

## 【判定基準】

凝集度 (%)	標準混濁管No.	凝集の観察
100	1	凝集沈殿し、上清は全く透明
75	2	強い凝集沈殿はあるが、上清はかすかに混濁
50	3	かなりの凝集混濁があり、上清もかなり混濁
25	4	わずかな凝集塊の沈殿を認める
0	5	凝集を認めない

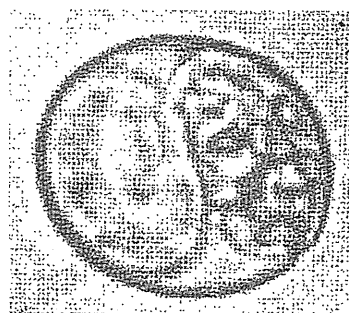


図6 トキソプラズマのオーシスト  
(丸山原図)

## 4. トキソプラズマ症

## 4.1 疾病の概要

病原体は原虫の *Toxoplasma gondii* で、ヒトを含む多くの動物の細胞内に感染する。发育段階によってタキゾイト(図4)、シスト(図5)、オーシスト(図6)と呼ばれる形態をとる。

トキソプラズマ原虫の終宿主はネコ科の動物で、その腸管内で有性生殖を営み、オーシストは糞便とともに排泄され、外界で成熟し感染力をもつようになる。ヒトは主にタキゾイトやシストの状態のトキソプラズマ原虫に感染した家畜の肉(特にブタの肉)を生に近い状態で食べたり、ネコの糞便とともに排出されたオーシストを経口的に摂取することにより感染する。

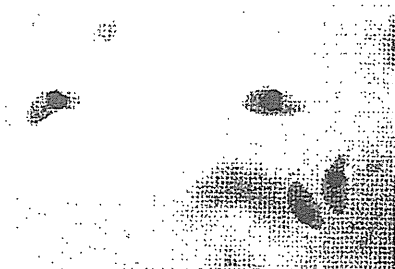


図4 トキソプラズマのタキゾイト  
(丸山原図)

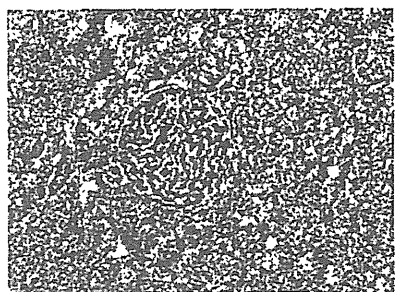


図5 トキソプラズマのシスト  
(丸山原図)

ヒトが感染した場合、潜伏期は不定で大部分が不顕性感染であるが、まれにリンパ節炎や脈絡網膜炎を起こす。患者の50~70%はこのタイプである。

妊娠初期に母親が初めてトキソプラズマに感染した場合、胎児は母体内で急性期を過ごし、死産や流産をまぬがれたとしても、出生後に後遺症として、脳水腫、脳内石灰化、精神運動障害、眼疾患の脈絡網膜炎などの症状を示す。妊娠末期に母親が感染した場合、胎児は出生後に発熱、肝臓、脾臓およびリンパ節の腫脹、黄疸、貧血などの急性症状を起こし、多くは死亡する。

イヌやネコでは、感染してもほとんど症状を現さない。幼犬が感染し、発症した場合、元気消失、食欲減退、40℃近い稽留熱、顕著な腹式呼吸、肺炎による呼吸困難等を呈する。幼猫では、猫免疫不全ウイルス感染症等の疾病に混合感染することで発症することがある。肺炎による呼吸困難、腹水や胸水の貯留、腹部リンパ節の腫大、脈絡網膜炎が見られる。まれに全身感染、腸炎、脳炎などを起こす。

## 4.2 検査法

## 4.2.1 遺伝子診断法

PCR法によりトキソプラズマ原虫に特異的なDNAを増幅し、検出する<sup>2)</sup>。PCR法では短時間のうちに、感度よく、特異的にトキソプラズマ遺伝子を検出することができるので、本症の確定診断に有効な方法であるが、一般に普及するまでには至っていない。

## 4.2.2 血清診断法

血清診断には、簡便なラテックス凝集反応による診断キット(トキシチェック-MT'栄研', 栄研化学株式会社, 図7)が市販されており、一般の臨床検査室で

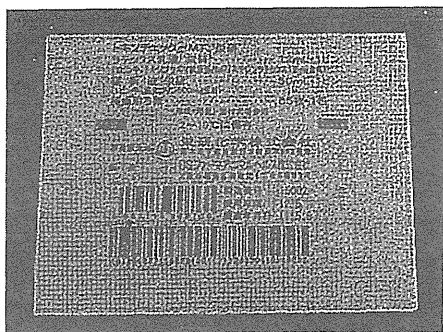


図7 ラテックス凝集反応によるトキソプラズマ検査キット  
(トキシチェック-MT‘榮研’, 榮研化学株式会社)

の診断が可能である。血清診断では、病日とともに抗体価が上昇するか、極めて高い抗体価が示されたときに診断的価値を有する。このラテックス凝集反応では1:64以上の抗体価を示した場合を陽性と判定する。

【例】市販のラテックス凝集反応キット(トキシチェック-MT‘榮研’)を用いた抗トキソプラズマ抗体検出法

- (1) U字型マイクロタイター用トレイの1~9の穴に緩衝液を25  $\mu$ Lずつ分注する(第9穴は対照とする)。
- (2) あらかじめ8倍に希釈した被検血清の25  $\mu$ Lを2倍希釈系列で1:2048(1~8穴)まで希釈する。
- (3) ラテックス乳液をよく振盪して均一な懸濁液とした後、1~9穴に1滴(25  $\mu$ L)ずつ滴下する。
- (4) トレイをよく振盪し、血清とラテックス乳剤をよく混合した後、乾燥防止のためラップをする。
- (5) 室温で一夜静置した後、下記の凝集像判定基準に基づいて判定する。

#### 【判定基準】

抗体価は判定基準の1以上を示した最終希釈倍数値をもって表す。

- 3: 沈降したラテックス凝集像の周囲がめくりあがり、周囲は不規則。
- 2: 沈降したラテックスが大きく全体に広がっている像。
- 1: 沈降したラテックスが中程度に広がっている像。
- 0.5: 陰性対照が示す像よりやや大きめな像。
- 0: 小さく“くっきり”とした円形の沈降像。

陰性<1:32 疑陽性=1:32 陽性 $\geq$ 1:64

\*疑陽性の場合、再検査をする。

## 5. 皮膚糸状菌症

### 5.1 疾病の概要

*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*などの真菌類が原因の皮膚感染症である。*M. gypseum*は土壌や家庭のほこりの中に生息している真菌であるが、イヌが土を掘り起こしたりしたときなどに、鼻や四肢に感染する。ヒトは主に上述した真菌に感染した動物と接触することで感染する。

ヒトでは、10~14日の潜伏期を経た後、主に皮膚の柔らかい部分に病変が現れる。*M. canis*の感染では、頭部に円形や不整形の灰白色の鱗状屑を、手や足には円形で紅斑性の境界明瞭な病変を形成する。*M. gypseum*による感染もほぼ同様であるが、比較的強い炎症像を示す。*T. mentagrophytes*による感染の多くは手指に現れ、膿疱性毛包炎を起こし、毛包から膿の排出が見られる。

動物も感染すると、脱毛、紅斑、痂皮形成を伴う炎症が顔、足の裏、体部の皮膚等に形成される。

### 5.2 検査法

#### 5.2.1 ウッド灯照射法

被毛に360 nmの紫外線(ウッド灯)を照射する。*M. canis*に感染している被毛は、蛍光を発する。しかし、*M. canis*以外の皮膚糸状菌では、蛍光を発しないので診断には注意が必要である。

#### 5.2.2 顕微鏡観察法

病変部の被毛を採取し、直接鏡検して分節分生子を観察する。スライドガラス上に、被検材料を置き、10~20%のKOH溶液を1, 2滴落とす。10~15分間放置して材料が軟化し透明になるのを待って鏡検する。毛根部に菌体が見られることが多いので、毛根部に注意して菌糸や分節分生子を検索する。

#### 5.2.3 培養検査法

イヌ、ネコの皮膚糸状菌症の原因菌を簡単かつ迅速に鑑別するための培地が数社から市販されている。

【例】市販のキット(ダーマキット, 共立製薬株式会社)を用いた培養検査法(図8)

このキットでは、病変部の被毛や落屑を添付の培地 *Dermatophyte test medium (DTM)* に接種し、室温(22~25 $^{\circ}$ C)で14日間まで培養する。DTMには、pH

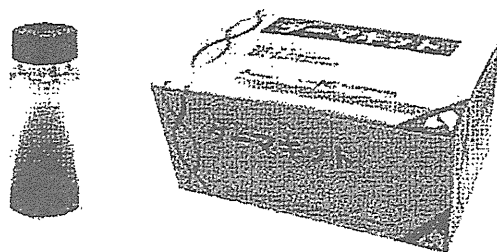


図8 イヌ・ネコの皮膚糸状菌症検査用培地  
(ダーマキット, 共立製薬株式会社)

指示薬(フェノールレッド)と非病原性の雑菌の増殖を選択的に阻害する抗生物質(クロラムフェニコールとシクロヘキシミド)が添加されている。*Microsporum*属, *Trichophyton*属が発育初期に産生するアルカリ性代謝物により培地が赤く変色することで鑑別することが可能である。

## 6. 犬糸状虫症

### 6.1 疾病の概要

犬糸状虫(*Dirofilaria immitis*)が原因で、イヌが最も重要な固有宿主である。イヌ体内で成虫から血中に産出されたマイクロフィラリアを蚊(トウゴウヤブカ, ヒトスジシマカ等)が吸血し、マイクロフィラリアは蚊の体内で2回脱皮して1 mmほどの第3期感染幼虫となる。イヌ, ヒトともに、犬糸状虫の感染幼虫を保有した蚊に吸血されて感染する。

軽症例のイヌでは軽度の発咳程度であるが、症状の進行に伴い毛艶が悪くなり、貧血、栄養低下、運動拒否、呼吸困難、運動後の失神などが見られる。重症例となると、腹水の貯留、心肥大、栓塞、皮下浮腫、諸臓器の鬱血などの循環器系の障害を起こして死亡する。ネコもまれに感染することがある。ネコでは特徴的な症状は認めにくい。急性例では呼吸困難、全身の痙攣を起こして突然死亡することがある。慢性例では嗜眠、食欲低下、嘔吐、下痢などを起こす。

