

実験室内における多包条虫卵の不活化条件に関する諸検討（その3） —市販消石灰によるアルカリ性が及ぼす影響—

Some Observations on the Means to Inactivate *Echinococcus multilocularis* Eggs in Controlled Laboratory Condition: III. Effects of Alkalinity with Commercial Slaked Lime

日高 正人 松山 紘之 孝口 裕一

Masahito HIDAHA, Hiroyuki MATSUYAMA and Hirokazu KOGUCHI

Key words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫) ; slaked lime (消石灰) ; egg (虫卵) ; inactivation (不活化) ; alkaline (アルカリ性)

緒 言

多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) の虫卵は、本寄生虫に感染したイヌ科動物の糞便とともに排出され、ネズミ等の中間宿主の感染源となる。ヒトにおいても、多包条虫の虫卵を偶発的に経口摂取することで感染が成立する(多包虫症)。ヒトにおける多包条虫の感染部位は主に肝臓で、病気の進行は非常に緩慢である¹⁾。多包虫症の治療は外科的切除が最も有効であるが、病巣の巨大化や転移が認められた場合には完全切除が困難になる¹⁾。なお、本症に罹患し、適切な処置が施されない場合は90%以上の患者が死に至る^{2,3)}。

ヒトにおける多包虫症の原因となる虫卵の性状については、これまで当所を含む世界中の研究機関で検討されてきた⁴⁻⁹⁾。また、多包条虫の実験従事者の安全確保や地域住民の感染予防対策を提案するため、我々は特に虫卵の不活化条件について研究してきた^{4,5)}。一般的に、多包条虫の虫卵を不活化するためには、主に加熱、-80℃以下での冷凍、または薬剤での処理が効果的とされている。多包条虫を含むテニア科の虫卵は多くの薬剤に耐性があることが知られているが^{10,11)}、塩素系漂白剤の主成分である次亜塩素酸ナトリウムで多包条虫卵を不活化できることが報告されている⁹⁾。次亜塩素酸ナトリウム以外にも取り扱いが容易で、市販されている薬剤の効果を検討することは対策を提案する上で重要である。その1つの候補として土壌改良剤として使用される消石灰(水酸化カルシウム)があげられる。消石灰は強アルカリ剤の1つであり、強力なタンパク質変性作用、及び脱脂作用を持つため、畜舎の洗浄や消毒に用いられている¹²⁾。安価で大量使用が可能であるため、急性の伝染病の予防や発生時の環境消毒に用いられる¹²⁾。実際に、消石灰や石灰乳(消石灰を懸濁させた乳状液: 飽

和消石灰水溶液)を用いることによって、鳥インフルエンザウイルスやサルモネラ属菌が不活化されることが報告されている^{13,14)}。住宅地の庭や道路にキツネの糞がある場合、消石灰を用いて虫卵を殺滅することができれば、多包虫症の感染源対策として地域住民が容易に行える可能性がある。そこで本研究では、市販されている消石灰を用いて多包条虫の虫卵を処理し、マウスへの感染性を指標として、本薬剤の虫卵に対する殺滅効果を評価した。

方 法

1. 虫卵の精製

北海道根室市において分離され、当所で継代維持されている多包条虫(北海道株)を本研究に用いた。虫卵は先に報告した方法⁴⁾で多包条虫に実験的に感染させたイヌの糞便(感染後33日)から調製した。糞便は水道水に懸濁し、茶漉しを用いてろ過した。次に、そのろ液を目開き125 μ mの金属メッシュを用いてろ過し、未消化物を除いた。そのろ液に5倍量の水道水を加えよく混合した後、簡易沈殿を行い、沈渣部分に含まれる虫卵を回収した。ペニシリン(Meiji Seika, 100万単位/L)及びストレプトマイシン(Meiji Seika, 2 g/L)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で約5,000虫卵/mLに調整し、これを精製虫卵懸濁液として試験に供した。

2. 虫卵処理

1) 石灰乳の効果

精製虫卵懸濁液2 mL(約10,000虫卵)が入ったコニカルチューブを3本用意した。これらを遠心分離(3,000 rpm、10分間)し、上清を取り除いた沈渣に、①PBS(陰性対照)、②消石灰10 gを50 mLの蒸留水に溶かし、遠心分離して不要物を取り除いた石灰乳、③1N水酸化ナトリウム溶液(和光純薬)をコニカルチューブの目盛りが12 mLとなる

ように添加した。よく転倒混和し、均一にした後、室温で一晩静置した。その後、すべての試験液を遠心分離して上清を取り除き、沈渣中の虫卵を 10 mL の PBS で 3 回十分に洗浄した。石灰乳、及び水酸化ナトリウム溶液で処理された虫卵は位相差顕微鏡（オリンパス社製、CK2）を用いて形態観察を行った。

