

学 位 論 文 題 名

多包条虫 *Echinococcus multilocularis* 代替終宿主
モデルの改善とフォーゲル包条虫 *E.vogeli* への応用

学位論文内容の要旨

エキノコックスは人獣共通感染症の原因として、その対策が急務となっている寄生虫の一つである。しかし、イヌを用いた終宿主レベルでの実験はヒトへの感染を防ぐため、大型隔離施設の必要性があり、研究が立ち後れているのが現状である。小型実験動物を用いた代替終宿主モデルは有用であるが、その感染成立機構については未だ不明な点が多く、改善の余地が残されている。本研究の第Ⅰ章ではスナネズミを用いた多包条虫代替終宿主モデルの改善を目的に薬剤処置、投与方法、宿主動物および原頭節について検討を行った。また第Ⅱ章では代替終宿主モデルの実用性を検討するために、多包条虫に対する駆虫薬の検定を行った。第Ⅲ章では発見以来、虫体についての研究がほとんど行われていないフォーゲル包条虫の代替終宿主モデルを確立し、成虫の発育を観察した。

第Ⅰ章では、まず、投与薬剤について検討を加えた。スナネズミを用いた多包条虫代替終宿主モデルでは、薬剤処置として従来ブチル酢酸プレドニゾロン（PTBA）を投与している。このPTBAにかわる薬剤の選択を試みた。特に飼料に混じて使用可能な製剤の選択を目的とし、これらの薬剤の経口投与での効果を含め検討した。PTBA、プレドニゾロン、ベタメサゾン、免疫抑制剤 Cyclosporin A、非ステロイド性抗炎症剤 ZileutonとNimesulideの混合、Nordihydroguaiaretic acidおよびMepacrineを用い、これらの薬剤の腹腔内および経口投与とPTBAの皮下投与における小腸からの回収虫体数を比較したところ、PTBAの非経口投与が最も効果的であることが示された。

次にPTBAの皮下および腹腔内投与における投与量の違い（0 - 10 mg/ head）による回収虫体数を比較したところ、いずれの投与経路においても、ともに用量依存性に回収虫体数は増加した。虫体は、PTBAの投与量が多いほど、小腸上部から回収される傾向があった。投与量に依存し宿主末梢血のリンパ球百分率は低下し、血清総蛋白量は上昇することが示された。この2つのパラメーターは、回収虫体数とも有意に相関し、より感受性の高い代替終宿主モデル動物の選択に有効な指標となる可能性が示唆された。また、感染前と感染後のPTBAの投与期間について検討したところ、前投与期間の長さは回収虫体数と正の相関を示した。感染後の投与期間の長さは回収虫体数とは相関を示さなかったが、虫体の発育は投与期間が長いほど良好であった。

宿主の改善を目的とし、北大繁殖スナネズミと2系統の近交系スナネズミ (MON/ Jms/ Gbs SlcおよびMGS/ Sea) について、回収虫体数について比較したが、有意な差は観察されなかった。また、野外で捕獲されたモンゴル産スナネズミと比較したところ、北大繁殖スナネズミでは、有意に回収虫体数が多く、現在用いている北大繁殖スナネズミより好適な宿主は選別できなかった。

次いで寄生虫の改善を目的に、採集地域、継代方法および継代回数の異なる4つの多包条虫原頭節 (コットンラット分離株、衛研分離株、当別分離株および野幌97分離株) の虫体回収率を比較した。使用する原頭節によって虫体の虫体回収率は大きく変化した。スナネズミからの回収虫体数は、虫卵感染によって維持されているコットンラット分離株およびエゾヤチネズミから回収された後、スナネズミ腹腔内投与による継代1代目の野幌97分離株で多く、コットンラット分離株をスナネズミで2代継代した衛研分離株およびエゾヤチネズミから回収された後、スナネズミ継代9代目の当別分離株では少なかった。回収虫体数が多かった分離株では、シスト塊は包液に富む小シストから構成され、含まれる原頭節が大きく、逆に回収虫体数が少ない分離株では、小シストが密集しており、含まれる包液も少なく、原頭節が小さかった。これらのことから、継代回数を重ねると、シスト組織が密になり、原頭節の感染能が低下する可能性がうかがわれた。