### 6.2 検査法

イヌの全血あるいは血清中に含まれる犬糸状虫成虫抗原を検出するイムノクロマト法を応用した簡易検査キットが数社から市販されている。

【例】市販のイムノクロマト法(キャナイン-フィラリア・キット, 株式会社微生物化学研究所)を用いた

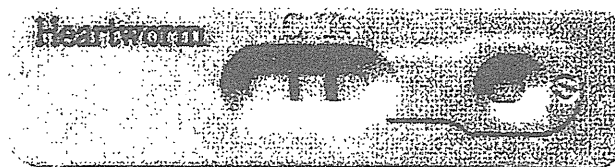


図9 イムノクロマト法によるフィラリア検査陽性例  
(キャナイン-フィラリア・キット, 株式会社微生物化学研究所)

### 犬糸状虫成虫抗原の検査法(図9)

- (1) イヌの全血, 血清あるいは血漿を付属の滴下用ピペットでデバイスの検体滴下窓に1滴(約 $40 \pm 10 \mu\text{L}$ )を滴下する。
- (2) 検査材料が完全に吸収された後に希釈液を2滴( $80 \pm 10 \mu\text{L}$ )滴下する。
- (3) 室温で5~10分間静置して反応線出現の有無を肉眼で観察する。
- (4) T位置(検査部位)とC位置(反応終了部位)の両方に赤紫色のラインが見られた場合, 陽性と判定する(図9)。
- (5) C位置のみに赤紫色のラインが出現した場合は陰性と判定する。

## 7. エキノコックス症

### 7.1 疾病の概要

食肉動物を終宿主とする多包条虫(*Echinococcus multilocularis*)が原因で、感染症法では4類感染症に類型されている。我が国では主にキタキツネとノネズミ等の野生動物間で感染環が形成されている。

ヒトでは、感染初期は無症状であるが、症状の進行とともに諸臓器に形成された嚢胞が大きくなり、5~10数年ほどで上腹部の膨満・不快感など悪性腫瘍のような症状が現れる。ほとんどの症例で肝臓に嚢胞が形成され、嚢胞は子供の頭ほどの大きさになる場合がある。感染から10年以上を経過すると、肝機能障害と腹痛、黄疸、貧血、発熱、腹水貯留などの症状が現れる。

キタキツネ, イヌ, ネコなどの終宿主は、特有の症状を示さない。中間宿主の動物では肝臓や肺などに嚢胞が形成される。北海道では動物園のゴリラ, ニホンザル, オランウータン, ワオキツネザルの多包条虫による死亡例が報告されている。

## 7.2 検査法

エキノコックスの成虫が宿主糞便内に排泄・分泌する代謝産物(成虫ES)抗原を用いたイムノクロマト法による検査キット(図10)が市販されている。このキットでは、約30分程度で目視による判定が可能である。

【例】市販のイムノクロマト法(エキット, わかもと製薬株式会社)を用いたエキノコックス成虫抗原の検査法

- (1) 採便棒で数箇所(約5箇所)の便を先端部分が埋まるくらい採取する。
- (2) 採便棒を容器に挿しこみ、右回りに止まるまでねじ込む。
- (3) 採便容器を縦に数回強く振る。
- (4) 採便容器の先端の滴下部を開放する。
- (5) 滴下ノズルを下に向け、採便容器を垂直にもち、容器の中程を軽く押し最初の2滴を捨てる。
- (6) 反応シートの検体滴下部位に3滴の希釈した検体を滴下する。
- (7) 15~30℃で30分間静置して反応させる。
- (8) 判定部位に現れるラインを観察し、赤色ラインの有無を目視にて判定する。

- ①判定部位にコントロールラインと判定ラインが認められた場合、エキノコックス抗原は陽性と判定する。少しでも判定ラインが見えたら、陽性とす(図11)。
- ②判定部位にコントロールラインのみが認められた場合、エキノコックス抗原は陰性と判定する。
- ③判定部位にコントロールラインが認められなかった場合、操作が不適であったか、または、試薬が劣化していたなどの可能性があるため、再検査を行う。

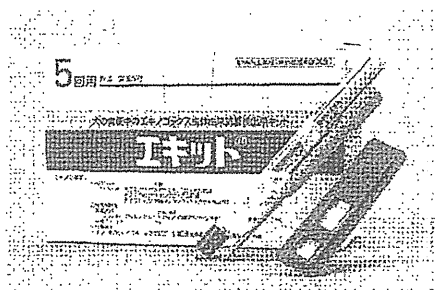


図10 イムノクロマト法によるエキノコックス抗原簡易検出キット

(エキット, わかもと製薬株式会社)

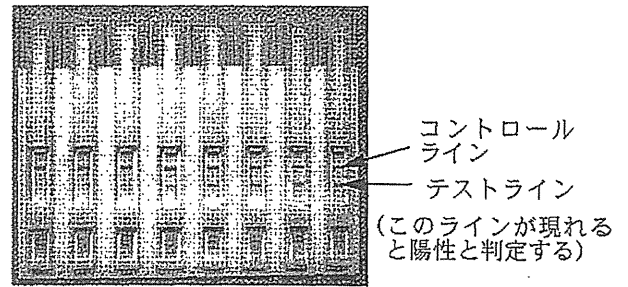


図11 エキットによる検査結果

## 8. 犬パルボウイルス感染症

### 8.1 疾病の概要

パルボウイルス科パルボウイルス属の犬パルボウイルス2(Ganine parvovirus-2: CPV-2)型が原因である。

本症は子犬を中心に世界中で発生している。主にイヌは、糞便中に排泄されたウイルスに直接感染するか、ウイルスに汚染された器物などから間接的に感染する。

生後2~3ヵ月齢以降のイヌが感染した場合、4~7日の潜伏期の後、元気・食欲の消失、発熱、嘔吐が現れる。次いで、下痢が始まり、脱水と体重減少が顕著となり、治療しないと数日で死亡することがある。妊娠犬が感染すると、胎盤を通じ胎児が感染し、妊娠早期であれば死産を起こす。分娩直前に子犬が感染した場合、全身感染を起こし、出生後に死亡することが多い。

### 8.2 検査法

糞便中の犬パルボウイルス抗原の検出法は、イムノクロマト法を用いた抗原検査キットが数社から市販されている。

イムノクロマト法を応用した、犬パルボウイルス(CPV)抗原検査用キットでは、特殊な器具を用いることなく、イヌの糞便中に排泄されるCPVを迅速かつ簡便に検出することが可能である。

【例】市販のイムノクロマト法(チェックマンCPV, 共立製薬株式会社)を用いたCPV抗原検査法(図12)

- (1) 採便用試験管の上部綿棒を外し、被検糞便(約0.1g)を綿棒全体に馴染ませる。
- (2) 綿棒を試験管内に戻して密栓し、上下に振ってよく懸濁し、これを試験液とする。
- (3) 試験管下部のスポート部分のスクリュウキャップを外す。
- (4) 検査用カードのSample部に試験液を3滴(約0.15mL)滴下する。

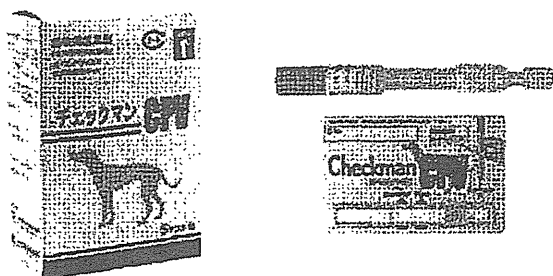


図12 犬パルボウイルス感染症の簡易検査キット  
(チェックマンCPV, 共立製薬株式会社)

- (5) 室温に静置して15分後に判定する。  
(6) Control部に赤紫色の線が出現すれば正常な試験が行われていると判断する。Test部に赤紫色の線が出現した場合に陽性と判定する。

## 9. 犬ジステンパー

### 9.1 疾病の概要

パラミクソウイルス科モルビリウイルス属の犬ジステンパーウイルス(Canine distemper virus: CDV)が原因である。世界各地で発生を見る。免疫機能の低い子犬や高齢犬は、特に感受性が高い。感染したイヌの鼻汁、唾液、眼分泌液、血液、排泄物との接触や飛沫を吸入することにより感染する。

潜伏期は1週間以内から4週間以上と様々である。臨床症状も軽度のものから重篤な症状を示すものまで多様である。感染3～7日後に急性の発熱があり、その数日後に再度の発熱が断続的に起こる。ウイルスの全身拡散に伴い、鼻汁の分泌、くしゃみ、結膜炎、激しい咳、血便を伴う下痢が続発する。皮膚病変として紅斑、水疱・膿疱の形成、鼻や肉球の肥厚・角質化(硬皰症)が見られる。ウイルスが脳内に侵入するとジステンパー脳炎を起こし、痙攣発作、後躯麻痺、白血球減少などを起こして、多くは死亡する。脳炎症状を呈すると予後は不良で、痙攣などの後遺症が残ることが多い。

### 9.2 検査法

イムノクロマト法を利用した犬ジステンパーウイルス(CDV)抗原検査用キットが市販されている。イヌの眼脂、鼻汁、唾液、生殖器(包皮または外陰部)および肛門(糞便)スワブ中に排泄されるCDVを迅速かつ簡便に検出することが可能である。

【例】市販のイムノクロマト法(チェックマンCDV, 共立製薬株式会社)を用いたCDV抗原検査法(図13)

- (1) 採材用試験管の上部綿棒を外し、糞便(約0.1g)もしくは、眼脂、鼻汁、唾液、生殖器(包皮または外陰部)および肛門のいずれかのスワブを付属の綿棒全体に採取する。
- (2) 綿棒を試験管内に戻して密栓し、約10秒間上下に振ってよく懸濁し、これを検体液とする。
- (3) 試験管下部のスポイト部分のスクリュエキャップを外す。
- (4) 検査用カードのSample部に検体液を3滴(約0.1～0.15 mL)滴下する。
- (5) 室温に静置して20分後に判定する。
- (6) Control部に赤紫色の線が出現すれば正常な試験が行われていると判断する。
- (7) Test部に赤紫色の線が出現した場合に陽性と判定する。



