

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580351

研究課題名（和文）南九州の放牧牛における腓蛭類の簡易診断法の開発と疫学調査

研究課題名（英文）Development of a conventional diagnostic method for *Eurytrema* and conducting an epidemiological survey on grazing cattle in South Kyushu

研究代表者

野中 成晃（NONAKA NARIAKI）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：50281853

研究成果の概要（和文）：牛の腓蛭および小形腓蛭の生体診断法として、ナイロンメッシュ濾過虫卵検査法および糞便内抗原検査法を開発した。日本各地および海外（ブラジル、ベトナム）から得た虫体の遺伝子を解析して2種の種としての独立性を明らかにしたが、一方で、形態学的鑑別が困難であることを示した。さらに、これまで詳細な検討がなかった治療法として、プラジカンテル 25mg/kg 1回経口投与が有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Two methods for diagnosis of *Eurytrema pancreaticum* and *E. coelomaticum*, called nylon-mesh filtration egg detection method and coproantigen detection method, were developed. DNA analysis on the trematodes collected in Japan, Brazil and Vietnam revealed that the two species of *Eurytrema* are the independent species, however, they could not be distinguished each other completely by their morphology. For treatment of the infection, it was found that one oral administration with 25 mg/kg of praziquantel was effective.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：疫学・腓蛭・分子生物学

1. 研究開始当初の背景

腓蛭（腓吸虫）類は牛や反芻動物の腓管に寄生する二生吸虫科の吸虫で、腓蛭（*Eurytrema pancreaticum*）と小形腓蛭（*Eurytrema coelomaticum*）の2種が知られている。人の感染例も報告されており、人獣共通感染症の原因の一つである。腓蛭はアジアや南アメリカを中心に分布し、マダガスカル島やロシアでも報告がある。小形腓蛭はブ

ラジルに広く分布し、中国やヨーロッパでも確認されている。日本においては、腓蛭は北海道から沖縄まで、小形腓蛭は関東以西に分布し、とくに九州本島の高原牧草地や八丈島、隠岐島、佐渡島、奄美大島、石垣島などの離島に多いとされるが、両種を区別し、かつ生体を対象とした詳細な疫学調査（感染状況や地域差などの検討）はこれまで行われてこなかった。

膵蛭類の成虫は扁平な木の葉状を呈し、生時は赤色を示す。虫卵は宿主の糞便とともに排出される。虫卵が第一中間宿主のオナジマイマイやウスカワマイマイ等の陸棲巻き貝に食べられると、ミラシジウムが消化管内で孵化し、巻き貝体内でスポロシスト、娘スポロシストと発育する。娘スポロシストはその体内に多数のセルカリアを形成し、貝の呼吸孔から外界に出る。娘スポロシストが第二中間宿主のササキリに食べられると、セルカリアは消化管から体腔や脳に移動して被囊シメタセルカリアになる。感染ササキリが草と一っしょにウシなどの終宿主に食べられると、メタセルカリアは終宿主の腸内で脱囊して膵管に入り成虫になる。なお、反芻動物に加えウサギが成虫感染を受けることが知られており、放牧地における保虫宿主としての重要性が指摘されている。

感染動物の症状は一般的に軽度とされ、内分泌系や血糖値にあまり影響は与えないが、虫塊による膵管の物理的障害が大きと言われる。そのため、多数寄生では膵臓機能障害に起因する消化障害や下痢、栄養低下による消瘦などが見られる。特に、小形膵蛭は虫体が小さく、膵管細末部や膵実質にまで侵入するため、膵管のカタル性炎、管壁の繊維性肥厚、上皮の過形成、リンパ浸潤などがみられ、細菌の二次感染を伴って、慢性間質性膵炎（膵硬変）を併発する。

