

## 人畜共通寄生虫の生物的防除：エキノコックス近縁種間競合モデルの開発と応用

### Biological control of multilocular echinococcosis

代表研究者	北海道大学獣医学部教授 Prof., Facul. of Ved. Med., Hokkaido Univ. Masao KAMIYA	神谷正男
協同研究者	酪農学園大学酪農学部教授 Prof., Facul. of Rakunou, Rakunou Gakuen Univ. Masashi OHBAYASHI	大林正士
	北海道大学免疫科学研究所教授 Prof., Inst. of Immunol. Sci., Hokkaido Univ. Ichiro AZUMA	東市郎
	北海道大学農学部助教授 Assoc. Prof., Facul. of Agr., Hokkaido Univ. Hisashi ABE	阿部永
	北海道大学獣医学部助手 Res. Assoc., Facul. of Vet. Med., Hokkaido Univ. Yuzaburo OKU	奥祐三郎
	北海道大学獣医学部助手 Res. Assoc., Facul. of Vet. Med., Hokkaido Univ. Munehiro OKAMOTO	岡本宗裕
	ジョンズホプキンス大学医学部大学院博士課程 Doctor Course Student, Sch. of Med., The Johns Hopins Univ. Ooi HONG KEAN	ウイ・ホンケン
	ミシガン州立大学獣医学部大学院博士課程 Doctor Course Student, Sch. of Ved. Med., Michigan State Univ. Nariaki NONAKA	野中成晃
	北海道大学獣医学部大学院博士課程 Doctor Course Student, Facul. of Vet. Med., Hokkaido Univ. Hiroshi SATO	佐藤宏
	北海道大学獣医学部大学院博士課程 Doctor Course Student, Facul. of Vet. Med., Hokkaido Univ. Kenji ISHIWATA	石渡賢治

Echinococcosis, also known as hydatid disease, is one of the most important cestode of man, domestic and wild animals. It is widely distributed in the world and recent information points to a spread of the disease into area previously free. Two species of tapeworm, i. e., *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*, are responsible for most cases of human disease, although

several other species are known to occur. In Japan multilocular echinococcosis or alveolar hydatid disease, caused by *Echinococcus multilocularis*, has further been reported in many hitherto "non-endemic" areas in Hokkaido in the past year, bringing the total number of endemic administrative districts to 121 in Hokkaido out of 212 as of April 1987. One of the aims of this research project is the biological control of this parasite by the application of antagonistic competition between *E. multilocularis* and a closely related cestode. Four strains of *E. multilocularis* and 4 species with 8 strains of taeniid cestodes have been isolated and maintained by serial passage in laboratory animals for the purpose of analysing biological antagonism between them in laboratory reared *Clithrionomys rufocanus*.

The results of our attempts to isolate the various cestodes are as follows.

*E. multilocularis*: In 1986, hepatic cysts of a swine in Kitami city, Hokkaido, were injected peritoneally into 6 Mongolian jirds. Of the 6 jirds, six months later, 2 were found to be infected with *E. multilocularis* cysts bearing fully grown protoscoleces. The cysts were then used for passage in rodents in our laboratory for further studies. Thus, we have successfully isolated a strain from the swine and also 3 more strains from rodents in Japan and in Alaska, U. S. A.

*T. taeniaeformis*: Differences in the degree of susceptibilities of the various experimental animals to the 4 strains were observed. Differences in the infectivity were also noted when the infection was carried out with the administration of eggs or oncospheres. Generally, Mongolian jirds and *C. rufocanus* were resistant when eggs of *T. taeniaeformis* were inoculated orally. However, these animals became susceptible when the route of infection was changed to the subcutaneous or intraperitoneal inoculation of oncospheres. In the jird, the site of attrition against *T. taeniaeformis* larva is shown to be the liver, whereas in *C. rufocanus*, it is the intestinal mucosa. In addition, the *T. taeniaeformis* isolated from *C. rufocanus* in Abuta, Hokkaido, was observed to have distinct biological characteristics such as infectivity as compared with the other strains, and successful experimental infection has been elicited in *C. rufocanus* by inoculation of its oncospheres into the duodenal lumen, thus indicating that infection by egg is also possible.

*T. crassiceps*: Cysticerci of *T. crassiceps* have been obtained from *Microtus monteblii* in Nagano prefecture, Japan, sent to us for identification by Dr. A. Uchida, and from *C. rutilus* in St. Lawrence Is., Alaska, USA. By implanting the cysticerci into the abdominal cavity of mice, we were able to pass this cestode in our laboratory. Adults of this cestode were obtained by experimental infection in dogs and the development of this cestode in the intermediate and final hosts were investigated.

*T. polyacantha*: The cysticerci obtained from *M. oeconomus* in St. Lawrence Is. have been inoculated orally to a dog which has started to deposit a gravid segment with matured eggs 60 days post infection.

*T. hydatigena*: The cysticerci have been isolated from a swine in Hokkaido and the adult worms (eggs) have been obtained by using a dog.

*Taenia* sp: In 1985, a bicephalic cysticercus was observed in rats in Kedah, Malaysia. In the following year, the bicephalic cysticerci were collected from the rats in the same area in Kedah and then fed to a cat. However, no adult cestode could be recovered from the cat.

Establishment of *C. rufocanus* colony: *C. rufocanus* is the natural intermediate host of *E. multilocularis* in Hokkaido. It is required to establish the colony as experimental animals in the laboratory so that the mechanism for antagonism between *E. multilocularis* and other cestodes can be analysed. Starting from 10 male and 7 female *C. rufocanus* a laboratory colony has been established with production rate, ca 20 animals per month.

Antagonistic competition between *E. multilocularis* and closely related taeniid cestode: A model of antagonism between *T. taeniaeformis* strains.

The strain of *T. taeniaeformis*-*C. rufocanus* origin which is resistant to rat can suppress completely the challenged infection of the rat susceptible strain in wistar rats. And the reversed effect was observed in the laboratory-reared *C. rufocanus*. It has been confirmed that the number of established cysts of *E. multilocularis* in the liver of *C. rufocanus* previously infected with *C. rufocanus* strain of *T. taeniaeformis* and of *E. multilocularis* alone show significant difference, i. e.,  $16.9 \pm 4.4$  and  $35.0 \pm 15.0$  ( $p < 0.05$ ) for 2 weeks interval and  $25.7 \pm 11.1$  and  $46.0 \pm 17.7$  ( $p < 0.01$ ) for 3 weeks intervals of challenged infection, respectively.

Alternative definitive hosts: Adult worms of *E. multilocularis* and *T. crassiceps* have been reared in the intestine of immunosuppressant-treated Mongolian jird, *Meriones unguiculatus* and golden hamster, *Mesocricetus auratus*.