図13 犬ジステンパーの簡易検査キット  
(チェックマンCDV, 共立製薬株式会社)

## 10. 猫白血病ウイルス感染症

### 10.1 疾病の概要

レトロウイルス科ガンマレトロウイルス属の猫白血病ウイルス(Feline leukemia virus: FeLV)が原因である。世界各地のネコに発生が見られる。

本症に感染したネコの唾液や血液を介して咬傷などにより感染する。母親がFeLVに感染している場合、胎児が胎盤感染したり、分娩時や保育時に子猫に感染することもある。幼猫では、免疫系が発達していないためウイルスが排除されずに持続感染状態になることが多く、このような感染幼猫では、免疫不全、重度の血球減少症、リンパ・造血系腫瘍などを発症する頻度が高い。

成猫では、免疫系によりウイルスが排除されて、持続感染状態を免れることがある。持続感染状態のネコで

は、病気を発症せずにウイルスキャリアとなったまま寿命を全うすることもある。発症した場合、免疫不全、重度の血球減少症、リンパ・造血系腫瘍などを呈する。

## 10.2 検査法

ネコの血清、血漿、全血および唾液中におけるFeLV抗原を検出するためのELISAキットが市販されている。また、FeLV抗体およびFIV抗原を同時に測定できる簡便なイムノクロマト法によるキットも市販されている。

【例】市販のイムノクロマト法(スナップ・FeLV/FIVコンボ, アイデックスラボラトリーズ株式会社)を用いたFeLV抗原の検査法(図14)

- (1) 付属のピペットを用いて検体(全血、血清または血漿)3滴をサンプルバイアルに分注する。
- (2) コンジュゲートの入ったボトルを垂直に保ちながら、コンジュゲートをバイアルに4滴加える。バイアルのふたを閉め、3～5回の転倒混和により検体とコンジュゲートをよく混ぜ合わせる。
- (3) デバイス本体を水平に置き、バイアル中の検体すべてをサンプル注入口に注ぐと反応膜を横切りアクティベートサークルの方向に流出する。
- (4) サンプルが反応膜を横切り、アクティベーターに達したらすぐに、アクティベーターを押す。
- (5) 反応膜上の各スポットの発色により結果を判定する。サンプルスポットの発色は、検体中のFeLV抗原またはFIV抗体の存在を示す。陽性コントロールスポットに発色が認められない場合は、再検査を行う。

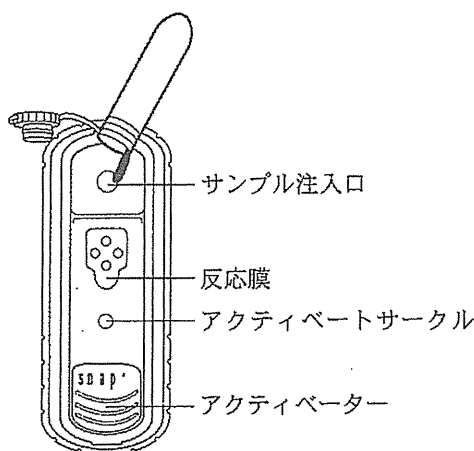


図14 FeLV, FIVの簡易検査キット

(スナップ・FeLV/FIVコンボ,  
アイデックスラボラトリーズ株式会社)

## 11. 猫免疫不全ウイルス感染症

### 11.1 疾病の概要

レトロウイルス科レンチウイルス属の猫免疫不全ウイルス(Feline immunodeficiency virus: FIV)が原因である。世界各地のネコに発生が見られる。主にけんかの際の咬傷により感染するため、オス猫の感染率はメス猫に比べると2倍以上高い。

FIVに感染したネコのすべてが発症するわけではない。臨床症状に基づいて、ウイルスの曝露後から急性期、無症候キャリア期、持続性リンパ節腫大期、エイズ関連症候群期および後天性免疫不全症候群期に分類される。急性期には、非特異的症状である発熱や、リンパ節腫大、白血球減少、貧血、下痢などが見られる。その後、細菌や真菌による二次感染や日和見感染、すなわち慢性の口内炎、歯肉炎、呼吸器疾患、腸炎、皮膚炎などが現れる。

### 11.2 検査法

ネコ血液中のFIV抗体を検出するためのELISAキットや、FeLV抗原およびFIV抗体を同時に測定できる簡便なイムノクロマト法によるキットが市販されている。

【例】FeLVの検査法(スナップ・FeLV/FIVコンボ)を参照(図14)。

### 参考文献

- 1) W. A. Jensen, M. Z. Fall, J. Rooney, D. L. Kordick and E. B. Breitschwerdt, Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1717-1722 (2000)
- 2) A. Calderaro, G. Piccolo, C. Gorrini, S. Peruzzi, L. Zerbini, S. Bommezzadri, G. Dettori and C. Chezzi, Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*, *Acta Bio Medica*, 77(2), 75-80 (2006)

(丸山 総一)

---

小 児 科 第54巻 第1号 (平成25年1月1日発行) 別冊

---

Pediatrics  
of Japan

小 児 科

特集：ペットからの感染症

## トキソプラズマ症

丸 山 総 一

---

金 原 出 版 株 式 会 社

---

## トキソプラズマ症

まるやま そういち  
丸山 総一\*

## 要旨

猫科の動物を終宿主とする原虫、*Toxoplasma gondii* が病原体の感染症である。本原虫の宿主域は広く、人を含む多くの哺乳類、鳥類に感染がみられる。トキソプラズマ原虫は、発展途上国のみならず先進国を含む世界中に分布する。人が感染した場合、多くは不顕性感染であるが、発症した場合でも発熱やリンパ節腫脹程度の軽度の症状を示すことが多い。一方、妊婦が初感染を受けると、胎盤感染により死・流産や先天性トキソプラズマ症（水頭症、脳内石灰化、精神運動障害、脈絡網膜炎など）を起こす。免疫不全患者では、髄膜脳炎、心筋炎、肺炎、脈絡網膜炎、皮膚炎などがみられ、致死的になる場合がある。

## I 病原体

胞子虫類に属する原虫、*Toxoplasma gondii* が病原体である。本原虫は、猫科の動物を終宿主とするが、宿主域が広く、人を含む多くの哺乳類や鳥類に感染する。2,000種以上の哺乳類や鳥類に感染するといわれる。猫科以外の動物はすべて非固有宿主として感染する<sup>1)</sup>。

トキソプラズマ原虫は、発育段階によってタキゾイト（増殖型虫体、大きさ4~7×4 μm）（図1）、シスト（嚢子型虫体、大きさ30~50 μm）（図2）、オーシスト（胞子型虫体、大きさ12×10 μm）（図3）の形態をとるが、いずれも感染性を有している<sup>2)</sup>。

人や豚などの非固有宿主では、タキゾイトとシストの感染がみられる。急性トキソプラズマ症は、タキゾイトが原因で発症するが、宿主体内で抗体が産生されるようになると、多数のブ



図1 トキソプラズマのタキゾイト（丸山原図）

ラディゾイトを包蔵するシストが脳や筋肉内に形成される。オーシストは終宿主である猫科動物の小腸粘膜でのみ形成される。オーシストは内部に2個のスपोロシストを、スपोロシストは4個のスポロゾイトを含有する。オーシストは環境の変化に強く、1年以上も生存可能である。

\* 日本大学生物資源科学部獣医公衆衛生学研究室  
〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866



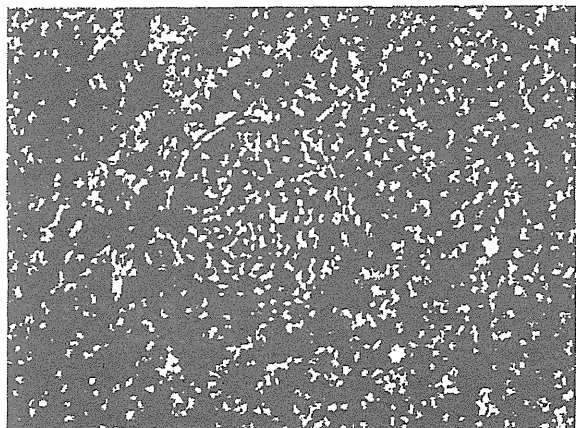


図2 トキソプラズマのシスト (丸山原図)

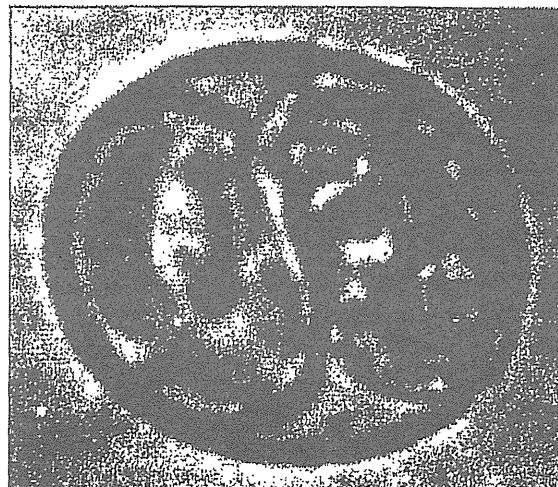


図3 トキソプラズマのオーシスト (丸山原図)

