

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07723

研究課題名(和文)人の食肉由来回虫症の感染源対策：南九州における牛と鶏の疫学的役割と制御法の探索

研究課題名(英文)Countermeasure against infectious source of human ascarid larval migrans: Investigation on the epidemiological role of cattle and chickens in southern Kyushu for effective control

研究代表者

野中 成晃(Nonaka, Nariaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50281853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの食肉由来回虫症の感染源動物として考えられている鶏および牛の診断ツールとして、豚回虫およびトキソカラ回虫(犬回虫、猫回虫)の血清抗体を特異的に検出するELISA法を開発した。これを用いて疫学調査を実施したところ、地鶏農家や肉用牛農家において人の動物由来回虫症の原因回虫が蔓延している可能性が示唆された。また、今後必要な疫学ツールとして、鶏および牛から回虫幼虫のDNAを検出できるreal-time PCR法(豚回虫検出)とnested multiplex PCR法(豚回虫、犬回虫、猫回虫検出)を開発した。

研究成果の概要(英文)：As diagnostic tools for detecting the causative round worms of human ascarid larval migrans in chickens and cattle, we developed ELISAs for detecting specific antibodies against *Ascaris suum* and *Toxocara* spp. (*T. canis* and *T. cati*). Using the tools, we conducted an epidemiological study and found that the causative round worms such as *A. suum*, *T. canis* and *T. cati* would be endemic in some of chicken and cattle farms. In addition, as new tools required for further epidemiological investigation, we developed real-time PCR for detecting *A. suum* DNA and nested multiplex PCR for differentiating *A. suum*, *T. canis* and *T. cati*.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：動物由来回虫 犬回虫 猫回虫 豚回虫 鶏 牛 食品由来感染症 人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

動物由来回虫症は、我が国を含め世界規模で問題となっている人獣共通寄生虫症で、動物の回虫類、すなわち犬回虫、猫回虫、豚回虫等が人に感染した場合に、人の体内で幼虫が發育せずそのまま体内移行するために引き起こされる疾病である。顕性の場合、呼吸器障害、視力障害、神経障害などがみられる。

我が国においては、犬・猫回虫症の顕性患者（内臓・眼トキソカラ症）は医学中央雑誌（1993年まで）に報告されているだけで約100名にのぼり、また、全国レベルで寄生虫症患者の血清診断を行っている研究分担者・丸山の研究室では1986年以降の動物由来回虫症累積症例数が1,000（約40例/年）を超えた。ところが、動物由来回虫感染のほとんどは特徴的症候を欠き、そのため診断時に類症鑑別候補に挙がらないため、感染を感知できないケース、すなわち潜在的感染患者は相当数にのぼると考えられる。実際、血清疫学調査では数%の抗体陽性率が報告されている。豚回虫症についても、1990年代半ばから問題視されるようになり、上記丸山研究室でも症例の数%は豚回虫によるものと推定している。

動物由来回虫の人への感染は、かつては犬、猫、豚の糞便中に排出される回虫卵の偶発的摂取が主要な経路であり、土壌の虫卵を直接口にしやすい幼児の感染が主であった。しかし、近年、我が国では、肉類の摂食、すなわち食肉由来感染（図1）が主になっている。待機宿主となる牛や鶏などの家畜・家

