

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06402

研究課題名(和文)包虫症対策のためのユニーク且つ効果的な野生中間宿主動物コントロール法の基礎的研究

研究課題名(英文)The basic research of unique and effective wild intermediate host animal control methods for alveolar hydatidosis

研究代表者

八木 欣平(Yagi, Kinpei)

北海道大学・獣医学研究院・客員研究員

研究者番号：70414323

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):有効な感染症対策を行うためには、病原体を維持している動物内での感染動態を明確にし、弱点を見つけ出し、そこに対策を適用しなければならない。エキノコックスの中間宿主動物における感染動態については不明な点が多く、特に宿主の感受性の量的な評価はほとんどされていない。本研究では、特殊感染実験施設内で近交系マウスを用い、虫卵感染後の寄生虫の発育動態を最新の分子学的技術により明らかにした。このことは、ワクチン等の開発に宿主の感受性の違いを考慮に入れなければならないことを示している。また野外での調査地域を設定し、そこで感染動態について検討を行い、これまでの方策の有効性と限界について明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エキノコックス症は高い確率で死亡する難治性の人獣共通寄生虫疾患である。北海道には国外から人為的に移入されたものであり、現在も年間20名以上の新規患者が報告されている。野生動物が主体の寄生虫であり、ヒトへの感染を防ぐためには、正確な寄生虫の性質と実態を明らかにする必要がある。日本では本症の先進的な研究が行われ、高い評価を受けている。これは北海道で多くの住民を死に追いやったこの寄生虫に対し、行政と大学等の研究機関が共同で対策と研究を行ったことによる。本研究は北海道立衛生研究所の世界唯一のエキノコックス感染実験施設を用いて行われた。その結果、中間宿主動物の寄生虫感染動態の解明に光を当てる事ができた。

研究成果の概要(英文): In order to take effective measures against infectious diseases, it is necessary to clarify the infection dynamics in animals that maintain pathogens, find weak points, and apply measures there. There are many unclear points about the infection kinetics of echinococcus in intermediate host animals, and there are few quantitative evaluations of the susceptibility of the host. In this study, we clarified the growth dynamics of parasites after egg infection using inbred mice in a special infection laboratory using the latest molecular techniques. This indicates that the development of vaccines and the like must take into account differences in host susceptibility. In addition, we set up a field survey area, examined the infection dynamics there, and clarified the effectiveness and limitations of the measures so far.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生虫症 エキノコックス 多包条虫 中間宿主 コントロール 感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エキノコックス症(多包虫症)は、本邦に常在する難治性寄生虫疾患であり、1900年代前半に人為的なキツネの移動により持ち込まれたものと推定されている。本症に感染した場合、適切な診断と治療を受けない場合致命的な経過を取ることから、本寄生虫症の流行は地域の住民にとって健康上の大きな脅威となっている。

これまで、本虫のコントロール対策として、感染源となる終宿主動物であるイヌ及びキツネに対する対策が検討され、実際に終宿主動物に対する駆虫薬を用いた対策などが検討され実行されてきた。しかしながら未だ毎年20名以上の新規患者の発生が報告され、その流行地域も拡大しつつある。この状況を打開するために、終宿主動物だけではなく、中間宿主動物に対する対策の可能性について検討する必要がある。

中間宿主に対する効果的な対策を講じるためには、本虫の中間宿主体内における感染動態や、現在遂行されている動物対策の問題点、そして寄生虫そのものの遺伝的な背景など未解明な基礎的情報が多数存在していた。それらを明らかにする事を中心にして研究は遂行された

2. 研究の目的

(1)中間宿主動物での感染動態を明らかにするためには、中間宿主動物の感染実験による解析が必要であった。今回のプロジェクトにおいては、特にワクチンの効果の鍵となることが推定される感染初期の動態について明らかにすることを目的とした。

(2)有効な対策方法である駆虫薬入りの餌(ベイト)の環境中への散布の有効性と、その問題点について検討を行った。フィールドを設定し、そこで得られた材料を解析することにより、終宿主動物対策の有効性を検証する。