## 研究目的

エキノコックス *Echinococcus* はヒポクラテスの時代（紀元前約 400 年）から人体に重篤な病害をもたらすことで知られている。現在、世界的に分布が拡大し重要な人獣共通感染症 Zoonosis の病原体として注目を集めている。我が国でも北海道のほぼ全域に分布拡大している多包条虫 *Echinococcus multilocularis* はとくに重要である。1988 年 4 月 15 日、北海道エキノコックス症対策協議会で、道内 212 市町村のうち、重点（＝エキノコックスが検出される）地域は前年の 103 から 121 市町村と増加し、患者数も新たに 6 名が認定され、264 名となった。札幌市を含む道央圏の汚染が進んでいるのが目立った。本州においても感染例（約 60 例）が報告されている。また、海外においても、北方圏に特有のものとしていたが、アメリカ合衆国、ヨーロッパ中央部、中国北西部、中近東、アフリカ北部からも報告されるようになり、社会的に重要な問題となっている。

エキノコックスは野生動物や家畜を含む複雑な生活環を有していることから、その防除はきわめて困難なため、これまで抜本的な対策がたてられないままであった。本研究では宿主腸管粘膜におけるアナフィラキシーや肝における免疫応答を基

礎とする虫体排除の現象をエキノコックスと近縁種との間の「種間競争」に応用し、エキノコックスの防除をしようとするものである。全体計画は図 1 に示すごとく 5 段階（I-V）に分かれているが、これらを実現するためには多包条虫と生活環（中間宿主、とくにエゾヤチネズミと終宿主）を共有し、多包条虫の免疫学的排除を可能にする交叉免疫反応を誘導し、ヒトや家畜に感染しないか、病原性が皆無の近縁種の検索が必要である。また、北海道における最重要中間宿主であるエゾヤチネズミを実験動物化して本格的な研究に備える必要がある。

## 研究経過と成果

初年度は安全に実験を進めるための耐熱タイプのバイオハザードルームの設置ならびに多包条虫と近縁種相互の実験系の確立に重点を置いた。次年度以降は引き続き国内外での野外調査をとおして競合寄生虫の選別、宿主抵抗性因子の解析、エゾヤチネズミの実験動物化、競合モデルの開発に関する研究を実施した。

### 1. 研究施設の整備

易熱性である寄生虫卵の特性を考慮した環境制御飼育室 27.65 m<sup>2</sup>、（日本クレア：CL-4596-2）を新設した。また、既設のイヌ、ネコ飼育室、各 20

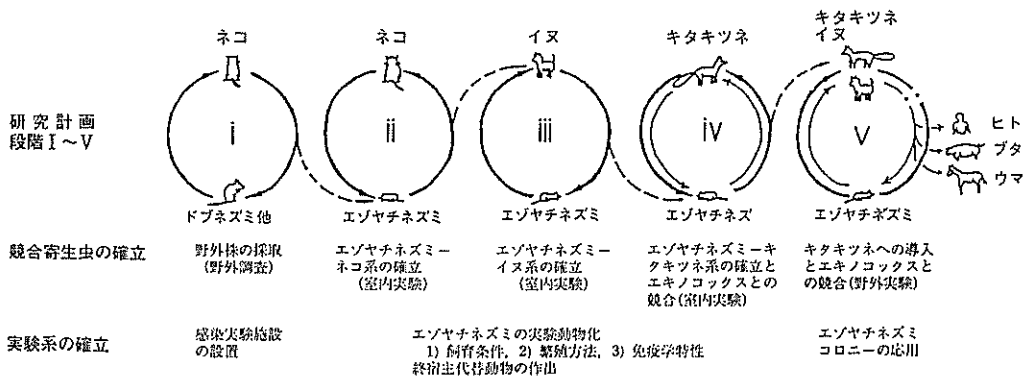


図 1. エキノコックス病の生物的防除研究計画。

m<sup>2</sup> に高圧蒸気混合装置 (TOTO: JYMS-N) と電気温水気 (サンヨー: Z8RQ-8F) を設置し実験への安全を期した (第1年度)。

2. エキノコックスと競合寄生種の選別とその生物学的性状

全研究期間を通じて実施した北海道, 本州, マレーシア, 米国アラスカ州での野外調査でエキノコックスとその競合種としてのテニア科条虫を採取し, 各種実験動物を用いて実験室内継代を試みた (第1-3年度)。また, 最終年度にはこれらの生物学的特性を明らかにした。(第3年度)。

1) 多包条虫 *Echinococcus multilocularis*: 北海道産ブタ由来株は1986年, 北見市のブタ (ランドレース系 F<sub>1</sub> 雌) 1頭の肝より得た嚢包 (一部固定, 図2) を細切りし6匹のスナネズミ (雌10

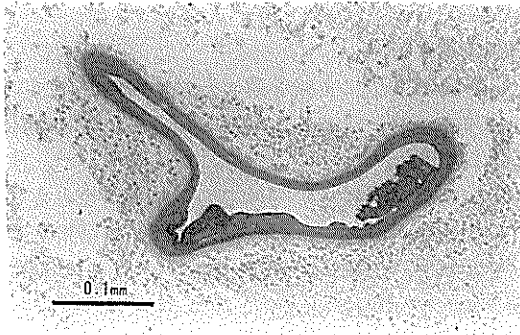
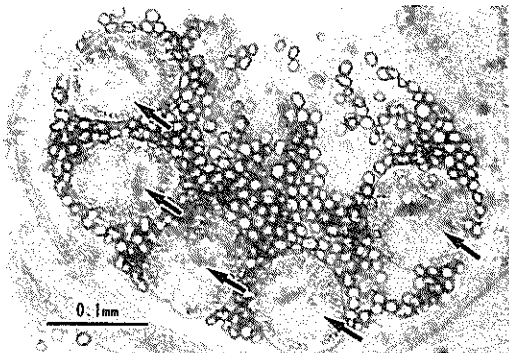


図2. ブタ肝エキノコックス (多包虫) 症組織像。壊死領域に認められるエキノコックス・シスト, 原頭節を欠く。PAS染色。



-12週例) に腹腔投与したところ, 6か月後, 2匹の腹腔と胸腔から頭節の充満する嚢包を採取し (図3), 実験室内での継代に成功した。アラスカ産ツンドラハタネズミ由来株は1988年6月, アラスカ州セントローレンス島で調査時 (文部省助成: 海外共同), 実験室に持ち帰り, エゾヤチネズミの復腔へ原頭節を接種することにより継代に成功した。その他, 1960年, アラスカ極地生物研究所から入手し, 以後, コットンラットとスナネズミを用いて継代した株 (以下, Em (A)) と1983年, 北海道東藻琴村のエゾヤチネズミから分離しスナネズミで継代した株 (以下, Em (H)) を実験に供した。

Em (A) と Em (H) の原頭節をネコとイヌに経口投与してそれぞれの発育をみたが, ネコではイヌに比べて回収率は10日以降著しく低下し, 片節形成も遅れることから, ネコはこれらの分離株に対して好適な宿主となり得ないことが明らかとなった。

