

日本産およびカナダから輸入された食用馬
の多包虫症に関する疫学的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

一 二 三 達 郎

2021 年 3 月

目次

序文	1
第1章：日本産の食用馬の多包虫症に関する疫学的研究	
1. 緒言	5
2. 材料と方法	
(1) 症例の概要	6
(2) 疫学調査	6
(3) 馬の年齢の推定方法	7
(4) 病理組織学的検査	7
(5) 遺伝子検査	7
(6) 評価方法	8
3. 成績	
(1) 病理組織学的検査の結果	8
(2) 遺伝子検査の結果	9
(3) 結果のまとめ	9
4. 考察	10
5. 小括	13
6. 図表	15

第 2 章：カナダから輸入された食用馬の多包虫症に関する疫学的研究

1. 緒言	2 2
2. 材料と方法	
(1) 症例の概要	2 4
(2) 病理組織学的検査	2 4
(3) 遺伝子検査	2 5
(4) 評価方法	2 6
3. 成績	
(1) 病理組織学的検査の結果	2 6
(2) 遺伝子検査の結果	2 6
(3) 結果のまとめ	2 7
4. 考察	2 8
5. 小括	3 0
6. 図表	3 1

第 3 章：馬の肝臓結節を用いた LAMP 法による多包条虫の mitochondrial cytochrome b (*cob*) 遺伝子の簡便かつ迅速な検出方法の開発

1. 緒言	3 9
-------	-----

2. 材料と方法

(1) 症例の概要	4 0
(2) LAMP 法に用いるプライマーの設計および条件検討	4 1
(3) 多包条虫の <i>cob</i> 遺伝子を標的とするコンベンショナル PCR	4 2
(4) TA クローニング	4 3
(5) 馬の肝臓結節を用いた LAMP 法 および検出限界遺伝子コピー数の算出	4 3

3. 成績

(1) LAMP 法の条件決定	4 3
(2) 馬の肝臓結節を用いた LAMP 法	4 4
(3) プラスミド検体を用いた LAMP 法による検出限界遺伝子コピー数の 算出	4 4

4. 考察

5. 小括

6. 図表

結論

謝辞

引用文献

序文

昭和から平成にかけて、馬肉の生産量は最低 3,741 トンから最大 8,433 トンと 2 倍以上に右肩上がり増加している[8-10]。この原因として、以前、馬肉は特定地方の郷土食であったが、近年のグルメブームの影響によるインターネット販売の普及とスーパーマーケットや居酒屋などの飲食店での販売により、馬肉が食肉として世間に広く流通するようになったことが考えられる。また、日本産の馬だけでなく、日本国外からも食用に供することを目的とした馬が生体で輸入されており、近年の主な輸入先はカナダおよびフランスである[10]。これらの馬はと畜場で食肉検査に供されるが、日本で馬の食肉検査を行っている都道府県は、北海道、青森県、秋田県、山形県、福島県、栃木県、群馬県、山梨県、長野県、岐阜県、福岡県、熊本県、沖縄県と限られている[8-10]。これらのうち、熊本県での処理頭数が 4,000～5,000 頭と最も多く、次いで福島県、青森県、福岡県が 1,000～2,000 頭である[8-10]。これらの馬の食肉検査には各自治体に所属する獣医師が関わっており、安心・安全な食肉の供給は公衆衛生行政に属する食肉検査員の職務および職責である。したがって、公衆衛生上重要な人獣共通感染症に関わる病原体の迅速な診断と摘発は食肉検査の質の向上にも繋がり、極めて重要な課題である。

2010年、山形県のと畜場に搬入された軽種馬の肝臓灰白色硬結節から多包虫感染が高率(18.8%)に検出され、北海道で多包虫に感染したと推察されており、山形県の事例は北海道以外のと畜場で初めて発見された馬の多包虫症の事例として報告されている[14]。エキノコックス症は単包条虫、多包条虫、フォーゲル包条虫、ヤマネコ包条虫などのエキノコックス属条虫の幼虫寄生による人獣共通感染症であり、日本では北海道においてキタキツネや犬を終宿主、エゾヤチネズミなどの野ネズミを中間宿主とする多包条虫の生活環が確認されている[17]。馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり、終宿主から糞便内に排泄された多包条虫の虫卵の経口摂取により感染し、幼虫である多包虫が肝臓に寄生して病変を形成する[14、16]。これまでの日本における馬の多包虫症についての報告は少ないが、そのほとんどは軽種馬に関する報告[14、16、28]で、ポニー種や重種馬などの他の品種における多包虫感染は報告されていない。

また、多包条虫は北アメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの北半球に広く分布している[4、19]。北アメリカでは、多包条虫はアラスカの西海岸に始まり、カナダ北極圏の北や東に広がる北ツンドラ地帯(Northern tundra zone)、アルバータ州、サスカチュワン州、マニトバ州などのカナダ南部の州とこれらに隣接するアメリカ合衆国の13州を含む領域である中北部地域(North-central region)

の 2 つの領域に分布する[18]。カナダにおいて、多包条虫は終宿主であるキツネ、犬、コヨーテ、中間宿主である野ネズミとの間に生活環が形成されている[2]。2004 年以降、日本はカナダから年間 2,500 頭以上の馬を食用のために生体で輸入している[9]。これらの馬のほとんどは熊本県のと畜場で食肉検査に供されており、日本産の馬と同様にこれらの輸入馬からも多包虫感染が検出される可能性が危惧された。しかし、カナダの馬における多包虫症について疫学的な調査を実施した報告はない。

さらに、これまでの馬の多包虫症に関する報告[14]において、診断方法は病理組織学的検査および PCR により行われているが、診断に時間を要する点と双方の診断結果に相違があることが難点である。そのため、従来の病理組織学的検査および PCR と同等な精度で、食肉検査で得られた材料で簡便かつ迅速に診断できれば、多包虫症の流行地における馬の食肉検査に有用であると考えられる。

以上のような背景から、日本産のさまざまな品種の馬における多包虫の感染状況を調査するために、第 1 章では福岡県のと畜場に搬入されたこれまで報告がある軽種馬に加えて、ポニー種、日本鞍系種、北海道和種などの様々な品種の馬における多包虫の感染状況を調査した。また、第 2 章において、熊本県のと畜場に搬入されたカナダから輸入された馬における多包虫の感染状況を調査した。

さらに、第 3 章では、簡便かつ迅速な遺伝子診断方法として有用である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法により、馬の肝臓結節を用いた多包虫症の新しい診断方法の開発を行い、従来の病理組織学的検査および PCR の結果と比較し、その有用性を評価した。

第1章：日本産の食用馬の多包虫症に関する疫学的研究

1. 緒言

エキノコックス症は単包条虫、多包条虫、フォーゲル包条虫、ヤマネコ包条虫などのエキノコックス属条虫の幼虫寄生による人獣共通感染症であり、日本では北海道においてキタキツネや犬を終宿主、エゾヤチネズミなどの野ネズミを中間宿主とする図1のような多包条虫の生活環が確認されている[17]。馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり、終宿主から糞便内に排泄された多包条虫の虫卵の経口摂取により感染し、幼虫である多包虫が肝臓に寄生して病変を形成する[14、16]。近年、山形県のと畜場に搬入された軽種馬の肝臓灰白色硬結節から多包虫感染が高率（18.8%）に検出され、北海道で多包虫に感染したことが推察されており、山形県の事例は北海道以外のと畜場で初めて発見された馬の多包虫症の事例として報告されている[14]。福岡県のと畜場には毎年、年間約1,200頭の軽種馬を含めた様々な品種の馬が搬入され、約200頭の馬に肝臓灰白色硬結節が認められ、多包虫感染が検出される可能性が危惧されていた。これまでの日本における馬の多包虫症についての報告は少ないが、そのほとんどは軽種馬に関する報告[14、16、28]で、ポニー種や重種馬など他の品種における多包虫感染は報告されていない。

そこで、本章では、福岡県のと畜場に搬入された様々な品種の馬から得られた肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査を行い、多包虫の感染状況についての調査を行った。

2. 材料と方法

(1) 症例の概要

2012年7月から2012年12月までの6ヵ月間に福岡県のと畜場に搬入された日本産の馬610頭が搬入された。その内訳は、軽種馬が470頭、ポニー種が61頭、日本輓系種が41頭、北海道和種が38頭であった。いずれの馬も生体検査時に異常な臨床症状はみられなかった。これらの馬のうち、食肉検査時に肝臓に灰白硬結節を認めた53頭から結節を採取した。結節は硬結で灰白色であり、断面は石灰化がみられ、充実性であった(図2)。肉眼的に複数個の結節がみられた場合、最も大きい結節のみを採取した。採取した結節を二分割し、一方を病理組織学的検査、もう一方を遺伝子検査に供した。

(2) 疫学調査

調査対象馬を搬入した家畜商に対して、最終肥育地などの飼養歴についての聞き取り調査を実施した。

(3) 馬の年齢の推定方法

沖の方法[23]に従い、切歯における永久歯の萌出と摩耗の程度によって馬の年齢を推定した。

(4) 病理組織学的検査

採取した肝臓灰白色硬結節を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、脱灰液（カルキトックスTM、和光純薬工業株式会社、大阪）に 4°C で 1 日脱灰処理を行い、5%硫酸ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社）で一晩中和処理を行った。その後、定法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色および過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を行った。

(5) 遺伝子検査

採取した結節を -20°C で凍結保存した。凍結した結節から 25 mg を採取し、DNeasy Blood and Tissue kit（Qiagen, ドイツ）を用いて DNA の抽出を行った。その後、Dinkel らの報告[5]に従い、多包条虫のミトコンドリア 12S rRNA（12S rRNA）遺伝子を標的とする Nested-PCR を実施した。Nested-PCR に使用したプライマーは表 1 に示す。PCR の反応液は、いずれも DNA 溶液 2.0 μ l に 2 \times PCR buffer 12.5 μ l、2mM dNTPs 5.0 μ l、10pM の各プライマー 0.3 μ l、PCR 用酵素（KOD FX neo, 東洋紡株式会社、大阪）0.3 μ l（1U/ μ l）を加え、

滅菌 Milli-Q 水を加えて全量を 25.0 μ l とした。電気泳動により、250 bp のバンドを確認した検体についてはダイレクトシーケンスを実施して塩基配列を決定し、日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータベースを用いた BLSAT 検索により登録株との相同性の検索を実施した。

(6) 評価方法

Goto らの報告[14]に従い、病理組織学的検査で多包虫に特徴的な PAS 染色陽性の角皮層が確認された症例、または遺伝子検査で多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された症例を「多包虫症」とした。

3. 成績

(1) 病理組織学的検査の結果

53 頭中 49 頭には、結節の中心部における壊死と石灰化、線維芽細胞や膠原線維の高度な増生による線維化結節よりなる肉芽腫で、結節の辺縁にはリンパ球、好酸球、マクロファージの浸潤が認められた。そのうちの 13 頭では、結節の中心部に HE 染色で好酸性の層状構造物が認められ (図 3)、PAS 染色陽性の多包虫に特徴的な角皮層がみられた (図 4)。さらに、1 頭において、角皮層の内側に薄い胚層と胚細胞の形成がわずかに認められたが、繁殖胞や原頭節はみら

れなかった（図 3）。また、53 頭中 3 頭は好酸球性胆管周囲炎、1 頭は胆管嚢胞であった。

(2) 遺伝子検査の結果

病理組織学的に壊死や石灰化を伴う線維化結節が認められた 49 頭では、角皮層がみられた 13 頭中の 10 頭に多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された。また、角皮層がみられなかった 36 頭中の 26 頭においても多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された。線維化結節がみられなかった 4 頭からは多包条虫の 12S rRNA 遺伝子は検出されなかった。これらの結果から、36 頭から多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された。多包条虫の 12S rRNA 遺伝子を標的とする PCR の代表的な写真を図 5 に示す。多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された 36 頭の PCR 増幅産物を用いて塩基配列の解析を実施した結果、多包条虫根室株の 12S rRNA 遺伝子の塩基配列（GenBank accession No. AB024424）と 100%一致した。