このように膵蛭の病原性は無視できないものである。にもかかわらず、治療法や疫学の解析が進んでいないのは、膵蛭の生前診断において信頼性の高い診断法がないことが原因の一つとしてあげられる。生前診断で有効な方法は、血清抗体検査と糞便内虫卵検査であるが、抗体検査法は実用化されていないものがない。また膵蛭類は産仔能力(虫卵排泄量)が非常に低く、糞便内虫卵検査で虫卵を検出するためには数日間連続して糞便を検査しなければ高い信頼性が得られないと言われている。さらに、膵蛭と小形膵蛭は虫卵の大きさに若干の違いがあるが、計測値はオーバーラップしており厳密に区別することはできない。加えて、膵蛭類の虫卵は比重が重いので、効率的に糞便夾雑物と虫卵を分離できる浮遊法を用いることができない。代替法として、肝蛭卵検査用に開発された各種沈殿集卵法が検査に用いられるが、膵蛭卵は肝蛭卵よりも小さく鏡検に時間を要するうえ、そもそも沈殿法は糞便夾雑物と虫卵の分離が不十分であるために、膵蛭卵検査にはかなりの労力と時間を要する。このため、生体を対象とした大規模な疫学調査を実施することが困難であった。

また、治療法についても、ニトロキシニルやプラジカンテルの複数回投与等が推奨されているが、これらの検討は個々の症例につ

いての結果であり、駆虫薬やその有効量を詳細に比較検討した研究はなく、有効な治療法は確立されていない。その原因の一つとして、迅速に行える信頼性の高い検査法がなく駆虫薬投与後の駆虫効果の判定が困難であったことがあげられる。

さて、この膵蛭と小形膵蛭であるが、成虫虫体の大きさ、口吸盤と腹吸盤の直径の比、精巣および卵巣の形状の違いから別種として扱われてきた。一方で、小形膵蛭は膵蛭の発達途中のものであるという説もあり、膵蛭と小形膵蛭の種としての独立性については議論の余地が残る。小形膵蛭の方が感染数も多く、病原性が高いとされるが、いままで、小形膵蛭と思われていたものの中には膵蛭の発育が不十分なものが混同されていた可能性もある。このように、膵蛭と小形膵蛭について今まで報告されてきた感染態度や病原性の違いについては再検討の必要がある。さらに、膵蛭類については遺伝子配列の違いに対する検討はほとんどなく、GenBankに登録されている膵蛭と小形膵蛭の遺伝子情報は一つだけである。

2. 研究の目的

膵蛭および小形膵蛭は牛や反芻動物の膵管に寄生する吸虫で、感染動物では膵臓機能障害に起因する消化障害を引き起こす。日本では全土に分布するが、特に九州の高原地域や離島で問題となっている。しかしながら、牛生体に対する迅速で信頼性の高い検査法がなく、両種の地域別流行状況や流行要因などについての詳細な検討がない。さらに、膵蛭と小形膵蛭の種としての独立性については多くの議論があり、成虫の形態解析から別種と判断されているが、遺伝子配列からの検討はほとんどない。本研究では、牛生体に対する診断法として、ナイロンメッシュを用いて効率的に糞便夾雑物を取り除くナイロンメッシュ濾過虫卵検査法および膵蛭類の排泄・分泌物を牛糞便中において捕らえる糞便内抗原検査法を開発する。また、疫学調査を行って九州南部を中心に膵蛭類の感染状況を明らかにする。さらに、膵蛭および小形膵蛭の形態と遺伝子を解析し種としての独立性を明らかにする。加えて、これまで詳細な検討がなかった感染動物の治療法について、開発した診断法を駆虫の判定法として用いることで、有効な治療法を確立する。

3. 研究の方法

3-1. 材料

膵蛭類の虫体および感染牛の糞便は、沖縄県石垣市、島根県大田市、東京都港区の食肉衛生検査所、沖縄県八重山諸島の農家、東海大学、北海道大学の協力を得て収集した。

3-2. 膵蛭類感染牛の簡易診断法の開発

a) ナイロンメッシュ濾過虫卵検査法

ナイロンメッシュには精度が高く耐久性に富む合成繊維網（ナイロンメッシュ・ボルディングクロス、NYTAL 製）を用いた。膝蛭類の虫卵の大きさがおよそ 40-60 x 23-40 μm であることを考え、虫卵が通過する最小の目開きのメッシュと虫卵が通過しない最大の目開きのメッシュを使用して、効率的に糞便夾雑物と虫卵の分離を試みた。糞便をまず肝蛭用（目開き 150 μm ）金網メッシュに通して大きな夾雑物を除去した後、簡易沈殿を行い、その沈渣を、加工した 50ml 遠沈管に取り付けた各種メッシュに通し、メッシュ不通過物および通過物を精査して、検査に用いるメッシュを選択した。