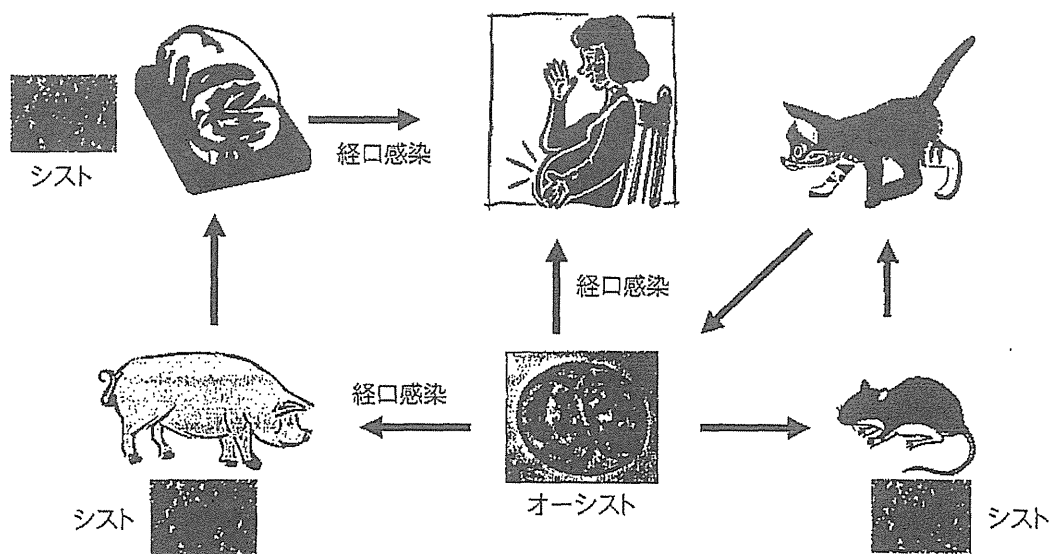


図4 トキソプラズマ症の感染経路

## II 感染経路

トキソプラズマ原虫のシストに感染した動物の生肉が猫科の動物に摂取された場合、小腸粘膜上皮で有性生殖を行い、オーシストが形成される。オーシストは糞便とともに外界に排出され、成熟すると他の動物への感染性を有するようになる。人は、主にタキゾイトやシストの状態のトキソプラズマ原虫に感染した家畜の肉

(とくに豚肉)を生や加熱不十分の状態を食べたり、成熟オーシストを保有する猫との接触、オーシストに汚染された土壌や水などから経口感染する(図4)。

先天感染は、妊婦がトキソプラズマ原虫に経口感染することにより起こる。経口摂取された原虫は、腸管内でオーシストからスポロゾイトが、シストからはブラディゾイトが遊離して腸管壁からリンパ行性あるいは血行性に体内に移行する。これらの虫体がマクロファージなどに

感染すると、タキゾイトヘステージ変換し、増殖しながら全身の組織に感染する。とくに、胎盤に好んで寄生・増殖することから、胎盤バリアを通過して、臍帯静脈から胎児胎内に感染すると、先天感染が成立する。

近年、AIDS患者、がん患者および免疫抑制薬の投与を受けている臓器移植患者などの免疫不全状態の患者が増加し、これらの患者にトキソプラズマ原虫が感染する機会が増えている<sup>3)4)</sup>。また、健常時に本原虫に不顕性感染していた人が、AIDSやがんを発症したり、臓器移植などで免疫抑制薬を投与されて免疫不全状態になることで体内のトキソプラズマ原虫が活性化し、発症する再燃性トキソプラズマ症もみられるようになった<sup>5)</sup>。

### Ⅲ 疫学

トキソプラズマ症は発展途上国ばかりでなく多くの先進国にもみられ、患者数は世界で5億人に達すると推計される。わが国の人における感染率は、年齢×(0.1~1)%といわれている。人を含む温血動物のトキソプラズマ原虫の感染率は、加齢とともに高くなる。

日本では、年間1,000~10,000人の妊婦がトキソプラズマ原虫に初感染し、130~1,300症例の先天性トキソプラズマ感染新生児が出生しており、重症先天性トキソプラズマ症の発生は、年間5~10例程度と考えられている<sup>5)</sup>。AIDS患者におけるトキソプラズマ脳炎の併発率は、米国で3~10%、ヨーロッパで25~50%、日本では8%前後といわれている<sup>5)</sup>。

わが国の猫の20~70%、犬の12~14%がトキソプラズマ抗体陽性であることが報告されている<sup>6)</sup>。最近の調査では、猫の抗体陽性率は5~6%と低値である<sup>7)8)</sup>。アジア諸国における猫のトキソプラズマ抗体陽性率は、タイの猫で11%<sup>9)</sup>、韓国で16.1%<sup>10)</sup>、バングラディッシュで33.3%<sup>11)</sup>、イランで90%<sup>12)</sup>と発展途上国では

高率になっている。

トキソプラズマ原虫は、野外にも広く分布している。わが国の野生動物を対象とした調査では、アライグマの9.9%<sup>13)</sup>、イノシシの6.3%、鹿の1.9%<sup>14)</sup>がそれぞれ抗体陽性であった。

## Ⅳ 人の臨床症状

### ① 先天性トキソプラズマ症

妊娠中に母親が初感染した場合、母体が無症状で経過した場合でもタキゾイトが胎盤を通過して、胎児は先天性トキソプラズマ症に感染することがある。妊娠3カ月前の感染では、通常流産する。妊娠中期から後期に感染し、胎児が体内で急性期を耐過して死産を免れた場合、出生後に水頭症、脳内石灰化、精神運動障害、脈絡網膜炎などの症状がみられる。重症例では重症心身障害児となる。

先天性トキソプラズマ症の70~90%が脈絡網膜炎を発症するといわれている。一般に、先天感染例の脈絡網膜炎の85%が両側性とされる。妊娠末期の感染では、胎児は出生後に発熱、肝臓、脾臓およびリンパ節の腫脹、黄疸、貧血などの急性症状を起こし、多くは死亡する<sup>5)</sup>。

### ② 後天性トキソプラズマ症

免疫健常者が後天感染した場合、潜伏期は不定で、大部分(80%以上)は不顕性感染となる。症候性の患者の潜伏期は、1~2週間程度で、軽度の発熱、リンパ節炎あるいは脈絡網膜炎などを起こす。リンパ節炎は、頭頸部のリンパ節に多発する。その他の症状として、倦怠感、筋肉痛、関節痛、頭痛、咽喉炎、斑状丘疹または蕁麻疹様の発疹などがみられる。ほとんどの患者は、数カ月で自然に回復するが、重症例では、肺炎、髄膜脳炎、肝炎、心筋炎などを起こしたり、脈絡網膜炎が悪化する。

免疫不全患者では、髄膜脳炎、心筋炎、肺炎、脈絡網膜炎、皮膚炎などがみられ、致死的になる場合がある。また、不顕性感染していた人が、

AIDS やがんを発症したり、臓器移植などで免疫抑制薬を投与されて免疫不全状態になった際に発症する再燃性感染では、病変は脳、肺、眼にもっとも多く、心臓、皮膚、消化管、肝臓などにも現れることもある<sup>9)</sup>。

## V 動物の臨床症状

### 1. 犬

成犬が発症することはきわめてまれである。幼犬ではジステンパーなどとの合併症として発症することがある<sup>9)</sup>。発症した場合、元気消失、食欲減退、40℃近い稽留熱、顕著な腹式呼吸、肺炎による呼吸困難などを呈する。

### 2. 猫

猫ではほとんど症状を示さない。幼猫では、猫免疫不全ウイルス感染症などの疾病に混合感染することで発症することがある。肺炎による呼吸困難、腹水や胸水の貯留、腹部リンパ節の腫大、脈絡網膜炎がみられる。まれに全身感染、腸炎、脳炎などを起こす<sup>15)</sup>。

### 3. 豚

罹患した動物の月齢、感染原虫の病原性などによって異なる。3~4カ月齢の子豚では、一般に急性症状を呈し、40~42℃の発熱、元気消失、眼結膜充血、鼻汁流出、顕著な腹式呼吸、耳介や下腹部のうっ血性紫斑、起立不能などを呈し、死亡することがある。成豚では不顕性感染や軽症で経過した後、回復するものが多い。妊娠豚では、死流産もみられる。

## VI 診断

トキソプラズマ症の感染は、トキソプラズマ原虫あるいはそのDNAの検出、または血清学的に診断する。トキソプラズマ原虫の分離は、もっとも確実な診断法ではあるが、その感度はきわめて低く、かつ難しい。患者の脳脊髄液やリンパ節乳剤などの検体をマウスの腹腔内に接

種することにより原虫を分離する。猫の糞便中に排泄されたオーシストは、硫酸重鉛飽和溶液(約33%)またはシヨ糖液(比重1.266)を用いた浮遊法で検査する。

本原虫のDNAの検出は、polymerase chain reaction (PCR) 法によりトキソプラズマ原虫に特異的な遺伝子を増幅し、検出する<sup>16)</sup>。PCR法では短時間のうちに、感度よく、特異的にトキソプラズマ遺伝子を検出することができるので、本症の確定診断に有効な方法であるが、一般に普及するまでには至っていない。

血清診断には、色素試験、間接蛍光抗体法、間接赤血球凝集反応、ラテックス凝集反応などがある。簡便なラテックス凝集反応による診断キットが市販されており、一般の臨床検査室での診断が可能である。血清診断では、病日とともに抗体価が上昇するか、きわめて高い抗体価が示されたときに診断的価値を有する。市販のラテックス凝集反応では1:64以上の抗体価を示した場合を陽性と判定する<sup>17)</sup>。

## VII 治療

患者の治療には各種サルファ剤、ピリメタミン、スピラマイシン、アジスロマイシンなどが用いられる。治療薬は、急性感染時のタキゾイトに対してのみ有効で、シストやオーシストには効果がない<sup>5)</sup>。

## VIII 予防法

トキソプラズマ症の予防には、生あるいは加熱不十分な肉を食べないようにする。本原虫のオーシストは抵抗性があり、環境中に偏在していることを認識しておく必要がある。したがって、子どもの砂遊びやガーデニング、野外でレジャー活動をした後は、手指に本原虫のオーシストが付着している可能性を考慮して、手洗いを励行する。

近年はペットを家庭内で飼育する例が多いので、猫の排便所を設けてそこに排便するように躡けるとともに、猫の糞便を適切に処理することが重要である。また、動物（とくに猫）に生肉を与えない、寝室に動物を入れない、動物とキスをしたり口移しに餌を与えない、動物と人の食器を分けるなどの節度ある付き合い方と、動物と接した後の手洗いとうがいを励行する。

先天感染の防止には、妊娠前にトキソプラズマ抗体を測定し、陰性であれば妊娠中に野良猫などとの接触を避けて、感染しないように注意する。妊娠中にトキソプラズマ抗体価が漸次上昇した場合は、化学療法を考慮する。