(3)中間宿主への感染性については、近縁の単包条虫では遺伝子型により宿主への感染性が異なることが報告されている。北海道への多包条虫の移入は人為的にアラスカを経由して移入されていると考えられているが、科学的な検証は十分になされていない。宿主への感染性に影響のある多包条虫の遺伝的多様性の基礎的情報を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1)北海道立衛生研究所には世界に類のないエキノコックスの虫卵を用いた特殊感染実験施設を有している。この施設においては1983年に根室で捕獲したエゾヤチネズミの肝臓に寄生していた多包条虫の実験室内継代に成功し、ビーグル犬とコトラットを用いて虫卵を介した継代を行っている(根室株多包条虫)。我々は寄生虫の感染動態を補足するための quantitative PCR(定量PCR)を確立し、継代している多包条虫を用いて、多包条虫に高感受性である近交系マウスの DBA/2 マウスと低感受性である C57BL/6 マウスに実験感染を行い、虫卵感染の初期の感染動態について、量的な評価を試みた。

(2)多包条虫の流行地域にある北海道大学の構内(1.8km²)では、キツネの生息が確認されていた。これまで採取されて保存されていたキツネ糞便および定期的に捕獲された野ネズミの検査材料を利用し、この領域における感染状況と、駆虫薬入り餌(ベイト)の散布の有効性とその問題点を検討した。

(3)北海道内各地で捕獲し解剖検査で得られたキツネの腸管から採取された多包条虫成虫及び、各地で捕獲された野ネズミに寄生していた虫体から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてミトコンドリアゲノムの遺伝的特徴を明らかにした。

4. 研究成果

(1)中間宿主への感染実験で得られた結果の一部を fig.1 に示す(さまざまなマウス組織における多包条虫の DNA の量の感染後の経時的変化)。経時的に検出される寄生虫 DNA はマウス的小腸中央で高い値を示し、その部位が、虫卵から孵化したオンコスフェアが侵入する部位であることを示した。また2時間後にはオンコスフェアの一部が肝臓に到達し、腸管での侵入過程は24時間後には終了していることが明らかになった。低感受性のマウスである C57BL/6 では、肝臓に到達している虫体の数が少ないことが推測され、宿主の感受性を調節する因子が腸管への侵入段階に存在する可能性が示唆された。このことは多包条虫感染における予防と制御についての戦略を構築する上で重要な知見であった。このような実験感染による研究は感染を安全に遂行できる特殊な実験施設でのみ可能であり、広く共有される情報として重要なものである。

