

## 二次包虫による多包虫の継代が多包条虫の虫卵産生能に影響した一例

A Case Report: Repeated Passages of Metacestode Using Experimental Secondary Echinococcosis Affected Reproductivity of *Echinococcus multilocularis*

後藤 明子 入江 隆夫\*<sup>1</sup> 孝口 裕一  
山野 公明 八木 欣平\*<sup>2</sup>

Akiko GOTO, Takao IRIE, Hirokazu KOUGUCHI,  
Kimiaki YAMANO and Kinpei YAGI

Key words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫) ; secondary echinococcosis (二次包虫症) ; passage (継代) ; reproductivity (虫卵産生能)

### 緒 言

ヒトの多包性エキノコックス症は、包条虫属の*Echinococcus multilocularis* (多包条虫) が原因となる人獣共通寄生虫感染症である。わが国において、ヒトの多包性エキノコックス症の患者は主に北海道で発生している<sup>1)</sup>。また、ヒトでは感染初期の自覚症状がなく、症状が現れた時は既に末期のことが多いため、北海道では「北海道エキノコックス症対策実施要領」に基づき、多包性エキノコックス症患者の早期発見のための住民検診が実施されている<sup>2)</sup>。現在、住民検診においては、腹部超音波検査に加え、感染者の血清に含まれる抗エキノコックス抗体を ELISA 法<sup>3)</sup> 及びウエスタンブロット法<sup>4)</sup> により検出する方法がとられている<sup>2,4)</sup>。これらの血清検査には、実験室内で人為的に増殖させた多包条虫の幼虫 (多包虫) に多数含まれる原頭節から抽出・調製された粗抗原が用いられている<sup>3,4)</sup>。

実験室内で多包虫を安定して増殖させるためには、実験室内で多包条虫株を保有し維持する必要がある。現在、多包条虫の虫卵や多包虫を生体外で長期間保存・培養する方法は確立されていないことから、実験室内において多包条虫株を維持するためには実験動物への感染が必須となる。実験室内においては、コトナラットなどの多包虫に感受性を有する齧歯目の実験動物を中間宿主、イヌを終宿主として多包条虫の生活環を形成させることができる<sup>5)</sup>。そのため、本来、実験室内で多包虫を増殖させるには、コトナラットなどの中間宿主となり得る実験動物に多包条虫の虫卵を経口投与して、体内で多包虫病巣を形成させる必要がある。

しかし、ヒトが多包条虫の虫卵を経口摂取すると多包性エキノコックス症を発症する恐れがあるため、虫卵の取扱いには危険が伴う。一方、多包虫の組織を別の新たな中間宿主となる動物の腹腔内に接種することによって、二次的に多包虫病巣を形成させることができる (二次包虫)<sup>6)</sup>。ヒトが多包虫の組織を経口摂取しても多包性エキノコックス症を発症することはないため、コトナラットなどの実験動物と二次包虫を用いた多包虫の継代法は、実験室内で多包虫及び原頭節を安定して増殖・維持するための比較的安全な方法として利用されている。

しかし、二次包虫としての継代数が増加するに従って、多包虫に含まれる包囊の成長が早まるとともに、原頭節の数の減少が認められることがある<sup>7)</sup>。また、個々の原頭節は終宿主動物の小腸内で 1 隻の成虫に成長するが、二次包虫として長期間維持・継代していた多包虫から得られた原頭節をイヌに投与した際、成虫への発育や虫卵の産生がみられなくなる場合がある<sup>8,9)</sup>。しかし、多包虫及び原頭節の形状や性状が正常に維持される二次包虫としての継代数の上限については、これまで具体的に検証されていなかった。

今回、二次包虫による継代を 17 回繰り返した多包虫組織から採集した原頭節をイヌに投与したところ、成虫への発育や虫卵の産生状況に通常とは異なる変化が認められた。この事象は、実験室内で二次包虫を利用して多包虫を長期間継代・維持する際に留意すべきものと考えられたので、本稿で詳細を報告する。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 供試株