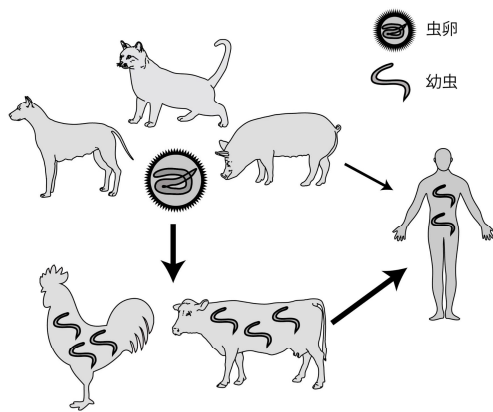


図1 犬・猫・豚回虫の人への伝播経路

禽がこれらの回虫に感染した場合、幼虫は体内を移行し肝臓や筋肉に幼虫のまま留まる。我が国では、食文化の変化により家畜の肉や肝臓の生食が好まれるようになって食肉由来回虫症が増加したと考えられ、実際、食生活の共有で家族感染が起きている。特に南九州では、鶏肉の生食を好むという特有の食文化があり、牛肉類はもとより鶏肉類（臓器を含む）の公衆衛生上のリスクは他の地域と比べて高いと考えられる。

本研究は、南九州における人の動物由来回虫症の原因としての牛と鶏のリスクを評価し、農場の感染予防対策によって食肉の安全

性を高めることを目的に企画した。具体的には、動物由来回虫症の感染回虫種が特定できるように人診断用に開発した特異性の高い診断システムを応用して、感染実験を通してその信頼性を評価すると共に、宮崎県の牛と鶏における抗体陽性率を調査し、動物への感染状況を明らかにすることがねらいである。

2. 研究の目的

動物由来回虫（犬、猫、豚回虫）症は、我が国における代表的な人獣共通寄生虫症である。人への感染は、成熟回虫卵の経口摂取によるものと、感染動物の肉類の摂食、すなわち食肉由来感染によるものがあり、近年、後者（食肉由来回虫症）が増加している。特に南九州では鶏肉類や牛肉類（臓器を含む）の生食を好む地方特有の食習慣があり感染リスクは高いと考えられる。

そこで、宮崎県において、肉類生食の公衆衛生上のリスクを明らかにしその対策を講じるために、人用に開発された動物由来回虫症の感染種が特定できる高特異的検査法の動物適用を計り、その信頼性を感染実験で評価すると共に、宮崎県の牛と鶏における抗体陽性率を調査し、動物の感染状況を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

【寄生虫材料】

犬回虫および猫回虫の成虫は宮崎県および宮崎市の動物愛護センターの協力を得て、センターに収容された犬および猫を市販駆虫薬（ドロンタールプラスおよびプロフェンダースポット）を投与することによって入手した。豚回虫は宮崎県食肉衛生検査所の協力を得て、と畜豚の小腸より入手した。鶏回虫はJA 宮崎の協力を得て、食鳥処理鶏の小腸より入手した。牛回虫は東海大学農学部・森友靖生教授の協力を得て、病理解剖牛より入手した。入手した雌成虫の一部については、解剖して子宮を取り出し、虫卵を収拾した。虫卵は27℃で培養し、幼虫包蔵卵を得た。

【検査法の開発】

血清抗体検出 ELISA :

犬回虫、豚回虫、鶏回虫、牛回虫の成虫抽出抗原（TcSWAP、AsSWAP、AgSWAP、TvSWAP）および前2回虫の第3期幼虫排出分泌抗原（TcES、AsES）を定法に従って作成し、各種抗原を用いたELISAについて反応条件の最適化を行った。

遺伝子検出 PCR :

ITS1領域をターゲットに豚回虫特異プライマーを設計し、Real-time PCR法による鶏肉および牛肉内の幼虫DNAの高感度検出法を開発した。各種回虫DNAを用いて感度および特異度を評価した後、マウス肝臓500mgへの幼虫の混入材料および実験感染を行ったマウスの肝臓からのDNA検出を試みた。最後に

本法を用いて、実験感染した鶏から得られた肝白斑から豚回虫 DNA の検出を試みた。一方で、豚回虫、犬回虫、猫回虫の DNA の検出が 1 回の検査で行える nested multiplex PCR の開発も試みた。リボゾーマル DNA 領域をターゲットに 3 種の回虫類に共通のプライマー、および増幅産物のサイズが異なるように回虫種特異的プライマーを設計し、nested multiplex PCR に適用した。上記の豚回虫検出用 real-time PCR と同様に、各種回虫 DNA を用いて感度および特異度を評価した後、マウス肝臓 500mg への幼虫の混入材料および実験感染を行ったマウスの肝臓からの DNA 検出を試みた。

