

エキノコックス実験区域における予備的多包条虫感染実験

Preliminary Experiments on *Echinococcus multilocularis*
in the Echinococcosis Research Unit

八木 欣平 伊東 拓也 石下 真通
高橋 健一 佐藤七七郎

Kinpei Yagi, Takuya Ito, Masamichi Ishige,
Kenichi Takahashi and Nanao Sato

北海道で流行している多包虫症の原因寄生虫である多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*)の生物学的な性格を調べる感染実験、特にその虫卵を扱う実験は本症の予防や疫学的なコントロールのために必要不可欠である。しかしな

がら、実験者が感染した場合重篤な疾病を引き起こすため、虫卵や感染動物を安全に扱う設備のない従来の実験施設では充分な実験的検討を行うことができなかった。

本種の虫卵は終宿主から糞便とともに排出され、大きさ

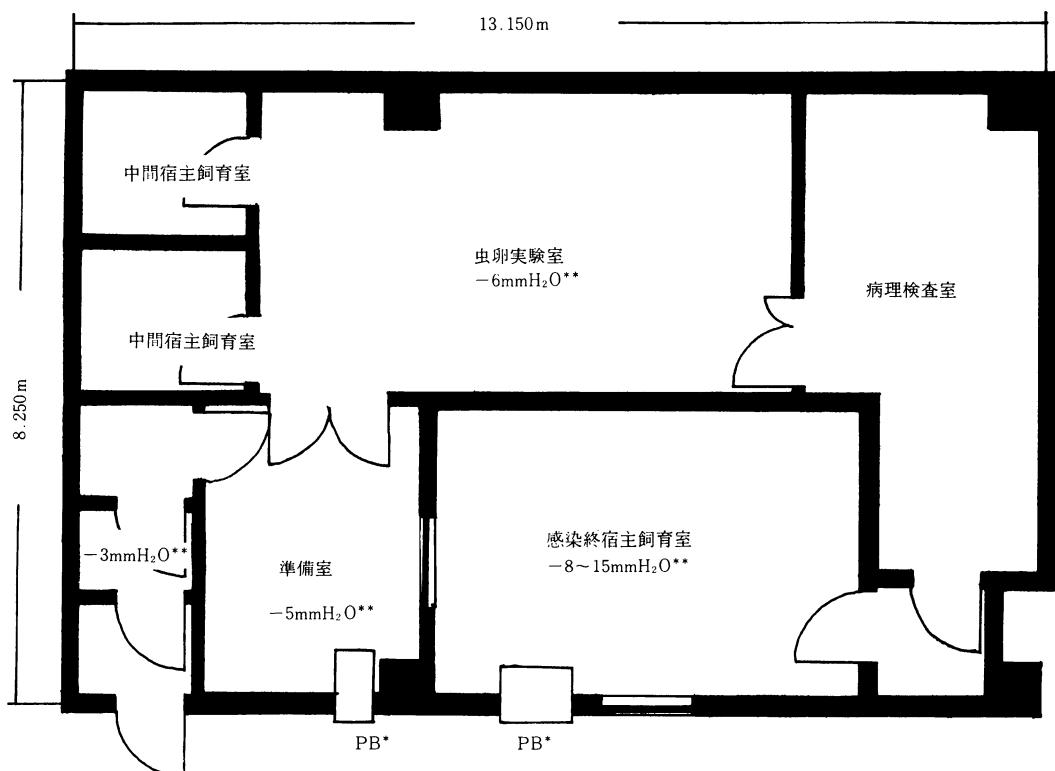


図1 エキノコックス実験区域

* 加熱型パスボックス
** 対サポート廊下気圧差

は直径約30~40μmで、中間宿主やヒトには経口的に感染する。この虫卵に対して現在のところ感染性をなくすための有効な薬剤はなく、完全な熱処理によって殺卵する以外に方法はないと考えられており、Gemmell¹⁾や坂本ら²⁾は感染実験については充分な装置と設備を準備して行うべきであると強調している。

当研究所に1987年に建設された動物実験研究施設のなかのエキノコックス実験区域（図1、以下エ実験区域）において、安全性に配慮した実験作業方法の確立を主目的に、実際に多包条虫を用いて終宿主ならびに中間宿主に感染実験を行った。