(3) 結果のまとめ

以上の結果から、病理組織学的検査で角皮層が認められた 13 頭と組織学的に角皮層はみられなかったが遺伝子検査により多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された 26 頭のあわせて 39 頭を多包虫症と診断した。感染率は 6.4%（39/610）

であった。表 2 において多包虫症と診断した馬 39 頭の品種、最終肥育地、性別、年齢、病理組織学的検査成績、遺伝子検査成績についての情報を示す。年齢は 4～6 歳齢、性別は雄 12 頭、雌 25 頭、去勢雄 2 頭であった。最終肥育地は福岡県 16 頭、佐賀県 13 頭、熊本県 4 頭、高知県 3 頭、北海道 3 頭であった。また、北海道での飼養歴が確認された個体は 4 頭であった。品種の内訳は軽種 26 頭、ポニー種 6 頭、日本挽系種 5 頭、北海道和種 2 頭で、品種別の感染率はそれぞれ 5.5% (26/470)、9.8% (6/61)、12.2% (5/41)、5.3% (2/38) であり、様々な品種で多包虫感染が認められた。

4. 考察

病理組織学的検査および遺伝子検査の結果から、福岡県のと畜場に搬入された様々な品種の馬において多包虫感染が認められた。本研究は病理組織学的検査と遺伝子検査の結果が異なる症例がみられ、病理組織学的検査と比較して遺伝子検査での検出率が高かった。検査結果が異なった原因として、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が PCR で検出されたとしても、角皮層が壊死や石灰化により組織学的に検出困難であったこと、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子は消失していたが、病理組織学的には多包虫の角皮層が残存していたことが考えられた。

しかし、病理組織学的に角皮層が検出困難であっても遺伝子検査において多包条虫遺伝子が存在すれば多包虫症の診断が可能であるため、PCR は多包虫症の検出に有用であると思われた。

今回の調査対象となった馬はすべて日本産であった。疫学調査で北海道での飼養歴が判明し、かつ病理組織学的検査および遺伝子検査により多包虫症と診断された症例は4頭で、これらの馬は過去の報告[14、16]と同様に多包虫症の有病地である北海道で多包虫に感染した可能性が考えられた。一方で、と畜場に搬入される馬は牛とは異なり、トレーサビリティが義務づけられていないため、本研究の多包虫感染馬の多くは最終肥育地以外の飼養歴は確認できず、北海道での飼養歴は不明であり、これらの馬については感染地の特定が困難であった。しかし、日本での多包条虫の地理的分布が北海道に限局していることや農林水産省が公表している日本における馬の生産状況に関する統計[8]によれば、日本で生産される軽種馬、挽用馬、ポニーはそれぞれ約90%が北海道で生産されていることから、北海道での飼養歴が不明であった多包虫感染馬も北海道で多包虫に感染した可能性を完全には否定できない。

従来、北海道での飼育歴がある犬が多包虫症のキャリアーとして危惧されてきたが[17]、馬がキャリアーとなる可能性もあると考えられ、馬の国内移動に

も注意する必要があると思われた。一般的に、馬は人や豚と同様に多包条虫の非好適な中間宿主であり、生活環の成立には関与せず、終宿主への感染性を示す原頭節の形成はみられない[17]。本研究では馬の肝臓結節内に原頭節は確認されなかったため、これらの馬の肝臓に寄生した多包虫を摂食することによる終宿主への感染の可能性はない。しかし、北海道産の競走馬における肝臓の多包虫症において、胚層に胚細胞が認められ、終宿主への感染性が保持されている可能性が示唆されており[16]、本研究の1例においても胚層に胚細胞がみられた。人の多包虫症ではまれに原頭節が形成されるが、馬では繁殖胞や原頭節が形成されたという報告は現時点ではみられない[28]。しかし、感染期間と個体の状態によっては馬においても原頭節形成が起こる可能性が指摘されており[14]、さらに症例を集積して馬における原頭節形成の可能性を検討する必要がある。

食肉検査でみられる馬の肝臓灰白色硬結節は「肝砂粒症」として部分廃棄されているが、本研究の結果からさまざまな品種の馬の肝臓結節の多くに多包虫症が含まれていた(39/53, 73.6%)。しかし、多包虫感染による馬の肝臓病変は線虫類など他の寄生虫感染による肝臓病変と肉眼的に類似しており[16]、多包虫症の有病地である北海道以外のと畜場では見落とされる可能性もある。した

がって、馬の食肉検査では肝臓病変の鑑別診断として多包虫症を考慮し、多包虫が含まれる可能性がある馬の肝臓結節は適切に処理することが、公衆衛生の観点からも重要であると考えられた。

以上のことから、福岡県のと畜場に搬入された様々な品種の馬において多包虫感染が認められ、これらの馬は北海道で多包虫に感染した可能性が考えられた。また、これまで日本での軽種馬以外の品種における多包虫感染についての報告はなく、本研究によって日本における様々な品種の馬の多包虫感染状況の一端が明らかになった。さらに、公衆衛生の観点から、と畜場における馬の肝臓灰白色硬結節の取り扱いには十分な注意が必要であると思われた。

5. 小括

日本産の様々な品種の馬における多包虫感染を明らかにするために、福岡県のと畜場に搬入された馬にみられた肝臓灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査を実施した。その結果、これまでに報告のある軽種馬以外にも、ポニー種、日本輓系種、北海道和種などの様々な品種の馬で多包虫感染が認められ、感染率は6.4% (39/610) であった。馬を搬入した家畜商への聞き取り調査で、日本での多包虫症の有病地である北海道での飼養歴を確認できた

馬は4頭だけであった。しかし、日本における馬の生産状況を考慮すると、北海道での飼養歴が確認できなかった馬も北海道で多包虫症に感染した可能性を完全には否定できない。また、食用馬の肝臓結節の多くには多包虫感染がみられたことから、公衆衛生の観点から、と畜場における馬の肝臓灰白色硬結節の取り扱いには十分な注意が必要であると思われた。

6. 図表

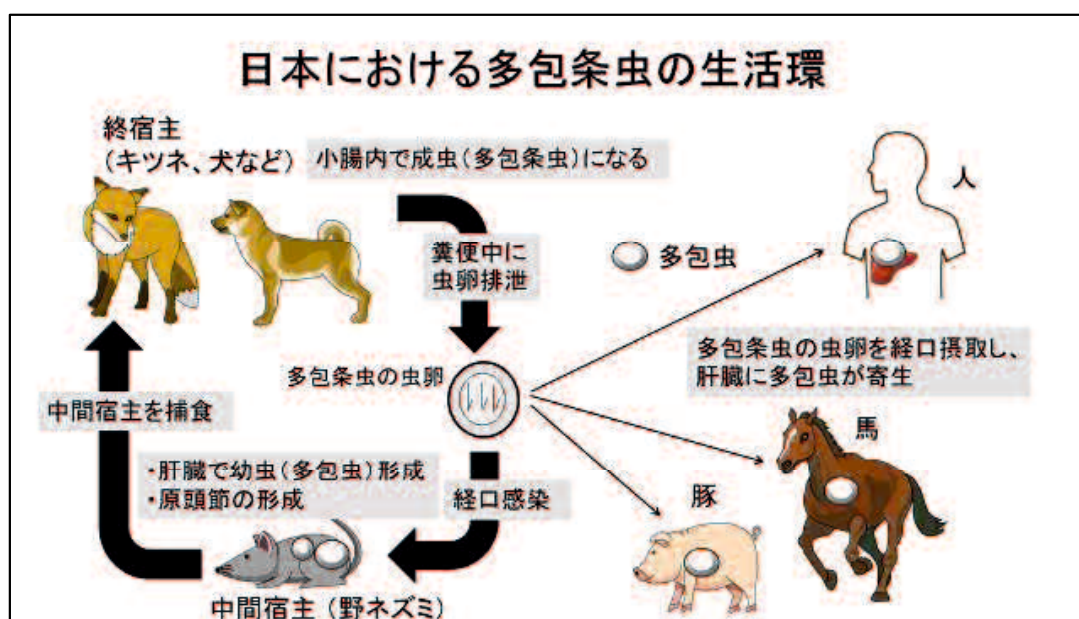


図 1. 日本における多包条虫の生活環

日本においては北海道に限局しており、多包条虫の生活環は終宿主であるキツネ、犬などの犬科動物、中間宿主であるエゾヤチネズミなどの野ネズミとの間で形成されている。馬は人や豚と同様に、終宿主から排泄された糞便に含まれる多包条虫の虫卵を経口摂取し、幼虫である多包条虫が肝臓に寄生して病変を形成する。

