

NIBS LETTER 2006 NOVEMBER
No. 541

日生研たより

2006年(平成18年)11月号 第52巻第6号(通巻541号)

挨拶・巻頭言

飽食に続くもの……………井土俊郎(2)

獣医病理学研修会

第46回 No. 907 ブタの胸腺
……………東京大学獣医病理学教室出題(3)

第46回 No. 909 カモの脳
……………北海道大学獣医病理学教室出題(4)

レビュー

‘BACシステム’ーヘルペスウイルスの
新しい改変系……………川口寧(5)

犬回虫によるヒト内臓幼虫移行症の豚を
用いた実験感染モデルの検討
……………平健介(9)

お知らせ

学会発表演題……………(8)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所
NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE
<http://nibs.lin.go.jp/>

飽食に続くもの

井土 俊郎

最近、メタボリックシンドロームという言葉をしばしば耳にする。動脈硬化による心筋梗塞や脳卒中など死に直結する疾病を惹起する高血圧、糖尿病、肥満などの生活習慣病の前駆症候群を指すという。健康診断の結果に表れた種々の数値を、正常値を指標として見ても特に悪い項目は無いものの、忍び寄るこれら生活習慣病、それに加えて悪性腫瘍のことなど加齢と共に気になってきた。日本獣医師会雑誌の会報欄を欠かさず見るようになったのもそんなことが頭の片隅にあることによる。男性の場合、内臓脂肪蓄積に因り胴囲が85 cm以上、かつ高脂血症、高血圧症あるいは糖尿病の中2項目が該当すればメタボリックシンドロームと診断されるという。美食を求める訳ではなく、満腹感を由とする訳でもなく、少なくとも非健康的な食生活は避けることを心がけているつもりでいるが、習慣となっている今の生活が健康的なものかどうか、当事者がそれを判断することはかなり難しい。

昨年秋、青梅市と姉妹都市になっているドイツのポツパルト市から来客を受け入れ、ほぼ同年代の夫妻と8日間ほど生活を共にした。我が家とは比較も出来ないほどの邸宅に住み、余裕のある生活ぶりが羨ましい限りであったが、彼らから見た日本の食卓は非常に食材が豊富で健康的であるといっていた。彼らにとっては日本の食卓は肉類が少なくおそらく物足りないと感じたに違いないが、原型をとどめた食材が多いことからそう感じたのだろう。しかし、その言葉を、ドイツに比較して日本の食卓には、まだ健康的な食生活の基本的な要素が備わっていると聞いたのだと素直に受け止めたい。栄養学的には概算で言えばタンパク質が13%、脂肪が25%それに炭水化物が62%というのが理想的な食生活といわれている。これは1970年頃の食生活に該当するといわれるが、今は脂肪とタンパク質過多となっている。いわば生活習慣病誘導型食習慣になっていると言える。現在、日本人の平均的な成人男子の理想的なカロリー摂取量は2,000～2,200 Kcalといわれる。女性はこの10%引き程度と言われる。これは職業によって異なるが、維持エネルギーと活動エネルギーはこれで賄える量である。