実験には2種類の多包条虫の分離株を用いた。ひとつは1951年アメリカ合衆国アラスカ州、セントローレンス島でキヌゲネズミ科のノネズミ *Clethrionomys rutilus* から分離されたもので、分離後北海道大学獣医学部で継代維持されたのち1966年当研究所に分与されたものである。この分離株はコットンラット *Sigmodon hispidus* を用いて2次包虫として現在まで継代維持された（以下A分離株）。もうひとつは1983年に北海道網走郡東藻琴村でエゾヤチネズミ *C. rufocanus bedfordiae* から分離され、A分離株と同様の方法で継代維持されたもの（以下B分離株）である。

実験感染は終宿主動物として約1.5歳齢のメスのビーグル犬4頭、中間宿主動物としては、Yamashita *et al.*³⁾およびOhbayashi⁴⁾の実験結果から感受性の高い動物として当研究所で自家生産した6~8週齢のコットンラット雌8頭ならびに同週齢のスナネズミ *Meriones unguiculatus* 雄雄3頭ずつを用いた。

感染実験は2つのシリーズから構成した。まずひとつは、継代している多包条虫の幼虫（多包虫）を終宿主に感染させ成虫を得て虫体から成熟した虫卵を分離することと、もうひとつは分離した虫卵を中間宿主へ感染させ幼虫の発育を観察することである。

まず、継代維持されていた2つの株の多包虫シストをコットンラットから分離し、常法に従い滅菌生理食塩水に原頭節が20,000個/mlの割合で含まれる懸濁液を作成した。この懸濁液をエ実験区域のなかの感染終宿主飼育室に設置した個別のチャンバー（図2）で飼育しているビーグル犬にゼラチンカプセルを用いて経口投与した。ゼラチンカプセルによる投与は注意深く数個に分けて行った。一頭当たりに投与した原頭節は4万個であり、おののの分離株についてイヌ2頭ずつに投与した。

Yamashita *et al.*⁵⁾は実験的に多包条虫をイヌに感染させた場合、原頭節摂取後虫卵が排出されるまでの期間が30~35日であったと報告している。今回の実験では原頭節投与後21日目以降はイヌの排泄物ならびにそれに汚染され

たものが無処理でエ実験区域から外界に漏洩しないように厳重に管理した。エ実験区域の気圧は虫卵による汚染の可能性の高い場所ほど低圧になるよう調節し、ドアの開閉時に虫卵が拡散することを防いだ（図1）。給気は中性能フィルター（NBS95%）を通し、温度22°Cに調節して供給し、排気についても同様に中性能のフィルターを通し外部に放出した。この区域の排水は全て加熱タンクにまとめ、121°Cで30分間加熱した後排水した。また、この区域で使用した作業衣、実験機材および動物の死体などは全て密閉された状態で蒸気による加熱型のパスボックスで処理した後、さらにオートクレーブで滅菌処理した。実験を通じて最も虫卵感染の危険性の高いイヌの飼育のために終宿主動物の飼育用チャンバー（図2）を設計、設置した。これは自動給水、自動洗浄のほか給餌が隣室の虫卵感染室から可能であること、さらに飼育終了後、蒸気で加熱処理が可能であることなどいくつかの特徴を持ち、糞便の採取や動物の解剖時以外研究者が直接感染源と接触することがなく、また、実験終了後虫卵をすみやかに失活させることができるとされている。この飼育チャンバーの空調は全区域の中で最も陰圧になるように調節し、汚染の拡大を防いでいる。

糞便中の虫卵の検査は比重1.27の蔗糖液を用いた浮遊法により原頭節投与後31日目から開始した。糞便は10%ホルマリンで固定した後70°Cで1時間以上加熱処理し、虫卵の有無を検討した。その結果A分離株原頭節を投与した1頭のイヌからは投与後35日目以降常に虫卵の排出を確認したが、他の3頭では虫卵を検出しないか、検出しても確認した虫卵は非常に僅かなものであった（表1）。

表1 多包条虫の原頭節を投与したビーグル犬の糞便中の虫卵

イヌNo.	感 染 後 日 数 (日)					
	31	35	36	38	41	44
1*	—	—	—	—	+	—
2*	—	/***	—	—	/***	—
3**	—	+	+	+	+	+
4**	—	—	—	—	—	—