2) 粉末状消石灰の効果

精製虫卵懸濁液 10 mL（約 50,000 虫卵）が入ったディスポーザブルシャーレ 2 枚と、多包条虫に実験的に感染させたイヌの糞便（感染後 33 日）5 g が入ったシャーレを 1 枚用意した。精製虫卵懸濁液を入れたシャーレには、①でんぶん（和光純薬）1 g（陰性対照）、②消石灰 1 g を添加し、混合した。糞便の入ったシャーレにおいては、③粉末状消石灰 1 g を糞便全体にまぶした。一晩静置した後、①と②のシャーレに入っている内容物をコニカルチューブに入れ、遠心分離して上清を取り除いた。③のシャーレに入った糞便はコニカルチューブに入れ、蒸留水 45 mL を添加し、懸濁した後、遠心分離して上清を取り除いた。そのようにして得られた①～③の沈渣にショ糖液（比重 1.27）を 45 mL 添加し、よく混合した。その後、遠心分離し、上清を 500 mL の蒸留水を入れたメートルグラスに移し、そのショ糖液を希釈した。メートルグラスの底に集まった虫卵を遠心分離（3,000 rpm、10 分間）により回収し、それぞれ虫卵数を計測し、マウスへの投与試験に用いた。

3. マウスへの虫卵投与試験

先に報告された方法に準じ⁴⁻⁸⁾、若干の改変を加えた以下の方法により行った。1) 石灰乳の効果、及び 2) 粉末状消石灰の効果による方法で処理された虫卵約 500 個を 1 群 5 頭の ddy マウス（7～12 週齢）にそれぞれ麻酔下にて、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与 28 日後に解剖し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓をディスポシャーレに置き、-18℃で一晩凍結した後、メスで約 1 mm 厚に薄切し、ヘッドルーペ（× 1.6）を用いた肉眼的観察により肝臓に定着・発育した病巣（シスト）を計数した。1) 石灰乳の効果、及び 2) 粉末状消石灰の効果における、各処理群間でのマウスの形成シスト数の違いを明らかにするために、統計ソフト R ver.4.1.3¹⁵⁾ を使用してノンパラメトリック多重比

較法（Steel-Dwass 法）による検定を行った。この解析には、nparcomp パッケージを使用した。

結果と考察

1. 石灰乳の効果

表 1 に示すように、水酸化ナトリウム溶液、及び石灰乳で一晩処理した虫卵をマウスに投与すると、陰性対照群と比べて有意に形成シスト数が減少した。水酸化ナトリウム溶液で処理した虫卵を投与したマウスにはシストが認められず、完全にその感染性を失っていた。また、石灰乳で処理した虫卵は感染性を完全に失ってはいないものの、投与した 5 頭のマウスのうち、形成シスト数が 0 となる個体も 1 頭観察された。石灰乳の pH は約 11～12 であった。水酸化ナトリウム溶液、及び石灰乳のどちらも強アルカリ剤であり、タンパク質変性作用、及び脱脂作用を持つため¹²⁾、これらの作用が虫卵にダメージを与えることが示された。

薬剤で処理した虫卵を光学顕微鏡下で観察すると、水酸化ナトリウム溶液で処理した虫卵は通常黄味がかっている色調が無色化し、その幼虫被殻と六鉤幼虫の形態が変形していた。しかし、石灰乳で処理した虫卵は PBS で処理した虫卵と形態的には差がみられなかった。テニア科条虫卵は次亜塩素酸で死滅することがわかっており、その際の特徴として、六鉤幼虫を含む幼虫被殻が崩壊することが知られている⁹⁾。水酸化ナトリウム溶液で処理した虫卵でも同様の傾向がみられたことから、次亜塩素酸同様に虫卵を殺滅する効果があると示唆された。石灰乳で処理した虫卵の形態に変化が見られなかったのは、タンパク質変性作用や脱脂作用が水酸化ナトリウム溶液に比べて弱い可能性が考えられた。

水酸化ナトリウム溶液や石灰乳が虫卵にダメージを与えることが分かったものの、実際に虫卵を殺滅させたい場面では、キツネの糞便についても考慮しなければならない。また、本研究で用いた石灰乳は飽和液であったため、より低い濃度の消石灰水溶液でも検討する必要がある。

2. 粉末状消石灰の効果

表 2 に示すように、精製虫卵懸濁液に消石灰を溶かした場合は、有意に形成シスト数が減少し、感染性を持つ虫卵

表 1 マウスへの虫卵投与試験による形成シスト数の比較（石灰乳の効果）

試薬	濃度	投与頭数	感染頭数	平均シスト数（標準偏差）
PBS（陰性対照群）	—	5	5	86.0 (15.7)
石灰乳	飽和	5	4	6.0 (7.4)*
水酸化ナトリウム溶液	1 mol/L	5	0	0 (0)*

