

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580353
 研究課題名（和文） エキノコックス終宿主動物の感染早期における確定診断と
 感染犬届け出基準の見直し
 研究課題名（英文） Diagnosis for *Echinococcus* definitive hosts in the early phase
 of infection and reconsideration of criteria for canine infection
 研究代表者
 野中 成晃（NONAKA NARIAKI）
 宮崎大学・農学部獣医学科・准教授
 研究者番号：50281853

研究成果の概要：

エキノコックス終宿主動物の感染早期（感染後約4週間の虫卵排出前期）において宿主糞便中に排出されるエキノコックス DNA の PCR 検出法を開発した。高感度プライマーの設計、PCR 粗阻害物質除去など DNA 抽出法や反応条件を最適化し、その信頼性を検証したところ、感染早期では DNA 検出率は 26～73%と散発的であったが、宿主を駆虫して得られる駆虫後糞便を検査することにより DNA 検出率は 100%となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用獣医学

キーワード：人畜共通感染症, エキノコックス, 犬, PCR, 診断

1. 研究開始当初の背景

エキノコックス（多包条虫）は北海道に広く蔓延する人獣共通寄生虫であり、主に野生動物間で維持されている。人は終宿主の糞便中に排泄された虫卵を食べることにより感染する。主な終宿主はキツネであるが、人との接触が多い犬もキツネと同様に終宿主となり、人への感染源となる。近年我々が行った飼育犬の調査では、4,768頭中18頭（0.4%）に感染を確認した。さらに、北海道から本州への移動犬において、2頭の感染例が報告されており、動物の移動に伴うエ

キノコックスの本州への侵入・定着が危惧されている。

この状況を受けて、感染症法が改正され、2004年10月から獣医師によるエキノコックス感染犬の届け出制が施行された。厚生労働省のガイドラインでは、エキノコックス感染犬の届け出について、3つの基準が設けられている。1) 病原体の検出：虫体または片節を確認した場合。2) DNAの検出：虫体または虫卵から多包条虫DNAを検出した場合。3) 抗原の検出：犬の糞便中にエキノコックス成虫の排泄分泌物（抗原）を検

出した場合。ただし、駆虫治療の結果、抗原が不検出になったものに限る。

犬は、エキノコックスに感染してから1ヵ月ほどして虫卵を出し始める。感染直後の1ヵ月は虫体が未熟なため、虫卵は出てこない。上記のように、DNA検査は排出された虫体あるいは虫卵を対象に検証されてきており、この虫卵排出前の1ヵ月間におけるDNA診断の有効性については検証されてこなかった。この期間における診断で威力を発揮するのが抗原の検出であるが、若干の偽陽性反応が見られることから、たとえ、駆虫治療の結果、抗原が不検出になったとしても、感染の可能性が非常に高いと判断できるが、そのみで確定診断することはできないのが現状である。

また、感染早期における確定診断の必要性は、犬のエキノコックス検査依頼の理由からも伺える。我々が行った犬の飼い主に対するアンケート調査では、その検査依頼理由として、「自分の飼い犬がネズミを食べたところを見たから」、あるいは、「放し飼いをして、ネズミを食べた可能性があるから」などの理由が多く含まれ、感染早期に診断を行う機会は決して少なくない。したがって、感染早期における確定診断法の確立は社会的急務である。

2. 研究の目的

本研究は、エキノコックス感染犬の虫卵排泄前期における確定診断法を確立し、現在施行されているエキノコックス犬届け出制の届け出基準を見直すことを目的とする。具体的には、犬を用いた感染実験を行い、虫卵排出前の期間に犬の糞便からエキノコックスのDNAを検出できるかどうかをPCR法により検討するとともに、現行の診断法と比較する。その際、糞便中に存在するPCR阻害物質の除去方法、感度および特異性の高いエキノコックス特異プライマーの構築およびPCRの方法も比較検討する。さらに、より積極的な診断法として、虫卵排出前の期間に駆虫を行い、駆虫後の駆虫虫体のDNA検出の可能性についても検討する。さらに、北海道で捕獲されたキツネ材料や海外共同研究者 (Dr. Isaac G. K. Phiri, University of Zambia) がザンビアで採取する犬の糞便材料を用いて、糞便DNA検出の信頼性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 糞便内DNA検出法の開発

これまでに報告された多包条虫特異的プライマーのGC比をあげるなど、より感度が向上するように新しく高感度プライマーを構築して、糞便からのDNA検出に最も適したプライマーを選別した。次に、糞便からの