2) 競合寄生虫: テニア科 Taeniidae の *Taenia* 属4種8系統が分離されそれぞれの生物学的特性が明らかとなった。

① 猫条虫 *Taenia taeniaeformis*: 札幌市内 (北大構内, 手稲), 近郊 (当別の2地区, 虻田) ならびにマレーシアでの採集分を含む6系統の分離株を採取した。それぞれの虫卵あるいはオンコスフェア (六鉤幼虫) 投与に対して各種実験動物で感受性に差があることが明らかになった。各



図3. ブタ肝エキノコックス組織をスナネズミに移植して得られた原頭節で充満する多包虫組織。左: 未固定の左偏標本 (→原頭節), 右: 病理組織切片 (→原頭節の鉤 HE染色)。

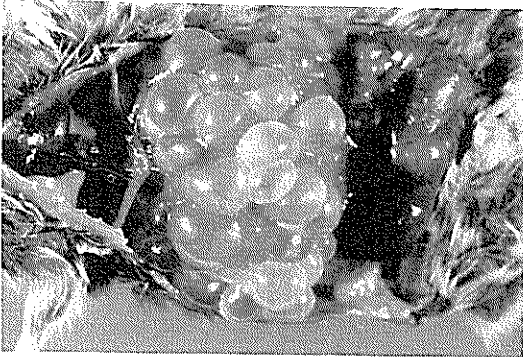


図4. エゾヤチネズミ肝に感染が成立した *Taenia taeniaeformis* 様システィセルクス。

株虫卵 100 個経口投与 4 週間後のマウスおよびラットにおいて、いずれにおいても感染は成立するがその程度はマウスに比べてラットではシスト径が大きい傾向にあった。株によっては、例えば北大・エゾヤチネズミ株に比べてマレーシア・ドブネズミ株はマウスにおいて極端に発育が悪い。同様にスナネズミ、エゾヤチネズミに各株虫卵を経口投与すると、当別・エゾヤチネズミ株をエゾヤチネズミに投与した 28 例中 1 例のみシスト 1 個が回収されたのを除いてスナネズミ、エゾヤチネズミいずれにもシストは検出されず強い抵抗性を示すことが明らかとなった。ところが人工的にふ化させたオンコスフェアを非経口的に投与するとスナネズミやエゾヤチネズミでも感染が成立することが明らかとなった。また、北大・ドブネズミ株を代表とする猫条虫でみるとスナネズミではオンコスフェア投与による感染経路上で肝臓を、エゾヤチネズミでは腸間粘膜を通過する過程で宿主の抵抗性が表現されることが示唆された。一方、虻田・エゾヤチネズミ株はラットに対して非感染性でエゾヤチネズミに対して各投与部位別陽性率は高く、とくにオンコスフェア十二指腸管腔に投与した場合 4 例全部が肝臓でよく発育したシスト形成がみられた。この事実は虫卵経口投与においても感染が成立することを示唆していることから、次に 4 匹のエゾヤチネズミに本株を投与したところ、予想どおり肝臓に感染が成立した(図4)。エゾヤチネズミ・ネコ系の競合種を選別



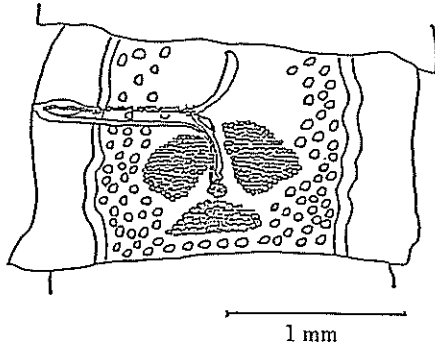
図5. *Taenia crassiceps* システィセルクスの形態。嵌入する頭節の反対側に外出芽。

することに成功した。以上の猫条虫分離株のうち、北海道虻田町のエゾヤチネズミ、北海道大学構内のドブネズミおよびマレーシアのドブネズミからそれぞれ分離された 3 株(以下、Crb 株、Rn 株、MRn 株)について好適中間宿主、その体内での成長、および成虫、幼虫の形態を比較した。

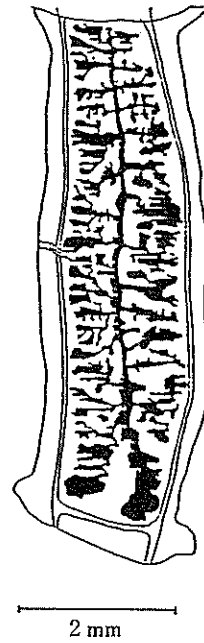
*T. taeniaeformis* 3 株の虫卵を各種齧齒類に経口投与し、その好適中間宿主を比較した。その結果、エゾヤチネズミには、Rn 株と MRn 株は感染が成立しなかったが、Crb 株の感染を認め、反対にラット、マウスには Rn 株、MRn 株の感染が認められたが、Crb 株は感染が認められなかった。Rn 株、MRn 株のシスト数は、マウスよりもラットで多かった。エゾアカネズミには Crb 株 Rn 株、ヒメネズミには 3 株すべてに感染が認められたが、これらのネズミでの虫体の成長は遅れていた。スナネズミにはどの株も感染が成立しなかった。以上のことから Crb 株はエゾヤチネズミ、Rn 株、MRn 株はラットを好適中間宿主とすることが明らかとなった。

3 株幼条虫の好適中間宿主での成長を観察したところ、Crb 株では他の 2 株に比べてシスト・虫体の大きさの増大が大きく、他の 2 株では感染後 30 日目以降の増大が停滞するのに対し、Crb 株ではその後も増大が続くことが認められた。3 株の成虫および幼虫の形態を比較したところ、こ

a. 成熟片節



b. 老熟片節



c. 虫卵

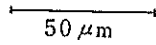


図6. イヌより回収された *Taenia crassiceps* 成虫の形態.

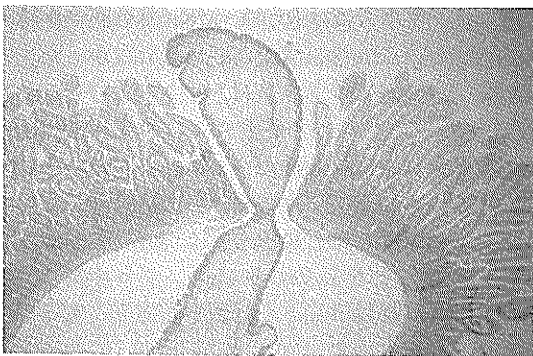


図7. スナネズミ腸壁を穿通して腸腔へ移行する *Taenia crassiceps*.