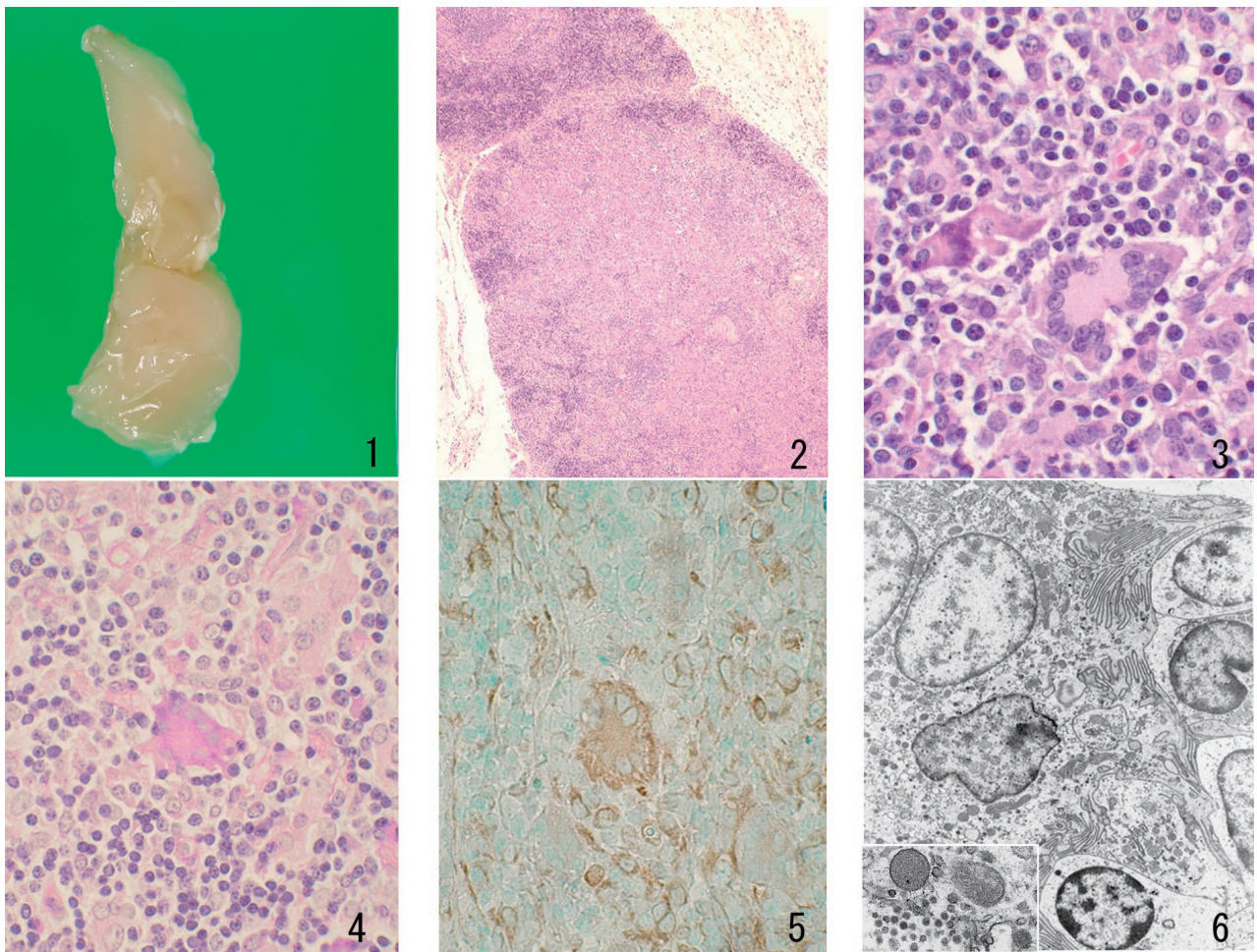
ところが1人1日当たり供給されているエネルギーは2004年度で2,562 Kcalで、かなり過剰なエネルギーが供給されている。ひたすらメタボリックシンドロームへの道を進んできたとも言える。一方で、食料自給率を見れば40%という現実のなかで、食料需給表から分かる国民1人1日当たりの供給熱量と国民栄養調査でわかる1人1日当たりの摂取熱量の差から推察される食料廃棄率は2001年で25%になるという。1995年に比較してこの率は増加している。コンビニエンスストア等における調理済み食品販売の現場を見るとこの数字に納得できるが、飽食を貪り、鮮度落ち、賞味期限切れあるいは食べ残した等の理由で大量の食品が廃棄されているという現実は、まさに食料の浪費である。4兆円以上も食料を輸入し、その中1兆円分を捨てるという莫大な経済的損失と同時に、この処分のために膨大なエネルギーを消費していることを考えると、1日も早くこの現状を改善してゆくことが求められる。