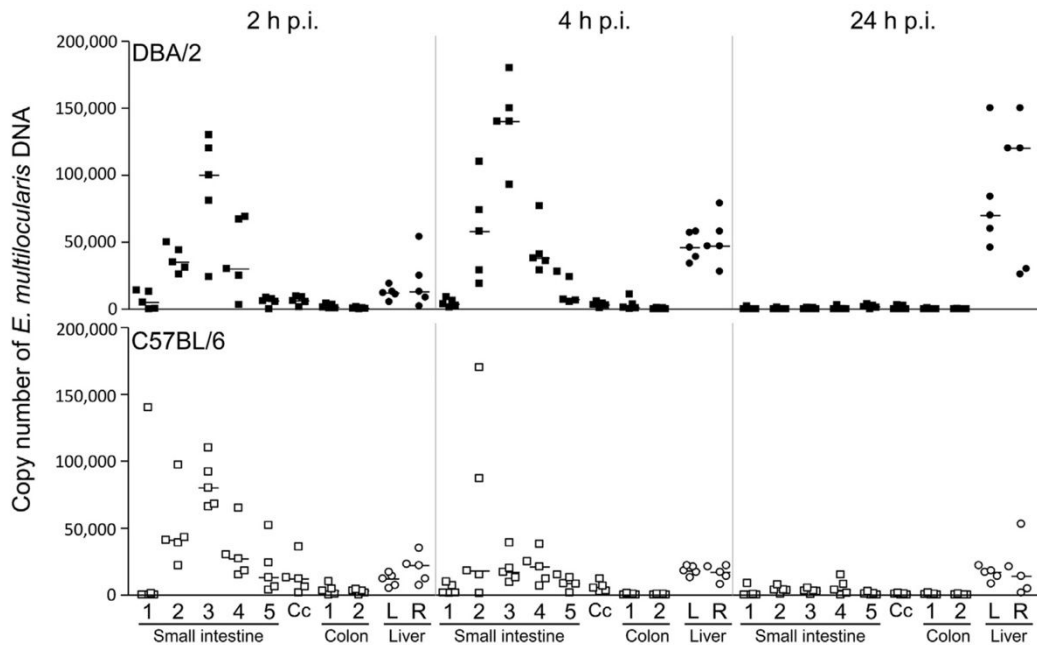


Fig.1. Amount of *Echinococcus multilocularis* parasite DNA in different mouse tissues. The quantity of parasite DNA detected in five small intestinal segments (1–5), caecum (Cc), two colonic segments, and the left (L) and right (R) lobes of the liver of DBA/2 (black squares/dots) and C57BL/6 (white squares/dots) mice at 2, 4, and 24 h.p.i. are shown. Each dot represents the data from one mouse. The copy number of the parasite DNA is indicated. The horizontal lines indicate the median values

(2)キツネに対する駆虫薬入り餌の散布の有効性を検討した地域を Fig.2 に示す。散布前に 60% 近くの糞便が、エキノкокクス陽性であったのに対し、駆虫薬入り餌 (ペイト) 散布後はエキノкокクス陽性糞便が激減した。しかしながら中間宿主動物での感染例はわずかに継続し、ペイト散布の頻度を増やしても陽性糞の検出は散発的に確認された (Fig.3)。これらの結果は、狭い地域でのペイト散布は、そこに居住する住民への感染源になる虫卵の絶対数を抑制することには有効である事を示す一方、キツネの移動時期に周辺地域からの感染個体の移入が推定されること、また中間宿主への感染と中間宿主の生存期間がコントロール対策を困難にすることが推測された。すなわち、地域からの流行の高度な排除のためには、中間宿主に対する対策を検討する必要があるものと考えられた。

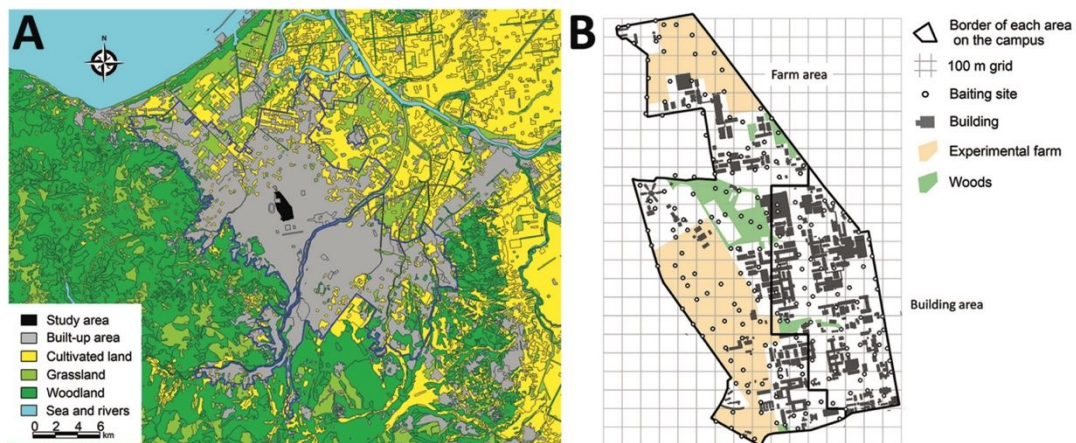


Figure 2. Study area for anthelmintic baiting experiment to control *Echinococcus multilocularis* tapeworms in Sapporo, Japan. A) Land use map around the study area, the Hokkaido University campus. The bold blue line shows the border of the urban area of Sapporo. B) Baiting sites and locations of buildings, farm areas, and wooded areas on the Hokkaido University campus. In the lifespan of infected voles section, dark gray bars show the life span of 7 infected *M. rufocanus* voles, estimated from the age on the day of trapping (+ SD of the z score). +, positive; -, negative.