第Ⅱ章において、代替終宿主モデルの実用性を検討するため、ハムスターを用いてプラジクアンテルによる小腸内の多包条虫の駆虫試験を行ったところ、多包条虫代替終宿主モデルが、イヌにかわる駆虫薬検定モデルとしても有用であることが示された。

現在、世界的に多包条虫および単包条虫の研究は多く行われているが、フォーゲル包条虫についての研究はほとんど進んでいない。そこで第Ⅲ章において、多包条虫代替終宿主モデルを応用し、PTBA処置を施したスナネズミにフォーゲル包条虫原頭節を経口投与したところ、その腸管内で虫体が定着、発育した。フォーゲル包条虫の成虫の発育についての報告はこれまでなく、本研究が初めての報告である。感染後7日目では片節形成開始の兆しであるバンドが出現し、感染後14日目には第2片節の形成が認められ、生殖原基および精巢の形成が確認された。感染後21日目では、第2片節内に生殖器が完成し、精巢および受精嚢内に精子が、子宮内には分裂した卵細胞が観察された。感染後28日目には第3片節が完成し、子宮内の虫卵には鉤が確認され、感染後34日目の虫体では虫卵に幼虫被殻の形成が認められた。感染後35日目には、糞便内に正常な形態を持つ虫卵が検出された。発育の割合は、感染後7日目では頭節のみ、感染後14日目では1片節、感染後21日目では2片節形成虫体が最も多く、感染後28日目には子宮内に鉤を備えた虫卵を含む3片節虫体が20 - 30%認められるようになった。感染後35日目の虫卵排出個体では3片節虫体が約70%を占めていた。フォーゲル包条虫感染スナネズミ糞便中の虫体由来抗原は、多包条虫成虫虫体抗原に対するモノクローナル抗体検出可能であることが示された。糞便内抗原価は感染後7日目以降上昇し、感染後18日目でピークに達した後、感染後28日目以降は緩やかに下降した。

フォーゲル包条虫代替終宿主スナネズミにおいて形態的に正常な虫卵が産生されたが、この虫卵の感染能を調べるために、スナネズミ、Hertley系モルモット、

ACN系ゴールデンハムスター， C.B.-17/ Icr scidマウスおよびBALB/ cA scidマウスに経口投与あるいは腹腔内投与した．感染後30 - 50日目の剖検では病変は確認できず，虫卵の感染能は確認できなかった．

スナネズミと同じく，多包条虫の代替終宿主として用いられているハムスターについて，フォーゲル包条虫代替終宿主としての可能性を検討した．ACNおよびCN系ゴールデンハムスターにスナネズミと同量のPTBA処置を行い，フォーゲル包条虫原頭節を経口投与したが，回収虫体数はスナネズミに比べ，非常に少なく，代替終宿主モデルには適さないことが示された．

学位論文審査の要旨

| | | |
|----|-----|------------------|
| 主査 | 教授 | 神谷正男 |
| 副査 | 教授 | 藤田正一 |
| 副査 | 助教授 | 奥 祐三郎 |
| 副査 | 教授 | 金澤 保 (産業医科大学) |
| 副査 | 室長 | 伊藤 守 (実験動物中央研究所) |

学位論文題名

多包条虫 *Echinococcus multilocularis* 代替終宿主 モデルの改善とフォーゲル包条虫 *E.vogeli* への応用

エキノコックスは人獣共通感染症の原因として、その対策が急務となっている寄生虫の一つである。しかし、イヌを用いた終宿主レベルでの実験はヒトへの感染を防ぐため、大型隔離施設の必要性があり、研究が立ち後れているのが現状である。小型実験動物を用いた代替終宿主モデルは有用であるが、その感染成立機構については未だ不明な点が多く、改善の余地が残されている。

本研究の第I章では、まず、投与薬剤について検討を加えた。スナネズミを用いた多包条虫代替終宿主モデルでは、薬剤処置として従来ブチル酢酸プレドニゾロン (PTBA) を投与している。このPTBAにかわる薬剤の選択を試みた。特に飼料に混じて使用可能な製剤の選択を目的とし、これらの薬剤の経口投与での効果を含め検討した。PTBA、プレドニゾロン、ベタメサゾン、免疫抑制剤Cyclosporin A、非ステロイド性抗炎症剤ZileutonとNimesulideの混合、Nordihydroguaiaretic acidおよびMepacrineを用い、これらの薬剤の腹腔内および経口投与とPTBAの皮下投与における小腸からの回収虫体数を比較したところ、PTBAの非経口投与が最も効果的であることが示された。

