

学 位 論 文 題 名

Development of *Taenia asiatica* in alternative intermediate and definitive hosts and coproantigen detection in the definitive hosts

（代替中間宿主および終宿主における *Taenia asiatica* の発育と終宿主における糞便内抗原検出について）

学位論文内容の要旨

Taenia asiatica による人のテニア症はアジア各国で流行しており、豚が中間宿主となることから公衆衛生上重要である。本寄生虫の感染状況を調べるためには診断法の確立が必要であり、サンドイッチ ELISA 法を用いた糞便内抗原検出法は *T. asiatica* 以外のテニア症において、高い診断感度と特異性が報告されている。本研究では *T. asiatica* 幼虫と成虫を実験室内で得るために代替宿主の開発を行い、*T. asiatica* に対する糞便内抗原の検出法を検討した。

まず、第1章では *T. asiatica* の代替中間宿主である SCID マウスとスナネズミにおける発育を観察し、これらから回収した囊虫を用いて、人と代替終宿主（ハムスターとスナネズミ）への感染能について検証した。

1. 六鉤幼虫を腹腔投与および皮下投与した SCID マウスからの *T. asiatica* 囊虫の回収率はそれぞれ 0-0.3% と 0.1-1.1% で、六鉤幼虫を皮下投与したスナネズミからの囊虫の回収率は 0.1-3.2% であった。一方、通常の感染経路である虫卵の経口投与後は、スナネズミから囊虫を全く回収できなかった。豚では囊虫は短期間のみ生存するが、本研究で SCID マウスやスナネズミにおいて長期間生存できることを示した。
2. 囊虫の形態的变化としては、囊虫の発育につれて頭節の額嘴部分の小顆粒の数が顕著に減少し、また、頸部の石灰小体の数が顕著に増加することを示した。
3. 20-45 週齢 *T. asiatica* 囊虫を用いて経口感染した代替終宿主から成虫が検出されたが、10 週齢 *T. asiatica* 囊虫を用いた場合は検出されず、10 週から 20 週の間に感染能を獲得することを示唆し、囊虫の形態的变化との関連を考察した。

4. 代替中間宿主のスナネズミから回収した囊虫を用いて人や代替終宿主に経口感染したところ、成虫の回収率はそれぞれ27%および70%だった。また、スナネズミから回収した成虫は生殖原基と遺残的な hooklets が観察された。以上の結果から、スナネズミは *T. asiatica* の代替終宿主および代替中間宿主として有用なモデルと考えられた。

第II章第1節では、*T. asiatica* 終宿主における糞便内抗原検出法の確立のために、ウサギを用いて抗 *T. asiatica* 成虫排泄・分泌抗原(TES)と粗抗原(TSO)に対するポリクローナル抗体（それぞれ rTESAb と rTSOAb）を作製した。

1. rTESAb と rTSOAb を用いて、*T. asiatica* 成虫と囊虫組織に対する免疫染色を行い、成虫の tegument と排泄管との反応が見られた。特に、rTSOAb は rTESAb より囊虫と強い反応が見られ、一方、rTESAb は rTSOAb より成虫 tegument に対する強い反応が見られた。
2. rTESAb を用いたサンドイッチ ELISA 法では、rTSOAb を用いたものより糞便内抗原に対する高い検出力が認められた。
3. rTESAb を用いたサンドイッチ ELISA 法における検出限界は 2.5 ng/ml となり、成虫感染診断法としての有用性が示唆された。

第II章第2節では、rTESAb を用いたサンドイッチ ELISA 法を用いて、5名のボランティアの *T. asiatica* 成虫感染における糞便内抗原の推移を検討した。同時に、虫卵および片節の検出と人の血清中の抗 TES 抗体を測定した。これらの結果から、人に対する *T. asiatica* 成虫感染診断法について考察した。

1. 人の感染における patent period では、糞便内抗原検出法は虫卵または片節の検出法より高い検出率を示した。この時期では各検出法単独では100%の検出信頼性を達成しなかったが、糞便内抗原と虫卵あるいは片節の検出結果を合わせると、100%の検出信頼率を達成した。
2. *T. asiatica* 成虫に感染したボランティア4人中3人の各糞便の糞便内抗原陽性率は prepatent period の前期では0-26%、prepatent period の後期では45-100%となった。したがって、本サンドイッチ ELISA 法は prepatent period の後期で高い検出能があることが示された。
3. 糞便における虫卵と糞便内抗原分布の不均衡性が観察され、糞便検査におけるこの不均衡性について考察した。
4. 血清抗体を TES を用いた ELISA 法により検査したところ、上昇はほとんど見られず、成虫感染における診断法としては不適切だと考えられた。