これらの測定値はこれまでの *T. taeniaeformis* の形態に関する報告の範囲内であったが、3株の間で測定値に有意差を認め、とくに Crb 株と Rn 株・

MRn 株の間に小鉤の全長と形、精巢の数と分布、および陰茎囊の後端の位置に差異が認められた。

② *T. crassiceps*: 1985年、内田らにより長野県のハタネズミから分離されたシスティセルクスを ICR マウスの腹腔内へ移植後、実験室内継代が可能となった。システィセルクスの形態 (図5) および実験感染させたイヌより回収された成虫の形態 (図6) から *Taenia crassiceps* と同定された。

虫卵経口投与実験で中間宿主としての各種齧歯類での発育を調べたところ、表4に示すごとく、エゾヤチネズミ、スナネズミはマウスに比べて高い陽性率を示したが、マウスに対しては強い抵抗性を示す。さらに、システムセルクスの腹腔内接種実験においても同様にマウスでは抵抗性でエゾヤチネズミではよく増殖することが明らかになっ

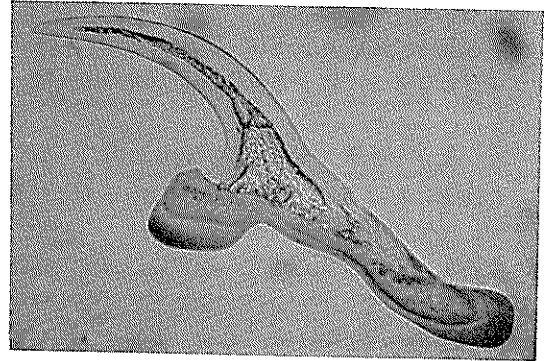
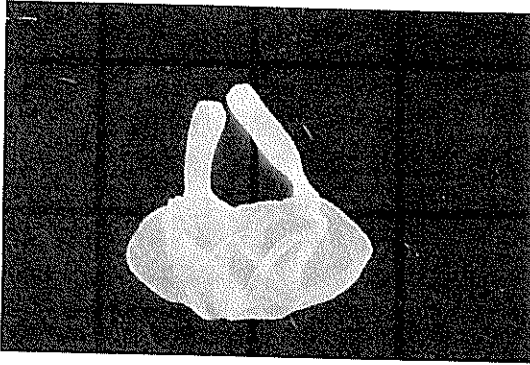


図8. マレーシア産双頭型 *Taenia* 属条虫システィセルクス。左: 双頭型システィセルクス (ます目 1 cm), 右: システィセルクス頭節の大鉤 (300 $\mu$ 大).

た。本種はシスティセルクスが中間宿主である齧歯類に経口投与された場合、特徴的な発育をすることが分かった。すなわちスナネズミ、エゾヤチネズミで 11 日目、マウスで 2 日目まで “tape worm stage” の虫体が腸管から回収されたが 3 種とも感染初期において虫体が腸壁を穿通して腹腔内へ移行し増殖することが認められた (図 7)。このことは自然界において中間宿主間の共喰いによって本条虫幼虫型で伝播され、無性的に増殖する可能性のあることを示している。また、別の *T. crassiceps* 分離株として 1988 年、アラスカ産ヒメヤチネズミ *Clethrionomys rutilus* の胸腔より採取した幼条虫 183 をスナネズミ腹腔へ接種し 64 日目に剖検したところ幼条虫 1156 を回収し、継代が可能となった。

③ *T. polyacantha*: 前記, *T. crassiceps* 同様幼条虫の段階で無性増殖する *T. polyacantha* をアラスカ・セントローレンス島のツンドラハタネズミから採取したので幼条虫をイヌ経口投与し、60 日目に糞便中に片節, 81 日目には 1 成虫の自然排泄があり虫卵を得た。各種実験小動物に虫卵を経口投与したところ広い中間宿主域をもつことが明らかとなった。

④ 胞状条虫 *T. hydatigena*: 北海道早来町のブタから得た細頸嚢中をイヌに経口投与して得た虫卵 1000 個経口投与およびオンコスフェア 2000 個腹腔内投与。経口投与では感染せず、オンコスフェア腹腔内投与スナネズミにおいてのみ

シスト (1~4 虫体) が回収された。なお、これらの実験に用いた虫卵の活性は、仔ヒツジおよび仔ブタに経口投与し調べたところ、それぞれ 80% 以上および約 35% であった。

大量 (7 万個) の虫卵を経口投与し、12 日目に死亡したブタの腹腔から未熟幼虫を回収し、ラット、ゴールデンハムスターおよびマウスの腹腔に移殖したところ、1 か月後にほとんどの虫体が生存していたが、2 か月後ではラット: 約 70%, マウス: 約 20% およびゴールデンハムスター: 20~50% の虫体が回収され、鉤は形成されているものが多かったが、未熟もしくは変性過程にあるものがほとんどであった。以上のように虫卵の経口投与に対しては抵抗性の動物でも幼虫を移植すると定着することが示された。

⑤ その他 *Taenia* 属条虫として 1985 年と 1986 年マレーシア・ケダの *Rattus* spp. から双頭型のシスティセルクスを得た (図 8)。鉤の数 52。大鉤約 300 $\mu$ , 小鉤約 200 $\mu$  大で独得の形態をしている。従来、報告されている *Taeniae* 属条虫の幼虫型と比較したところ、寄生部位、鉤の形、数、大きさ、すべての嚢虫が双頭節をそなえていることから独立種と考えられる。ストロビロセルクスを用いてネコへの感染実験を行なったが成虫は得られていない。

3) 生物的性状: 上記, エキノコックスと競合寄生種の形態, 各種実験動物への感受性などの比較の他に, 各種分離株の DNA 抽出後, 制限酵素

による切断片の電気泳動パターン (RFLP) ならびに各抗原の SDS-PAGE による比較, ウェスタン・ブロッティングによる共通抗原の検索を行なった。

### 3. エゾヤチネズミの実験動物化

北海道における最重要中間宿主であるエゾヤチネズミの繁殖方法が確立された。

飼育条件: 温度  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 換気回数は新鮮空気 10~15 回/時に設定した。照明は 6~20 時まで点灯した。なお, 夜間, 別に 2 燭光の明りをつけた。飼育ケージは通常マウスケージを使用し, 乾草と脱脂綿を入れた。飼料は市販の CE-2 とベビーフード (日本クレア), 水は給水瓶にて自由に与えた。当別で捕獲した雌 10, 雄 7 匹で繁殖を試みたところ現在, 同週齢の 20 個体/月を実験に供することが可能になった。

### 4. 終宿主としての実験小動物の検討

エキノコックスを含むテニア科条虫の終宿主としては主に食肉目動物とされている。今回, 代替動物としての実験小動物 (ゴールデンハムスター, スナネズミなど) の可能性について検討したところ, 免疫抑制処置をすることにより正常に发育した多包条虫ならびに *T. crassiceps* 成虫を得ることが可能となった。

