

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：10107
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23650226
 研究課題名（和文） 新種エキノコックス包虫病体モデル動物の作成
 研究課題名（英文） Animal models for hydatid development of new species
Echinococcus shiquicus
 研究代表者
 中谷 和宏（NAKAYA KAZUHIRO）
 旭川医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：70109388

研究成果の概要（和文）： 2005 年に中華人民共和国のチベット高地において発見された新種 *Echinococcus shiquicus* の包虫(チベット包条虫)について、(1) BALB/c と NOD/Shi-*scid* マウスの腹腔にて包虫の発育・増殖に成功した。(2) 包虫を 18 日間凍結保存後、BALB/c マウスへ接種して包虫の生存・増殖を確認した。(3) それらの嚢包を肝癌細胞 H-4-II-E を供培養にして EMEM 培地にて 185 日間培養し、直径約二倍に及ぶ嚢包の拡大、クチクラ層の肥厚、顕著な原頭節と石灰小体を形成させることについても成功した。

研究成果の概要（英文）： This study is carried out about the hydatid metacestode of new species *Echinococcus shiquicus* which was discovered in the Qinghai-Tibet plateau region of China in 2005. We used two strains of experimental mice, NOD/Shi-*scid* and BALB/cA, for the development and multiplication of metacestode. The parasite freezing preservation with Liquid nitrogen and the culture of vesicle were succeeded. From now on, these results will bring of more effects for the future studies of this parasite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学

 キーワード：*Echinococcus shiquicus*、チベット包虫、*scid* マウス、嚢包、増殖形態、凍結保存、*in vitro*

1. 研究開始当初の背景

チベット包条虫 *Echinococcus shiquicus* は 2005 年に発見された *Echinococcus* 属の新種であり、チベット高原に生息するチベットスナギツネを終宿主、クチグロナキウサギを中間宿主とする *Taenia* 科の条虫である。遺伝学的には本邦の北海道で蔓延している多包条虫の姉妹種とされるため、この包虫がどのような発育や増殖経過を辿るのかを生物学的に精査する事は、公衆衛生学的にも極めて重要な課題と考えられた。

2. 研究の目的

まず第一にこの包虫を実験室内で維持するにはマウスがもっとも妥当であるが、発見者の一人である四川省 CDC の Qui Jiaomin からはマウスへの感染には失敗した旨の連絡があった。そこで、感染には極めて感受性が高く、日本では容易に入手可能な重症性免疫不全マウスへの感染を試すことにした。

第二に、この包虫はその入手が極めて困難な状

況であるため増殖が予想通り順調に行かない場合には計画が頓挫する危険性がある。その保証として凍結保存による保証を確保する必要があった。

第三に、動物の愛護と管理に関する法律を視野に入れ実験動物の数を最小限にするためと、包虫の増殖や分化の過程を連続して肉眼的に観察可能にする培養系の構築を目標とした。

3. 研究の方法

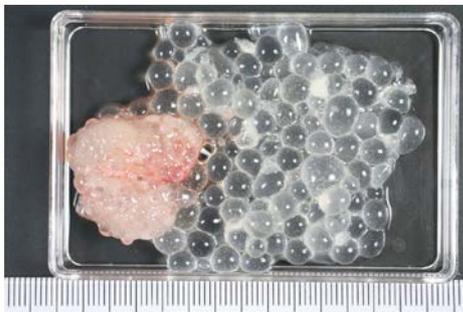
Qui Jiaomin より委譲を受けた少量の虫卵を次亜塩素酸ナトリウムで慎重に処理し、卵殻を除去した。得られた oncosphere を *scid* マウスの腹腔へ接種した。囊包の凍結保存にはプログラムフリーザーで段階的に冷却凍結後、液体窒素にて 18 日間に渡り -196°C で凍結保存し、凍害剤と低温下による生存の可能性を調べるため室温へ戻し、BALB/c マウスの腹腔へ接種して確認した。また、囊包の培養には、感染 BALB/c マウスの腹腔から採取した囊包をラット肝癌細胞 H-4-II-E を供培養してウシ胎仔血清を加えた MEME 培地にて 185 日間培養し、外観を実体顕微鏡下で観察した。最終的には囊包を組織標本とし、その細部について顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) 重症性免疫不全マウスへの感染動態について