* 北海道分離株原頭節、40,000個経口投与

** ア拉斯カ分離株原頭節、40,000個経口投与

*** 糞便採取不能

この結果から中間宿主に投与する虫卵の採取は常に虫卵排出を確認したA分離株原頭節投与犬について、投与後50日目に以下の手順を行った。まず、イヌをクロロホルムで麻酔した後、ペントバルビタールナトリウムを静脈内へ致死量投与し麻酔死させた。次に放血後小腸を取り出し幽門

表2 多包条虫の原頭節を投与したビーグル犬の小腸から検出した成虫の寄生数ならびに寄生部位

イヌNo.	小腸部位*						総 数
	1	2	3	4	5	6	
1 **	0	0	0	1	9	18	28
2 **	0	0	0	0	0	0	0
3 ***	405	1,420	5,160	3,740	1,355	445	12,515
4 ***	0	0	0	0	0	1	1

* 小腸を6等分し上部より1から6とした。

** 北海道分離株原頭節、40,000個経口投与

*** アラスカ分離株原頭節、40,000個経口投与

部および回腸の末端部を結索した。この小腸を寄生部位の検討のため6等分し、それぞれを生理食塩水の入ったボトルにいれ、ボトルの外面を充分に洗浄し病理検査室に運んだ。虫体の小腸からの分離は病理検査室で行った。同様の解剖検査を残りの3頭のイヌについても原頭節投与後50日および73日目に行った。これら4頭のイヌの小腸の各部位で分離された寄生虫体数を表2に示す。また、分離されたア分離株成虫の染色標本を図3に示す。本成虫の頭節の形態に奇形と思われるものがしばしば認められたが、この理由が株の性格であるのか2次包虫による継代の影響なのかについては更に検討が必要である。形態に関しては詳細に検討し、あらためて報告する予定である。

分離した虫体は Williams *et al.*⁶⁾ の方法にはほぼ準じペニシリソ G カリウム1000IU/ml、硫酸ストレプトマイシン10mg/ml を含む滅菌生理食塩水中に4°Cで保存した。保存6日後に中間宿主に感染させる成熟虫卵を得るために Colli & Williams⁷⁾ の方法にはほぼ準じて、虫体を人工胃液(1% (v/v) 塩酸、5% (w/v) 含糖ペプシンを含む生理食塩水) 中で37°C、24時間処理し、200個/ml の虫卵懸濁液を作成した。虫卵の調製は病理検査室に設置された安全キャビネット内で行った。中間宿主動物への感染は翌日病理検査室の流しのシンク内で、それぞれ200個の虫卵を注意深く経口投与することにより行った。虫卵を投与した動物は感染中間宿主飼育室の飼育棚で飼育した。この飼育棚は実験者に危険がないように空気の流れを調節した。

感染の有無を検討するための解剖は、虫卵投与後21日、55日および85日目にエーテル麻酔後放血殺したのち行い、それ以外のコットンラットについては116日および130日目に斃死したものについて行った。これらの結果を表3にまとめた。虫卵投与後116日目以降のコットンラットではシスト内に原頭節の形成を認めた。このことからこの施設において多包条虫の生活環が実験的に完成されたことを確認した。

このように今回の実験の作業を通じて、当研究所の工実験区域において多包条虫の虫卵を扱う実験がどうすれば安全におこなわれるかがおおむね確立されたと考えられる。また、ア分離株は20年以上の2次包虫症による継代にもかかわらず虫卵を産生し、しかもその虫卵は中間宿主への感

表3 アラスカ分離株多包条虫虫卵200個の中間宿主への感染

感染動物No.	性別	剖検時の感染後日数(日)	感染の有無
1*	♀	21	+
2*	♀	21	+
3*	♀	55	+
4*	♀	55	-
5*	♀	116	+
6*	♀	130	+
7*	♀	130	+
8*	♀	経過観察中	
9**	♂	21	-
10**	♀	21	-
11**	♂	55	-
12**	♀	55	-
13**	♂	85	-
14**	♀	85	-