最後に、第Ⅱ章第3節ではサンドイッチ ELISA 法を用いて、代替終宿主における短期間および長期間の成虫の生存をモニターした。

1. スナネズミにおいてほぼ感染後 12 日目からのみ糞便内抗原の上昇が測定され、サンドイッチ ELISA 法は代替終宿主における早期(感染後 12 日前)の *T. asiatica* 成虫生存をモニターすることはできなかった。
2. 剖検により成虫が検出されたハムスターでは糞便内抗原の上昇が認められ、一方、剖検により成虫が検出されなかったスナネズミではほとんど上昇が認められず、一部の個体でのみ糞便内抗原の上昇が認められ、これらの個体では剖検前に成虫が排出されたことが推察された。
3. スナネズミにおいて成虫が排出された理由として免疫抑制処置の頻度を減らしたことが考えられた。因に、免疫抑制処置しなかったハムスターからは、糞便内抗原の上昇は認められず、剖検においても成虫は全く検出されなかった。

本研究では、代替中間宿主として SCID マウスとスナネズミから感染能力を有する *T. asiatica* 嚢虫が得られ、完全に発育することが示された。一方、代替終宿主としてスナネズミとハムスターでは成虫の部分的な発育のみ認められ、今後の改善の可能性を考察した。また、この代替中間宿主での幼虫の発育から嚢虫の成熟の指標として、形態的な特徴から嚢虫の感染能力を評価できる可能性が示唆された。糞便内抗原検出のためのサンドイッチ ELISA 法は人の *T. asiatica* 感染の診断法として高い検出能を示し、また、代替終宿主においても虫体の生存をモニターする手段として有用であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	奥	祐三郎
副 査	教 授	片 倉	賢
副 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	高 島	郁 夫

学 位 論 文 題 名

Development of *Taenia asiatica* in alternative intermediate and definitive hosts and coproantigen detection in the definitive hosts

(代替中間宿主および終宿主における *Taenia asiatica* の発育と終宿主における糞便内抗原検出について)

Taenia asiatica は豚を中間宿主とし、人のテニア症としてアジア各国で流行していることが近年判明した条虫である。本寄生虫の研究は代替宿主が開発されることにより、促進されるものと考えられる。申請者は *Taenia asiatica* の囊虫および成虫を実験室内で得るために、実験小動物を用いた代替宿主について検討し、さらに人の成虫感染における糞便内抗原の検出法として、サンドイッチ ELISA を検討した。

まず、*Taenia asiatica* の代替中間宿主として SCID マウスとスナネズミを用い、これらの腹腔内や皮下に六鉤幼虫を投与し、皮下における定着と長期間における囊虫の生存を観察した。さらに、これらの囊虫の感染能については人と代替終宿主（ハムスターとスナネズミ）において確認した。一方、代替終宿主として、ハムスターとスナネズミでは虫体回収率は低く、発育も限られているものの、小腸から幼若成虫が得られた。

人の *Taenia asiatica* 感染診断用の糞便内抗原検出法の確立のために、成虫の排泄・分泌抗原と虫体抗原に対するポリクローナル抗体を作製し、サンドイッチ ELISA に用いた。ボランティアの成虫感染における糞便内抗原の経時的な推移を調べ、同時に、糞便から虫卵および片節の検出を行い、人の診断法として比較検討した。成虫の発育につれてサンドイッチ ELISA の OD 値の上昇が認められ、虫卵および片節が検出出来ない時期においても抗原検出率が上昇し、サンドイッチ ELISA の有用性が示唆されたが、今後多数の野外サンプルを用いた確認が必要と考えられる。なお、OD 値の変動の原因の一つとして、糞便内における虫卵と抗原の分布について調べた。最後に、サンドイッチ ELISA を用いて代替終宿主における成虫の生存・排除をモニターし、感染経過のモニター法としてのサンドイッチ ELISA の可能性を示唆した。

以上、申請者は *Taenia asiatica* について、実験小動物中間宿主および終宿主開発を試み、本寄生虫の研究発展に寄与し、さらに人の診断法として糞便内抗原検出法の開発に貢献するものである。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者張秀玲の博士論文は、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。