2002年の厚生労働省の糖尿病実態調査によると、糖尿病が強く疑われる者が成人の9.0%、可能性を否定できない者が10.6%いるという。飽食の結果としてこの実態が在る訳で、大量の食料を無駄にしながら病気に向かって突き進む日本の姿は如何にも病的に映る。現在、輸入している食料をすべて国産で賄うには今の耕地使用法では耕作地が更に1,200万 ha 必要になると言われるが、これは現在の耕地と合わせると国土総面積の44%に相当し、実現不可能な数字である。世界全人口を養う食料が生産できなくなる絶対的食糧不足の時代がもう目前に迫っている今、従来通り食料を輸入出来る保証は全くない。その時のショックを出来る限り小さくするためにも、またメタボリックシンドロームへのリスクを下げるためにも各個人が非健康的な飽食の生活習慣を改める時がきている。これは、医療費の削減、エネルギーの節約など多くの経済効果をも生む。美食・飽食は幸福感をもたらすが、それはまたメタボリックシンドロームへの道でもある。

(常務理事)

ブタの胸腺

東京大学獣医病理学教室出題 第46回獣医病理学研修会標本 No. 907



動物：ブタ，（父 Large Yorkshire × Dutch Landrace，母 Landrace × Large Yorkshire），雌，42日齢。

臨床事項：T-2 トキシン投与実験に用いられた対照個体（DMSO 経口投与）。実験期間中，臨床状態に変化はみられなかった。

剖検所見：胸腺の大きさは正常，固定後断面は黄白色充実性（図1）。その他の臓器に変化は認められなかった。

組織所見：皮質が著しく萎縮し（図2），髄質に多核巨細胞，類上皮細胞およびリンパ球から構成される肉芽腫性病変が広範に認められた（図3）。PAS染色では一部の多核巨細胞，類上皮細胞が陽性（図4）。Gram染色，Gomori のメセナミン銀染色およびチールネルゼン染色は陰性。免疫組織化学的検索では vimentin（図5），desmin 陽性。Lysozyme には弱陽性。電顕検索では，多核巨細胞は細胞膜嵌合により周囲の類上皮細胞と接していた（図6 Bar = 3 μm）。多核巨細胞の細胞質内には，多くの被覆小胞および顆粒が認められた（図6-Inset Bar = 1 μm）。豚サーコウイルス2型についての免疫組織化学的検索およびPCR法による検索，抗酸菌に対するPCR法による検索（16S rDNA, hsp65）のいずれも，陰性であった。

参考所見：同様の組織病変は，提出症例の腸間膜リンパ節，脾臓および腎臓においても認められ，同一実験の処置群（ $n = 3$ ），対照群（ $n = 1$ ）の他個体でも観察された。