1) ゴールデンハムスター: 多包条虫原頭節 2 万個を 8~10 週齢, 雄 17 匹に経口投与して虫体回収数, 各虫体の片節数, 形態を観察した。プレドニゾロン Prednisolone-Tertiary-Butylacetate (以下, PTB) 処置例では 31 日目まで虫体が回収された。同処置例 25 日目に回収された虫体では 3 片節を有するものが 40% を超えていた。また, これらの虫体のうち複数の個体に Smyth & Smyth (1969) がイヌの腸管から回収した単包条虫で報告した自家受精像が認められ一部, 虫卵産生が認められた。また, 日本産 *T. crassiceps* のシスティセルクスをゴールデンハムスター, チャイニーズハムスターおよびコットンラットに経口投与し, 小腸内における发育を調べた。チャイニーズハムスターおよびコットンラットでは腸管からそれぞれ 11 日目および 7 日目までに排除されたが, ゴールデンハムスターでは 20 日目以降でも

虫体が回収された。ゴールデンハムスターでの虫体の发育については PTB 投与群非投与群併せて調べたがほぼ同様の結果が得られた。感染 4 日目では片節が形成され, 生殖原基が出現した。7 日目ではほとんどの虫体で, 陰茎索および精巢の原基が出現した。一部の虫体でさらに卵巢, 卵黄腺および子宮の原基が出現した。10 日目で, 隆, 輸精管, 毛状突起, 卵巢, 卵黄腺およびメーリス腺が分化し, 精巢内には成熟した精子が認められた。15 日では成熟片節となり, さらに大部分の虫体は分枝した子宮内に卵子が認められた。21 日目では老熟片節が認められ, 受精が成立していることがわかった。さらに子宮内には未熟虫卵が認められた。28 日目では成熟虫卵が認められた。また, PTB コーチゾン投与ハムスターのほうが非投与ハムスターよりも虫体回収率が高く, 感染期間も長かった。さらに免疫抑制処置を工夫することにより正常な虫卵を採取することに成功した。これらの結果から, *Taenia crassiceps* はゴールデンハムスター消化管において成熟し, 活性のある虫卵が産生される。

2) スナネズミ: 成齢 (20 週齢) および若齢 (3, 4, 5 週齢) スナネズミに多包虫原頭節を経口投与し, 特に感染初期における成虫型多包条虫の定着率を観察した。成獣では感染後 2 日 (回収率 0.20-0.59%), 幼獣 (4 週齢) では感染 10 日 (0-0.06%) まで虫体は回収された。また, 幼獣 (3, 4, 5 週齢) 群間の差異について感染 7 日に観察したところ, それぞれ回収率は 2.58-21.74%, 0%, 0% であった。上記の回収率で示した生存虫体の他に, 頭節を陥入した虫体, あるいは変性死滅虫体が高率に回収された。一方, 感染前からの, あるいは感染直後からの継続的な PTB 処置により成獣および幼獣 (3, 4, 5 週齢) 個体で回収率と发育に顕著な改善がみられ, イヌ腸間と同程度の正常の发育を示す虫体が感染 28 日においてそれぞれ 0.945, 9.10%, 0.42%, 0% 回収された。以上の結果は加齢因子が実験小動物での多包条虫成虫型の定着・发育に重要な意義を持ち, PTB 処置によりスナネズミ腸管内でも多包条虫が成熟することを示している。(図 9)



## 5. 近縁種間に認められる競合モデル

1) 種間競合の概念に関する研究: いわゆる「種間競争」には食物あるいは生息場所などの生態的地位の競争とされているが、本研究の基礎になるものは腸間粘膜を主体とするアレルギーが関与する競合にある。アレルギー反応を逆に利用しようとするもので、「種間競争」の新しい概念を寄生虫学へ導入しようとするものである。そのため、各種蠕虫類を用いて排除機構の解析を行なった。すなわち、肥満細胞欠損 *W/W<sup>v</sup>* マウスにおける施毛虫の排除遅延、ナキウサギならびにスナネズミにおける *Trichostrongylus colubriformis* に対する宿主組織と排除の関連について検討した。

2) 競合寄生虫に対する宿主抵抗性因子の解析: 競合寄生虫としての *T. taeniaeformis* 感染に対する中間宿主の抵抗性因子を解析するため、各種免疫抑制処置 (X線, コーチゾン, ジクロホスファミド, カラギーナン, コブラ毒因子) を行ない、虫体の発育, 宿主の組織反応, 抗体産生 (ELISAによるIgMとIgG抗体価) を比較した。その結果, *T. taeniaeformis* 感染に対するICRマウスの先天性抵抗性には, 抗体あるいはマクロファージよりも好酸球, 好中球およびT細胞などのほうが重要であることが示唆された。さらに近郊系マウスの先天性および獲得抵抗性の解析の一環として, マウスの正常および感染血清の移入の効果について検討した。使用した動物は *T. taeniaeformis* 感受性マウスとしてAKR/J, 抵抗性マウスとしてBALB/cAならびにC57BL/KsJである。これら3系統のマウスを感染コントロールおよびドナーとし, レシピエントはすべてAKR/Jとした。まず, 無感染, 感染後10日目, 感染後45日目の血清を非働化した後, マウスの腸腔に0.5 cc (45日目血清は, 0.2 cc) 投与した。24時間後, *T. crassiceps* 虫卵をチャレンジし, 21日後剖検した。

AKR/Jの血清を移入したものでは, 無処理コントロールと無感染血清移入との間には有意な差はなかったが, 感染10日目および45日目血清を移入したものでは, コントロールのシスト形成

に対しそれぞれ75.6%, 86.5%の防御効果を示した。C57BL/LsJでは10日目血清ですでに, 94.0%の防御を示し, 抵抗性マウスは感受性マウスより早い時期に感染防御能が上がるという結果 (Michell *et al.*, 1980) と一致した。しかしC57BL/KsJ, BALB/cAの無感染血清移入においても, コントロールに対しそれぞれ85.3, 59.1%の防御率が確認され, なんらかの先天性な抵抗性因子の関与が示唆された。

また, *T. taeniaeformis* 感染ラットにおける幼虫周囲の肝肥満細胞 (HMC) の動態およびその性状について検討した。1) HMC, 結合織肥満細胞 (CTMC), 粘膜肥満細胞 (以下, MMC) の組織化学的比較を行なったところ, HMCにはMMC様の粘膜HMCの他にMMCとCTMCの中間型である中間型HMCが認められた。2) これらの細胞は感染の経過とともにそれぞれ特有の増加パターンを示した。3) Compound 48/80 および幼虫抽出液投与による脱顆粒は, Compound 48/80 処置後IFAA固定トルイジンブルー染色の結果ではCTMCおよび中間型HMCは脱顆粒したが, MMCおよびMMC型HMCでは変化は認められなかった。幼虫抽出液投与ではすべての型の肥満細胞の脱顆粒が認められた。宿主抵抗性の面からこれらの細胞の機能を調べるためHMCの分離および培養が必要である。