【目的】中国四川省チベット高地の石渠(Shiqu)で新種の *Echinococcus* が発見され、Xiao ら(2005)によって *E. shiquicus* と命名された。当地域ではチベットギツネ *Vulpes ferrilata* を終宿種、クチグロナキウサギ *Ochotona curzoniae* を中間宿主として生活環を維持していると考えられる。そこで、実験室内で包虫の発育を観察するため *scid* マウスへの感染を試みた。

【方法】チベットギツネの腸管より得られた虫卵を孵化させ NOD/Shi-*scid* マウスの腹腔へ接種し、3 代継代して増殖させた。摘出包虫をホモゲナイズし、PBS で 14% 濃度に調整した。その懸濁液 0.5ml を同マウスの腹腔へ接種した。感染 21 週後に増殖した包虫を摘出・秤量して固定後、組織切片を作成して鏡検した。



【成績】包虫は特異な増殖形態を示した。囊胞は互いに軽度には癒着することはあってもマウスの腹腔内諸臓器へは癒着することなく、容易に単離が

可能であった。さらに、肝臓の横隔膜面でのみ多数の小囊胞が多房性に増殖していることが観察された。組織学的には、ほぼ円形の各囊胞周囲に宿主炎症性変化がほとんど随伴せず、クチクラ層は極めて薄く囊胞液が多量に存在するため、内腔は楕円形あるいは球形を呈した。

【結論】これらの事象が重症性免疫不全マウスのみ特徴的に現れるものなのか、あるいは他のマウスや動物種でも同様の傾向が表出されるのか、更なる検討が必要であると考えられた。

(2) 正常 BALB/cA マウスへの感染動態

【目的】Qiu, J. は、チベットスナギツネの小腸より得られた *E. shiquicus* 成虫を 100 隻ずつ 50 匹のマウスへ経口接種したところ、1 匹のマウスしか感染させることができなかった(私信 2007)。そこで、成虫を NaClO 処理し、得られた oncosphere を重症性免疫不全マウス NOD/Shi-*scid* の腹腔へ接種したところ包虫の増殖と発育を認め、実験室内での継代に成功した(第 28 回日本寄生虫学会にて報告 2009)。今回さらに、包虫が近交系マウス BALB/c でも増殖可能か否かを検討した。

【方法】継代している NOD/Shi-*scid* の腹腔より包虫を摘出して homogenize した。滅菌 PBS を加え、250µm の金属メッシュで濾過後、沈査量で約 14% になるように濃度を調整した。この懸濁液を 5 匹の BALB/c の腹腔へ 0.5ml ずつ接種し、腹部が膨大するようになった 47 週後に剖検して包虫を採取した。



【成績】全てのマウスに包虫の増殖が認められ、その重量はそれぞれ 23.0, 13.6, 11.8, 9.7, 7.9g であった。3 匹のマウスでは、表面が白濁した透明感のある多房性集塊状をなし、同時に少数の単房性囊胞も観察されている。残り 2 匹のマウスでは、囊胞塊全体が弾力性のある皮膜に包まれ、不透明感を呈していた。この皮膜は線維性結合織からなり、毛細血管やリンパ管の新生が認められ、囊胞周囲には線維芽細胞、形質細胞、リンパ球などが集簇していた。

【結論】BALB/c の炎症像は、析出した fibrin や

macrophage 主体の NOD/Shi-*scid* の場合とは大きく異なり、宿主側の反応が強く現れる。従って増殖には二倍ほどの時間を要するが、包虫の継代へも十分に利用が可能であると判断された。