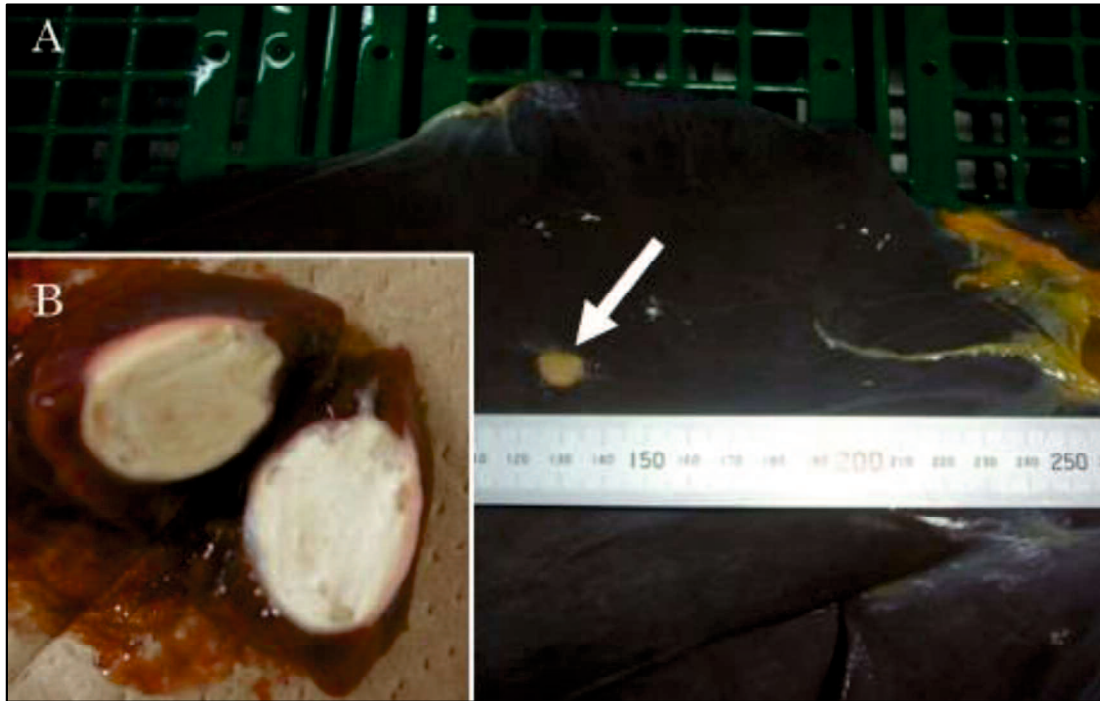


図 2. 日本産の馬にみられた肝臓灰白色硬結節の肉眼写真

A: 症例 No.21 の肝臓において、直径約 1 cm 大の灰白色硬結節（白矢印）が認められた。

B: 断面は灰白色充実性で、石灰化がみられ、硬結であった。

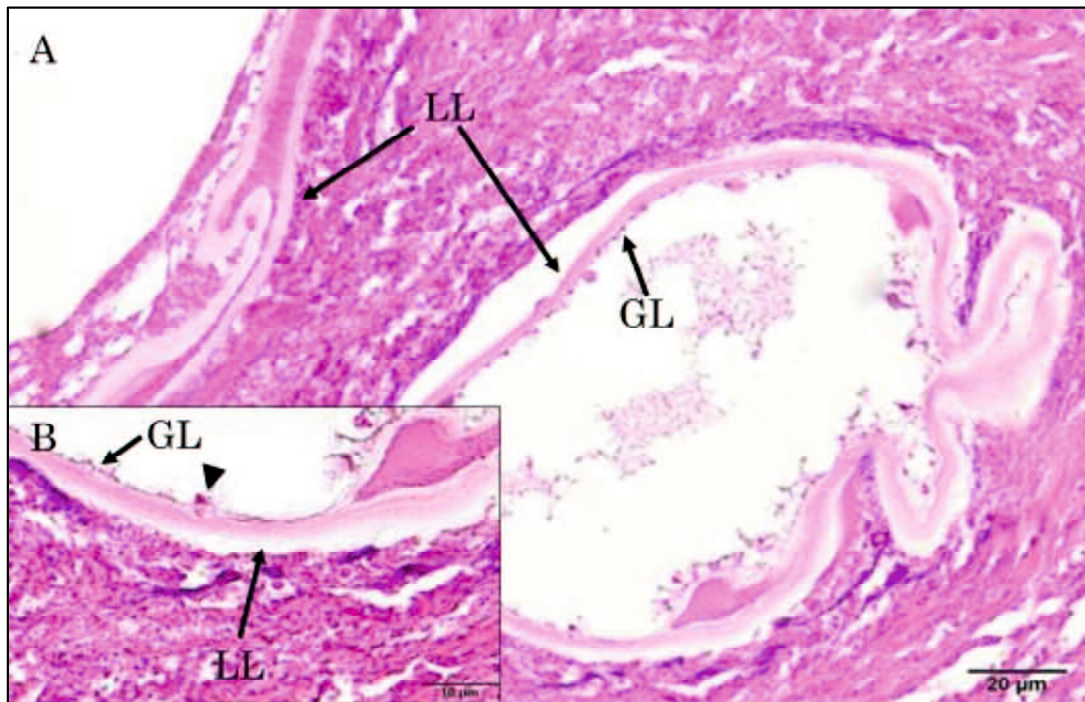


図 3. HE 染色組織写真 (症例 No.21、脱灰後検索)

- A: 好酸性の層状構造物である角皮層 (laminated layer: LL) とその内側に薄い胚層 (germinal layer: GL) の形成が認められた (Bar = 20 μ m)。
- B: 胚層から突出する胚細胞 (矢頭) も散見された (Bar = 10 μ m)。

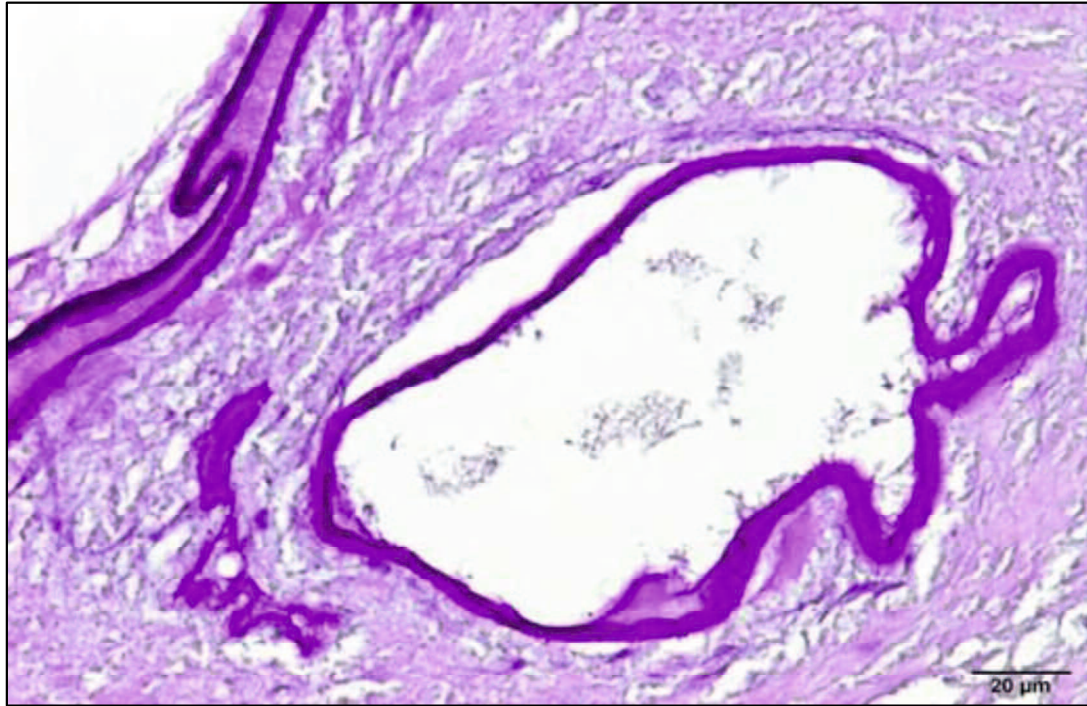


図 4. PAS 染色組織写真（症例 No.21、脱灰後検索）
PAS 染色において角皮層は赤紫色に染色された（Bar = 20 μm）。

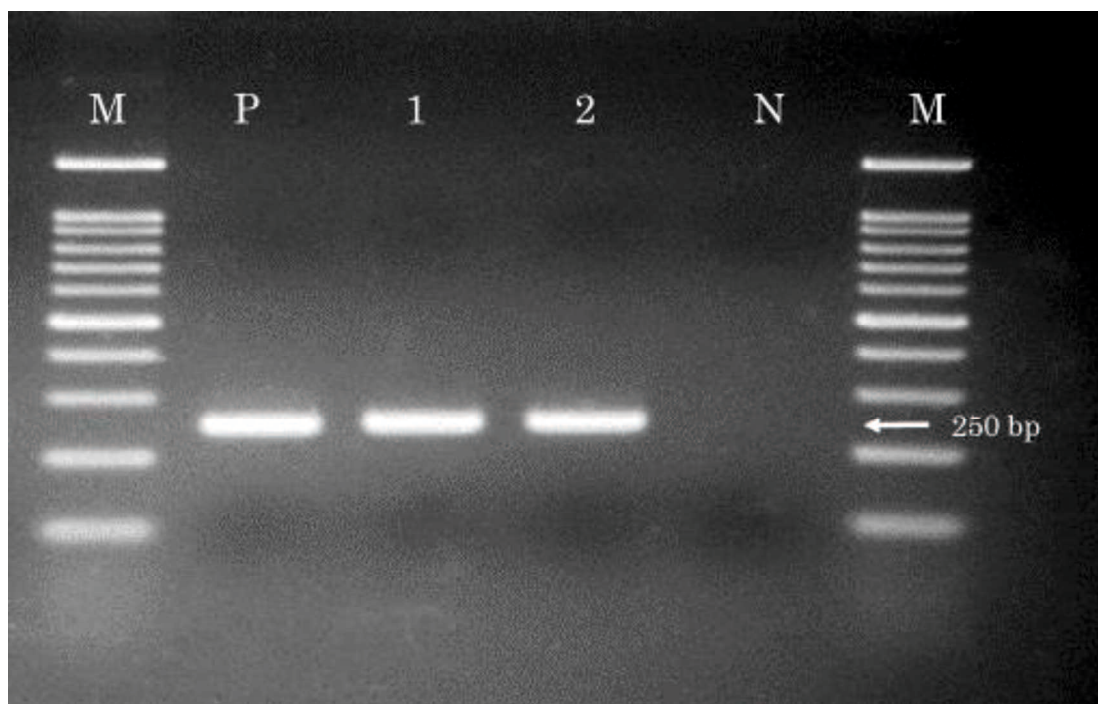


図 5. 多包虫症と診断された症例の Nested-PCR 検査写真

M: DNA マーカー、 P: 陽性対照 (多包条虫北海道根室株)、

1: 症例 No.21、 2: 症例 No.37 (北海道での飼養歴のある個体)、

N: 陰性対照 (滅菌 Milli-Q 水)

表1 Nested-PCR検査において使用したプライマー

	プライマー	塩基配列	PCR産物(塩基)
1st PCR	P60F	5'-TTAAGATATATGTGGTACAGGATTAGATACCC-3'	373 bp
	P375R	5'-AACCGAGGGTGACGGGCGGTGTGTACC-3'	
2nd PCR	P-nest-F	5'-ATATTTTGTAAGGTTGTTCTA-3'	250 bp
	P-nest-R	5'-ACAATACCATATTACAACAATATTCCTATC-3'	

表2 多包虫症と診断された馬39頭の情報

症例No.	品種	最終肥育地	性別	年齢	病理組織学的検査	Nested-PCR
1	軽種	熊本県	去勢雄	5	-	+
2	軽種	高知県	雄	6	+	+
3	軽種	福岡県	雄	6	-	+
4	軽種	福岡県	雌	4	+	+
5	軽種	佐賀県	雌	5	-	+
6	軽種	福岡県	雌	4	-	+
7	軽種	福岡県	雌	3	-	+
8	軽種	佐賀県	雌	3	+	+
9	軽種	高知県	雌	5	+	+
10	軽種	佐賀県	雌	4	-	+
11	軽種	佐賀県	雄	4	+	-
12	軽種	福岡県	雌	6	-	+
13	軽種	福岡県	雌	6	-	+
14	軽種	福岡県	雌	6	+	+
15	軽種	福岡県	雌	4	+	+
16	軽種	佐賀県	雌	4	-	+
17	軽種	佐賀県	雌	6	-	+
18	軽種	高知県	雄	6	-	+
19	軽種	佐賀県	雌	4	-	+
20	軽種	佐賀県	雌	2	+	-
21	軽種	佐賀県	雌	6	+	+
22	軽種	佐賀県	雄	6	+	-
23	軽種	福岡県	雄	5	-	+
24	軽種	佐賀県	去勢雄	4	+	+
25	軽種	佐賀県	雄	3	-	+
26	軽種	佐賀県	雄	6	-	+
27	ポニ一種	福岡県	雌	4	-	+
28	ポニ一種	北海道	雄	4	-	+
29	ポニ一種	福岡県	雌	6	-	+
30	ポニ一種	福岡県	雄	3	-	+
31	ポニ一種	福岡県	雌	6	-	+
32	ポニ一種	福岡県	雌	6	-	+
33	日本輓系種	福岡県	雄	6	+	+
34	日本輓系種	熊本県	雌	3	-	+
35	日本輓系種	(北海道→) 福岡県	雌	6	-	+
36	日本輓系種	熊本県	雌	4	+	+
37	日本輓系種	北海道	雌	6	-	+
38	北海道和種	北海道	雄	3	-	+
39	北海道和種	熊本県	雌	6	-	+

第 2 章：カナダから輸入された食用馬の多包虫症に関する疫学的研究

1. 緒言

多包条虫の幼虫寄生による多包虫症は人獣共通感染症である[4]。多包条虫は北アメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの北半球に広く分布している[4、19]。北アメリカでは、多包条虫はアラスカの西海岸に始まり、カナダ北極圏の北や東に広がる北ツンドラ地帯 (Northern tundra zone)、アルバータ州、サスカチュワン州、マニトバ州などのカナダ南部の州とこれらに隣接するアメリカ合衆国の 13 州を含む中北部地域 (North-central region) の 2 つの領域に分布することが知られていた[18]。しかし、Peregrine らの報告[24]によれば、ブリティッシュコロンビア州に住む旅行歴のない犬が多包虫症に罹患した事例がある。また、疫学調査において、ブリティッシュコロンビア州に生息するコヨーテなどの野生の犬科動物が多包条虫を保有していることが明らかとなった[11]。これらの結果から、カナダにおける多包条虫の分布が拡大していることが示唆された。カナダにおいて、多包条虫は終宿主であるキツネ、犬、コヨーテと中間宿主である野ネズミとの間に図 6 のような生活環が形成されている[2]。

馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり、終宿主動物から糞便内に排泄された多包条虫卵の経口摂取により感染し、幼虫である多包虫が肝臓に寄生

して病変を形成する[14、16]。日本において、Goto らの報告[14]によれば、山形県のと畜場に搬入され、肝臓に灰白色硬結節がみられたサラブレッド種の52.6%に多包虫感染が認められた。日本の競走馬の大部分が北海道で生産され、また北海道は多包虫症の有病地であるため、これらの馬は北海道で多包虫に感染したと推察された。しかし、日本国外の馬における多包虫の感染状況に関する報告はない。2004年以降、日本はカナダから年間2,500頭以上の馬を食用のために生体で輸入している[9]。これらの馬のほとんどは重種馬であり、熊本県の農場で輸入後3~4ヵ月間肥育され、その後、熊本県のと畜場に搬入される。熊本県食肉衛生検査所のと畜検査員への聞き取り調査によれば、食肉検査時において、と畜された馬の約10%に肝臓の灰白色結節が認められるとことが報告されている。

そこで、本章では、カナダから輸入された馬における多包虫感染の状況を明らかにするために、カナダから輸入された馬に認められた肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織検査および遺伝子検査を実施した。

2. 材料と方法

(1) 症例の概要

2017年8月から2018年2月、2018年8月から2019年1月の間、熊本県のと畜場に重種馬2,326頭が搬入された。と畜場に馬を搬入した家畜商によれば、これらの馬はカナダのアルバータ州の農場で飼養された後、2～16歳齢時に日本に輸入されており、その後、熊本県の農場で3～4ヵ月間肥育された後、食肉検査に供された。生体検査時に、これらの馬に異常な臨床症状はみられなかった。食肉検査時において、2,326頭中150頭に肝臓において灰白色硬結節が認められた。結節は限局性であり、硬結で灰白色を呈していた（図7）。肉眼的に複数個の結節がみられた場合、最も大きい結節のみを採取した。採取した結節を二分割し、一方を病理組織学的検査、もう一方を遺伝子検査に供した。

(2) 病理組織学的検査

採取した肝臓の灰白色硬結節を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、10%ギ酸・ホルマリン混合液（ギ酸、ホルムアルデヒド液：富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）で脱灰処理を行い、5%硫酸ナトリウム溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）で一晩中和処理を行った。その後、定法に従ってパラフィン切片

を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を行った。

(3) 遺伝子検査

採取した結節を -20°C で凍結保存した。凍結した結節から 25 mg を採取し、DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, ドイツ) を用いて DNA の抽出を行った。過去の報告[1、5、13]に従って、多包条虫のミトコンドリア 12S rRNA (12S rRNA) 遺伝子および mitochondrial cytochrome b (*cob*) 遺伝子、エキノコックス属の mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子を標的とする PCR を実施した。使用したプライマーを表 3 に示す。PCR の反応液は、いずれも DNA 溶液 1.0 μl に 2 \times Gflex PCR buffer (タカラバイオ株式会社、滋賀) 6.25 μl 、10pM の各プライマー 0.15 μl 、PCR 用酵素 (Tks Gflex DNA polymerase, タカラバイオ 株式会社) 0.15 μl (1.25 U/ μl) を加え、滅菌 Milli-Q 水 4.8 μl を加えて全量を 12.5 μl とした。さらに、得られた PCR 産物の塩基配列を決定するためにダイレクトシーケンスを実施し、得られた塩基配列をアメリカ国立生物工学情報センター (NCBI: National Center for Biotechnology Information) のデータベース (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) を用いて BLSAT 検索により登録株との相同性を解析した。

(4) 評価方法

病理組織学的検査で角皮層が認められ、PCR で多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された症例、または病理組織学的検査で角皮層はみられなかったが、PCR で多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された症例を「多包虫症」とした。

3. 成績

(1) 病理組織学的検査の結果

150 頭のすべての結節は、微小な壊死を伴う線維芽細胞と膠原線維の増生による線維化結節であり、結節の辺縁には軽度から中等度な好酸球、リンパ球、マクロファージの浸潤がみられた (図 8)。150 頭中 14 頭では、結節の中心部において HE 染色で好酸性の層状構造物が認められ (図 9)、PAS 染色陽性の角皮層がみられた (図 10)。しかし、繁殖胞や原頭節は認められなかった。

(2) 遺伝子検査の結果

150 頭中 10 頭から多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された。10 頭のうち、4 頭には病理組織学的に角皮層が認められ、6 頭には病理組織学的に角皮層がみられなかった。これら 10 頭は多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする PCR においても陽性であった。多包条虫の 12S rRNA 遺伝子を標的とする PCR の代表的な

写真を図 11 に示す。しかし、組織学的に角皮層がみられた 10 頭は多包条虫の 12S rRNA 遺伝子は検出されず、さらにエキノコックス属を同定するための *cox1* 遺伝子を標的とする PCR でも陰性であった。10 頭の PCR 陽性産物から得られた多包条虫の 12S rRNA 遺伝子の塩基配列は多包条虫の 12S rRNA 遺伝子 (GenBank accession No. EU043372, L49455) と 100%一致した。また、10 頭の PCR 陽性産物から得られた多包条虫の *cob* 遺伝子の塩基配列はオーストラリアから分離されたヨーロッパ型 (ハプロタイプ E1) 多包条虫の *cob* 遺伝子 (GenBank accession No. AB461395) と 99~100%一致した。

(3) 結果のまとめ

以上の結果から、病理組織学的検査で角皮層が認められ、かつ多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された 4 頭と病理組織学的に角皮層はみられなかったが、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が検出された 6 頭のあわせて 10 頭を多包虫症と診断した。したがって、肝臓に灰白色硬結節を有する馬の 6.7% (10/150) に多包虫感染が認められた。多包虫感染馬の性別、年齢、肝臓結節の大きさ、病理組織学的検査および遺伝子検査の結果を表 4 に示す。

4. 考察

病理組織学的検査および遺伝子検査によって、カナダから輸入された馬の一部に多包虫感染が認められることを明らかにした。本研究のいくつかの症例では病理組織学的検査と遺伝子検査の結果に相違がみられた。病理組織学的検査で角皮層がみられ、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子を標的とする PCR に陰性であった症例では、*Echinococcus equinus* の幼虫による単包虫症を鑑別診断として考慮する必要がある[24、27]。しかし、これらの症例はエキノコックス属レベルを検出する *cox1* 遺伝子を標的とする PCR では陰性であった。したがって、病理組織学的に角皮層がみられたが、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子および *cox1* 遺伝子を標的とする PCR に陰性であった症例は確定診断が得られなかった。これらの症例における PCR の感度の低下の原因は不明である。さらなる確定診断のためには、リアルタイム PCR などによる感度が高い検出方法が必要となるかもしれない。病理組織学的検査で角皮層はみられなかったが、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子を標的とする PCR が陽性となった症例は、病変内に多包条虫の角皮層が病理組織学的に検出されなかったとしても、多包条虫の 12S rRNA 遺伝子が存在することを示唆した。この結果から、PCR は多包虫症の疫学調査に有用である。

本研究で多包虫に感染した馬はカナダから輸入され、熊本県で肥育された後、熊本県のと畜場に搬入された。国立感染症研究所の報告[6]によれば、1999年から2018年の間、犬および人の多包虫症は有病地である北海道から主に検出され、熊本県では検出されていない。一方で、日本への輸入前、本研究で多包虫に感染していた馬はカナダでの多包虫症の有病地であるアルバータ州の農場で飼養されていた[18]。これらのことを考慮すると、本研究で多包虫に感染していた馬がカナダで飼養されていた地域は多包条虫に汚染されており、カナダで多包虫に感染した可能性が考えられた。この仮説の支持として、多包条虫の *cob* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、本研究の多包虫に感染した馬からヨーロッパ型（ハプロタイプ E1）の遺伝子が分離された。日本における Nakao らの報告[20]では、キツネや野ネズミからアジア型（ハプロタイプ A3 および A4）の多包条虫遺伝子が検出されている。一方、Geszy らの報告[12]によれば、カナダのアルバータ州において、コヨーテからヨーロッパ型（ハプロタイプ E1）の多包条虫遺伝子が検出されたことが明らかになった。これらのことを考慮すると、得られた多包条虫の遺伝子型から、感染地は日本よりもカナダである可能性が高いことが示唆された。本研究は馬から分離された多包虫の遺伝子型の分類を行った最初の報告例である。

結論として、カナダから輸入されて日本でと畜された馬で、肝臓に灰白色硬結節が認められた馬の一部に多包虫感染が認められた。また、PCR 産物から得られた多包条虫の *cob* 遺伝子の塩基配列は、ヨーロッパ型（ハプロタイプ E1）の多包条虫遺伝子と 99～100%の相同性であり、このことから感染地は日本よりもカナダである可能性が高いことが示唆された。

5. 小括

カナダから輸入された馬における多包虫感染を明らかにするために、熊本県のと畜場に搬入されたカナダから輸入された馬の肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査を実施した。その結果、肝臓に灰白色硬結節がみられた馬 150 頭中 10 頭を多包虫症と診断した。また、多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする PCR から得られた増幅産物の塩基配列はオーストリアで分離されたヨーロッパ型（ハプロタイプ E1）の多包条虫遺伝子と 99～100%の相同性であった。日本とカナダに分布する多包条虫の遺伝子型を考慮すると、感染地は日本よりもカナダである可能性が高いことが示唆された。