3) *T. taeniaeformis* Crb株によるRn株の感染防御: 中間宿主ラットにおいて感染性を異にする *T. taeniaeformis* 2株 (Crb株とRn株, 日本産 *T. crassiceps*) の間に認められる競合について調べた。その結果, Crb株 (虫卵), Rn株 (オンコスフェア皮下) 何れもRn株虫卵のチャレンジ感染を完全に防御する。また, システィセルクス (Tcをふくむ) の移植でもある程度の防御がみられるがシスト形成以前の抗原刺激がきわめて強い効果を示すことが明らかとなった。

4) エゾヤチネズミを「場」としたエキノコックスEm(H)株に対する *T. taeniaeformis* Crb株の種間競合: 上記, 3. で実験動物化エゾヤチネズミを用いて *T. taeniaeformis* Crb株虫卵300個を経口投与し, 2および3週後にエキノコック

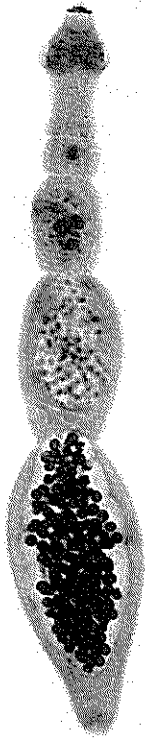


図9. エキノコックス (多包条虫) の成虫。免疫抑制処置スナネズミから体長2 mm。イヌを用いないで成虫を得ることが可能となった。

ス Em (H) 株虫卵 300 個を経口投与し、さらに 4 週後剖検して各々の群での Em (H) によるシスト数を算定した。2 週間隔では Em (H) のみの感染群で  $35.0 \pm 15.0$  個に対して Crb 株のあと Em (H) を感染させた群では  $16.9 \pm 4.4$  個、3 週間隔群でそれぞれ  $46.0 \pm 17.7$  個、 $25.7 \pm 11.1$  個であった。いずれの群も有意 (2 週間隔で  $p < 0.05$ ; 3 週間隔で  $p < 0.01$ ) に Crb 株の感染が 4 週後のエキノコックス Em (H) のエゾヤチネズミ肝臓でのシスト形成を抑制することが明らかになった。感染回数、間隔による影響、また、その他の株による競合も検討した。ラットにおける同種株間 *T. taeniaeformis* Crb 株対 Rn 株および異種日本産 *T. crassiceps* 対 Rn に対する競合に加えてエゾヤチネズミにおける Crb 株対エキノコックス Em

(H) 株の競合が認められた。しかしながらエキノコックス感染を 100% 抑えることはできなかった。エキノコックスを含めて種間、株間、テニア科条虫の中間宿主レベルでの競合の存在が確認された。

#### 今後の課題と発展

本研究は、テニア科条虫間の交叉免疫を基礎とした「種間競争」の新しい概念を寄生虫学へ応用するための研究の先駆けとなった。国内外からの競合種の選別、エゾヤチネズミの実験動物化、モデル動物での交差感染を通して「種間競争」の存在が確認された。しかしながら、本研究で用いられたオンコスフェアの感染数を抑制することはできるが、すべてを排除することはできなかった。無性増殖をするエキノコックスの特性として、一部の幼条虫 metacestode が免疫状態の中間宿主体内で生存・増殖するメカニズムの解析は今後の重要な課題と考えられる。また、中間宿主側の要因として多包虫が容易に発育するハタネズミ亜科動物の特性、特に実験動物化されたエゾヤチネズミを用いてその免疫系の解明が必要であろう。寄生虫側からのアプローチとして現在、競合寄生種として検討されている *Taenia* 属 4 種 8 株を保有に至っているが、今後もより広い地域から継続して選別することが望まれる。自然選択は遺伝子レベルではなく生物レベルで起こることを考えると、現在エキノコックスの独立 4 種の分布する南北アメリカ大陸に進化の過程で隔離された競合種の存在が期待される。

本研究は昭和 63 年から文部省・国際学術研究「北方圏に分布する寄生虫・エキノコックスの防除」によって引き継がれることになった。本年 6 月、ワシントン大 R. L. ラウシュ教授らと共同で米国アラスカ州セントローレンス島からエキノコックスの他に新たな競合種の導入を計った。これらすべての寄生虫の特性が調べられ感染防御に関与する機能的な抗原の検索が実施されている。自然界の野生動物 (当面エゾヤチネズミであるが将来は終宿主: キツネ、イヌなど) へ積極的に導入するための準備である。一方、組換え DNA 技術を用いた抗原の合成、ワクチンの開発を目標と

した検討も始まった。本研究が契機となった文部省・試験研究「エキノコックスの競合寄生種導入のための感受性エゾヤチネズミの作出と応用」によって、中間宿主の面から、さらに一般研究(B)「テニア科条虫成虫に対する腸管粘膜応答を主体とした排除機構の解析」によって、終宿主の面から虫体排除の検討が可能となった。すでに4、で述べたごとく、ある種の処置を実験動物(ハムスターなど)に施せば腸管でエキノコックスの成虫(虫卵)が得られるという事実も明らかとなった(図9)。このことは実験動物学の分野で代替動物を用い、人体に危険な虫卵と実験者を完全に隔離する施設が容易に設置できるという有利な点とともに終宿主レベルでの虫体の排除機構を究明する上でも計り知れない進展が期待される。

本研究と関連してエキノコックスの防除のための国際協力が進められている。1986年6月には第55回日本寄生虫学会(会長大林正士、札幌)が開催され本研究グループによってシンポジウム「エキノコックス症の現況と対策」、特別講演 R. L. ラウシュ教授(ワシントン大・医)「人におけるエキノコックス症、特に多包虫症」が開催された。さらに関連集会として学術講演会 1) ゲンメル教授(オタゴ大・医)「多包虫と単包虫の防除における相違点」、2) ラウシュ教授「エキノコックスの生物学と世界の包虫症の現況」を主催(後援日産科学振興財団)し、グローバルな観点からのエキノコックスの防除に関する討議がなされた。また、WHOは本年度からエキノコックスのワクチンの開発を目標にして免疫学に関する作業部会(1988年9月、ロンドン、ジュネーブ)を新たに加え、総合的防除対策のための国際協力を推進する計画である。研究代表者神谷が参加(助成日産科学振興財団)し、正式に本研究の応用のため以下の3項目が採用された。

1) テニア科の競合寄生種を用いた多包虫の防除、2) ゴールデンハムスターを用いた多包条虫終宿主モデルの確立、3) 中間宿主エゾヤチネズミにおける競合モデルの確立