【鶏における検討】

実験 1 . ヒトの動物由来回虫症診断法の適用 :

36 日齢の採卵鶏ジュリア種に対して、犬回虫、猫回虫、豚回虫、鶏回虫の幼虫包蔵卵を経口投与した(投与虫卵数は犬回虫、猫回虫、鶏回虫 : 2,000 個、豚回虫 : 50,000 個)。投与後 12 週目まで 2 週間ごとに継時的に採血し、得られた血清に対し、スクリーニング検査として AsSWAP を用いた ELISA (AsSWAP-ELISA) を行い、その有用性について検討した。次に、TcES と AsES を用いた ELISA (TcES-ELISA、AsES-ELISA) を行い、両抗原への反応性の違いから感染虫種判定の可能性を検討した。犬回虫・猫回虫(トキソカラ回虫)感染については、さらにヒト診断用に市販されている TcES を抗原とするウエスタンブロット(WB)法を用いて診断の可能性を検討した。豚回虫感染では、抗鶏回虫抗体による検査結果への影響が見られたため、AgSWAP を被検血清と予め混合して AgSWAP に反応する抗体を吸収する吸収試験を行って特異的診断の可能性を検討した。

実験 2 . 特異抗原の探索 :

実験 1 より経時的に得た鶏血清との反応性を WB 法により比較した。また、得られた特異抗原に対して、MALDI-TOF-MS 法によりタンパク質を同定した。

実験 3 . 感染鶏における抗体産生の評価 :

鶏の豚回虫抗体価保有状況の評価資料を得るため、感染の頻度と抗体価および抗体の avidity の推移との関係を感染実験(虫卵 500 個の経口投与)により観察した。鶏へ単独(1 回) 2 回、多数回感染(週 2 回×6 週間)を行って観察した。なお、繰り返し感染群の一部については、最終感染時に虫卵の大量投与(50,000 個)を行い、3 時間後および 3 日後に安楽殺して、腸管に侵入した幼虫数と肝臓に到達した幼虫数を 1 回感染群と比較した。

疫学調査 1 :

宮崎県の食鳥処理場から分与されたブロイラー血清 150 検体、および宮崎県内の 9 農

場の 178 羽の地鶏から得られた血清について、実験 1 で開発した感染虫種判定法を用いて検査した。

【牛における検討】

疫学調査 1 :

宮崎県内 2 か所のと畜場から肉用牛の血清 332 検体入手し、AsSWAP-ELISA を用いて検査した。また、抗体陽性となった検体に対して、牛回虫の交差反応を除外するため、TvSWAP で吸収処理した後、AsES-ELISA を行った。さらに、TvSWAP 吸収処理 AsES-ELISA でトキソカラ回虫陽性となった 33 検体について、ヒトの確定診断に用いられる犬回虫分泌排泄抗原を用いた WB 検査を行った。

疫学調査 2 :

宮崎県食肉衛生検査所の協力を得て食肉衛生検査で検出された牛の肝臓の白斑病変部位 17 検体入手し、豚回虫、犬回虫、猫回虫 DNA を検出する nested multiplex PCR 法による検査を行った。