次に、沖縄県石垣市および島根県大田市の食肉衛生検査所から、感染牛の全膝蛭虫体と直腸便を収集し、膝臓の感染虫体数と糞便 1 グラムあたりの虫卵数（EPG）を測定した。感染牛における感染虫体数の度数分布と EPG の関係を比較検討し、ナイロンメッシュ濾過虫卵検査法の信頼性を評価した。

b) 糞便内抗原検査法

屠畜場から得た膝蛭成虫から粗（Somatic）抗原を作成した。また、膝蛭成虫の室内培養を行い、その培養上清から成虫の排泄・分泌（ES）抗原を作成した。次に、ウサギを用いて各抗原に対するポリクローナル抗体を作成した。抗体の一部をビオチン化し、作成したポリクローナル抗体の組み合わせを比較検討して、牛の糞便中に排泄された膝蛭の抗原（分泌・排泄物）を挟んで補足するサンドイッチ ELISA 法の開発を試みた。

3-3. 膝蛭と小形膝蛭の種の独立性の検討

東京都港区、島根県大田市、沖縄県石垣市、ブラジル、ベトナムの屠場で採取した虫体計 125 検体について、吸虫類で遺伝子情報の多いミトコンドリア cytochrome oxidase c subunit 1 (CO1) や核 Internal transcribed spacer 2 (ITS2) などの塩基配列を PCR-direct sequencing 法により解読し、遺伝学的にグループ（遺伝子型）分けを行った。その後、各遺伝子型の形態学的特徴を解析し、遺伝子型と膝蛭および小形膝蛭の関係を評価した。

3-4. 疫学調査

今回、膝蛭類の材料が入手できた日本の牛は黒毛和種のみである。黒毛和種は肥育期に入るとほとんどが舎飼いとなるため、放牧時に感染すると考えられる膝蛭は、育成期での感染、すなわち、生産地で感染した可能性が高い。そこで、家畜個体識別システムを利用して、上記の 3 つの屠畜場において膝蛭虫体を採取した牛の生産地を調べ、膝蛭と小形膝蛭の日本における分布状況を解析

した。

3-5. 治療法の検討

沖縄県八重山諸島において、和牛農家で飼育されている牛の感染状況を調べ、感染牛に対して、ブラジカンテルを 25mg/kg および 50mg/kg、1 回経口投与し、治療効果の評価を開発したナイロンメッシュ濾過虫卵検査法で行った。

4. 研究成果

4-1. ナイロンメッシュ濾過虫卵検査法

検査法の条件設定に用いた糞便は膝蛭重度感染牛から得たもので EPG は 22 であった。糞便は肝蛭用（目開き 150 μm ）金網メッシュを通した後、500ml のビーカーにて 3 回簡易沈殿を行い、沈渣を 60 μm 、41 μm および 20 μm のナイロンメッシュに通した。メッシュ不通過物および通過物を検査したところ、ほぼすべての虫卵が 20 μm メッシュにトラップされることがわかった。糞便量を変えて検査したところ、5 g までは糞便中に含まれるほぼすべての虫卵が 20 μm メッシュにトラップされていたが 10 g 以上では処理課程での虫卵ロスが多くなった。本法では検査対象物（20 μm メッシュ不通過物）の量が極めて少なく、5 g の糞便を検査することで、検査の効率化が図れることがわかった。

島根県および沖縄県の食肉衛生検査所で採取した膝蛭類感染牛の虫体および糞便を用いて、ナイロンメッシュ濾過虫卵検査法の信頼性を評価した。寄生虫体数と糞便 10 g（5 g 糞便を 2 回検査）の虫卵検査結果を比較した結果、48 検体中 47 検体において虫卵が認められた。虫卵が検出されなかった検体は寄生虫体数が 5 匹であったが、寄生虫体数が 5 匹以下の他の 9 検体からは虫卵が検出されており、本法が高い信頼性を持つことが示された。