本研究グループはこれまで、エキノコックスの分布拡大が、地球レベルで進行している環境破

壊と密接な関係があることを述べてきた。アマゾン川流域の森林や、北アメリカのツンドラ地帯と穀倉地帯を隔てていた森林の伐採、あるいは札幌農学校へ初めて導入された4頭の乳牛が現在では欧米を越える集約酪農への変遷や都市、農村を問わず大量消費に伴った廃棄物の増大は同じ結果をもたらしたと考えられる。この傾向が続く限りアカギツネとそれに巧みに適応したエキノコックスの分布拡大が考えられるが、本研究によって種間競合を利用した一つの防除対策の方向を提示することができた。

謝辞 この研究は昭和60年から62年の3年間にわたる日産科学振興財団の研究助成によるものです。この間、特に初年度においては実験施設、機器の充実のためその経費の大部分を充当させていただきました。この助成により研究を大きく発展させることができ、さらに次のステップの国際学術研究の基礎を築くことができました。ここに同財団およびご推薦下さった日本畜産学会ならびに同財団選考委員会の方々に深く感謝いたします。また、種々の有益な助言・協力を賜った次の方々に厚くお礼申し上げます。佐々 学東京大学名誉教授、八戸芳夫北海道大学名誉教授、故玉手英夫東北大学名誉教授、R. L. ラウシュ・ワシントン大学教授、福井正信・国立予防衛生研究所部長、工藤 節北海道大学事務官。さらに、研究に参加・協力をいただいた北海道大学獣医学部家畜寄生虫病学講座に在籍した、島山茂樹、中沢正年、石館依子、吉田富美子、北口智英、宮地 俊、齋藤 龍、藤田 修、巖城 隆、金子哲子、北岡真代子、東 浩、伊藤一洋、石井清人、稲葉知英子の諸氏に深く感謝の意を表します。

#### 研究発表

- 1) 神谷正男: エキノコックス(包虫症)とキタキツネ, ドクターサロン, 30, 479-488 (1986).
- 2) 神谷正男: 寄生虫・エキノコックスの話題—キタキツネとの絡み合い—, 月刊保団連, 238, 3-10 (1986).
- 3) 神谷正男: 寄生虫・エキノコックス病対策の新しい流れ, 環境衛生, 34, 6-15 (1986).
- 4) Kamiya, M.: Infectious diseases transmitted by dogs to humans, *Asian Med. J.* 31, 87-93 (1988).

- 5) 神谷正男: 寄生虫・エキノコックスとその地理的分布に関する考察, 415, 9-14 (1988).
- 6) 大林正士: エキノコックス広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査—その数値をどう読むか, 日本臨床, 43 (秋期臨増), 181-193 (1985).
- 7) 大林正士: *Echinococcus cruzi* Brumpt and Joyeux 1924 について, 寄生虫分類形態談話学会報, 3, 4 (1985).
- 8) 大林正士: 豚のエキノコックス, 養豚の友, 4, 16-7 (1985).
- 9) 大林正士: エキノコックス, とくに多包条虫に関する最近の情報, 日獣会誌, 38, 423-427 (1985).
- 10) 大林正士: 多包条虫に関する知見, 日本獣医学の進展 (日本獣医学会 100 周年記念), 161-163 (1985).
- 11) 大林正士: エキノコックス症—特に北海道における多包条虫を中心に—, 獣医学 1986, 伊沢・清水 (編), 59-72, 近代出版, 東京 (1986).
- 12) 大林正士: エキノコックスの分布拡大: 北海道と本州, 媒介動物生息密度の増加が原因か?, 医学の歩み, 142, 75 (1987).
- 13) 大林正士: エキノコックス症とその広がり, メディヤサークル, 33, 81-88 (1988).
- 14) 神谷正男: エキノコックス, 特に多包条虫の伝播における野生動物の位置づけ, モダンメディア, 34, 343-351 (1988).
- 15) 神谷正男: エキノコックスの現状について, ふぉーなす, 8, 7-8 (1988).
- 16) 神谷正男, 大林正士: イヌからうつる感染症, 日本医師会雑誌, 97, 1921-1925 (1987).
- 17) 大林正士: 東南アジアを中心とする寄生虫の系統分類学的研究 (II), 文部省科学研究費補助金海外学術調査報告書 pp 89 (1987).
- 18) 神谷正男, 奥祐三郎, 岡本宗裕, 島山茂樹, 宮地俊, 野中成晃, 大林正士, ウイ・ホンキェン: 多包条虫と近縁種 *Taenia* 属条虫の実験室内継代, 寄生虫誌, 35 (増), 111 (1986).
- 19) Ishidate, Y.: The effect of immunosuppressive treatment in ICR mice on the resistance to *Taenia taeniaeformis* infection, *Jpn. J. Vet. Res.*, 34, 133 (1986).
- 20) 石館依子, 奥祐三郎, 神谷正男, 大林正士: 猫条虫 (*Taenia taeniaeformis*) 感染に対する宿主抵抗性因子の解析—ICR マウスにおける免疫抑制処置, 寄生虫誌, 35 (増), 151 (1986).
- 21) 島山茂樹, 神谷正男, 奥祐三郎, 岡本宗裕, 大林正士: 北海道産野ネズミ, 特にエゾヤチネズミにおける猫条虫感受性に関する研究, 寄生虫誌, 35 (増), 111 (1986).
- 22) Hatakeyama, S.: Susceptibility of voles in Hokkaido and the innate resistance of *Clethrionomys rufocanus* to infection by the cestode, *Taenia taeniaeformis*, *Jpn. J. Vet. Res.*, 34, 131 (1986).
- 23) Kamiya, M., Ooi, H.-K., Oku, Y., Yagi, K. and Ohbayashi, M.: Growth and development of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected cats, *Jpn. J. Vet. Res.*, 33, 135-140 (1985).
- 24) Kamiya, M., Ooi, H.-K. and Ohbayashi, M.: Susceptibility of cats to the Hokkaido isolates of *Echinococcus multilocularis*, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48, 763-767 (1986).
- 25) Kamiya, M., Oku, Y., Itayama, H. and Ohbayashi, M.: Prolonged expulsion of adult *Trichinella spiralis* and eosinophil infiltration in mast cell-deficient *W/W<sup>v</sup>* mice, *J. Helm.*, 59, 233-239 (1985).
- 26) Okamoto, M.: Susceptibility of pika to gastro intestinal parasitic nematodes of ruminants, *Jpn. J. Vet. Res.*, 33, 90 (1985).
- 27) 岡本宗裕, 神谷正男, 奥祐三郎, 大林正士: スナネズミにおける *Trichostrongylus axei* および *T. colubriformis* 感染実験, 第 100 回日本獣医学会大会講演要旨, 東京 (1985).
- 28) Kamiya, M., Ooi, H.-K., Oku, Y., Okamoto, M., Ohbayashi, M. and Seki N.: Isolation of *Echinococcus multilocularis* from the liver of swine in Hokkaido, Japan, *Jpn. J. Vet. Res.*, 35, 99-107 (1987).
- 29) 神谷正男, 奥祐三郎, 岡本宗裕, 宮地 俊, 野中成晃, 齋藤 龍, 大林正士, ウイ・ホンキェン: エキノコックス近縁種間競合モデルの開発と応用—ブタ由来多包条虫と近縁種の分離, 寄生虫誌, 36 (増), 84 (1987).
- 30) 神谷正男, 野中成晃, 宮地 俊, 大林正士: ブタ由来多包条虫と近縁種 *Taeniidae* 科条虫の実験室内継代, 第 103 回日本獣医学会講演要旨, 東京 (1987).
- 31) Nonaka, N.: Analysis of innate resistance of rodents to infection by various strains of *Taenia taeniaeformis*, *Jpn. J. Vet. Res.*, 35, 142 (1987).
- 32) 野中成晃, 神谷正男, 大林正士: 猫条虫 *Taenia taeniaeformis* のオンコスフェア投与による各種実験小動物における発育, 寄生虫誌, 36 (増), 43 (1987).
- 33) Miyaji, S.: Development and proliferation of *Taenia crassiceps* in intermediate and definitive hosts, *Jpn. J. Vet. Res.*, 35, 138 (1987).
- 34) 宮地 俊, 奥祐三郎, 神谷正男, 大林正士: 実験動物における *Taenia crassiceps* の発育, 寄生虫誌, 36 (増), 43 (1987).
- 35) Saitoh, R.: Fate of cysticerci of *Taenia crassiceps* following oral infection in small mammals, *Jpn. J. Vet. Res.*, 35, 145 (1987).
- 36) 神谷正男, ウイ・ホンキェン, 大林正士, Ow-Yang, C. K.: マレーシアの *Rattus* spp. より採取