4 . 研究成果

(1) 研究の主な成果

【検査法の開発】

豚回虫 DNA 検出用 Real-time PCR 法は、1 匹の幼虫を検出することが可能であり、犬回虫や猫回虫 DNA とは反応せず、高感度と高特異度を示した。さらに、幼虫 1 匹を混入したマウス肝臓や感染実験を行ったマウスの肝臓から豚回虫 DNA を検出できることが確認され、食肉・食鳥検査において、豚回虫感染の特徴である肝白斑の類症鑑別に貢献すると考えられた。実際、鶏への実験感染で得られた肝白斑病変部位から豚回虫 DNA を検出することに成功した。また、nested multiplex PCR についても、犬回虫、猫回虫、豚回虫いずれの幼虫も 1 匹から検出することが可能であり、それぞれの回虫種の特異プライマーは他の回虫種とは反応せず、高感度と高特異度を示した。幼虫を混入したマウス肝臓を検査したところ、犬回虫と豚回虫については幼虫 1 匹から、猫回虫は幼虫 2 匹から検出可能であることがわかった。さらに、感染実験を行ったマウスの肝臓からはいずれの回虫種も検出できることが確認され、豚回虫 DNA 検出用 Real-time PCR 法と同様に、食肉・食鳥検査において、3 種の回虫感染の検出に貢献すると考えられた。

【鶏に対する検討結果】

実験 1 :

すべての犬回虫、猫回虫、豚回虫感染鶏は感染後に AsSWAP に対して抗体陽性となり、AsSWAP はスクリーニング抗原として有用であると考えられた(図 2)。しかし、鶏回虫感染鶏においても陽性反応が認められ、抗鶏回虫抗体との交差反応が問題となることがわかった(図 2)。虫種特異性が比較的高い

ES 抗原を用いた ELISA では、適切な希釈濃度の血清を用いることで、犬回虫、猫回虫感染鶏において TcES に対する反応が AsES に対する反応を上回り、トキソカラ回虫を判別できる可能性が示唆された（図 3）。さらに、WB 法では、人での診断基準となるトキソカラ回虫特異バンドが犬回虫、猫回虫感染鶏でのみ認められ、本法の有用性も示された。一方、豚回虫、鶏回虫感染鶏では両者ともに AsES に対する反応が TcES に対する反応を上回り、ES 抗原を用いた ELISA では両種の感染の判別は困難であった。そこで、AgSWAP 吸収処理 AsES-ELISA を行って抗豚回虫特異抗体の検出を試みたところ、豚回虫感染鶏のみが強い反応を示し（図 4）、本法により豚回虫と鶏回虫感染の判別が可能であることが示唆された。

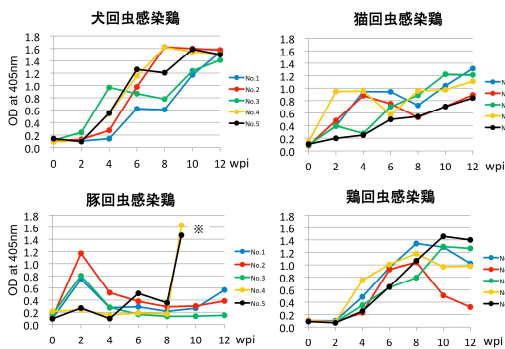


図 2. 4 種の回虫感染鶏の血清における AsSWAP-ELISA の OD 値の推移
※：豚回虫感染鶏の No. 4 と 5 は感染後 8 週目（8wpi）に再感染させた。

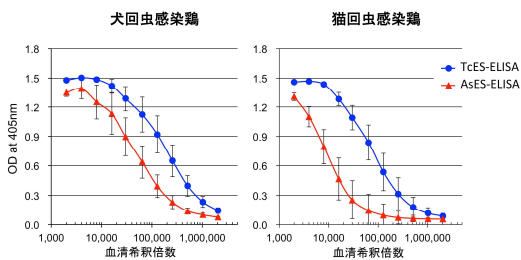


図 3. 犬回虫および鶏回虫感染鶏血清に対する TcES-および AsES-ELISA の OD 値の比較

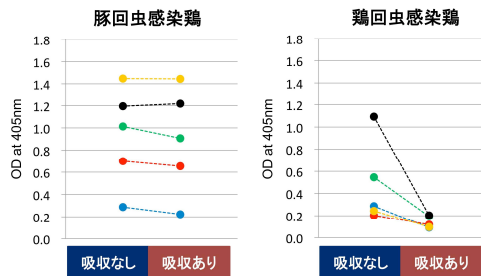


図 4. 豚回虫および鶏回虫感染鶏の血清に対する AgSWAP 吸収効果の比較

実験 2：

WB 解析により、豚回虫成虫抽出抗原に含まれる 38kDa 抗原が豚回虫感染に特異的に反応していることがわかり、種特異的診断抗原としての有用性が示された。この 38kDa 抗原を MALDI-TOF-MS 法により解析したところ、aldose reductase であることがわかった。