* コットンラット *Sigmodon hispidus*

** スナネズミ *Meriones unguiculatus*

染性を有していることが明らかになった。しかしながら、1頭のア分離株および2頭のホ分離株原頭節投与犬で感染が成立しないか、または感染した場合でも投与量に比べて極端に回収虫体数が少なかったことや、分離したア分離株虫卵を投与したスナネズミで感染が成立しなかったことなど、予測された結果と異なる点を多く認めた。これらの点を含めて今後この施設を用いた実験的な検討をさらに安全

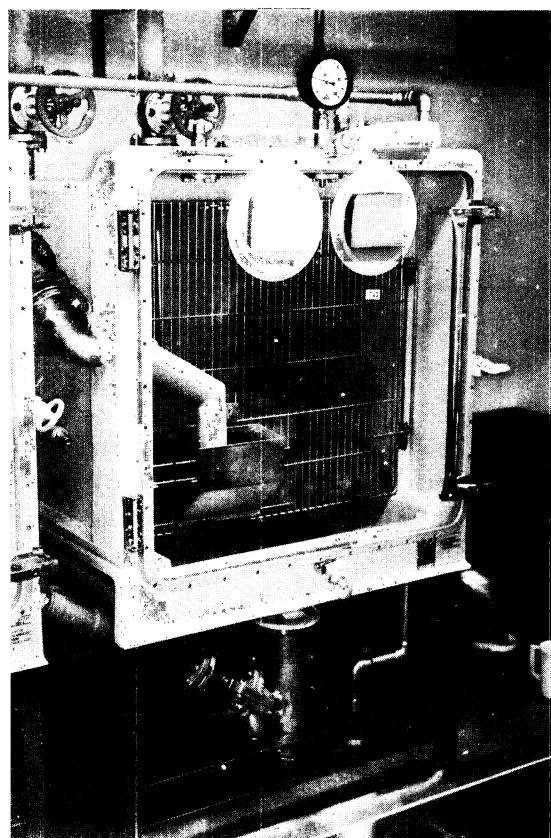


図2 感染終宿主飼育用チャンバー

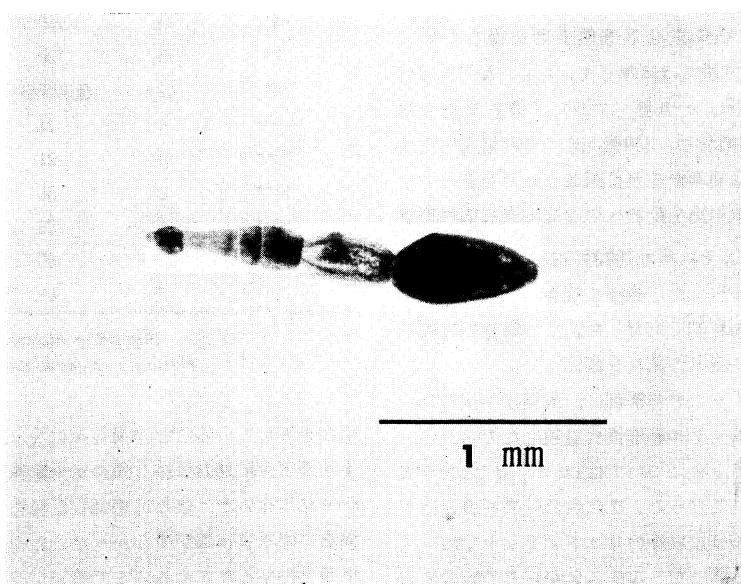


図3 アラスカ分離株多包条虫成虫
(セミコンカーミン染色)

性を確認しながら推進する必要があると考えられた。

本実験にあたり施設の設計、運営および実験に御助言御協力をいただいた服部畦作博士、川瀬史郎実験動物室長ならびにスタッフの皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Gemmell M. A.: Bull. Wld Hlth Org., **39**, 122 (1968)
- 2) 坂本司他：寄生虫誌，**20**, 120 (1971)
- 3) Yamashita J. *et al.*: Jpn. J. Vet. Res., **6**, 135 (1958)
- 4) Ohbayashi M.: *ibid.*, **8**, 134(1960)
- 5) Yamashita J. *et al* : *ibid.*, **4**, 113 (1956)
- 6) Williams J. F. *et al.*: J. Parasitol., **67** 540 (1981)
- 7) Colli C. W. and J. F. Williams: *ibid.*, **58**, 422 (1972)