- した双頭型テニア科条虫システィセルクスについて, 寄生虫誌, 36(増), 43 (1987).
- 37) 神谷正男, 佐藤 宏: 終宿主動物としてのゴールデンハムスターにおける多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の發育, 第 105 回日本獣医学会大会, 講演要旨, 東京 (1988).
- 38) 神谷正男: エキノコックス, とくに多包条虫の伝播に果たす野生動物の位置づけ, 第 105 回日本獣医学会大会, シンポジウム, 東京 (1988).
- 39) 神谷正男, 佐藤 宏, 北岡真代子: 終宿主動物としてのゴールデンハムスターにおけるテニア科条虫の發育, 特に多包条虫 *Echinococcus multilocularis* と *Taenia crassiceps* について, 第 35 回日本実験動物学会大会, 講演要旨, 金沢 (1988).
- 40) 神谷正男, 奥祐三郎, 岡本宗裕, ウイ・ホンキェン, 大林正士: *Taenia taeniaeformis* エゾヤチネズミ感受性株によるドブネズミ由来株の感染防御, 第 57 回日本寄生虫学会大会, 講演要旨, 名古屋 (1988).
- 41) ウイ・ホンキェン, 神谷正男, 大林正士: ミンクにおける多包条虫の実験的経口感染, 同上 (1988).
- 42) 石渡賢治, 奥祐三郎, 神谷正男, 大林正士: *Taenia taeniaeformis* 感染ラットにおける幼虫周囲の肝肥満細胞の動態およびその性状, 同上 (1988).
- 43) 北岡真代子, 奥祐三郎, 神谷正男, 大林正士: ゴールデンハムスター腸管内における *Taenia crassiceps* の性成熟と虫卵産生, 同上 (1988).
- 44) 金子哲子, 奥祐三郎, 神谷正男, 岡本宗裕, 大林正士: コスタリカ住血線虫 *Angiostrongylus costaricensis* およびタイ住血線虫 *A. siamensis* の成虫移植による抵抗性獲得, 同上 (1988).
- 45) 佐藤 宏, 神谷正男: 成齢および幼齢スナネズミ *Meriones unguiculatus* 腸管内での多包条虫成虫型の發育, 第 35 回日本寄生虫学会北日本支部会大会, 講演要旨, 山形 (1988).
- 46) 石井清人, 岡本宗裕, 奥祐三郎, 神谷正男: マウスのコスタリカ住血線虫 (*Angiostrongylus costaricensis*) 感染に対する抵抗性の獲得における細脂移入の効果, 同上 (1988).
- 47) 神谷正男, 佐藤 宏, 阿部 永, 大林正士, ウイ・ホンキェン, J. F. Wilson, R. L. Rausch: アラスカの齧歯類から分離された多包条虫とその近縁種について, 同上 (1988).
- 48) 稲葉知英子, 神谷正男, 岡本宗裕, 奥祐三郎, ウイ・ホンキェン: エゾヤチネズミにおける *Taenia taeniaeformis* (Tt) と *T. crassiceps* (Tc) の同種および異種間での獲得抵抗性について, 同上 (1988).
- 49) 伊藤一洋, 奥祐三郎, 岡本宗裕, 神谷正男: 各種近交系マウスの猫条虫 (*Taenia taeniaeformis*) に対する先天的および獲得抵抗性の解析, 第 106 回日本獣医学会大会, 講演要旨, 大阪 (1988).
- 50) 神谷正男, 佐藤 宏, 阿部 永, 大林正士, ウイ・ホンキェン, J. F. Wilson, R. L. Rausch: 北方圏に分布するエキノコックスの防除に関する研究, 同上 (1988).
- 51) 佐藤 宏, 神谷正男: エキノコックス終宿主代替動物としての実験小動物, 特にスナネズミ腸管内での多包条虫成虫型の發育, 同上 (1988).
- 52) Miyaji, S., Oku, Y., Kamiya, M. and Ohbayashi, M.: Growth of a Japanese isolate of *Taenia crassiceps* in the intermediate and definitive hosts, *Parasitol. Res.*, (submitted).
- 53) Sato, H. and Kamiya, M.: Viable egg production of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 reared in the intestine of prednisolone-treated golden hamsters, *Mesocricetus auratus*, *Jpn. J. Parasitol.*, 38 (in press)
- 54) Staitoh, R., Oku, Y., Kamiya, M. and Ohbayashi, M.: Survival of *Taenia crassiceps* in mice and jirds following oral infection with metacestodes, *Parasitology* (submitted).
- 55) Kitaoka, M., Oku, Y. and Kamiya, M.: The development of adult *Taenia crassiceps* in golden hamster, *J. Parasitol.* (submitted).
- 56) Nonaka, N., Oku, Y., Okamoto, M. and Kamiya, M.: Analysis of innate resistance of rodents to infection by various strains of *Taenia taeniaeformis*, *Folia Parasitologica*, (submitted).
- 57) Kamiya, M.: Research on the immunology of *Echinococcus multilocularis* in Japan, WHO working Group on the immunology of *Echinococcus*, London (1988).