実験 3：

鶏の血清を AsES-ELISA で評価したところ、抗体価は 1 回感染群では感染 2~4 週後をピークに低下し、感染後 14 週後には非感染群のレベルまで低下した。2 回感染群では再感染後に 2 次応答による高い抗体価の上昇が認められたが、再感染 2 週後をピークに低下し、再感染 10 週後には非感染群のレベルまで低下した。したがって、1~2 回感染では抗体価が短期間しか維持されず、これは豚回虫の鶏体内での移行動態、すなわち豚回虫幼虫は鶏体内では留まらず、感染した幼虫は気管型移行を行って短期間で排泄されている可能性を示唆するものと考えられた。一方、繰り返し感染群においては、初回感染から 4 週目でピークに達し、初回感染から 6 週目以降緩やかに低下した。また、繰り返し感染群と 1 回感染群において、小腸から回収された幼虫数に有意な差はなかったが、肝臓から回収された幼虫数は、繰り返し感染群は有意に低かった。したがって、繰り返し感染によって宿主に防御免疫が誘導され、感染後半に体内移行幼虫の殺傷が起こった結果として、宿主における豚回虫抗原への暴露量が低下し、繰り返し感染中にも拘らず抗体価の上昇が頭打ちとなった可能性が考えられた。Avidity 検査においては、各群とも感染後継時的に avidity が上昇したことから、抗体の Avidity 評価により、感染後の期間を推測できると考えられた。

疫学調査 1：

プロイラーはすべて陰性であったのに対し、地鶏では豚回虫陽性鶏 1 羽（1 農場）、トキソカラ回虫陽性鶏 21 羽（5 農場）が検出され、地鶏において人の動物由来回虫症の原因回虫が蔓延している可能性が示唆された。

【牛に対する検討結果】

疫学調査 1：

332 検体中、86 検体が抗体陽性となった。この 86 検体に対して、TvSWAP 吸収処理 AsSWAP-ELISA を行った結果、トキソカラ回虫が 39 検体、豚回虫が 17 検体で陽性となり、肉用牛農家においても回虫類の汚染経路が存在する可能性が示唆された。さらに、トキソカラ回虫の WB 検査では、TvSWAP 吸収処理 AsES-ELISA でトキソカラ回虫陽性となった 33 検体中 32 検体で陽性を示唆するバンドが得られ、トキソカラ属回虫の感染の可能性がより濃厚となった。

疫学調査 2：

検査した 17 検体はすべて陰性であった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究により、これまで調査ツールが開発されていなかった鶏および牛のトキソカラ

回虫（犬回虫および猫回虫）と豚回虫感染に対する血清抗体検査および幼虫 DNA の検出が可能となり、ヒトの動物由来回虫症の感染源動物としての鶏と牛の疫学的役割を解明する手段を得た。これまで患者の凍告（職歴）から鶏肉と牛肉の生食の危険性が指摘されていたのみであるが、今後はより具体的な危険度の解析が可能となると考えられる。また、感染農家を特定することにより、農家内での感染経路の解析、さらにはその制御対策へとつながり、我が国の公衆衛生の向上に大きく寄与するものと考えられる。

(3)今後の展望

本研究で調査ツールを開発できたことから、今後は、食肉衛生検査所および食鳥処理場との連携を強化して、肉用鶏と肉用牛の血清および肝白斑病変の調査を拡大し、本研究で開発した検査法を用いて、感染鶏と感染牛を出荷する農家を特定する予定である。出荷農家が特定できれば、感染農家における動物への感染経路の解明が可能となり、動物への有効な感染制御方法の考案につながれると考えている。

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) Nguyen YTH, Wang Z, Maruyama H, Horii Y, Nonaka N, Yoshida A.