4-2. 糞便内抗原検査法

島根県大田市食肉衛生検査所の協力により得た膝蛭類の虫体を用いて somatic 抗原を、虫体の培養上清から ES 抗原をそれぞれ作成し、これらの抗原をウサギに免役してポリクローナル抗体を作成した。得られたポリクローナル抗体の一部をビオチン化した。これらの抗体および抗原を用いてサンドイッチ ELISA の各種条件設定を行った結果、粗抗原 0.5ng を検出できる assay 系を開発することができた。次に、検査に供する糞便液濃度を検討した結果、糞便の 2 倍希釈液から得られる高濃度の糞便上清でも、抗原検出に影響がないことがわかり、膝蛭感染牛の検査法として期待できる結果が得られた。

4-3. 膝蛭類の遺伝学的隔離の評価と形態

学的鑑別に関する検討

膝蛭と小形膝蛭の遺伝学的隔離を遺伝学的に評価し、形態学的な差異との関連性を解析した。東京都港区、島根県大田市、沖縄県石垣市、ブラジル、ベトナムの屠場で採取した虫体計 125 検体について、核 ITS2 とミトコンドリア CO1 遺伝子の PCR および塩基配列解読を行ったところ、103 検体で両領域の配列が得られた。系統樹解析では、両領域ともに 2 つのメインクレード (ITS2: α , β ; CO1: a, b) に分かれ、69 検体および 33 検体が α -a (遺伝子型 A) および β -b (遺伝子型 B) の組み合わせに含まれた。これらの虫体について、形態分類に利用される体長、体幅、口吸盤径/腹吸盤径比、精巢分葉、卵巣分葉の 5 項目について評価したところ、遺伝子型 A は 48/69 (69.6%) において 4 項目以上で膝蛭の、遺伝子型 B は 7/33 (21.2%) において 4 項目以上で小形膝蛭の特徴を示し、遺伝子型 A は膝蛭、遺伝子型 B は小形膝蛭であると考えられた。しかし、残りは形態学的に鑑別できない虫体であった。このことから、膝蛭と小形膝蛭は遺伝学的に区別できるものの、形態学的には完全な区別が困難であることがわかった。

4-4. 疫学に関する検討

感染牛の産地が感染場所と考えられることから産地別に感染種をみると、島根県、九州内部からは膝蛭のみが、沖縄県本島・鹿児島県徳之島では小形膝蛭のみが、沖縄県八重山諸島では両種が検出され、2 種の分布には地域的な偏りが存在すると考えられた。

また、ブラジルには小形膝蛭のみ分布すると考えられていたが、今回入手した虫体には膝蛭も小形膝蛭も含まれており、ブラジルには両種が分布することがわかった。ベトナムから入手した虫体にも膝蛭と小形膝蛭が含まれていた。

一方、膝蛭類の CO1 および ITS2 遺伝子の系統樹で得られたメインクレード内の変異は小さく、さらに、ブラジルおよびベトナム産膝蛭類の塩基配列は日本産膝蛭類の変位幅に収まることから、膝蛭類の種内変異は非常に小さいものであることが推察された。

さらに、感染牛の糞便から虫卵を回収し、虫卵破碎後に虫卵 DNA を抽出して PCR direct sequence を行うことにより、膝蛭と小形膝蛭を遺伝学的に鑑別することができた。したがって、膝蛭と小形膝蛭の分布域調査は、屠体から回収する虫体を必ずしも使用する必要はなく、糞便内の虫卵を用いて行うことが可能であることがわかった。本法は、疫学調査の強力なツールとなることが示唆された。

4-5. 駆虫試験

沖縄県八重山諸島で検出した膝蛭類虫卵

排出牛 13 頭に対して、プラジカンテル 25mg/kg および 50mg/kg を 1 回経口投与して駆虫試験を実施した結果、全頭で投与後 7 日以内に糞便内虫卵が陰転し、これまでの報告よりも低用量のプラジカンテル、すなわち 25mg/kg 1 回経口投与で完全な駆虫が可能であることがわかった。本用量で虫体は死滅すると考えられるが、駆虫薬投与後 3 日目の糞便からは虫卵が検出されることから、駆虫後の検査においては、膀胱内に残った虫体から徐々に排泄される虫卵の検出を避けるため、駆虫薬投与後 7 日目を以降の判定が望ましいことがわかった。