次にPTBAの皮下および腹腔内投与における投与量の違い (0 - 10 mg/head) による回収虫体数を比較したところ、いずれの投与経路においても、ともに用量依存性に回収虫体数は増加した。虫体は、PTBAの投与量が多いほど、小腸上部から回収される傾向があった。投与量に依存し宿主末梢血のリンパ球百分率は低下し、血清総蛋白量は上昇することが示された。この2つのパラメーターは、回収虫体数とも有意に相関し、より感受性の高い代替終宿主モデル動物の選択に有効な指標となる可能性が示唆された。また、感染前と感染後のPTBAの投与期間について検討したところ、前投与期間の長さは回収虫体数と正の相関を示した。感染後の投与期間の長さは回収虫体数とは相関を示さなかったが、虫体の発育は投与期間が長いほど良好であった。

宿主の改善を目的とし、より多くの虫体を回収可能なスナネズミ系を選択するために当教室において生産されているスナネズミ（北大繁殖スナネズミ）と2系統の近交系スナネズミおよび野外で捕獲されたモンゴル産スナネズミについて、回収虫体数について比較したが、現在用いている北大繁殖スナネズミより好適な宿主は選別できなかった。

次いで、採集地域、継代方法および継代回数の異なる4つの多包条虫原頭節（コトトラット分離株、衛研分離株、当別分離株および野幌97分離株）の虫体回収率を比較した。使用する原頭節によって虫体の虫体回収率は大きく変化した。継代回数を重ねると、シスト組織が密になり、原頭節の感染能が低下する可能性が示唆された。

第Ⅱ章において、代替終宿主モデルの実用性を検討するため、ハムスターを用いてプラジクアンテルによる小腸内の多包条虫の駆虫試験を行ったところ、多包条虫代替終宿主モデルが、イヌにかわる駆虫薬検定モデルとしても有用であることが示された。

第Ⅲ章において、多包条虫代替終宿主モデルを応用し、PTBA処置を施したスナネズミにフォーゲル包条虫原頭節を経口投与したところ、その腸管内で虫体が定着、発育した。フォーゲル包条虫の成虫の発育についての報告はこれまでなく、本研究が初めての報告である。感染後7日目では片節形成開始の兆しであるバンドが出現し、感染後14日目には第2片節の形成が認められ、生殖原基および精巢の形成が確認された。感染後21日目では、第2片節内に生殖器が完成し、精巢および受精嚢内に精子が、子宮内には分裂した卵細胞が観察された。感染後28日目には第3片節が完成し、子宮内の虫卵には鉤が確認され、感染後34日目の虫体では虫卵に幼虫被殻の形成が認められた。感染後35日目には、糞便内に正常な形態を持つ虫卵が検出された。フォーゲル包条虫感染スナネズミ糞便中の虫体由来抗原は、多包条虫成虫虫体抗原に対するモノクローナル抗体検出可能であることが示された。糞便内抗原価は感染後7日目以降上昇し、感染後18日目でピークに達した後、感染後28日目以降は緩やかに下降した。

フォーゲル包条虫代替終宿主スナネズミにおいて形態的に正常な虫卵が産生されたが、この虫卵の感染能を調べるために、スナネズミ、Hertley系モルモット、ACN系ゴールデンハムスター、C.B.-17/Icr scidマウスおよびBALB/cA scidマウスに経口投与あるいは腹腔内投与した。30 - 50 DPIの剖検では病変は確認できず、虫卵の感染能は確認できなかった。

スナネズミと同じく、多包条虫の代替終宿主として用いられているハムスターについて、フォーゲル包条虫代替終宿主としての可能性を検討した。ACNおよびCN系ゴールデンハムスターにスナネズミと同量のPTBA処置を行い、フォーゲル包条虫原頭節を経口投与したが、回収虫体数はスナネズミに比べ、非常に少なく、代替終宿主モデルには適さないことが示された。

以上のように、申請者は多包条虫代替終宿主モデルの改善と従来、研究がほとんど進んでいないフォーゲル包条虫の代替終宿主モデルを初めて確立し、今後の当該研究領域の発展に資する成果を得た。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者松尾加代子の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。