6. 図表

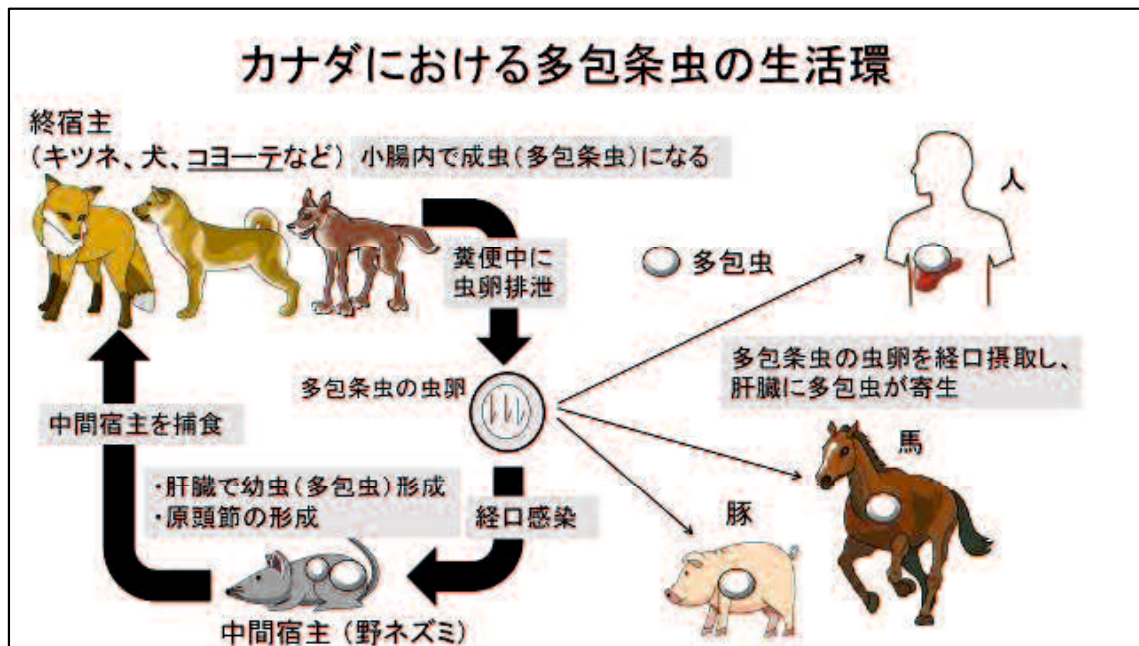


図 6. カナダにおける多包条虫の生活環

カナダにおいては、多包条虫の終宿主としてキツネや犬に加え、コヨーテも重要な終宿主であり、中間宿主である野ネズミとの間に多包条虫の生活環が形成されている。

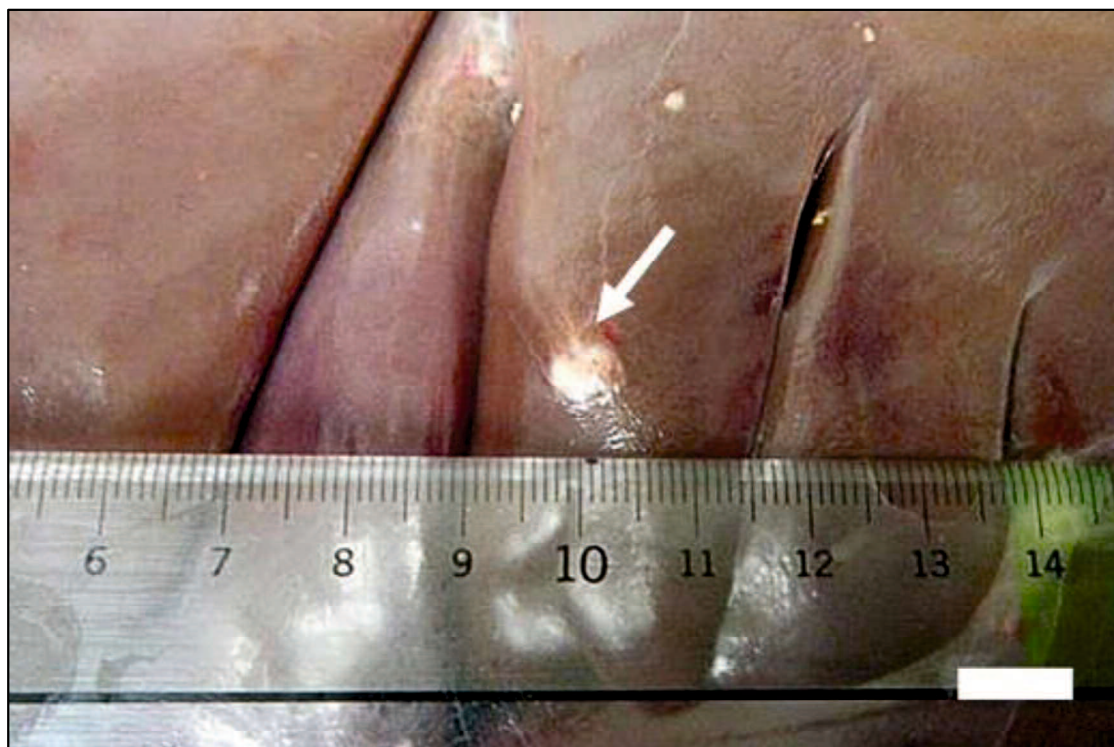


図 7. カナダから輸入された馬にみられた肝臓灰白色硬結節の肉眼写真
症例 No.3 において、直径 8 mm 大の灰白色硬結節（白矢印）が認められた
(Bar = 1 cm)。

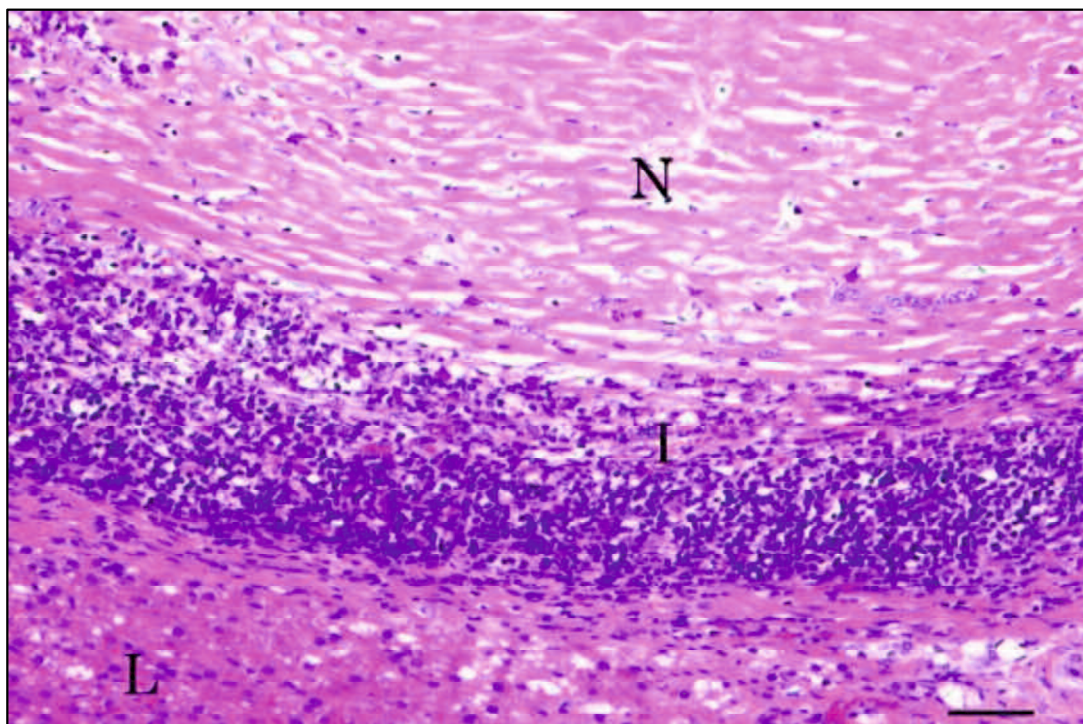


図 8. 結節の HE 染色弱拡大組織写真 (症例 No.3、脱灰後検索)

結節 (N) は線維芽細胞と成熟した膠原線維の著しい増生よりなり、肝臓の実質 (L) とは境界明瞭であった。線維化結節の辺縁において、リンパ球、好酸球、マクロファージなどの軽度から中等度な炎症性細胞浸潤 (I) が認められる (Bar = 50 μ m)。

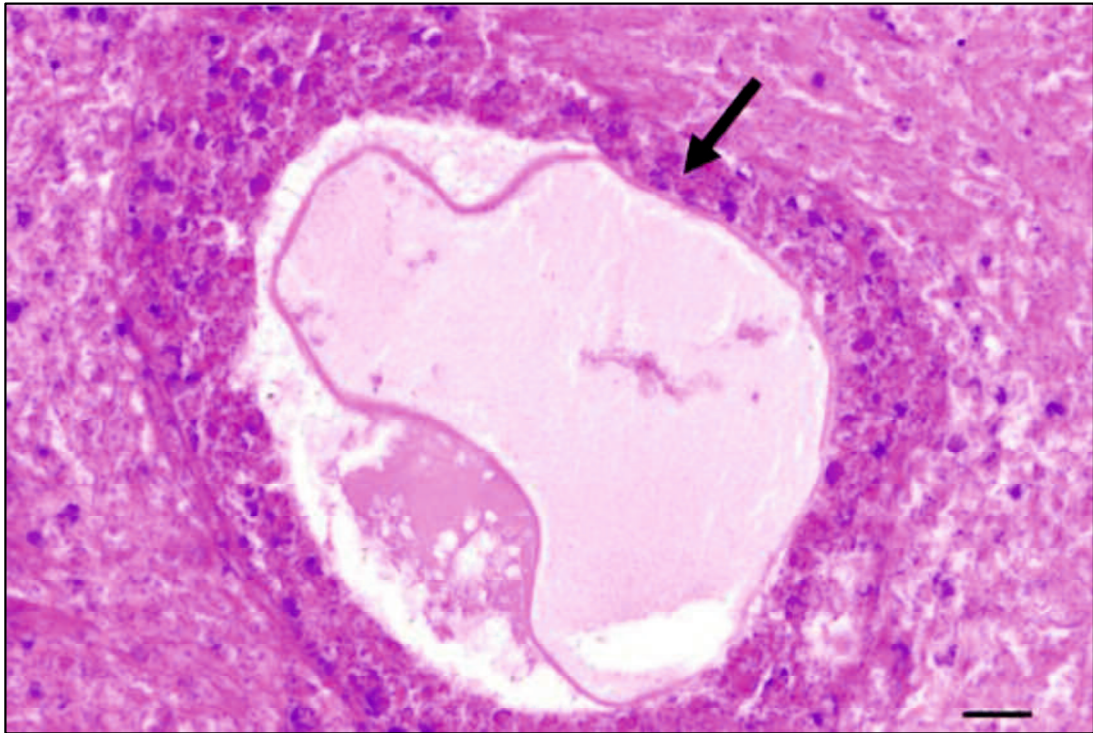


図 9. 結節の HE 染色強拡大組織写真（症例 No.3、脱灰後検索）

結節の中心部において、線維性結合組織に埋没するように好酸性の層状構造物として角皮層（黒矢印）が認められる（Bar = 20 μm ）。

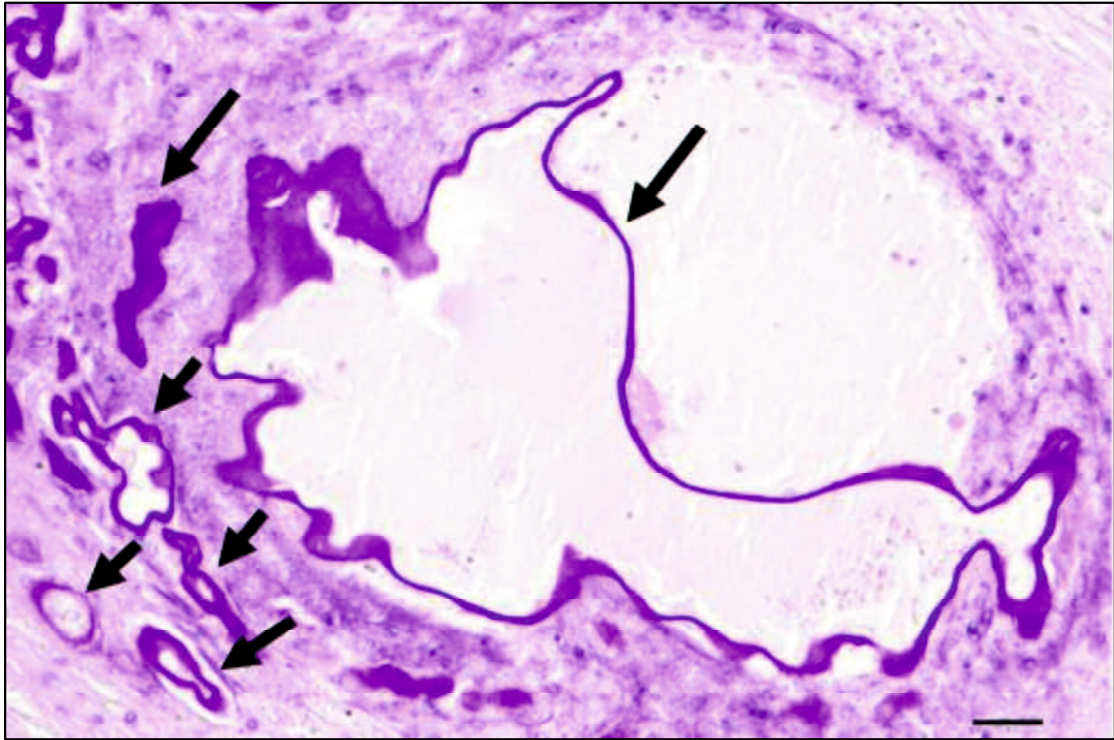


図 10. 結節の PAS 染色組織写真 (症例 No.3、脱灰後検索)