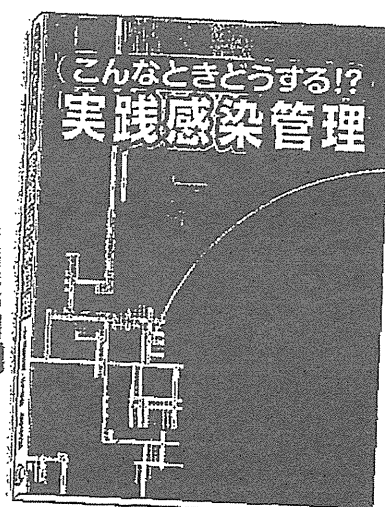
## 文献

- 1) Dubey JP, Beattie CP : Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Inc, USA, 1988
- 2) 石井敏雄 : 獣医寄生虫学・寄生虫病学. 講談社サイエンティフィク, 2002 : 84-95
- 3) Derouin F, Pelloux H : Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. Clin Microbiol Infect 2008 ; 14 : 1089-1101
- 4) Kotton CN : Zoonoses in solid-organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2007 ; 44 : 857-866
- 5) 矢野明彦 (編) : 日本におけるトキソプラズマ症. 九州大学出版会, 2007 : 1-136
- 6) Hagiwara T : Toxoplasmosis of animals in Japan. Int J Zoon 1977 ; 4 : 56-70
- 7) Nogami S et al : Seroprevalence against *Toxoplasma gondii* in domiciled cats in Japan. J Vet Med Sci 1998 ; 60 : 1001-1004
- 8) Maruyama S et al : Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. Microbiol Immunol 2003 ; 47 : 147-153
- 9) Jittapalapong S et al : Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in stray cats and dogs in the Bangkok metropolitan area, Thailand. Vet Parasitol 2007 ; 145 : 138-141
- 10) Kim HY et al : Prevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats of Gyeonggi-do, Korea. Korean J Parasitol 2008 ; 46 : 199-201
- 11) Samad MA et al : Sero-epidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infection in man and animals in Bangladesh. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997 ; 28 : 339-343
- 12) Haddadzadeh HR et al : Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in stray and household cats in Tehran. Vet Parasitol 2006 ; 138 : 211-216
- 13) Sato S et al : Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. J Parasitol 2011 ; 97 : 956-957
- 14) Matsumoto J et al : Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and wild sika deer (*Cervus nippon*) in Gunma Prefecture, Japan. Parasitol Intern 2011 ; 60 : 331-332
- 15) 佐藤良彦ほか : ネコにみられた全身性トキソプラズマ病の1例. 日本獣医師会雑誌 1986 ; 39 : 796-799
- 16) Calderaro A et al : Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. Acta Biomed 2006 ; 77 : 75-80
- 17) Maruyama S et al : Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. J Vet Med Sci 2000 ; 62 : 635-637

○ ○ ○

実践的かつすぐに役立つノウハウを満載!  
ICD, ICN, ICMT, BCICPS必携の書!!

# こんなときどうする!? 実践感染管理



**編集** 浅利 誠志 大阪大学医学部附属病院感染制御部副部長  
木下 承浩 神戸大学医学部附属病院医療技術部長  
山中喜代治 大手前病院中央検査部臨床検査部長

日々直面する様々な感染症への対応、予防対策に役立つ内容を写真やイラストを交えてわかりやすく解説。学生でも理解できるように感染症学、微生物学の基礎知識から感染管理の最新動向までを収載した。ICD(インフェクションコントロールドクター)、ICN(感染管理認定看護師)、ICMT(感染制御認定臨床微生物検査技師)、BCICPS(感染制御専門薬剤師)必携の書。

## 主な内容

### Introduction 待ったなし! 感染症・感染管理

- ①世界の感染症の現状 ②日本の院内感染の現状 ③すぐに役立つ感染管理

### 第1章 こんなときどうする!? 感染管理

- ①消毒・処置・滅菌の最新必須知識 ②微生物別対応法 ③感染部位別対応法  
④一類感染症 ⑤職業別対応法

### 第2章 感染管理の基礎知識

- ①微生物対応法 ②常在菌と病原菌の区別 ③感染症診断の進め方 ④感染症治療薬  
⑤感染症の届出と感染症法 ⑥簡単なアウトブレイクの見つけ方 ⑦サーベイランス

### 第3章 目で見る微生物の特徴

- ①細菌 ②真菌 ③寄生虫 ④ウイルス

### 第4章 実践! 病院感染管理

- ①医療関連者管理 ②施設管理 ③院内感染対策組織管理  
④美しい日本の医療:開かれた病院とは ⑤職員の感染管理教育~効果的な職員教育とは?

**読者対象** 医師, 検査技師, 看護師, 薬剤師など感染管理に関わる医療スタッフ

B5判 368頁 50図 原色151図 ISBN978-4-307-10146-2

定価5,880円(本体5,600円+税5%)

2011・2

 **金原出版**

〒113-8687 東京都文京区湯島2-31-14 TEL03-3811-7184(営業部直通) FAX03-3813-0288  
振替 00120-4-151494 ホームページ <http://www.kanehara-shuppan.co.jp/>

## Survey on Helminths in the Small Intestine of Wild Foxes in Qinghai, China

Wei LI<sup>1)</sup>, Zhihong GUO<sup>1,2)</sup>, Hong DUO<sup>1)</sup>, Yong FU<sup>1)</sup>, Mao PENG<sup>1)</sup>, Xiuying SHEN<sup>1)</sup>, Hideharu TSUKADA<sup>3)</sup>, Takao IRIE<sup>2)</sup>, Tetsuo NASU<sup>4)</sup>, Yoichiro HORII<sup>2,5)</sup> and Nariaki NONAKA<sup>2,5)\*</sup>

<sup>1)</sup>Academy of Animal and Veterinary Medicine, University of Qinghai, No. 1, Weier road, Sci-biological Industry Areas, Xining, Qinghai, the People of Republic of China

<sup>2)</sup>Laboratory of Veterinary Parasitic Diseases, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

<sup>3)</sup>Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), 375-716 Shiono, Miyota, Nagano 389-0201, Japan

<sup>4)</sup>Laboratory of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

<sup>5)</sup>Laboratory of Veterinary Parasitic Diseases, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

(Received 12 April 2013/Accepted 27 May 2013/Published online in J-STAGE 10 June 2013)

**ABSTRACT.** The intestinal helminth fauna of Tibetan sand foxes (*Vulpes ferrilata*) and red foxes (*Vulpes vulpes*) inhabiting in Qinghai, China, was evaluated by conducting necropsy of hunted foxes and fecal egg examination of field-collected feces. In northeast and south Qinghai, 36 foxes were necropsied, and the species of foxes and the parasites detected were identified by the DNA barcoding. In 27 red foxes and 9 Tibetan sand foxes examined, *Mesocostoides litteratus* (total prevalence: 64%), *Toxascaris leonina* (50%), *Taenia pisiformis* (8%) and *Taenia crassiceps* (8%) were found in both species of foxes. *Echinococcus shiquicus* (8%) and *Taenia multiceps* (6%) were found only in Tibetan sand foxes. *Echinococcus multilocularis* (3%) and *Alaria alata* (8%) were found only in red foxes. In the fecal egg examination of the rectal feces, 100% of taeniid cestodes, 73% of *Toxascaris* and 27% of *Mesocostoides* worm-positive samples showed egg-positive, indicating that coprological survey for parasite eggs could only provide partial information of intestinal parasite fauna. For field-collected feces, molecular identification of feces origins and fecal egg examination were performed. In 15 Tibetan sand fox and 30 red fox feces, we found *E. multilocularis* eggs in one feces of Tibetan sand fox. The present study indicated that the upper intestinal helminth fauna of the two fox species in Qinghai does not differ significantly and both species would play an important role in the maintenance of taeniid cestodes.

**KEY WORDS:** China, helminth fauna, Qinghai, red foxes, Tibetan sand foxes.

doi: 10.1292/jvms.13-0187; *J. Vet. Med. Sci.* 75(10): 1329–1333, 2013

Qinghai province in China locating at the Qinghai-Tibetan plateau has the unique ecosystem formed by high-altitude adapted animals and plants. Two fox species, the Tibetan sand fox (*Vulpes ferrilata*) and the red fox (*Vulpes vulpes*), inhabit in Qinghai. It is considered that the former species is a diurnal specialist that thrives with pikas exclusively and the latter species is a nocturnal generalist that can thrive with a wide variety of foods [3, 7, 15, 19]. Although some general information is available, local ecology of the two fox species in this area, such as local distribution, habitat segregation, feeding habitat and its interaction, etc. has not been investigated in detail.

On the other hand, Qinghai is known to be one of the most endemic regions of echinococcosis in the world [4]. In this area, 3 species of *Echinococcus*, *E. granulosus*, *E. multilocularis* and *E. shiquicus*, are co-distributed [18, 20]. Domestic and wild canine animals, as the definitive host,

play an important role in the maintenance of these *Echinococcus* species. Red foxes and Tibetan sand foxes are the main definitive host of *E. multilocularis* and *E. shiquicus*, respectively. For *E. granulosus*, domestic dogs are the main definitive host, however, foxes are possibly involved in the maintenance [16].

Several studies have been conducted to evaluate the prevalence of *Echinococcus* spp. in foxes in Qinghai. Post-mortem examination of hunted foxes was conducted in two studies: one study that necropsied 23 foxes hunted in southeast Qinghai performed fox and *Echinococcus* species identification [2], however, the other study that necropsied 149 foxes hunted in several regions of Qinghai did not identify fox and *Echinococcus* species, and thus, the information is less valuable [23]. Alternatively, test methods for coproantigen and copro-DNA detection in field-collected fox feces were developed as a non-invasive ecological method [5, 14, 17], and studies were conducted using such methods in southeast Qinghai [2, 23]. Unfortunately, all of the studies just focused on *Echinococcus* infection and were lack of the infection status of the other parasites in the two fox species.

This study was conducted to evaluate the intestinal helminth fauna of Tibetan sand foxes and red foxes inhabiting in northeast and south Qinghai by conducting necropsy of hunted foxes and fecal egg examination of field-collected

\*CORRESPONDENCE TO: NONAKA, N., Veterinary Parasitic Diseases, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-Kibanadai-Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan.

e-mail: nnonaka@cc.miyazaki-u.ac.jp

©2013 The Japanese Society of Veterinary Science



Fig. 1. Study sites. A: Map of China with Qinghai province marked as dark area. B: Map of Qinghai province. Dark area in Map B indicates the Qinghai Lake. Bold line represents the district border, and thin line represents the county border. 1: Gangcha county, 2: Haiyan county, 3: Xinghai county (Heka town), 4: Guinan county, 5: Chengduo county, \*: Xining (the provincial capital).

feces. The validity of fecal egg examination for the investigation of intestinal helminths was evaluated by comparing the result of necropsy and egg examination of rectal feces. The grasp of the parasite fauna would be useful information not only to understand the biodiversity in the Qinghai-Tibetan plateau, but also to understand the long term feeding habitat of the two fox species that can be suspected from the intermediate hosts of the infected parasites. Furthermore, the grasp of infection status of zoonotic parasites, such as *Echinococcus* in the two fox species, would be necessary to design effective control measures.