1987 年に北海道根室市で捕獲したエゾヤチネズミ (*Clethrionomys rufocanus bedfordiae*、タイリクヤチネズミ

\*<sup>1</sup> 現 宮崎大学農学部

\*<sup>2</sup> 現 北海道大学大学院獣医学研究院

の亜種<sup>10)</sup>に寄生していた多包虫由来で、当所でコトナラットとイヌを用いて維持している多包条虫株（根室株）<sup>11)</sup>を用いた。今回の実験には、2013年に根室株の虫卵をコトナラットに感染させて得た多包虫を継代元として、二次包虫による継代をコトナラットで17回繰り返した多包虫を使用した。なお、それぞれの継代時には、コトナラットへの接種後3カ月以上経過して十分に発育し、多数の原頭節を内含している多包虫を使用した。

## 2. 方法

多包虫組織の接種後約4カ月経過したコトナラットの腹腔から多包虫を摘出し、ハサミで細断した。細断した多包虫を金属メッシュ製の容器に入れてリン酸緩衝生理食塩水に浸漬することにより、多包虫組織内の原頭節を分離・精製した。精製した原頭節の形状を観察して計数した後、原頭節約25万個を含むリン酸緩衝生理食塩水懸濁液をイヌ（3カ月齢のビーグル犬）に経口投与した。

原頭節投与後33日目にイヌ糞便中に含まれる多包条虫卵を直接塗抹法<sup>12)</sup>で検出し、投与した原頭節が多包条虫成虫に成長してイヌ小腸内に寄生していることを確認した。また、同日に採集したイヌ糞便約200gから多包条虫卵の集卵をショ糖浮遊法<sup>13)</sup>により試みた。集卵した多包条虫卵の感染能及び多包虫の発育状況を確認するため、コトナラッ

トに虫卵を経口投与し、4カ月後に解剖して多包虫及び原頭節の形状を観察した。

原頭節投与後35日目にイヌの小腸に寄生していた多包条虫成虫をすべて採集した。採集した成虫は10%ホルマリンで固定してから、一部を標本として実体顕微鏡下で計数・観察するとともに、約50隻の虫体をセミコンカーミン液で染色して光学顕微鏡下で形態を観察した。

なお、本研究に係る動物実験は北海道立衛生研究所動物実験委員会による承認後に実施した（課題番号：K 25-1号、K 28-1号、K 31-1号）。

## 結果と考察

多包虫を二次包虫として長期間維持・継代した際、鉤の欠落など形状の変化した原頭節が多包虫組織内に認められることがあるが（未発表）、今回投与した原頭節には虫卵感染により得られた多包虫に含まれる原頭節との形態的な差は見られなかった。これらの原頭節を投与したイヌの腸内には83,680隻（投与した原頭節の33.5%）の多包条虫成虫が寄生していることが確認された。しかしながら、実体顕微鏡下での観察では標本中に最終片節内に虫卵を有する虫体を確認することができなかった（図1）。また、これらの成虫のうち約50隻を染色して光学顕微鏡下で構造