Evaluation of real-time PCR assay for the detection of *Ascaris suum* contamination in meat and organ meats. J. Food Safety, 査読有, 37, 2017, e12301.

〔学会発表〕(計17件)

(1) Yoshida A, Wang Z, Shibata M, Nguyen YTH, Nonaka N, Maruyama H.

トキソカラ属回虫による食肉汚染の検出を目的とした real-time multiplex PCR 法の開発. 第 70 回日本寄生虫学会南日本支部大会. 2017 年.

(2) 園田志野, 吉田彩子, Nguyen YTH, 野中成晃.

豚回虫感染鶏における抗体産生の動態について 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017 年.

(3) 王珍珍, Nguyen YTH, 早田弥生, 野中成晃, 丸山治彦, 吉田彩子.

Development of nested multiplex PCR assay for the detection of *T. canis*, *T. cati* and *A. suum* contamination in meat and organ meats. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 2017 年.

(4) 吉田彩子, Nguyen YTH, 丸山治彦, 堀井

洋一郎, 野中成晃.

肉用鶏におけるヒトの動物由来回虫症原因虫種に対する抗体保有状況. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年.

(5) Nguyen YTH, Yoshida A, Maruyama H, Horii Y, Nonaka N.

Candidate antigens for specific detection of ascarid infection in chickens. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年.

(6) 田中舜, 吉田彩子, 三澤尚明, 堀井洋一郎, 丸山治彦, 森友靖生, 野中成晃.

肉用牛におけるトキソカラ属回虫、豚回虫感染の血清学的、分子生物学的検討. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年.

(7) 早田弥生, 吉田彩子, 丸山治彦, 堀井洋一郎, 野中成晃.

ヒトの動物由来回虫症血清診断法のニトリへの適応. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 2016 年.

(8) 後田眞樹, 吉田彩子, 早田弥生, Nguyen YTH, 王珍珍, 堀井洋一郎, 丸山治彦, 三澤尚明, 野中成晃.

実験感染鶏におけるイヌ回虫、ネコ回虫、ブタ回虫体内移行幼虫の分布. 第 68 回日本寄生虫学会南日本支部大会. 2015 年.

(9) 前田知織, 吉田彩子, 柴原政幸, 篠原京子, 丸山治彦, 堀井洋一郎, 野中成晃.

肉用牛における回虫類（犬、猫、豚回虫）とトキソプラズマに対する抗体保有状況. 第 64 回九州地区獣医師大会. 2015 年.

〔図書〕(計1件)

野中成晃.

医薬ジャーナル社、人獣共通感染症改訂 3 版、2016 年、485-490.

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中 成晃 (Nonaka, Nariaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50281853

(2)研究分担者

丸山 治彦 (Maruyama, Haruhiko)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90229625

(3)連携研究者

吉田 彩子 (Yoshida, Ayako)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20343486

三澤 尚明 (Misawa, Naoaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20229678

上村 涼子 (Uemura, Ryoko)
宮崎大学・農学部・助教
研究者番号：90529190

堀井 洋一郎 (Horii, Yoichiro)
宮崎大学・農学部・名誉教授
研究者番号：80173623

(4)研究協力者

前田 智織 (Maeda, Chiori)
宮崎県・福祉保健部・主任技師

Nguyen Thi Hoang Yen
宮崎大学・医学獣医学総合研究科・院生

早田 弥生 (Hayata, Yayoi)
宮崎大学・農学部・学生

田中 瞬 (Tanaka, Shun)
宮崎大学・農学部・学生

園田 志野 (Sonoda, Shino)
宮崎大学・農学部・学生