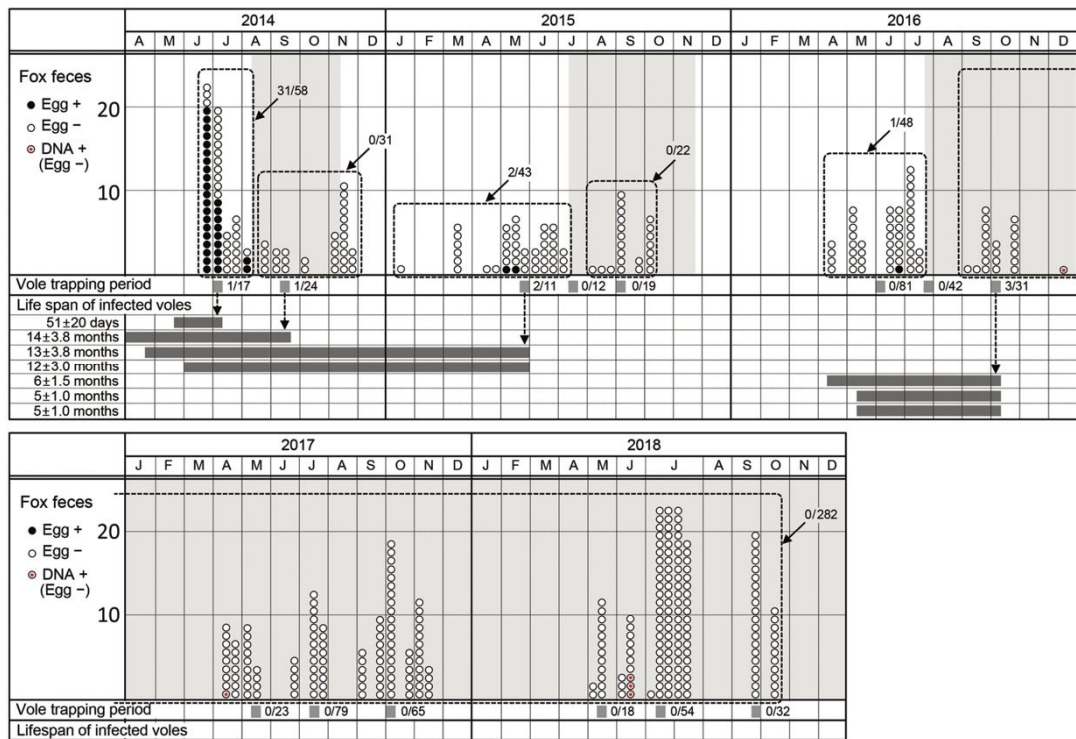


Figure 3. *Echinococcus multilocularis* tapeworm prevalence in foxes and voles at Hokkaido University campus, Sapporo, Japan, June 2014–October 2018. In the fox feces section, circles in each month show the fecal samples collected at the beginning, middle, and end of the month (88 fecal samples were collected in the middle of July 2018). Black circles indicate fecal samples that were *E. multilocularis* egg-positive. White circles indicate fecal samples that were *E. multilocularis* egg-negative. Circled red dots show fecal samples that were egg-negative and positive for *E. multilocularis*-specific copro-DNA. Fractions indicate the egg-positive rate of fecal samples collected during each period enclosed by a dashed line. Light gray shaded areas indicate the baiting periods. In the vole trapping period section, gray strips show the vole trapping periods. Fractions indicate the infection rate of *E. multilocularis* in *Myodes rufocanus* voles in each trapping period. In the lifespan of infected voles section, dark gray bars show the life span of 7 infected *M. rufocanus* voles, estimated from the age on the day of trapping (+ SD of the z score). +, positive; -, negative.