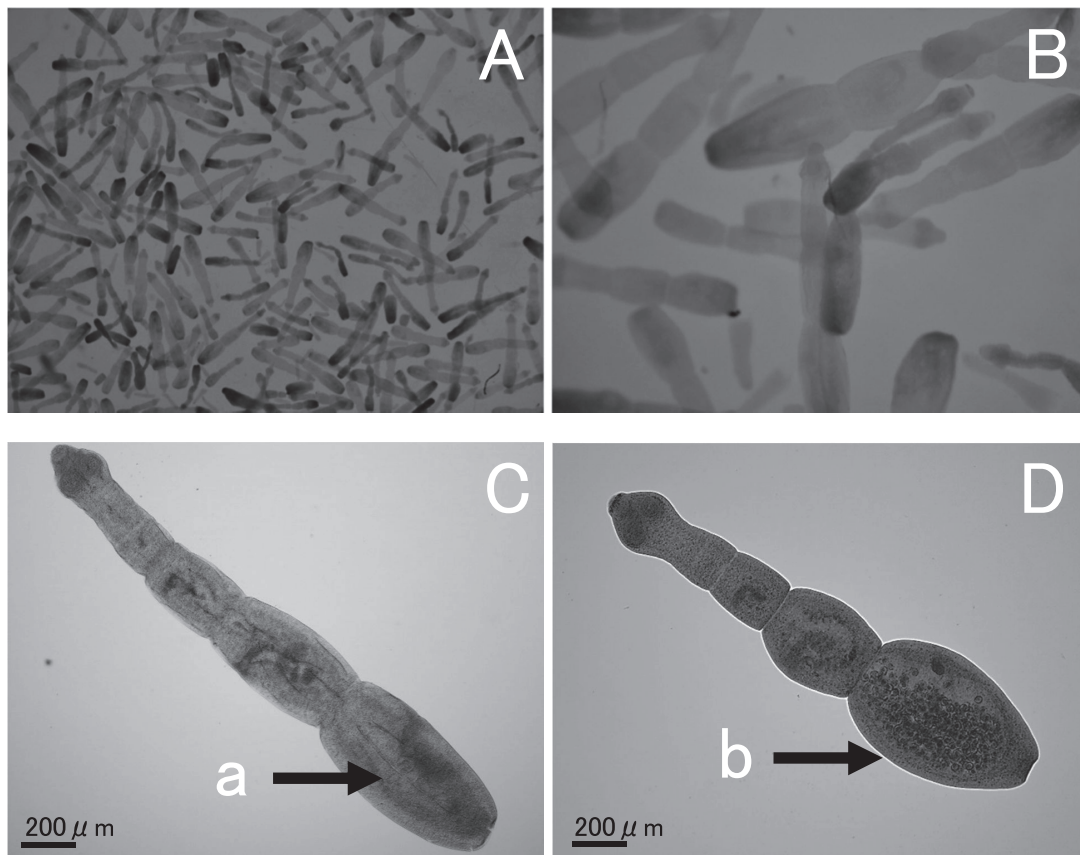


図1 原頭節投与後35日目のイヌの腸内から得られた多包条虫成虫

A-C、二次包虫として17回継代した多包虫の原頭節を投与したイヌから採集した群（本研究）；D、虫卵を投与した中間宿主から得られた多包虫の原頭節を投与したイヌから採集した群（対照）。虫体はいずれも10%ホルマリンで固定。本研究で得られた大部分の虫体においては、最終片節の子宮内に虫卵様の形態は認められず（A、B；実体顕微鏡像）、同部位に細胞集塊（a）が見られた個体が少数観察された（C）。対照群（D）においては、同部位に多数の成熟虫卵が確認できる（b）。

を観察したところ、最終片節内に成熟した虫卵を有する虫体は認められず、未成熟な虫卵とみられる細胞塊を保有する虫体を5隻程度確認するにとどまった(図1)。

イヌに多包条虫の原頭節を投与すると、35日目前後に最初の虫卵排出量のピークが見られることが多い<sup>14,15)</sup>。今回、原頭節投与後33日目のイヌの糞便200gから、ショ糖浮遊法でおおよそ250個の虫卵が得られた。採集した虫卵をコトナラット2頭に50個ずつ経口投与し、4カ月後に解剖したところ、正常な形状の原頭節を多数内含した多包虫が形成されていることを確認した。

今回、原頭節を投与したイヌの糞便には成熟虫卵が含まれていたにもかかわらず、虫体の形態観察及び計数に用いた成虫標本の中に成熟虫卵を保有している虫体は確認できなかった。このことについては、今回寄生していたすべての成虫の中には成熟虫卵を保有する虫体が含まれていたものの、その数のごくわずかであった、または成熟虫卵を含んだ老熟片節が離脱した直後であったために確認されなかった可能性が考えられたが、詳細については明らかにできなかった。

現在のところ、二次包虫として長期間維持・継代した多包虫の形状や原頭節の形成数及び原頭節が成虫に発育した際に虫卵産生状況が変化する詳細なメカニズムについては解明されていない。しかし、二次包虫を用いた継代法は多包条虫本来の生活環から逸脱しているものであるため、継代を繰り返す行為そのものが多包虫の性状に影響を与えていることは十分に考えられた。また、当所で継代しているヨーロッパのヒト多包性エキノコックス症患者由来株においても、二次包虫として継代・維持していた多包虫から得られた原頭節をイヌに投与したところ、最終片節に虫卵を保有していない虫体が観察されたとの報告があるため<sup>9)</sup>、今回の事象は根室株特有の性状ではなく、多包条虫に共通した性状である可能性が高いと考えられた。