## MATERIALS AND METHODS

**Study sites:** This study was conducted in 5 counties located at northeast and south Qinghai, China (Fig. 1). In all sites, Tibetan and other minority ethnic groups conduct nomadism of yak and sheep in a vast expanse of grassland. The average altitudes of the study sites are 3,000–3,800 m in Haiyan, Gangcha, Guinan and Xinghai counties and 4,500 m in Chengduo county.

**Hunting and dissection of foxes and parasite examination:** Under the permission of the ministry of forestry, China for academic investigation on wild foxes, we asked local hunters to hunt foxes in Haiyan, Gangcha, Guinan and Chengduo counties in December 2010 to April 2011 and December 2011 to February 2012. Foxes were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least 10 days to inactivate *Echinococcus* eggs. Then, they were dissected and examined for their small intestinal helminths. The detected parasites were counted and stored in 70% ethanol for further examination. In addition, rectal feces were collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for fecal egg examination.

**Collection of fox feces in the field:** Fox feces were collected at grassland within 100 km apart from Heka town in Xinghai county in September 2010, August 2011 and August 2012. Collected feces were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least 10 days to inactivate *Echinococcus* eggs and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

**Molecular identification of fox species by DNA barcoding:** A part of the liver and muscle of the dissected foxes were collected and stored in 70% ethanol. Then, DNA was extracted from the liver or muscle using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). For the field-collected feces, fox rectum-derived cells distributed on the surface of feces were collected by washing the frozen feces with ASL buffer (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen) following the method reported [12]. Then, DNA was extracted from the washing of frozen feces using QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). On both DNA, PCR for the partial sequence of the D-loop region was performed with primers, prL (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3') and prH (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3') as described previously [12], and DNA sequences of PCR products were read with a DNA sequencer (Model 3100, Applied Biosystems of Life Technologies Corporation, Tokyo, Japan) using Big-Dye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems of Life Technologies Corporation). Sequences obtained were applied to BLAST similarity search (Basic Local Alignment Search Tool) for species identification.

**Fecal egg examination:** Fecal egg examination was performed on 0.5 to 1.0 g of rectal feces or field-collected feces by the centrifugal sucrose flotation technique. When taeniid eggs were detected from the field-collected feces, the eggs were collected under a stereomicroscope for the molecular identification of their species.

**Molecular identification of detected parasites:** DNA was extracted either from the worms detected in the intestine or from the eggs detected in feces. For cestodes and trematodes, PCR for the partial sequence of mitochondrial cytochrome oxidase *c* subunit 1 (CO1) gene was performed with primers, 2575 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') and 3021 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') following the method reported [1]. For nematodes, PCR for the partial sequence of internal transcribed spacer 2 (ITS2) region was performed with primers, LC1 (5'-CGAGTATC-GATGAAGAACGCAGC-3') and HC2 (5'-ATATGCTTA-AGTTCAGCGGG-3') following the method reported [10]. DNA sequences of PCR products were read as described above.

**Statistics:** The difference in the prevalence was statistically evaluated by the Fisher's exact test and the Fisher-Freeman-Halton test (an extension of Fisher's exact test from  $2 \times 2$  tables to general row by column tables) using statistical software R [13].  $P < 0.05$  was considered as significant.

## RESULTS

**Necropsy:** A total of 36 foxes (27 red foxes and 9 Tibetan sand foxes) were examined. Both species were obtained in Haiyan and Gangcha counties, although more red foxes

Table 1. Fox species necropsied and their intestinal helminths at four counties in Qinghai province

County	Fox species <sup>a)</sup>	No. necropsied	No. foxes harboring parasite species <sup>a)</sup> (range of No. parasites per fox)							
			<i>Mes. lit.</i>	<i>Tox. leo.</i>	<i>Ala. ala.</i>	<i>Ech. mul.</i>	<i>Ech. shi.</i>	<i>Tae. cra.</i>	<i>Tae. mul.</i>	<i>Tae. pis.</i>
Haiyan	<i>Vul. vul.</i>	19	11 (3-1,430)	8 (2-20)	3 (17-52)	1 (116)	0	2 (1-8)	0	1 (1)
	<i>Vul. fer.</i>	2	1 (87)	1 (6)	0	0	0	1 (3)	0	0
Gangcha	<i>Vul. vul.</i>	4	1 (4)	2 (12-179)	0	0	0	0	0	1 (3)
	<i>Vul. fer.</i>	1	0	1 (12)	0	0	0	0	1 (3)	0
Guinan	<i>Vul. vul.</i>	4	4 (4-654)	2 (3-15)	0	0	0	0	0	0
	<i>Vul. fer.</i>	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Chengduo	<i>Vul. vul.</i>	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	<i>Vul. fer.</i>	6	6 (19-96)	4 (4-34)	0	0	3 (833-1,640)	0	1 (1)	1 (2)
Total	<i>Vul. vul.</i>	27	16 (3-1,430)	12 (2-179)	3 (17-52)	1 (116)	0	2 (1-8)	0	2 (1-3)
	<i>Vul. fer.</i>	9	7 (19-96)	6 (4-34)	0	0	3 (833-1,640)	1 (3)	2 (1-3)	1 (2)

a) *Vul. vul.*: *Vulpes vulpes*, *Vul. fer.*: *Vulpes ferrilata*, *Mes. lit.*: *Mesocostoides litteratus*, *Tox. leo.*: *Toxascaris leonina*, *Ala. ala.*: *Alaria alata*, *Ech. mul.*: *Echinococcus multilocularis*, *Ech. shi.*: *Echinococcus shiquicus*, *Tae. cra.*: *Taenia crassiceps*, *Tae. mul.*: *Taenia multiceps*, *Tae. pis.*: *Taenia pisiformis*. NA: Not applicable.

were obtained than Tibetan sand foxes. Only red foxes were obtained in Guinan county and only Tibetan sand foxes in Chengduo county.

From 32 foxes (89%), 8 different species of intestinal helminths were detected (Table 1). All sequences of the PCR products obtained from the parasite DNA were completely identical to those of the representative species registered in GenBank. There was no significant difference in the prevalence of intestinal helminths between two fox species (Fisher-Freeman-Halton test). *Mesocostoides litteratus* was most abundant and found in both fox species (overall prevalence in red foxes: 59% and that in Tibetan sand foxes: 78%). All of the Tibetan sand foxes obtained in Chengduo county (n=6) were infected with this species. In addition, *Toxascaris leonina*, *Taenia pisiformis* and *Taenia crassiceps* were found in both fox species with overall prevalence of 44, 7 and 4% in red foxes and 67, 11 and 11% in Tibetan sand foxes, respectively. *Echinococcus multilocularis* (3%) and *Alaria alata* (8%) were found only in red foxes, while *Echinococcus shiquicus* (8%) and *Taenia multiceps* (6%) were found only in Tibetan sand foxes.

Mixed infection with multiple parasite species was found in 12 red foxes (44%) and 7 Tibetan sand foxes (78%). Mixed infection with different taeniid cestodes was found in one red fox in which *E. multilocularis* and *T. crassiceps* were detected.

There was no significant sex difference in the overall prevalence of *M. litteratus* (male: 9 infected/15 examined vs. female: 7/12 in red foxes and 4/5 vs. 3/4 in Tibetan sand foxes) or *T. leonine* (8/15 vs. 6/12 in red foxes and 3/5 vs. 3/4 in Tibetan sand foxes) in either species (Fisher's exact

test). Sex difference in the prevalence at each site or of other parasite infection was not evaluated due to the small sample size or the small number of infected animals.

**Rectal feces examination:** Rectal feces were able to be collected from 23 foxes out of 36 examined. The result of the fecal egg examination is shown in Table 2. When the result was compared with that of the necropsy, the specific parasite eggs could be detected in 100, 73 and 27% of samples from taeniid cestodes-, *Toxascaris*- and *Mesocostoides*-detected foxes, respectively.

**Field-collected feces examination:** In the study site, 70 feces were collected. Feces origins (fox species) could be identified in 45 samples: 30 were of red foxes, and 15 were of Tibetan sand foxes. By the fecal egg examination, *E. multilocularis* eggs were detected in one feces of Tibetan sand fox, however, eggs of other parasites were not detected.

DISCUSSION

As reported previously [19], two fox species, the Tibetan sand fox and the red fox, were found in the study sites. Although ecological characteristics of the two fox species are different, they shared the dominant parasite species, such as *M. litteratus* and *T. leonina*, and the statistical difference in parasite fauna of the small intestine was not elucidated in this study.

The most dominant species in the two fox species was *M. litteratus*. Although the lifecycle of the genus *Mesocostoides* has not been clarified in detail, this could indicate that both species of foxes intend to ingest the second intermediate host or possibly paratenic host of this parasite, such as birds,



Table 2. Comparison of worm-detection at necropsy and egg-detection in fecal egg examination

Examination	No. positive samples for parasite species <sup>a)</sup> in each examination							
	<i>Mes. lit.</i>	<i>Tox. leo.</i>	<i>Ala. ala.</i>	<i>Ech. mul.</i>	<i>Ech. shi.</i>	<i>Tae. cra.</i>	<i>Tae. mul.</i>	<i>Tae. pis.</i>
Necropsy	15	11	2	— <sup>b)</sup>	1	1	2	2
Fecal egg examination	4	8	0	—	1 <sup>c)</sup>	1 <sup>c)</sup>	2 <sup>c)</sup>	2 <sup>c)</sup>

a) *Mes. lit.*: *Mesocostoides litteratus*, *Tox. leo.*: *Toxascaris leonina*, *Ala. ala.*: *Alaria alata*, *Ech. mul.*: *Echinococcus multilocularis*, *Ech. shi.*: *Echinococcus shiquicus*, *Tae. cra.*: *Taenia crassiceps*, *Tae. mul.*: *Taenia multiceps*, *Tae. pis.*: *Taenia pisiformis*.

b) Examination was not done, because no samples were obtained from foxes infected with the parasite species. c) Detected as morphologically species-indistinguishable taeniid eggs.

reptiles and small mammals [6–8]. It has not been cleared, if the parasite can infect to pikas that the Tibetan sand fox as specialist thrives on. Similarly, the finding of *T. pisiformis*, *T. crassiceps* and *T. multiceps* in Tibetan sand foxes may indicate that the fox species ingests hares, voles and sheep head as well, although the frequency of such feeding was supposed to be fewer than feeding on pika [7, 15]. It is known that Tibetan nomads do not eat sheep head, and thus, ingestion of sheep head thrown away may explain the infection of *T. multiceps* rather than hunting of sheep. On the other hand, other parasite species detected in red foxes indicate that the red foxes ingested frogs, voles and hares [15].