(3) 北海道内で採取されたミトコンドリアの多型解析により、北海道の多包条虫は少なくとも2つのハプログループに分かれることが明らかになった。このことは人為的な移入が複数回あった可能性を示している。人為的な動物の移動による感染の拡大リスクについては、改めて正しい情報を元に注意を喚起する必要があるとともに、寄生虫の遺伝的な差異による中間宿主への感染性の差異の有無についても実験的な検討が必要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Hayashi, Hirokazu Kouguchi, Yuhei Imasato, Takao Irie, Kinpei Yagi, Nariaki Nonaka, Ryo Nakao	4. 巻 51
2. 論文標題 Early-phase migration dynamics of Echinococcus multilocularis in two mouse strains showing different infection susceptibilities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Parasitol	6. 最初と最後の頁 893-898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpara.2021.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abdelbaset Eweda Abdelbaset, Kinpei Yagi, Nariaki Nonaka, Ryo Nakao	4. 巻 1
2. 論文標題 Cystic echinococcosis in humans and animals in Egypt: An epidemiological overview	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Res Parasitol Vector Borne Dis	6. 最初と最後の頁 100061-100061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crvbd.2021.100061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Kida, Hirokazu Kouguchi, Takao Irie, Kinpei Yagi, Ryo Nakao, Nariaki Nonaka	4. 巻 87
2. 論文標題 Sensitivity comparison between Mini-FLOTAC and conventional techniques for the detection of Echinococcus multilocularis eggs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uraguchi Kohji, Irie Takao, Kouguchi Hirokazu, Inamori Azusa, Sashika Mariko, Shimozuru Michito, Tsubota Toshio, Yagi Kinpei	4. 巻 28
2. 論文標題 Anthelmintic Baiting of Foxes against Echinococcus multilocularis in Small Public Area, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1677-1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2808.212016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kouguchi Hirokazu, Enkai Shigehiro, Matsuyama Hiroyuki, Hidaka Masahito, Inaoka Daniel Ken, Kita Kiyoshi, Yagi Kinpei	4. 巻 45
2. 論文標題 Data on the combined effect of atovaquone, mefloquine, and 3-bromopyruvic acid against <i>Echinococcus multilocularis</i> protoscoleces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 108707~108707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2022.108707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 林直樹、入江隆夫、尾針由真、木下豪太、孝口裕一、八木欣平、中尾亮、野中成晃
2. 発表標題 北海道に分布する多包条虫 <i>Echinococcus multilocularis</i> のミトゲノムにおける遺伝的多様性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Hayashi, Takao Irie, Yuma Ohari, Gohta Kinoshita, Hirokazu Kouguchi, Kinpei Yagi, Ryo Nakao, Nariaki Nonaka
2. 発表標題 Genetic diversity of <i>Echinococcus multilocularis</i> in Hokkaido, Japan based on mitogenome sequences
3. 学会等名 9th Sapporo Summer Symposium for One Health(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林直樹、入江隆夫、尾針由真、孝口裕一、木下豪太、八木欣平、中尾亮、野中成晃
2. 発表標題 北海道に分布する多包条虫 <i>Echinococcus multilocularis</i> のミトゲノムにおける遺伝的多様性およびその北海道への移入、拡散に関する考察
3. 学会等名 第67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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Yuhei Imasato, Ryo Nakao, Hirokazu Kouguchi Takao Irie, Jun Matsumoto, Kinpei Yagi, Nariaki Nonaka, Ken Katakura
2. 発表標題	Comparative study of the Echinococcus multilocularis miRNA profiles in intermediate hosts
3. 学会等名	8th Sapporo Summer Symposium for One Health (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Naoki Hayashi, Ryo Nakao, Hirokazu Kouguchi, Yuhei Imasato, Takao Irie, Jun Matsumoto, Kinpei Yagi, Nariaki Nonaka
2. 発表標題	Comparative analysis on the migration dynamics of Echinococcus multilocularis at the early stage of infection in two mouse strains.
3. 学会等名	8th Sapporo Summer Symposium for One Health (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	林直樹、入江隆夫、尾針由真、孝口裕一、Elisha Chatanga、木下豪太、八木欣平、岡本宗裕、中尾亮、野中成晃
2. 発表標題	北海道に分布する多包条虫のミトゲノムおよび核ゲノムにおける遺伝的多様性と集団間交雑の可能性
3. 学会等名	第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	林直樹、孝口裕一、今里裕平、入江隆夫、八木欣平、野中成晃、中尾亮
2. 発表標題	マウス2系統における多包条虫Echinococcus multilocularis感染初期動態の比較
3. 学会等名	第68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
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 長澤靖葉、林 直樹、孝口裕一、八木欣平、中尾亮、野中成晃
2. 発表標題 共培養細胞種による多包糸虫原頭節の発育比較と長期培養による成虫化
3. 学会等名 第68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
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菅又 昌実	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 272
3. 書名 日本の感染症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野中 成晃 (Nonaka Nariaki) (50281853)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	中尾 亮 (Nakao Ryo) (50633955)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	孝口 裕一 (Kouguchi Hirokazu) (50435567)	北海道立衛生研究所・その他部局等・主幹 (80106)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大久保 和洋 (Okubo Kazuhiro) (10785562)	北海道立衛生研究所・その他部局等・主査 (80106)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関