結節の中心部において、PAS 染色陽性の角皮層 (黒矢印) が多数認められる (Bar = 20 μ m)。

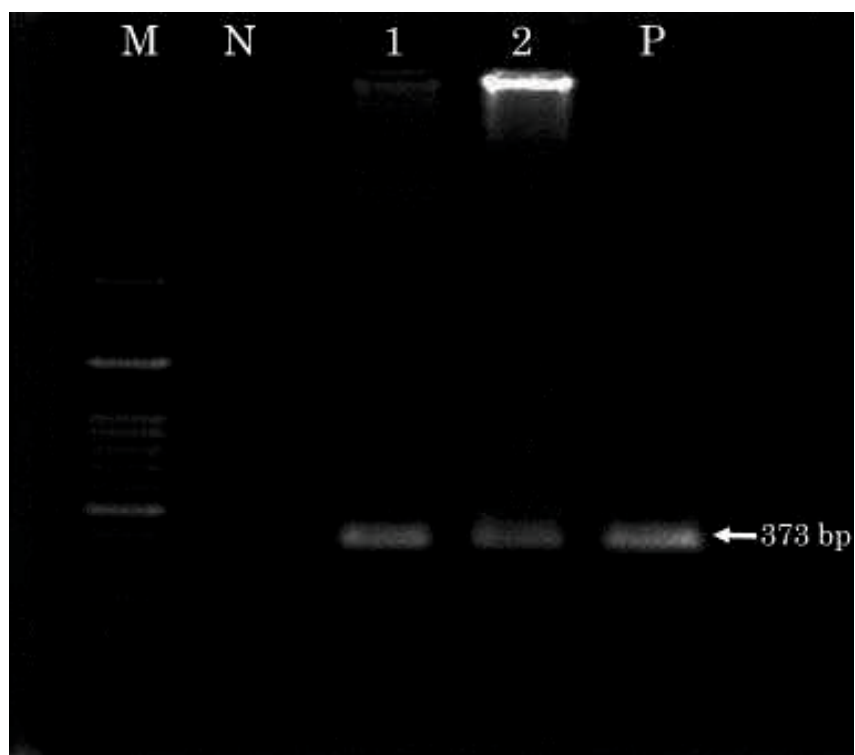


図 11. 多包虫症と診断された症例の多包条虫の

ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子を標的とする PCR

M: DNA マーカー、 N: 陰性対照 (滅菌 Milli-Q 水)、 1: 症例 No.3、

2: 症例 No.4、 P: 陽性対照 (多包条虫北海道根室株)

表3 各PCRにおいて使用したプライマー

標的遺伝子	塩基配列	PCR産物(塩基)
12S rRNA	Forward: 5'-TTAAGATATATGTGGTACAGGATTAGATACCC-3'	373 bp
	Reverse: 5'-AACCGAGGGTGACGGGCGGTGTGTACC-3'	
<i>cob</i>	Forward: 5'-TGCGTTATTGGCATATGGTAG-3'	693 bp
	Reverse: 5'-GTGCCACCCTCAGTTACT-3'	
<i>cox1</i>	Reverse: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3'	446 bp
	Reverse: 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'	

表4 多包虫症と診断されたカナダからの輸入馬10頭の情報

症例No.	性別	年齢 ^a	結節の大きさ ^b (mm)	病理組織学的検査	12S rRNA PCR
1	雌	5	8	—	+
2	去勢雄	2	2	—	+
3	去勢雄	7	8	+	+
4	去勢雄	2	6	+	+
5	去勢雄	4	4	—	+
6	去勢雄	3	10	—	+
7	雌	8	4	—	+
8	去勢雄	3	13	+	+
9	去勢雄	3	1	—	+
10	雌	6	7	+	+

^a 各馬の年齢に関する情報はと畜検査申請書から得た。

^b 結節の大きさは直径の長さである。

第3章：馬の肝臓結節を用いた LAMP 法による多包条虫の mitochondrial

cytochrome b (*cob*) 遺伝子の簡便かつ迅速な検出方法の開発

1. 緒言

多包条虫は北アメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの北半球に広く分布しており、多包条虫の幼虫寄生による多包虫症は人獣共通感染症である[4、19]。多包条虫は終宿主であるキツネ、犬、コヨーテなどの犬科動物、中間宿主である野ネズミとの間に生活環が形成されている[2]。馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり、終宿主動物から糞便内に排泄された多包条虫卵の経口摂取により感染し、幼虫である多包虫が肝臓に寄生して病変を形成する[14、16]。これまでに馬の多包虫症に関する報告[14]において、診断は病理組織学的検査および PCR によって行われているが、双方の結果に相違があり、PCR は時間がかかり、手技が煩雑であることも問題点であった。そのため、従来の病理組織学的検査や PCR と同等の精度があり、簡便かつ迅速な新しい診断方法が確立できた場合、食肉検査における馬の多包虫症の摘発に有用である。

Loop - mediated isothermal amplification (LAMP) 法は高感度な核酸増幅方法であり、コンベンショナル PCR と比較し、より短時間に、より簡便な操作で実施できる[22]。LAMP 法では、4 種類のプライマーと 2 種類のループプライ

マーの計 6 種類のプライマーを使用し、等温条件下で 1 時間またはそれよりも短い時間で標的遺伝子を増幅させる[22]。LAMP 法は、様々なウイルス[25]、細菌[15]、原虫[3]、寄生虫[26]などの病原体の検出に活用されている。多包条虫の遺伝子を検出することを目的とした LAMP 法として、多包条虫の mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子[7]や NADH dehydrogenase subunit 5 (*nad5*) 遺伝子[21]を標的とする LAMP 法が報告されている。また、これらの報告[7、21]はキツネや犬などの終宿主の糞便を用いた LAMP 法であり、馬の肝臓結節を用いた LAMP 法は報告されていない。

そこで、本章では、馬の肝臓結節を用いた多包条虫の mitochondrial cytochrome b (*cob*) 遺伝子を標的とする LAMP 法の確立を行い、病理組織学的検査と PCR の結果とを比較し、LAMP 法の有用性について評価した。また、段階希釈した検体やプラスミドを用い、LAMP 法での検出限界濃度および遺伝子コピー数の算出を試みた。

2. 材料と方法

(1) 症例の概要

第 2 章で用いたカナダから輸入された馬の肝臓の灰白色硬結節のうち、41 頭

の結節を使用した。症例の内訳は、病理組織学的検査および Gesy ら報告[13]に基づいた *cob* 遺伝子を標的とする PCR を実施し、病理組織学的検査で角皮層がみられ、かつ PCR 陽性である症例が 4 頭、病理組織学的検査で角皮層はみられなかったが、PCR 陽性である症例が 7 頭、病理組織学的検査で角皮層がみられたが、PCR 陰性である症例が 10 頭、病理組織学的検査で角皮層がみられず、かつ PCR 陰性である症例が 20 頭であった。「病理組織学的検査で角皮層がみられ、PCR で多包条虫の遺伝子が検出された症例、または病理組織学的検査で角皮層が認められなかったが、PCR で多包条虫遺伝子が検出された症例」を多包虫症とし、11 頭を多包虫症と診断した。

(2) LAMP 法に用いるプライマーの設計および条件検討

LAMP 法に用いるプライマー設計として、既知の多包条虫 *cob* 遺伝子 (GenBank accession No. AB461399) の塩基配列を参考に、4 本のプライマー (F3, B3, FIP, BIP) と 2 本のループプライマー (LoopF, LoopB) の計 6 本のプライマーを設計した (ニッポンジーン株式会社、富山)。LAMP 法に使用したプライマーは表 5 に示す。LAMP 法の反応液は、DNA 溶液 1.0 μ l にプライマー混合液 (0.2 μ M の F3 および B3 プライマー、1.6 μ M の FIP および BIP プライマー、0.8 μ M の LoopF および LoopB プライマーを含む) 1.3 μ l、Isothermal

Master Mix (OptiGene, イギリス) 15.0 μ l、滅菌 Milli-Q 水 7.7 μ l を加え、全量を 25.0 μ l とした。

LAMP 法の条件検討として、多包条虫北海道根室株の原頭節から抽出した DNA の段階希釈検体 (濃度: 5.27×10^4 pg/ μ l \sim 5.27×10^{-2} pg/ μ l) を陽性対照、滅菌 Milli-Q 水を陰性対照として用いた。LAMP 法の反応は、等温増幅蛍光測定装置 Genelyzer F II (キャノンメディカルシステムズ株式会社, 栃木) により行った。増幅はそれぞれ 60 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、63 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C で 30 分間行い、その後、アニーリングとして 98 $^{\circ}$ C から 80 $^{\circ}$ C になるまで 6 分間反応させ、至適条件を決定した。

(3) 多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とするコンベンショナル PCR

Gesy らの報告[13]に従い、多包条虫の原頭節から抽出した DNA の段階希釈検体を用いて多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする PCR を実施した。使用したプライマーは表 6 に示す。PCR の反応液は、いずれも DNA 溶液 1.0 μ l に 2 \times Gflex PCR buffer (タカラバイオ株式会社、滋賀) 6.25 μ l、10pM の各プライマー 0.15 μ l、PCR 用酵素 (Tks Gflex DNA polymerase, タカラバイオ株式会社) 0.15 μ l (1.25 U/ μ l) を加え、滅菌 Milli-Q 水 4.8 μ l を加えて全量を 12.5 μ l とした。PCR により得られた増幅産物は TA クローニングに供した。

(4) TA クローニング

多包条虫の *cob* 遺伝子の PCR 増幅産物を T-Vector pMD20 (タカラバイオ株式会社) ヘライゲーション後、大腸菌コンピテントセル (DH5 α) に形質転換した。培養後、QIAGEN Plasmid Mini kit (QIAGEN, ドイツ) を用い、製品のプロトコールに従ってプラスミドの精製を行った。

(5) 馬の肝臓結節を用いた LAMP 法および検出限界遺伝子コピー数の算出

確立した条件に従い、41 頭の結節から抽出した DNA を用いて LAMP 法を実施した。また、作製したプラスミドを段階希釈した検体 (4.99×10^5 pg/ μ l ~ 4.99×10^{-7} pg/ μ l) を用いて LAMP 法を実施し、検出限界濃度を決定し、検出限界遺伝子コピー数を算出した。1 μ l あたりの遺伝子コピー数は (アボガドロ数 $6.023 \times 10^{23} \div$ プラスミドの分子量) $\times 10^{-12} \times$ プラスミドの濃度 (pg/ μ l)、により求めた。

3. 成績

(1) LAMP 法の条件決定

多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いた *cob* 遺伝子を標的とした PCR では DNA 濃度が 0.527 pg/ μ l の検体まで陽性であった。一方、LAMP 法では、

増幅に要した時間やアニーリング温度を考慮し、64°C30分間での増幅が最も良い条件であった。この条件下で、LAMP法ではDNA濃度が5.27 pg/ μ lの検体まで検出可能であった。条件検討を行った際のPCRの結果は図12、LAMP法の結果は図13に示す。

(2) 馬の肝臓結節を用いたLAMP法

確立した条件の下、41頭の結節から抽出したDNAを用いてLAMP法を実施した。病理組織学的検査で角皮層がみられ、かつPCR陽性である4頭および病理組織学的検査で角皮層はみられなかったが、PCR陽性である7頭の多包虫症と診断された計11頭において、LAMP法は陽性であった。また、病理組織学的検査で角皮層がみられたが、PCR陰性である10頭および病理組織学的検査で角皮層がみられず、かつPCR陰性である20頭の計30頭において、LAMP法は陰性であった。以上の結果から、病理組織学的検査およびPCRの結果とLAMP法の結果は100%一致していた。馬の肝臓結節を用いたLAMP法の写真を図14に示す。また、病理組織学的検査およびPCRの結果とLAMP法の結果との比較を表7に示す。