DNA検出に適すると思われるPCR kitをいくつか選定し、上記で選択したプライマーとの組み合わせで、糞便からのDNA検出に最も適したPCR kitを選別した。

(2) 糞便内PCR阻害物質除去法の検討

糞便中の多糖類や胆汁酸など、PCRを阻害する様々な物質を除去する既知の手法と、現在市販されている糞便内DNA抽出kitを比較検討し、犬糞便からのDNA検出に最も適した方法を選別した。

(3) 感染実験

ビーグル犬を用いてエキノコックス成虫の感染実験を行った。エキノコックスは感染後最短で26日目から虫卵を排出することがわかっているため、実験供与犬は感染後3週目（虫卵排出前）に安楽殺し、解剖検査により感染虫体数を計測した。糞便は感染前から終了日まで毎日採取し、糞便内抗原検査と糞便内DNA検査を行って、両検査の信頼性を評価した。

(4) 駆虫実験

ビーグル犬を用いてエキノコックス成虫の感染実験を行い、感染後2週目に駆虫薬・プラジカンテルにより駆虫を行った。実験供与犬は感染後3週目に安楽殺し、解剖検査により感染虫体が駆虫されたことを確認した。糞便を感染前から終了日まで毎日採取し、糞便内抗原検査と糞便内DNA検査を行って、両検査の信頼性を評価した。特に、駆虫後の材料採取はこまめ（数時間ごと）に行い、駆虫された虫体DNAの糞便中への排出時期を特定した。また、虫卵を含む便の糞食による検査結果への影響を検証した。

(5) 北海道の犬・猫材料の利用

犬・猫のエキノコックス検査（虫卵検査および糞便内抗原検査）を行っている環境動物フォーラム (FEA) から、糞便内抗原検査陽性となった動物の糞便（駆虫前後の糞便を含む）を提供してもらい、糞便内DNA検出法によるエキノコックス特異的DNAの検出を検証した。材料を提供してもらう飼い主には、糞便材料を研究に用いることへの合意を事前に取り、DNA検査結果を通知した。

(6) キツネ材料の利用

疫学調査のために野外で採取した糞便について、表面洗浄液中に存在するDNAから糞主動物の特定を行った。同材料（表面洗浄液）を用いて、開発した糞便内DNA検出法による検査を行い、糞便内DNA検査の有用性を検討した。

(7) ザンビアの犬材料の利用

らの検査方法を感染犬届け出基準に組み入れるためには、今後、臨床材料による検討数を増やす必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1) Nonaka, N., Kamiya, M. and 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." *Journal of Veterinary Medical Science* 71(1): 105-107. 査読：有

2) Nonaka, N., Kamiya, M., Kobayashi, F., Ganzorig, S., Ando, S., Yagi, K., Iwaki, T., Inoue, T. and Oku, Y. (2009). "*Echinococcus multilocularis* infection in pet dogs in Japan." *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 9(2): 201-205. 査読：有

3) Lagapa, J. T., Oku, Y., Kaneko, M., Ganzorig, S., Ono, T., Nonaka, N., Kobayashi, F. and Kamiya, M. (2009). "Monitoring of environmental contamination by *Echinococcus multilocularis* in an urban fringe forest part in Hokkaido, Japan." *Environmental Health and Preventive Medicine* 118(4): 576-582. 査読：有

4) Oku, Y., Nonaka, N., Matsumoto, J., Arumua, M. T., Sugimoto, C., Watanabe, J., Toyoda, A. and Kamiya, M. (2008). "On a comprehensive full-length cDNA library of larval *Echinococcus multilocularis*." *Japanese Journal of Veterinary Parasitology* 6(2): 80. 査読：無

5) Nonaka, N., Hirokawa, H., Inoue, T., Nakao, R., Ganzorig, S., Kobayashi, F., Kamiya, M. and Oku, Y. (2008). "A first record of a cat excreting *Echinococcus multilocularis* eggs in Japan." *Japanese Journal of Veterinary Parasitology* 6(2): 79. 査読：無

6) Matsumoto, J., Nonaka, N., Katakura, K. and Oku, Y. (2008). "Molecular mechanisms involved in the growth and development of *Echinococcus multilocularis* metacystodes." *Japanese Journal of*

Veterinary Parasitology 6(1): 7-12. 査読：無

7) Matsumoto, J., Sakamoto, K., Shinjyo, N., Kido, Y., Yamamoto, N., Yagi, K., Miyoshi, H., Nonaka, N., Katakura, K., Kita, K. and Oku, Y. (2008). "Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of alveolar echinococcosis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(1): 164-170. 査読：有

8) Nonaka, N., Hirokawa, H., Inoue, T., Nakao, R., Ganzorig, S., Kobayashi, F., Inagaki, M., Egoshi, K., Kamiya, M. and Oku, Y. (2008). "The first instance of a cat excreting *Echinococcus multilocularis* eggs in Japan." *Parasitology International* 57(4): 519-520. 査読：有