(3) チベット包虫の凍結保存について

【目的】当センターでは分離されるチベット包虫をマウスの腹腔で継代しているが、株数の増加に伴う種々の問題が目立ってきた。マウスの購入費、飼育管理経費、ケージの購入費などによる経済的負担が上昇し、人手がかかることや飼育スペースが不足するなどの他に、マウス増数に伴う株間のコンタミの危険性も懸念され、加えて継代に要する時間や手間の増大も無視できない状況にある。チベット包虫の形態的側面からは、各株の世代数が増すと石灰小体、繁殖胞ならびに原頭節の形成が低下して多房化が顕著となり、継代期間の短縮傾向が認められる。さらに、動物の愛護に関する法律や日本学術会議のガイドラインに示されているように、実験動物に対する 3R の理念からもその使用数を減少させることを考慮する必要がある。上記の諸問題を解決する一つの方法としてチベット包虫の保存に液体窒素による凍結保存があると考え、その可能性を検討してみた。

【方法】マウスの腹腔で増殖させたチベット包虫嚢胞塊をホモゲナイズして 260 μ m のメッシュで濾過し、得られた沈渣を抗生物質 (penicillin と streptomycin) と凍害剤 (DEMSO) を添加した培養液 (MEM) に 1 対 9 の割合で混合し、cryotube へ 1ml づつ分注してプログラムフリーザーで 4°C 30 分、-28°C 30 分、-80°C 30 分の設定で凍結後、液体窒素 (-196°C) 内で 18 日間保存した。その後、凍結試料を 37°C で融解し、10ml の培養液を加えて攪拌と遠心を二度行い凍害剤を除去した。沈渣を滅菌 PBS で攪拌し、4.6% (v/v) 濃度に調整した懸濁液を 0.5ml づつ BALB/cA/Jcl ♀ 10 匹の腹腔へ接種した。感染 10 ヶ月後にマウスを解剖しチベット包虫の病巣を摘出し、凍結保存の有効性を調べた。

【成績】感染させたマウスの内 1 匹が飼育期間内に下痢と消瘦を発症したため処分された。残りの 9 匹の内 7 匹の腹腔に少量 (0.1~0.4g) の包虫塊が生残していた。これらについて組織切片を作成し、鏡検したところ、病巣部の外周は宿主の結合織を主体とした炎症性組織が取り囲み、内部に萎縮した少数の嚢包が確認された。

【結論】十分な感染期間を設けたにもかかわらず包虫の増殖が充分認められなかった。その原因には感染量が少なかったこと、重症性免疫不全マウスである NOD/Shi-*scid* が用いられなかったこと、凍結保存の温度設定や凍結・融解処理に不都合があったこと等、さらなる技術的な面での改良余地

が求められた。

(4) チベット包虫の培養

【目的】包虫自体の増殖や分化を経時的に観察するには動物実験ではほとんど困難であり、培養という人工的環境下で随時その動向が追認できれば最良な結果を得ることが可能となる。また、動物実験の頻度や使用数を最小限に抑制できる。

【方法】BALB/c の腹腔で増殖させた嚢包を無菌的に摘出した。この嚢包を、クリーンベンチ内でラット肝癌細胞を支持細胞として牛胎児血清と抗生物質を加えた EMEM 培地 3ml 培養瓶に入れ、35°C の CO₂ インキュベーター内で 185 日間連続培養した。

【成績】嚢包の直径が約 3 倍にまで増加した。倒立顕微鏡で継続的に観察した結果、内部のクチクラ層や胚層の厚さが経時的に増して透明感を欠くようになり、内部には石灰小体や繁殖胞が増数するまでになった。また、培養後半では元の嚢包から新しい嚢包が出芽して、いわゆる多胞化傾向を示す増殖が観察された。ちなみに、別途に実施した多胞虫 *E. multilocularis* では嚢包内部に壊死変成が見られ培養が不成功に終わった。

【結論】チベット包虫は姉妹種である多胞虫に比較し、上記の培養方法で容易に培養が可能であることが証明され、今後はより好適な培地を試す道筋が確立できたと評価された。

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 10 件)

(1) Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, Haukisalmi V, Konyaev S, Oku Y, Okamoto M, Ito A. 2013. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *Int J Parasitol.* 43(6):427-37.