4-6. 国内外における位置づけとインパクト

膝蛭類の遺伝子塩基配列情報は中国のグループによる 18SrRNA の塩基配列以外に報告がなく、本研究により得られた CO1 および ITS2 の塩基配列に関する知見は、今後の国内外における膝蛭類の分子疫学や分子診断の基礎情報となる。

また、本研究により、膝蛭と小形膝蛭は遺伝学的に隔離された独立グループであるが、これらを形態のみで完全に鑑別することができないことがわかった。すなわち、今後の膝蛭と小形膝蛭の鑑別は遺伝子情報に基づいて行うべきであることを示している。さらに、この事実はこれまでの形態学に基づいて区別してきた膝蛭と小形膝蛭に関する知見に混同や誤認があることを暗示しており、今後は遺伝子情報に基づいた同定を行って各種の知見を再構築する必要がある。

4-7. 今後の展望

膝蛭と小形膝蛭に関する知見 (生物学、病理、疫学など) を再構築するために、遺伝子情報に基づいた両種の簡易鑑別法を構築する必要があり、種特異的プライマーを用いた PCR 診断法の開発が望まれる。

本研究により虫卵からの DNA 抽出およびこれによる種の鑑別が可能であることを示した。したがって、虫卵による感染牛生体の鑑別診断が可能となり、今後はこれを利用した疫学、生物学、病原性解析の展開が期待される。

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 1 件)

1) Sakaguchi, K., Shinohara, T., Sakai, H., Shoji, N., Horii, Y., Nonaka, N. 2012. Application of nylon mesh in fecal examination for *Eurytrema* eggs. Japanese Journal of Veterinary Parasitology, 10, 21.

〔学会発表〕（計6件）

1) 野中成晃，食肉由来寄生虫症．平成 24 年度宮崎県食肉衛生検査所協議会研修会．2013 年 2 月 2 日．宮崎県総合保健センター（宮崎県）．（招聘）

2) 酒井博史 下田崇 酒井由紀夫 野中成晃．膵蛭卵検査におけるナイロンメッシュの活用．平成 24 年度家畜診療等技術九州地区発表会．2012 年 10 月 31 日-11 月 1 日．福岡県中小企業振興センター（福岡県）．

3) 坂口浩平、Pham Ngoc Doanh、郭志宏、甘甜甜、昌子暢賢、山本裕子、新田芳樹、岡島淳悟、Itabajara da Silva Vaz Junior、今内覚、堀井洋一郎、野中成晃．膵蛭 *Eurytrema pancreaticum* と小形膵蛭 *E. coelomaticum* の遺伝学および形態学的鑑別の検討．第 154 回日本獣医学会学術集会．2012 年 9 月 14-16 日．岩手大学（岩手県）．

4) 坂口浩平、Pham Ngoc Doanh、郭志宏、甘甜甜、昌子暢賢、山本裕子、新田芳樹、岡島淳悟、Itabajara da Silva Vaz Junior、今内覚、堀井洋一郎、野中成晃．膵蛭 *Eurytrema pancreaticum* と小形膵蛭 *E. coelomaticum* の遺伝学的検討および形態学的鑑別について．第 6 回蠕虫研究会．2012 年 7 月 27-28 日．青島サンクマール（宮崎県）．

5) 坂口浩平、篠原呂之、酒井博史、昌子暢賢、堀井洋一郎、野中成晃．ナイロンメッシュを用いた膵蛭類の虫卵検査法の効率化．第 64 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 61 回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会．2011 年 11 月 3-4 日．宮崎市民プラザ（宮崎県）．

6) 坂口浩平、篠原呂之、酒井博史、昌子暢賢、堀井洋一郎、野中成晃．膵蛭類の虫卵検査におけるナイロンメッシュの活用．第 152 回日本獣医学会学術集会．2011 年 9 月 19-21 日．大阪府立大学（大阪府）．

〔図書〕（計1件）

1) 野中成晃．吸虫総論、検査法．In: 獣医寄生虫病学．緑書房．2013 年．pp.160.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

堀井 洋一郎 (HORII YOICHIRO)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号：80173623