9) Nonaka, N., Oka, M., Kamiya, M. and Oku, Y. (2008). "A latex agglutination test for the detection of *Echinococcus multilocularis* coproantigen in the definitive hosts." *Veterinary Parasitology* 152(3-4): 278-283. 査読：有

10) Oku, Y., Iwaki, T., Ganzorig, S., Nonaka, N., Miyahara, T., Okazaki, K. and Kamiya, M. (2007). "Control trial against *Echinococcus multilocularis* by local residents." *Japanese Journal of Veterinary Parasitology* 5(2): 36. 査読：無

11) 奥祐三郎, 巖城隆, スミヤ・ガンゾリク, 野中成晃, 井上貴史, 宮原俊之, 岡崎克則 and 神谷正男 (2007). "北海道のエキノコックス感染源対策の試みと今後の住民参加." *獣医畜産新報* 60(5): 376-378. 査読：無

12) Inoue, T., Nonaka, N., Kanai, Y., Iwaki, T., Kamiya, M. and Oku, Y. (2007). "The use of tetracycline in anthelmintic baits to assess baiting rate and drug efficacy against *Echinococcus multilocularis* in foxes." *Veterinary Parasitology* 150(1-2): 88-96. 査読：有

13) Inagakai, M., Nonaka, N., Inoue, T., Yagi, K., Katakura, K. and Oku, Y. (2007). "Improvement of copro-DNA detection for diagnosis in prepatent period of *Echinococcus multilocularis* infection in

dogs.” Japanese Journal of Veterinary Parasitology 5(2): 35. 査読：無

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) 野中成晃. 犬用エキノコックス迅速診断キット「エキット」の信頼性と有用性について. 北海道小動物獣医師会 2008 年次大会, 2008 年 11 月 1 日, 札幌市・ロイトンサッポロ
- 2) 神谷正男. 犬エキノコックス症の糞便内抗原簡易検出キット「エキット」の評価と感染源対策への応用. 第 8 回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 2008 年 11 月 1 日, 東京都港区・北里大学薬学部コンベンションホール
- 3) 野中成晃. 犬のエキノコックス症診断のための糞便内抗原簡易検出キット「エキット」の評価. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 24-26 日, 宮崎市・ワールドコンベンションセンター
- 4) 奥祐三郎. 多包条虫の網羅的 cDNA ライブラリーの in silico 解析、特にプロテアーゼ類について. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 24-26 日, 宮崎市・ワールドコンベンションセンター
- 5) 中村星太, ザンビアの牛から検出された単包条虫の genotype について. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 24-26 日, 宮崎市・ワールドコンベンションセンター
- 6) Nonaka, N. Development of a multiplex PCR to identify carnivore origins of feces for applying to epizootiological surveys of *Echinococcus multilocularis* in Hokkaido, Japan. The 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Medicine, 2007 年 8 月 23 日, ベルギー・ゲント・国際会議センター
- 7) Oku, Y. Anthelmintic baiting to wild foxes by local residents for the control of alveolar echinococcosis in Hokkaido (Koshimizu and Kutchan), Japan. The 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Medicine, 2007 年 8 月 23 日, ベルギー・ゲント・国際会議センター
- 8) 奥祐三郎. 多包虫の網羅的 cDNA ライブラリーについて. 第 54 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2007 年 9 月 21 日, 宮城県, 仙台市・宮城大学

9) 野中成晃. ザンビアにおける飼育犬の消化管内寄生虫調査. 第 54 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2007 年 9 月 21 日, 宮城県, 仙台市・宮城大学

10) 奥祐三郎. 多包虫の網羅的 cDNA ライブラリーについて. 第 144 回日本獣医学会, 2007 年 9 月 2 日, 北海道, 江別市・酪農学園大学

11) 野中成晃. 本邦初報告となる飼育猫からの多包条虫卵の排泄. 第 144 回日本獣医学会, 2007 年 9 月 2 日, 北海道, 江別市・酪農学園大学

12) Cabrera, P. Prevalence study of *Echinococcus granulosus* and other parasites by three diagnostic techniques in rural farms in Uruguay. The 22nd International Congress of Hydatidology & International Symposium of Zoonosis, 2007 年 5 月 15-19 日, ギリシャ・アテネ・ヒルトンホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 成晃 (NONAKA NARIAKI)
宮崎大学・農学部獣医学科・准教授
研究者番号：50281853

(2) 研究分担者

片倉 賢 (KATAKURA KEN)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：10130155

奥 祐三郎 (OKU YUZABURO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：60133716

(3) 連携研究者

なし