(2) Swastika K, Dewiyani CI, Yanagida T, Sako Y, Sudarmaja M, Sutisna P, Wandra T, Dharmawan NS, Nakaya K, Okamoto M, Ito A. 2012. An ocular cysticercosis in Bali, Indonesia caused by *Taenia solium* Asian genotype. *Parasitol Int.* 61(2):378-80.

(3) Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Giraudoux P, Raoul F, Nakaya K, Xiao N, Qiu J, Qiu D, Craig PS, Ito A. 2012. A loop-mediated isothermal

amplification method for a differential identification of *Taenia tapeworms* from human: application to a field survey. *Parasitol Int.* 61(4):723-5.

(4) Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, Nakao M, Sadjjadi SM, Hijawi N, Abdel-Hafez SK, Sako Y, Okamoto M, Ito A. 2012. Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East. *Parasitol Int.* 61(4):599-603.

(5) Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. 2012. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium* in Japan. *Parasit Vectors.* 17(5):18.

(6) Nkouawa A, Sako Y, Moyou-Somo R, Ito A. 2011. Serological and molecular tools to detect neurologic parasitic zoonoses in rural Cameroon. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 42(6):1365-74.

(7) Knapp J, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Saarma U, Lavikainen A, Ito A. 2011. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol.* 61(3):628-38.

(8) Sako Y, Tappe D, Fukuda K, Kobayashi Y, Itoh S, Frosch M, Grüner B, Kern P, Ito A. 2011. Immunochromatographic test with recombinant Em18 antigen for the follow-up study of alveolar echinococcosis. *Clin Vaccine Immunol.* 18(8):1302-5.

(9) Ito A, Okamoto M, Li T, Wandra T, Dharmawan NS, Swastika KI, Dekumyoy P, Kusolsuk T, Davvajav A, Davaasuren A, Dorjsuren T, Mekonnen SM, Negasi ZH, Yanagida T, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Lavikainen AJ, Nkouawa A, Mohammadzadeh T. 2011. The first workshop towards the control of cestode zoonoses in Asia and Africa. *Parasit Vectors.* 21:4:114.

(10) Sako Y, Nakaya K, Ito A. 2011. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Exp Parasitol.*

127(3):693-701.

[学会発表] (計 4 件)

① 中谷和宏, 柳田哲矢, 迫康仁, 中尾稔, 伊藤亮. チベット包虫 *Echinococcus shiquicus* の凍結保存. 第 82 回日本寄生虫学会 2013 年 3 月 29 日東京

② 中谷和宏, 柳田哲矢, 迫康仁, 中尾稔, 伊藤亮. 多包虫の凍結保存. 第 58 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. 2012 年 10 月 6 日 北海道旭川市

③ 中谷和宏, 柳田哲矢, 迫康仁, 中尾稔, 伊藤亮. 実験用マウスにおけるチベット包虫の発育 (多包虫, 単包虫との比較). 第 81 回日本寄生虫学会. 2012 年 3 月 24 日兵庫県西宮市

④ 中谷和宏, 柳田哲矢, 迫康仁, 中尾稔, 伊藤亮. チベット包条虫と単包条虫のマウスでの包虫発育. 第 57 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. 2011 年 10 月 1 日 山形県山形市

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 和宏 (NAKAYA KAZUHIRO)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70109388

(2) 研究分担者

伊藤 亮 (ITO AKIRA)
旭川医科大学・医学部・客員教授
研究者番号 : 70054020