(3) プラスミド検体を用いたLAMP法による検出限界遺伝子数の算出

作製したプラスミド検体を段階希釈した検体のLAMP法を実施した結果、検

出限界濃度は 4.99×10^{-4} pg/ μ l であった。この結果から、検出限界の遺伝子コピー数は 135 コピー/ μ l であった。プラスミド検体を用いた LAMP 法の写真は図 15 に示す。

4. 考察

これまでに犬などの終宿主の糞便を用いて多包条虫の *cox1* 遺伝子[7]や *nad5* 遺伝子[21]を標的とした LAMP 法が報告されているが、馬の多包虫症の検出を目的とした LAMP 法は報告されていない。本研究は馬の肝臓結節を用いた多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法が確立された初めての報告である。本研究で設計したプライマーについて、他のエキノコックス属や他の寄生虫に対する交差性については確認していないが、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて標的遺伝子の塩基配列との相同性を確認したところ、相同性が高い塩基配列は確認されなかった。今後、近縁種を含めた寄生虫の DNA サンプルを用いてさらなる検討が必要である。

これまでに馬の多包虫症の診断は病理組織学的検査およびコンベンショナル PCR の結果に基づいて行われてきた[14]。しかし、これらの検査方法は時間を要し、手技が煩雑で、さらに双方の結果に相違があることが難点であった[14]。

そこで、従来の病理組織学的検査および多包条虫の *cob* 遺伝子 PCR の結果と LAMP 法による結果を比較したところ、双方の結果は 100%一致した。したがって、本研究で確立した LAMP 法は従来の病理組織学的検査や PCR と同等の精度を有していることが考えられた。

検出限界濃度について多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いて検討したところ、コンベンショナル PCR の方が LAMP 法と比較して低い濃度で検出された。この結果から、検出感度の面ではコンベンショナル PCR の方が LAMP 法より優れていた。しかし、LAMP 法はコンベンショナル PCR と比較してより短時間に、より簡便な操作で実施できるため、スクリーニング検査などの簡易検査の用途として有用である。また、プラスミド検体を用いた多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法により、1 μ l 中に遺伝子が最低 135 コピー存在すれば、多包虫の検出が可能であることが明らかになった。

結論として、本研究により馬の肝臓結節を用いた多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法を確立した。本研究で確立した LAMP 法は従来の病理組織学的検査やコンベンショナル PCR による診断結果と完全に一致し、これらの検査と同等の精度を有していることが示唆された。本研究で確立した多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法は、特に多包虫症の流行地での馬の食肉検査

において PCR に代わる簡便かつ迅速で有用な診断方法となり得る。

5. 小括

本研究では、馬の食肉検査での簡便かつ迅速な多包虫症の検出を目的とし、多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法の確立を行った。多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いて条件検討を行った結果、64°C30 分での増幅が最適な条件であった。その後、馬の肝臓結節から抽出した DNA を用いて LAMP 法を実施した結果、従来の病理組織学的検査およびコンベンショナル PCR の結果と完全に一致した。また、段階希釈したプラスミド検体を用いて LAMP 法を実施した結果、検出限界の遺伝子コピー数は 135 コピー/μl であることが明らかになった。本研究で確立した LAMP 法は従来の病理組織学的検査および PCR とほぼ同等の精度を有しており、特に多包虫症の流行地での馬の食肉検査において PCR に代わる簡便かつ迅速で有用な診断方法として期待される。

6. 図表



図 12. 多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いた PCR

PCR での検出限界濃度は $0.527 \text{ pg}/\mu\text{l}$ であった。

M: DNA マーカー、 N: 陰性対照 (滅菌 Milli-Q 水)、

1: $5.27 \times 10^4 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 2: $5.27 \times 10^3 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 3: $5.27 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 4: $5.27 \times 10^1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、

5: $5.27 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 6: $5.27 \times 10^{-1} \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 7: $5.27 \times 10^{-2} \text{ pg}/\mu\text{l}$

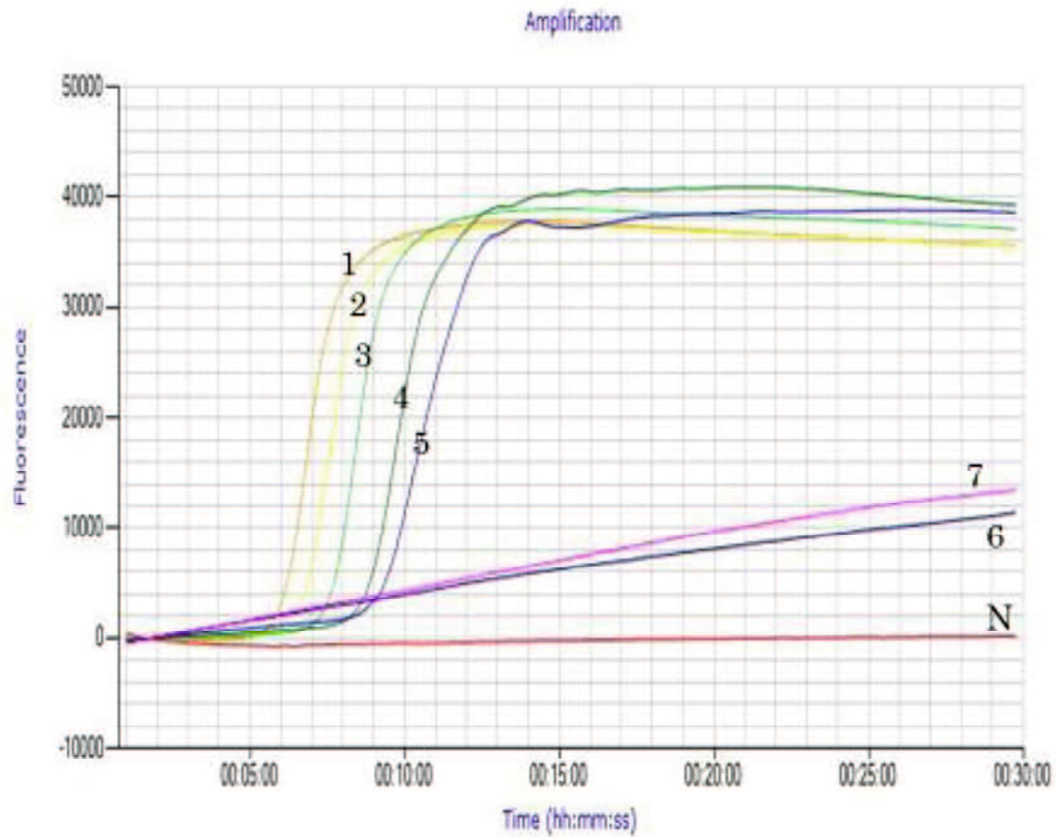


図 13. 多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いた LAMP 法

LAMP 法での検出限界濃度は $5.27 \text{ pg}/\mu\text{l}$ であった。

M: DNA マーカー、 N: 陰性対照 (滅菌 Milli-Q 水)、

1: $5.27 \times 10^4 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 2: $5.27 \times 10^3 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 3: $5.27 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 4: $5.27 \times 10^1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、

5: $5.27 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 6: $5.27 \times 10^{-1} \text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 7: $5.27 \times 10^{-2} \text{ pg}/\mu\text{l}$

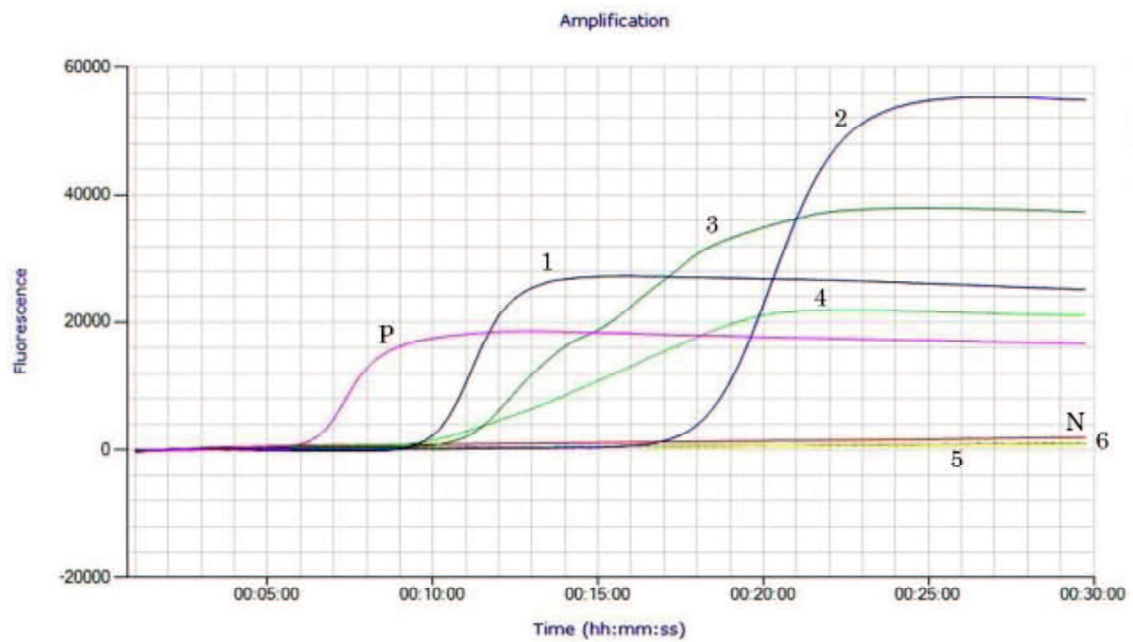


図 14. 馬の肝臓結節を用いた LAMP 法

LAMP 法での結果は従来の病理組織学的検査および PCR の結果と一致していた。

P: 陽性対照 (多包条虫北海道根室株)、N: 陰性対照 (滅菌 Milli-Q 水)

1, 2: 病理組織学的検査で角皮層がみられ、PCR 陽性である症例

3, 4: 病理組織学的検査で角皮層はみられないが、PCR 陽性である症例

5: 病理組織学的検査で角皮層がみられるが、PCR 陰性である症例

6: 病理組織検査で角皮層はみられず、PCR 陰性である症例

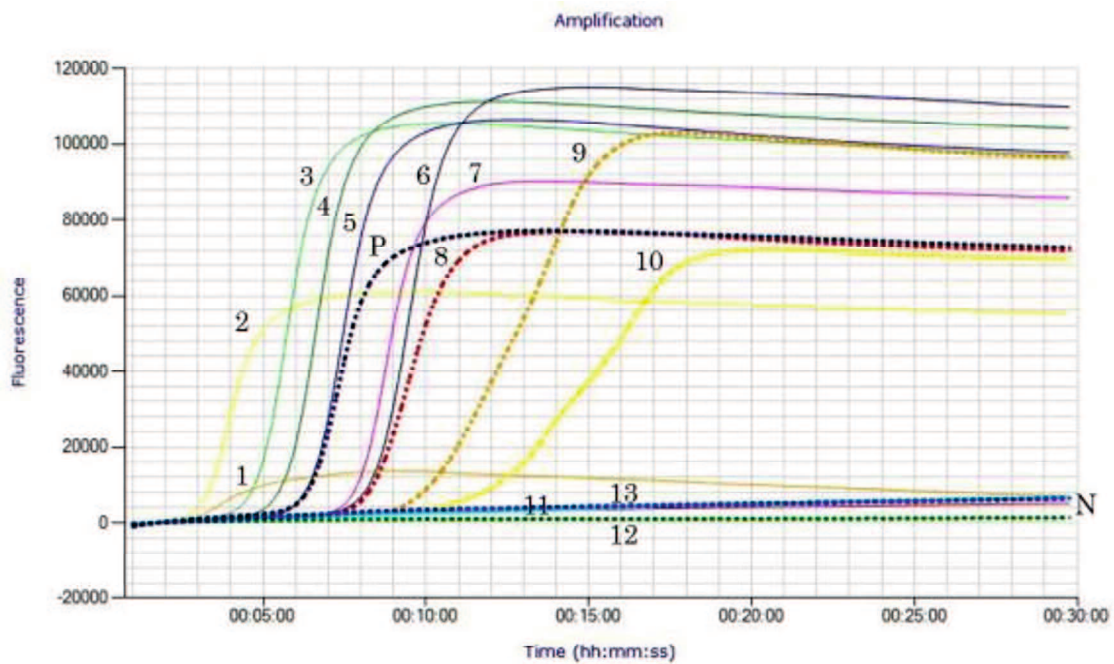


図 15.プラスミド検体を用いた LAMP 法

プラスミド検体を用いた LAMP 法での検出限界濃度は 4.994×10^{-4} pg/ μ l であつた。

N: 陰性対照 (滅菌 Milli-Q 水)、P: 陽性対照 (多包条虫根室株)