実験室内において多包条虫株を維持・継代するにあたり、多包虫及び原頭節の生物学的性状の変化を抑えるためには、コトナラットのみを使用して二次包虫による継代を続けるよりも、コトナラットとイヌを用いた生活環を形成させる方が望ましいと考えられる。しかし、この方法を常に用いると多包虫を継代する度にイヌを用いた感染実験を行うことになるため、実験者が虫卵に接して多包性エキノコックス症に感染する危険性が増大する。継代に伴う多包虫及び原頭節の生物学的性状の変化を抑えつつ、虫卵を取り扱う感染実験の頻度を減らすには、コトナラットとイヌを用いた多包条虫の生活環形成と二次包虫を利用したコトナラットでの多包虫の継代を適切に併用することが肝要となる。今回の結果により、実験室内で多包虫を維持・継代する工程において、二次包虫を用いた継代が可能な回数の上限が示された。すなわち、二次包虫による継代数が17代より

少ないうちに原頭節をイヌに投与して虫卵を採集し、再びコトナラットに虫卵を感染させて正常な生物学的性状を有した多包虫を得て、これらを初代材料として再び二次包虫による継代を行う必要がある。この結果に基づき、多包性エキノコックス症の検査及び多包条虫に関する研究を効率的に行うための長期的な計画が可能となった。

本稿を終えるにあたり、二次包虫感染コトナラットの飼育にご協力いただきました三協ラボサービスの担当者各位に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 病原微生物検出情報事務局：エキノコックス症 1999～2018年。病原微生物検出情報，40(3)，33-34 (2019)
- 2) 八木欣平：北海道のエキノコックス症対策—行政の取り組みについて—。道衛研所報，67，1-7 (2017)
- 3) 佐藤秀男，三田村 弘，新井純理，熊谷 満：酵素抗体法によるヒト包虫症の血清学的診断（第1報）多包虫性抗原による酵素抗体法。道衛研所報，33，8-15 (1983)
- 4) 長井忠則，山野公明：エキノコックス症の血清検査。エキノコックス症（多包条虫）診断と治療のガイドライン（北海道エキノコックス症対策協議会エキノコックス症患者調査専門委員会編），北海道，札幌，2010，pp.1-5
- 5) 八木欣平，伊東拓也，石下真通，川瀬史郎：コトナラットにおける多包条虫の発育についての検討。道衛研所報，40，9-12 (1990)
- 6) Yamashita J, Ohbayashi M, Konno S: Studies on echinococcosis VI: Secondary *echinococcosis multilocularis* in mice. Jpn. J. Vet. Res., 5, 197-202 (1957)
- 7) 川瀬史郎：多包虫の継代。北海道のエキノコックス（北海道立衛生研究所編），北海道立衛生研究所，札幌，1999，pp.71-72
- 8) 八木欣平，伊東拓也，石下真通，高橋健一，佐藤七七朗：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。道衛研所報，38，55-59 (1988)
- 9) 八木欣平，伊東拓也，川瀬史郎，高橋健一：ヨーロッパ株多包条虫の虫卵を介したイヌ—コトナラットによる継代の確立とPCR-RFLPによる株の同定。道衛研所報，51，72-75 (2001)
- 10) 阿部 永，石井信夫，伊藤徹魯，金子之史，前田喜四雄，三浦慎悟，米田政明：日本の哺乳類 [改訂版]，東海大学出版会，秦野，2005
- 11) 八木欣平，大山 徹：根室分離株多包条虫からの種特異的遺伝子 (U1 snRNA gene) のPCR法を用いた検出。道衛研所報，44，55-58 (1994)
- 12) 佐伯英治，升 秀夫，早川典之：臨床検査シリーズ 寄生虫鑑別アトラス—オールカラー版—，メディカルサイエンス，東京，2003
- 13) 伊東拓也，八木欣平，石下真通：蔗糖液浮遊法が多包条虫卵への適用—猫条虫卵を用いての回収率—。道衛研所報，39，79-80 (1989)
- 14) 八木欣平，伊東拓也：感染実験による多包条虫の生物学的性状の解析。北海道のエキノコックス（北海道立衛生研究所編），北海道立衛生研究所，札幌，1999，pp.51-63
- 15) 孝口裕一：イヌの多包条虫駆虫時の虫卵排出パターン。道衛研所報，69，85-87 (2019)