Five species of taeniid cestodes were detected in the foxes examined. *Taenia crassiceps* and *T. pisiformis* were found in both species at necropsy. *Echinococcus multilocularis* was found in a red fox at necropsy and its eggs were found in a feces of Tibetan sand fox, and thus, the parasite species could infect to both fox species. Infections with *E. multilocularis* in Tibetan sand foxes and in pikas were reported in the previous studies [2, 18], and thus, this parasite could be maintained efficiently by Tibetan sand fox and pika cycle as well as by red fox and vole cycle. In contrast, *E. shiquicus* was found exclusively in Tibetan sand foxes both in this study and in the previous studies [5]. Although the number of foxes examined was limited and more foxes should be examined to clarify, the red fox may not be a susceptible host for this parasite. On the other hand, as observed in other studies [2, 23], *E. granulosus* was not detected in either fox species in this study. Nevertheless, finding *Taenia* and *Echinococcus* species in the foxes would provide us a warning that surveys on field-collected feces with egg examination conducted in this area require a further method for the species discrimination of taeniid eggs.

Comparison of the results of necropsy and egg examination of rectal feces indicated that coprological survey for parasite eggs could provide valid but limited information of parasite fauna. Taeniid eggs were detected in 100% of foxes infected with taeniid cestodes. However, the observation could be a rare case, and an actual detection rate is considered to become lower because the previous studies showed that the detection rate of taeniid eggs from the rectal feces of red foxes infected with *E. multilocularis* was less than 50% [9, 21]. On the other hand, other parasite eggs, especially those of *Mesocostoides*, were detected in only part of the infected foxes. *Mesocostoides* eggs have thin eggshell and are stored and protected in a sac called paruterine organ of a gravid segment. Ignorance of detecting segment itself in the

egg examination may explain the low rate of detection of the parasite eggs.

Various surveys on parasites examining animal feces have been conducted elsewhere [11, 14, 17]. Previous studies had some difficulty in identification of origins of feces collected, however, molecular identification methods for feces origins have been developed recently and applied to field surveys [5, 12]. In those studies, examination of parasites was conducted by detection of parasite eggs, coproantigen or copro-DNA [2, 17, 22]. However, the latter two detection methods are best applicable to surveys on the specific parasite, such as *Echinococcus* spp., and are not suitable for surveys on parasite fauna. In this study, we performed egg examination on field-collected feces in a town of Qinghai and found one positive sample that contained *E. multilocularis* eggs. Considering the above result, the observation indicated that the prevalence of intestinal parasites of foxes in the study site was quite low. For additional information, infection with trematodes, such as *Alaria alata*, could not be evaluated in this study, because fecal egg examination was performed by a floatation technique.

In conclusion, the present study revealed that the upper intestinal helminth fauna of the Tibetan sand fox and the red fox distributing in Qinghai is overlapped each other, and both fox species play an important role in the maintenance of taeniid cestodes. Therefore, the role of the foxes should be taken into consideration when countermeasures against echinococcosis or taeniosis (cysticercosis) are taken place.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We are grateful to the staff of the Laboratory of Veterinary Parasitic Diseases, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki and the staff of Academy of Animal and Veterinary Medicine, University of Qinghai for their valuable support. This work was supported by the Strategic Japanese-Chinese Cooperative Program of Japan Science and Technology Agency (JST), and by the Integrated Research Project for Human and Veterinary Medicine in University of Miyazaki funded by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan.

#### REFERENCES

1. Guo, Z. H., Kubo, M., Kudo, M., Nibe, K., Horii, Y. and Nonaka, N. 2011. Growth and genotypes of *Echinococcus granulosus* found in cattle imported from Australia and fattened in Japan. *Parasitol. Int.* **60**: 498–502. [Medline] [CrossRef]

2. Han, X., Wang, H., Qiu, J., Ma, X., Cai, H., Liu, P., Ding, Q., Dai, N., Ito, A. and Craig, P. S. 2006. Epidemiological study on *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* in Banma county of Qinghai province. *Chin. J. Zoonoses* **22**: 189–190 (in Chinese).
3. Harris, R. B., Wang, Z. H., Zou, J. K. and Liu, Q. X. 2008. Notes on biology of the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*). *Canid News* **11**: 1–7.
4. Jenkins, D. J., Romig, T. and Thompson, R. C. A. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.—a global update. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1205–1219. [Medline] [CrossRef]
5. Jiang, W., Liu, N., Zhang, G., Renqing, P., Xie, F., Li, T., Wang, Z. and Wang, X. 2012. Specific detection of *Echinococcus* spp. from the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*) and the red fox (*V. vulpes*) using copro-DNA PCR analysis. *Parasitol. Res.* **111**: 1531–1539. [Medline] [CrossRef]
6. Kugi, G. 1973. Studies on life-history of *Mesocestoides* (2). On tetrahyridium of *Mesocestoides litteratus* found from Japanese pheasant and copper pheasant. *J. Vet. Med.* **586**: 265–267 (JVM).
7. Liu, Q., Harris, R. B. and Wang, X. 2010. Food habits of the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*) in the Kunlun Mountains, Qinghai Province, China. *Mamm. Biol.* **75**: 283–286.
8. Martinez-Carrasco, C., Ruiz de Ybanez, M. R., Sagarminaga, J. L., Garijo, M. M., Moreno, F., Acosta, I., Hernandez, S. and Alonso, F. D. 2007. Parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Murchia, southeast Spain. *Revue Med. Vet.* **158**: 331–335.
9. Morishima, Y., Tsukada, H., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 1999. Evaluation of coproantigen diagnosis for natural *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Jpn. J. Vet. Res.* **46**: 185–189. [Medline]
10. Navajas, M., Cotton, D., Kreiter, S. and Gutierrez, J. 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.* **15**: 211–218. [Medline] [CrossRef]
11. Nonaka, N., Nakamura, S., Inoue, T., Oku, Y., Katakura, K., Matsumoto, J., Mathis, A., Chembesofu, M. and Phiri, I. G. K. 2011. Coprological survey of alimentary tract parasites in dogs from Zambia and evaluation of a coproantigen assay for canine echinococcosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **105**: 521–530. [Medline]
12. Nonaka, N., Sano, T., Inoue, T., Arumua, M. T., Fukui, D., Katakura, K. and 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**: 75–83. [Medline] [CrossRef]
13. R Development Core Team. 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna (cited 2013 April 2). Available from <http://www.R-project.org/>.
14. Raoul, F., Deplazes, P., Nonaka, N., Piarroux, R., Vuitton, D. A. and Giraudoux, P. 2001. Assessment of the epidemiological status of *Echinococcus multilocularis* in foxes in France using ELISA coprotests on fox faeces collected in the field. *Int. J. Parasitol.* **31**: 1579–1588. [Medline] [CrossRef]
15. Schaller, G. B. 1998. *Wildlife of the Tibetan Steppe*, University Chicago Press, Chicago.
16. Thompson, R. C. A. and McManus, D. F. 2001. Aetiology: parasites and life-cycle. pp. 1–16. In: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern (Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. X. and Pawlowski, Z. S. eds.), World Organization for Animal Health, Paris.
17. Tsukada, H., Hamazaki, K., Ganzorig, S., Iwaki, T., Konno, K., Lagapa, J. T., Matsuo, K., Ono, A., Shimizu, M., Sakai, H., Morishima, Y., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 2002. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelmintic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. *Parasitology* **125**: 119–129. [Medline] [CrossRef]
18. Wang, Z., Wang, X. and Liu, X. 2008. Echinococcosis in China, a review of the epidemiology of *Echinococcus* spp. *EcoHealth* **5**: 115–126. [Medline] [CrossRef]
19. Wozencraft, W. C. 2008. Family Canidae. pp. 416–422. In: *A Guide to the Mammals of China* (Smith, A. T. and Xie, Y. eds.), Princeton University Press, Princeton.
20. Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P. M., Craig, P. S. and Ito, A. 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.* **35**: 693–701. [Medline] [CrossRef]
21. Yimam, A. E., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 2002. Prevalence and intensity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides albus*) in Otaru city, Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* **49**: 287–296. [Medline]
22. Yu, S. H., Wang, H., Wu, X. H., Ma, X., Liu, P. Y., Liu, Y. F., Zhao, Y. M., Morishima, Y. and Kawanaka, M. 2008. Cystic and alveolar echinococcosis: an epidemiological survey in a Tibetan population in Southeast Qinghai, China. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**: 242–246. [Medline]
23. Zhang, J. X. and Wang, H. 2007. Epidemiological survey on *Echinococcus* infection in animals in Qinghai Province. *Chin. J. Parasitic Dis.* **25**: 350–352 (in Chinese with English abstract). [Medline]

# Characterization of a Surface Glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs

Hirokazu Kouguchi<sup>1</sup>, Jun Matsumoto<sup>2</sup>, Ryo Nakao<sup>3</sup>, Kimiaki Yamano<sup>1</sup>, Yuzaburo Oku<sup>4</sup>, Kinpei Yagi<sup>1\*</sup>

**1** Department of Infectious Diseases, Hokkaido Institute of Public Health, Sapporo, Japan, **2** Laboratory of Medical Zoology, Nihon University College of Bioresource Sciences, Fujisawa, Kanagawa, Japan, **3** Division of Bioinformatics, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan, **4** Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori, Japan

