。

C. 研究結果

血痰中に認めた肺吸虫卵は数が少なく、しかも卵殻が破綻し、あるいは卵内容が変性した虫卵が大多数であった。このため、虫卵の形態学的特徴に基づく種同定を諦め、分子同定を試みた。まず虫卵からDNAを抽出し、次にPCRによるリボソームDNA・ITS2領域の増幅、更にPCR産物の制限酵素による切断パターン解析（RFLP）と塩基配列の解読・解析を行った。その結果、RFLPパターンから宮崎肺吸虫と判定された。塩基配列解読の結果も宮崎肺吸虫であったので、この配列をDDBJに登録し、アクセッション・ナンバーを得た（AB629937）。

D. 考察

当該猫の所有者の居住地は和歌山県紀北地方に所在する。同地方は、サワガニから宮崎肺吸虫のメタセルカリアが高率に検出され、本虫の濃厚な分布地であることが既に証明されている。

今回の検討により、本症例も宮崎肺吸虫の感染であると確定された。地元のサワガニを摂食して感染したと強く示唆された。我が国には3種類の肺吸虫が分布し(ウエステルマン肺吸虫には更に2型がある)、サワガニはいずれの種(および型)でも第2中間宿主として、動物への感染源の役割を果たす。動物の肺吸虫感染事例が見付かるような地区では、肺吸虫の生活環が円滑に営まれていると推定される。従って、動物症例の原因種を確実に同定し、人体寄生種と確定されたならば、その地区のサワガニにおける肺吸虫汚染の危険性を地域住民に啓発する必要がある。このような感染予防対策が、人獣における肺吸虫感染リスクの管理と軽減の方法として重要と考えられた。

当該の獣医科医院では、伴侶猫の肺吸虫感染事例を2例、本症例以外にも経験している。いずれも和歌山県紀北地方で飼育された猫の症例である。1例は重度の発咳を主訴に来院し(2009年11月)、糞便から肺吸虫卵が検出された。他の1例は、本症例と同様に避妊手術で来院し(2010年5月)、術後、気管チューブに付着した血痰から肺吸虫卵が検出された。これら2例の原因種は同定されていないが、いずれも宮崎肺吸虫による感染として問題ないと考えられた。猫の肺吸虫症例が継続して発生する同地方では、宮崎肺吸虫への積極的な対策が必要と考えられた。伴侶動物の疫学調査に取り組むと共に、地域住民に対する啓発活動への取り組みを進めるべく、準備を計画している。

E. 結論

和歌山県紀北地方で飼育された猫が、宮崎肺吸虫に感染していた。宮崎肺吸虫に対する感染予防に向けて、積極的な対策が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. 小野陽子, 藪添賢二, 藪添敦史, 杉山 広, 森嶋康之, 福本真一郎. 喀痰内虫卵の塩基配列から種同定した飼い猫における宮崎肺吸虫感染の一例. 平成23年度獣医学術近畿地区学会, 泉佐野, 2011年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし.

2. アニサキス症に関する研究

2-1. 中国のタチウオから検出されたアニサキスI型幼虫の分子同定

A. 研究目的

我が国の人体症例から検出されるアニサキス虫体は、分子同定の結果、ほとんど総てが *Anisakis simplex sensu stricto* (狭義の *A. simplex*, 以下As) であると明らかにされている。アニサキス症患者は、マサバを喫食して感染したと記憶・指摘する者が多いことから、マサバ由来の虫体の分子同定を行なった。その結果、北海道や関東(千葉)で水揚げされたマサバにはもっぱらAsが寄生していたが、九州(福岡)では別種の *A. pegreffii* (以下Ap) が主体を占めた。魚種を替えて、タチウオについても同様の検索に取り組んだところ、関東(千葉)で水揚げされたものは同様にAsであり、九州(長崎)ではApが主体を占めた。以上の結果から、九州で発生するアニサキス患者は、遠隔地の魚を原因として、アニサキスに感染したと考えられた。

東アジアの各国(韓国・台湾・中国)では、タチウオが住民に非常に好まれる魚と聞く。そこで実際に台湾に赴き、タチウオを入手して検索したところ、我が国の魚からはほとんど検出の記録がない *A. typica* (以下At) が、アニサキスI型幼虫として優占的に寄生することが分

かった。そこで今年度は中国に注目し、魚に寄生するアニサキスの種類を調べることにした。検出虫体が人体症例の主要病原種である As なのか、あるいは症例との関連に乏しい Ap や At なのかを明らかにすることは、アニサキス感染のリスク解析の観点からも重要と考えたことから、本課題に取り組んだ。

B. 研究方法

中国(浙江省寧波市)で水揚げされたタチウオ 7 尾を購入して検索した。得られたアニサキス I 型幼虫について個体別に DNA を抽出、リボソーム DNA・ITS 領域 (ITS1 領域から 5.8 S リボソーム DNA を経て ITS2 領域に至る配列) を PCR 増幅し、PCR 産物の塩基配列を解読・解析して、虫種を分子同定した。

C. 研究結果

7 尾のタチウオのうち、陽性魚は 2 尾で、計 6 隻のアニサキス I 型幼虫が検出された。検出虫体は配列解読・解析の結果、総て At と判定された。

D. 考察

At は熱帯・暖海域から検出されるアニサキスである。魚介に寄生する At の第 3 期幼虫は、As や Ap との形態鑑別が困難で、アニサキス I 型として取り扱われてきた。しかしながら、第 4 期にまで発育すると、形態学的な特徴から、At は As/Ap との形態鑑別が可能となる。このような At の特徴を活用して虫種同定が行なわれ、At は人体に感染することが報告されている。しかしながら、At によるアニサキス症の患者数は、極めて少ない。

アニサキス症の人体症例に関し、中国からは報告が見られない。魚介に寄生するアニサキスの主要虫種が、我が国でも人体症例との関連に乏しい At であることが、その原因とも考えられた。中国における人体アニサキス症例の発掘が進み、原因虫種の分子同定が実施されるなど、

今後の検討の進展が期待された。

E. 結論

中国(浙江省寧波市)産のタチウオを検索したところ、我が国でも人体症例との関連が高くない At のみが検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. Sugiyama, H., Umehara, A., Kawakami, Y., Ohmae, H., Ooi, H.-K., Uchida, A. Molecular identification of *Anisakis* type I larvae from hairtail fish in Taiwan and Japan. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP 2011), Buenos Aires, 21-25 August 2011.
2. 杉山 広, 武藤麻紀, 大前比呂思, 森嶋康之, 山崎 浩. 中国のタチウオから検出されたアニサキス I 型幼虫の分子同定. 第 153 回日本獣医学会学術集会・日本獣医寄生虫学会, 大宮, 2012 年 3 月.
3. 杉山 広. アニサキスを原因とする食中毒. 第 153 回日本獣医学会学術集会・公衆衛生学学科会シンポジウム, 大宮, 2012 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録共になし。