*：陰性対照群に対して有意差あり（ $p < 0.01$ ）

表 2 マウスへの虫卵投与試験による形成シスト数の比較（粉末状消石灰の効果）

試薬と条件	投与頭数	感染頭数	平均シスト数（標準偏差）
虫卵懸濁液にでんぶん 1 g（陰性対照群）	5	5	48.8 (17.5)
虫卵懸濁液に消石灰 1 g	5	5	5.4 (4.5)*
糞塊に粉末状消石灰 1 g	5	5	34.8 (19.0)

*：陰性対照群に対して有意差あり（ $p < 0.01$ ）

数の低下がみられた。しかし、糞塊の上に粉末状消石灰を振りかけても効果はなかった。消石灰を溶かしたシャーレ内の溶液の pH は約 12 であった。

消石灰は粉末の状態では細菌に対し、ほとんど効果を示さないことが知られており、石灰乳のように水分を得ることで効果を発揮する¹⁴⁾。また、消毒薬は有機物が多いほど、本来の消毒効果が低下する¹²⁾。糞便には有機物が多い一方で、多量に水分を含んでいるわけではないため、粉末状消石灰だけではその効力を発揮できなかったと考えられる。

これらの結果から、市販消石灰は条件によっては多包条虫卵にダメージを与える効力があると示された。当所医動物グループには、北海道民から多包条虫やキツネの糞便について様々な相談が寄せられる。その中で、キツネの糞便が様々な場所（庭先、家庭菜園、校庭など）にあり、糞便を取り除いた後の処理はどうすべきかという質問も多い。その際には、糞便のあった場所に熱湯をかけ、虫卵を殺滅することを勧めている。しかし、都市公園、校庭あるいは河川敷など広い敷地には、大量の熱湯を持ち出すことが困難な場合もあると想定される。そのような場合、糞便を除去した後、石灰乳を糞便があった場所にかけることで、虫卵にダメージを与え、ある程度リスクを下げることができると考えられた。なお、キツネの糞便の上に直接消石灰を振りかけても効果は期待できないので、注意が必要である。

文 献

- 1) 奥祐三郎：人獣共通寄生虫のエキノコックス症，社団法人中央畜産会，東京，2010
- 2) Ammann RW, Eckert J: Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. In *Echinococcus* and hydatid disease. (eds. Thompson RCA, Lymbery AJ), CAB International, Wallingford, 1995, pp.411-463
- 3) Ammann RW, Eckert J: Cestodes: *Echinococcus*. *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, **25**, 655-689 (1996)
- 4) 入江隆夫，孝口裕一：実験室内における多包条虫卵の不活化条件に関する諸検討。道衛研所報，**64**，63-65 (2014)
- 5) 入江隆夫，孝口裕一：実験室内における多包条虫卵の不活化条件に関する諸検討（その2）—市販弱酸性次亜塩素酸水の影響—。道衛研所報，**67**，87-89 (2017)
- 6) 石下真通，伊東拓也，八木欣平：多包条虫卵の寿命とその温度条件。道衛研所報，**43**，49-51 (1993)
- 7) 八木欣平，伊東拓也：多包条虫卵の感染性に及ぼす低温および乾燥の影響。道衛研所報，**49**，167-168 (1999)
- 8) 八木欣平，伊東拓也：室温で一定湿度に保存したイヌ糞便中の多包条虫卵の感染性について。道衛研所報，**53**，96-97 (2003)
- 9) Craig PS, Macpherson CNL: Sodium hypochlorite as an ovicide for *Echinococcus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **82**, 211-213 (1988)
- 10) Parnell IW : Some observations on taeniid ovicides: screening techniques, and the effects of some inorganic compounds. *J. Helminthol.*, **39**, 257-272 (1965)
- 11) Eckert J, Gottstein B, Heath D, Liu FJ: Prevention of echinococcosis in humans and safety precautions. In *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern*. (eds. Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS), WHO and OIE, Paris, 2001, pp.238-247
- 12) 獣医衛生学教育研修協議会：動物衛生学，文英堂出版，東京，2018
- 13) 石倉洋司：消石灰の鳥インフルエンザウイルスに対する消毒効果の検討。島根県家畜病性鑑定室報，**12**，35-38 (2008)
- 14) 横関正直：石灰による踏み込み消毒および畜鶏舎床面・壁面消毒の効果の実験的検討。畜産の研究，**69**(2)，113-115 (2015)
- 15) R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/> (確認：2023年4月6日)