1: 4.99×10^5 pg/ μ l、 2: 4.99×10^4 pg/ μ l、 3: 4.99×10^3 pg/ μ l、

4: 4.99×10^2 pg/ μ l、 5: 4.99×10^1 pg/ μ l、 6: 4.99 pg/ μ l、 7: 4.99×10^{-1} pg/ μ l、

8: 4.99×10^{-2} pg/ μ l、 9: 4.99×10^{-3} pg/ μ l、 10: 4.99×10^{-4} pg/ μ l、

11: 4.99×10^{-5} pg/ μ l、 12: 4.99×10^{-6} pg/ μ l、 13: 4.99×10^{-7} pg/ μ l、

表5 多包条虫の*cob*遺伝子を標的とするLAMP法に使用したプライマー

プライマー	塩基配列
F3	5'-AGGGTGTTTGGAATGTTGG-3'
B3	5'-ATGAACCGATAACACACGAA-3'
FIP	5'-TTGAAGTAAGGACAGTGGCAGCGTTATGGGTGAGGCTTTACT-3'
BIP	5'-TGCCGTTGGTTGGTTCTATGGTCAATGTTAACACCCGACAC-3'
LoopF	5'-AAGACATCTGACGCCAAGG-3'
LoopB	5'-GTATGTGGTTGGTGGATTTTCG-3'

表6 多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とするPCRに使用したプライマー

プライマー	塩基配列	PCR産物 (塩基)
Forward	5'-TGCGTTATTGGCATATGGTAG-3'	693 bp
Reverse	5'-GTGCCACCCTCAGTTACT-3'	

表7 病理組織学的検査およびPCRの結果とLAMP法の結果の比較

	LAMP法(+)	LAMP法(-)	合計
病理(+)/PCR(+) (n=4)	4	0	4
病理(-)/PCR(+) (n=7)	7	0	7
病理(+)/PCR(-) (n=10)	0	10	10
病理(-)/PCR(-) (n=20)	0	20	20
合計	11	30	41

結論

本研究では、日本産の様々な品種の馬およびカナダから輸入された馬における多包虫感染の実態を明らかにすること、また馬の食肉検査の現場で使用可能な LAMP 法を用いた多包条虫遺伝子の簡便かつ迅速な検出方法の確立を目的とした。

第 1 章では、日本産の様々な品種の馬における多包虫感染を明らかにするために、福岡県のと畜場に搬入された日本産の様々な品種の馬にみられた肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査を実施した。その結果、これまでに報告がある軽種馬以外にも、ポニー種、日本輓系種、北海道和種など様々な品種の馬で多包虫感染が認められた。飼養歴等から、北海道で多包虫に感染した可能性が推察された。

第 2 章では、カナダから輸入された馬における多包虫感染を明らかにするために、熊本県のと畜場に搬入されたカナダから輸入された馬の肝臓の灰白色硬結節を用いて病理組織学的検査および遺伝子検査を実施した。その結果、肝臓灰白色硬結節がみられた馬 150 頭中 10 頭を多包虫症と診断した。また、多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする PCR から得られた増幅産物の塩基配列はオーストリアで分離されたヨーロッパ型（ハプロタイプ E1）の多包条虫遺伝子と 99～

100%の相同性であった。日本とカナダに分布する多包条虫の遺伝子型を考慮すると、感染地は日本よりもカナダである可能性が高いことが示唆された。

第3章では、馬の食肉検査での簡便かつ迅速な多包虫症の検出を目的とし、多包条虫の *cob* 遺伝子を標的とする LAMP 法の確立を行った。多包条虫の原頭節から抽出した DNA を用いて条件検討を行った結果、64°C30 分での増幅が最適な条件であった。その後、馬の肝臓結節から抽出した DNA を用いて LAMP 法を実施した結果、従来の病理組織学的検査およびコンベンショナル PCR の結果と完全に一致した。また、段階希釈したプラスミド検体を用いて LAMP 法を実施した結果、検出限界遺伝子コピー数は 135 コピー/μl であることが明らかになった。本研究で確立した LAMP 法は従来の病理組織学的検査および PCR とほぼ同等の精度を有しており、特に多包虫症の流行地での馬の食肉検査において PCR に代わる簡便かつ迅速で有用な診断方法となり得る。

以上の結果から、本研究で得られた知見は食肉検査などの公衆衛生行政への貢献が期待できると考える。

謝辞

本稿を終えるに臨み、御指導と御校閲をいただいた鹿児島大学共同獣医学部病態予防獣医学講座組織病理学分野の三好宣彰教授に謹んで深甚なる謝意を表します。

実験の遂行にあたり材料を分与してくださった国立感染症研究所寄生動物部の森嶋康之主任研究官、北海道立衛生研究所感染症部医動物グループの孝口裕一主査に深謝いたします。

実験の遂行にあたり材料の採材にご協力いただいた福岡県食肉衛生検査所および熊本県食肉衛生検査所の皆様に深謝いたします。

引用文献

1. Bowles, J., Blair, D., and McManus, D.P. 1992. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54:165–173.
2. Catalano, S., Lejeune, M., Liccioli, S., Verocai, G.G., Gesy, K.M., Jenkins, E.J., Kutz, S.J., Fuentealba, C., Duignan, P.J. and Massolo, A. 2012. *Echinococcus multilocularis* in urban coyotes, Alberta, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1625–1628.
3. Chua, A.P.B., Galay, R.L., Tanaka, T. and Yamazaki, W. 2020. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay Targeting the Citrate Synthase Gene for Detection of *Ehrlichia canis* in Dogs. *Vet. Sci.* 7: E156.
4. Deplazes, P and Eckert, J. 2001. Veterinary aspects of alveolar echinococcosis — a zoonosis of public health significance. *Vet. Parasitol.* 98: 65–87.
5. Dinkel, A., von Nickisch-Rosenegk, M., Bilger, B., Merli, M., Lucius, R. and Romig, T. 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the

- definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy.
J. Clin. Microbiol. 36: 1871-1876.
6. Echinococcosis in Japan, 1999-2018 [homepage on the Internet].
Infectious Agents Surveillance Report Vol. 40 p33-34.
<https://www.niid.go.jp/niid/en/iasr-vol33-e/865-iasr/8695-469te.html>
 7. Feng, K., Li, W., Guo, Z., Duo, H., Fu, Y., Shen, X., Tie, C., E, R., Xiao, C., Luo, Y., Qi, G., Ni, M., Ma, Q., Yamazaki, W., Yoshida, A., Horii, Y., Yagi, K. and Nonaka, N. 2017. Development of LAMP assays for the molecular detection of taeniid infection in canine in Tibetan rural area.
J Vet Med Sci. 79: 1986-1993.
 8. 農林水産省生産局畜産部畜産振興課編纂, 馬関係資料平成 25 年度版,
<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/pdf/25uma-total.pdf>
 9. 農林水産省生産局畜産部畜産振興課編纂, 馬関係資料平成 29 年度版,
<https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/attach/pdf/sonota-25.pdf>
 10. 農林水産省生産局畜産部畜産振興課編纂, 馬関係資料令和 2 年度版,
<https://www.bajikyo.or.jp/pdf/31kankeisiryoku.pdf>

11. Gesy, K., Hill, J.E., Schwantje, H., Liccioli, S. and Jenkins, E.J. 2013. Establishment of a European-type strain of *Echinococcus multilocularis* in Canadian wildlife. *Parasitology*. 140: 1133–1137.
12. Gesy, K. M., Schurer, J. M., Massolo, A., Liccioli, S., Elkin, B.T., Alisauskas, R. and Jenkins, E.J. 2014. Unexpected diversity of the cestode *Echinococcus multilocularis* in wildlife in Canada. *Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl.* 3: 81-87.
13. Gesy, K.M. and Jenkins, E.J. 2015. Introduced and Native Haplotypes of *Echinococcus multilocularis* in Wildlife in Saskatchewan, Canada. *J. Wildl. Dis.* 51: 743–748.
14. Goto, Y., Sato, K., Yahagi, K., Komatsu, O., Hoshina, H., Abiko, C., Yamasaki, H. and Kawanaka M. 2010. Frequent isolation of *Echinococcus multilocularis* from the livers of racehorses slaughtered in Yamagata, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 449-451.
15. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis*

- complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2616-22.
16. Kaji, Y., Taniyama, H., Matsukawa, K., Okada, H., Tsunoda, S., Tagami, M. and Akita, H. 1993. First incidence of multilocular echinococcosis in a race horse in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 869-870.
 17. 神谷正男: エキノコックス症の危機管理へ向けて - 現状と対策 -, *日獣会誌*, 57, 605-611 (2004).
 18. Massolo, A., Liccioli, S., Budke, C. and Klein, C. 2014. *Echinococcus multilocularis* in North America: the great unknown. *Parasite.* 21:73.
 19. Moro, P. and Schantz, P.M. 2009. Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 13:125–133.
 20. Nakao, M., Xiao, N., Okamoto, M., Yanagida, T., Sako, Y. and Ito, A. 2009. Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Int.* 58: 384–389.
 21. Ni, X., McManus, D.P, Yan, H., Yang, J., Lou, Z., Li, H., Li, L., Lei, M., Cai, J., Fan, Y., Li, C., Liu, Q., Shi, W., Liu, X., Zheng, Y., Fu, B., Yang, Y. and Jia, W. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

- assay for the identification of *Echinococcus multilocularis* infections in canine definitive hosts. *Parasit. Vectors.* 7: 254.
22. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 28: E63.
 23. 沖博憲: 馬の年齢の数え方, 馬の医学書, 日本中央競馬会競走馬総合研究所編, 第1版, 33, 緑書房, 東京 (2004).
 24. Peregrine, A.S., Jenkins, E.J., Barnes, B., Johnson, S., Polley, L., Barker, I.K., De Wolf, B. and Gottstein, B. 2012. Alveolar hydatid disease (*Echinococcus multilocularis*) in the liver of a Canadian dog in British Columbia, a newly endemic region. *Can. Vet. J.* 53: 870–874.
 25. Poon, L.L., Leung, C.S., Chan, K.H., Lee, J.H., Yuen, K.Y., Guan, Y. and Peiris, J.S. 2005. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43: 427–30.

26. Salant, H., Abbasi, I. and Hamburger, J. 2012. The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* [corrected] coprodetection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87 : 883-7.
27. Simsek, S., Roinioti, E and Eroksuz, H. 2015. First report of *Echinococcus equinus* in a donkey in Turkey. *Korean. J. Parasitol.* 53: 731–735.
28. Ueno, M., Kuroda, N., Yahagi, K., Ohtaki, T. and Kawanaka, M. 2012. Analysis of antibody responses by commercial western blot assay in horses with alveolar echinococcosis. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 813-815.