## Abstract

Alveolar echinococcosis is a refractory disease caused by the metacestode stage of *Echinococcus multilocularis*. The life cycle of this parasite is maintained primarily between foxes and many species of rodents; thus, dogs are thought to be a minor definitive host except in some endemic areas. However, dogs are highly susceptible to *E. multilocularis* infection. Because of the close contact between dogs and humans, infection of dogs with this parasite can be an important risk to human health. Therefore, new measures and tools to control and prevent parasite transmission required. Using 2-dimensional electrophoresis followed by western blot (2D-WB) analysis, a large glycoprotein component of protoscoleces was identified based on reactivity to intestinal IgA in dogs experimentally infected with *E. multilocularis*. This component, designated SRf1, was purified by gel filtration using a Superose 6 column. Glycosylation analysis and immunostaining revealed that SRf1 could be distinguished from Em2, a major mucin-type antigen of *E. multilocularis*. Dogs (n = 6) were immunized intranasally with 500 µg of SRf1 with cholera toxin subunit B by using a spray syringe, and a booster was given orally using an enteric capsule containing 15 mg of the same antigen. As a result, dogs immunized with this antigen showed an 87.6% reduction in worm numbers compared to control dogs (n = 5) who received only PBS administration. A weak serum antibody response was observed in SRf1-immunized dogs, but there was no correlation between antibody response and worm number. We demonstrated for the first time that mucosal immunization using SRf1, a glycoprotein component newly isolated from *E. multilocularis* protoscoleces, induced a protection response to *E. multilocularis* infection in dogs. Thus, our data indicated that mucosal immunization using surface antigens will be an important tool to facilitate the development of practical vaccines for definitive hosts.

**Citation:** Kouguchi H, Matsumoto J, Nakao R, Yamano K, Oku Y, et al. (2013) Characterization of a Surface Glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs. PLoS ONE 8(7): e69821. doi:10.1371/journal.pone.0069821

**Editor:** Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

**Received:** March 26, 2013; **Accepted:** June 12, 2013; **Published:** July 23, 2013

**Copyright:** © 2013 Kouguchi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) #23790404, #24790407 and Grant-in-Aid for Scientific Research (C) #23580433 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (MEXT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kinpei@iph.pref.hokkaido.jp

## Introduction

Alveolar echinococcosis (AE) is a serious public health problem in many endemic regions of the Northern Hemisphere [1]. Within the genus *Echinococcus*, the species that have major public health importance are *Echinococcus granulosus*, the causative agent of cystic echinococcosis (CE), and *E. multilocularis*, the causative agent of AE [2]. The life cycle of *E. multilocularis* is maintained between intermediate hosts, mainly rodents in the wild and definitive host wild carnivores. In human AE, infection is caused by accidental ingestion of parasite eggs excreted in the feces of carnivores such as foxes and dogs. As much as 10 or more years after the initial infection, metacestodes proliferate unrestrictedly into the liver and other organs, forming a tumor-like mass, which may cause organ dysfunction. Although the prevalence of *E. multilocularis* infection in humans is generally low, AE can be highly lethal because of the unlimited capacity for proliferation and metastasis of the parasitic lesions, unless appropriate treatment is administered.

Normally, the major definitive hosts of *E. multilocularis* are wild foxes, and dogs are not considered to play an important role in the natural transmission of the parasite, with the exception of highly endemic areas such as western China and part of Alaska [3–5]. However, dogs also possess high susceptibility to experimental infection with the adult parasite, suggesting that accidental infection of dogs with *E. multilocularis* could be an important source of AE infection in humans because of their close contact with their owners.

To control this zoonotic disease, some prevention programs have been implemented in various endemic areas. Distribution of baits containing praziquantel is an effective measure for reducing the infection rate of *E. multilocularis* in wild foxes. Some studies have reported that bait distribution achieved significant level of (from 30 to 50%) reduction in the prevalence of *E. multilocularis* within 18 months [5–8]. Likewise, prevention programs, including repeated treatment of dogs with praziquantel and health education for dog owners, resulted in a significant reduction in *E. granulosus* infections [9]. However, to maintain such effectiveness, it is

necessary to conduct these prevention programs over a long-term period, which would place a significant economic burden on society. Therefore, it is necessary to establish new measures to reduce the risk of parasite transmission from the definitive host to humans. The development of effective vaccines can provide new measures for the long-term control of this parasite.

Limited knowledge is available regarding immunology-based protective responses to *Echinococcus* infection in definitive hosts due to controversial reports [10]. In fact, a few studies have demonstrated acquired immunity to *E. multilocularis* in canids. In particular, whether this parasite stimulates an acquired immune response in the intestines of canids is still debatable [11]. Tanaka et al. showed that repeated experimental infection in 2 dogs with *E. multilocularis* resulted in a significant reduction in worm burden in dogs [12]. Similar results were observed in dogs infected with *E. granulosus* [13]. Early attempts, including generating immunity in dogs through vaccination with various native antigens from *E. granulosus*, induced significant levels of protection [14–16]. Recently, Zhang et al. showed that subcutaneous vaccination with a series of *egM* recombinant antigens provided very high levels of protection against *E. granulosus* in dogs [17]. Petavy et al. reported that an oral recombinant vaccine against *E. granulosus* showed promise with respect to resisting CE in dogs [18]. These experimental results suggest that prevention of the disease by vaccination is possible and that dogs can generate a high degree of protective immunity against parasites. On the other hand, these above-mentioned reports have been criticized in terms of their statistical analyses [10]; therefore, additional supporting data are needed. Moreover, there has been little progress in the development of a vaccine against *E. multilocularis* in dogs.

IgA is widely accepted as a protective molecule in the gut; in particular, IgA binds to bacteria or gut-dwelling parasites, exerting its key function as an initial barrier to infection. Thus, research in mucosal immunology is focused on developing new approaches for mucosal vaccines [19].

In this report, we identified a potential vaccine candidate based on reactivity to intestinal IgA from dogs infected with *E. multilocularis*. We describe, for the first time, that this antigen shows mucosal vaccine potential against *E. multilocularis* infection in dogs.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

This study was performed in strict accordance with the Guidelines for Animal Experimentation of the Japanese Association for Laboratory Animal Science, and the protocol for the animal experiments was approved by the ethics committee of the Hokkaido Institute of Public Health (permit number: K23-02). All the surgeries were performed under sodium pentobarbital anesthesia, and every effort was made to minimize suffering.

### Parasite Materials

*E. multilocularis* (Nemuro strain) was obtained from a dog-cotton rat life cycle routinely maintained at the Hokkaido Institute of Public Health. Protoscoleces were collected from cysts developed in cotton rats at 10–14 months after infection and were washed 7 times with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl (PBS) with penicillin G (500 IU/mL) and streptomycin (1 mg/mL). Adult worms were collected on day 35 postinfection from the infected dogs. The worms were first released from the intestinal contents by soaking them in PBS to remove intestinal mucus and were then rinsed several times in PBS. These materials were used to prepare vaccine antigens and

crude extracts for 2D-WB analysis. All experiments in this study were performed in a specially designed safety facility (biosafety level 3) at the Hokkaido Institute of Public Health, Sapporo, Japan.

### Collection of Serum and Intestinal Swab Samples

All the dogs used in this study were purchased from Sankyo Lab Service Co. Ltd. (Sapporo, Japan). To collect serum and intestinal swab samples, 6 dogs (female beagles, 3–16 months old) were divided into 3 groups and were used for experimental infection. Dogs in group 1 were infected once. Dogs in groups 2 and 3 were infected 3 and 5 times, respectively. All experimental infections were performed by oral administration of  $5 \times 10^5$  *E. multilocularis* protoscoleces, and the infection was terminated on day 35 postinfection by administering praziquantel. Repeated infections were performed with at least 1-week intervals between infections.

Serum samples were collected every week after infection from infected dogs, and sera were stored individually at  $-30^\circ\text{C}$  until use. Interstitial swab samples were collected from the small intestine of infected dogs. The small intestine was divided into 6 sections, and the central 3 sections of the intestine were opened with sterile scissors. Secretions were wiped as equivalently as possible with a sterile cotton swab and placed into tubes in 2 mL PBS containing protease inhibitor cocktail (Roche), streptomycin, and penicillin G. The tubes were immediately placed in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Each group of intestinal swab samples was pooled and used in 2D-WB analysis.

### Purification of a Vaccine Antigen from *E. multilocularis* Protoscoleces

Approximately 1.4 mL of the washed protoscoleces was transferred to a polystyrene test tube (17×100 mm) containing 5 mL PBS supplemented with 2.4% Triton X-100. Following gentle shaking for 3 min at room temperature, the suspension was sonicated 6 times for 10 s with a probe-type ultrasonic generator (UCD-130, Tosho Electronic Co.) at  $4^\circ\text{C}$  to obtain a crude extract of protoscoleces. The crude extract was centrifuged for 15 min at 3,500 rpm, and the clarified supernatant was dialyzed against distilled water overnight. The dialyzed solution was separated into aliquots of approximately 5 mL in a small vial and lyophilized. This sample was used as the protoscoleces crude extract (PCE). The PCE was dissolved in 1 mL distilled water and an appropriate amount of protease inhibitor cocktail (complete EDTA free, Roche). Two hundred microliters of the dissolved crude extract was centrifuged to remove insoluble materials and applied to a Superose 6 10/300GL column fitted on an AKTA explorer (GE Healthcare) equilibrated with PBS at a flow rate of 0.3 mL/min. The fraction eluted at the void volume (7.5 to 9 mL) was used as the vaccine antigen and was designated SRf1. Elution positions of thyroglobulin (669 kDa) and aldolase (158 kDa) were determined in a separate run under identical conditions. The purity of SRf1 was determined by densitometric analysis of Coomassie brilliant blue-stained SDS-PAGE gels by using the UN-SCAN-IT ver. 6.1 software (Silk Scientific, Inc., Orem, UT, USA). BSA was used as a standard.

### 2D-PAGE and Western Blotting

2D-PAGE followed by western blot (2D-WB) analysis was performed as described previously [20]. Briefly, 120  $\mu\text{g}$  of crude extract from adult worms (i.e., ACE) or PCE was applied to 2D-PAGE. The separated proteins were stained with CBB or reagents in a Pro-Q Emerald 300 glycoprotein gel kit (Molecular Probes, Inc.), as recommended by the manufacturer. After 2D-PAGE, the