診断：豚における胸腺皮質の萎縮を伴う肉芽腫性病変

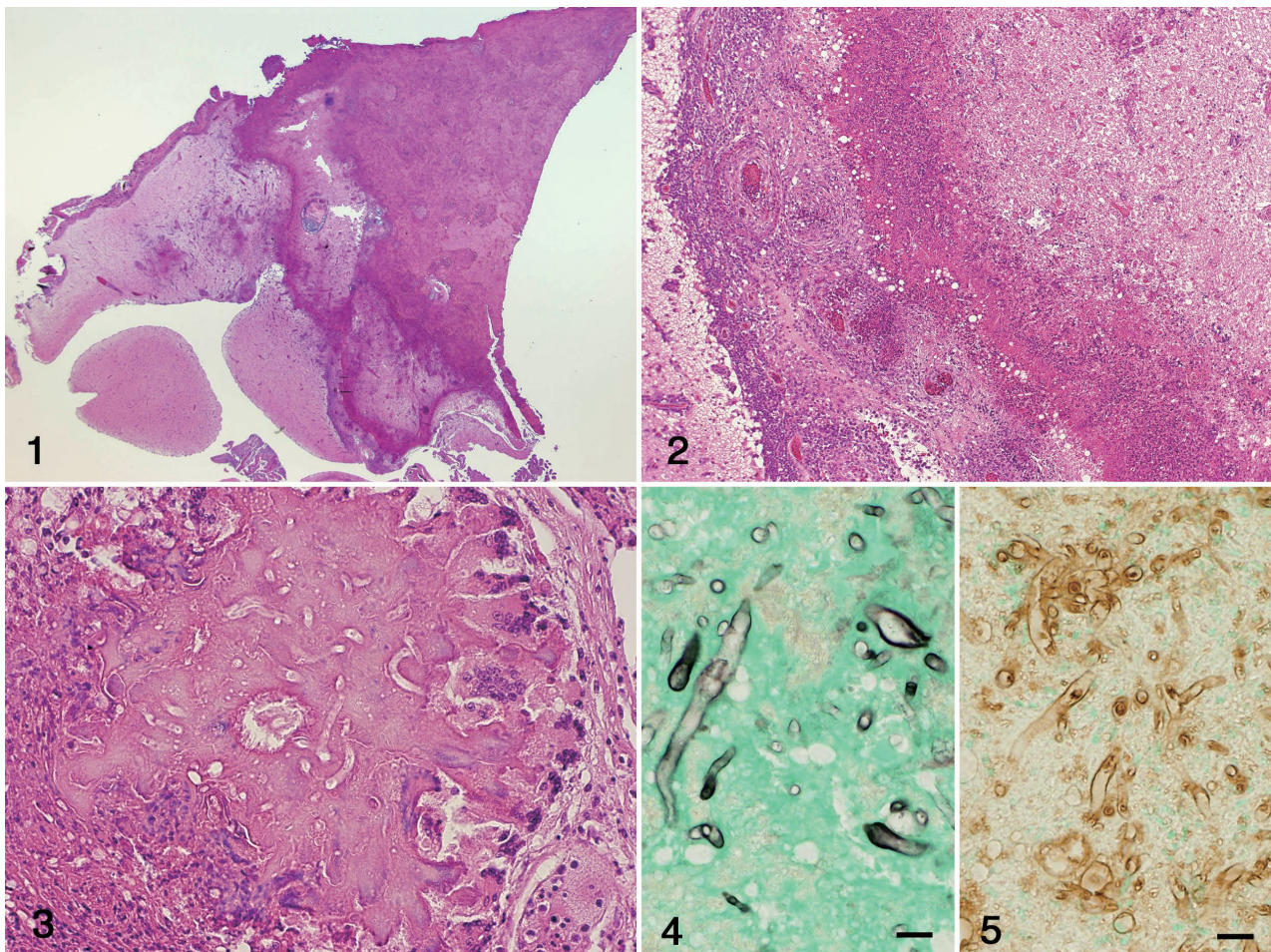
考察：本例は組織学的特徴および病変の分布から，感染症の可能性が高いと考えられた。ブタで多発性肉芽腫性病変を示す疾患として，抗酸菌症，ブルセラ病，ムコール症，離乳後多臓器性発育不良症候群（PMWS）が報告されている。しかしながら，これらの疾患に特徴的な病原体，封入体は認められなかった。また，ヒトのサルコイドーシスも多発性肉芽腫性病変を示すが，この疾患に特徴的な星状体，シャウマン小体もみられなかった。PMWSでは封入体が形成されない症例が報告されていること，抗酸菌症でも明瞭な菌体が確認されないものもあることから，PCR法を実施したがいずれも陰性であった。よって，原因不明の肉芽腫性病変であると考えた。（馬場也須子）

参考文献：

Baba, Y *et al.*, *Vet. Pathol.* in press (2006).

カモの脳

北海道大学獣医病理学教室出題 第46回獣医病理学研修会標本 No. 909



動物：トリ，カルガモ，雄，約5ヶ月齢。

臨床事項：某動物園で5月に13羽のカルガモの雛が保護され，このうち3羽が6～7月に各々肉芽腫性肺炎，肉芽腫性肺炎・胸椎炎，脳の膿瘍と内眼球炎により死亡した。アスペルギルス感染症を疑い残りのカモにイトリゾールを投与した。提出例は投薬したカモの1羽で，7月初旬に軽度の歩行異常を示し，以後動作が緩慢になった。8月下旬起立不能となったが，数日で回復した。10月再度起立不能に陥り死亡した。
 肉眼所見：左右大脳半球頭頂部概ね1/2を占める壊死が形成されていた。これに接する前頭骨表面は顆粒状に肥厚していた。剖検時には他の臓器に異常は認められなかったが，切り出しの際左右肺各々に径3mmに至る膿瘍を1個ずつ認めた。
 組織所見：大脳の頭頂部は広範にわたり壊死に陥っていた(図1)。壊死巣周囲の脳実質，髄膜にはマクロファージ，リンパ球と少数の偽好酸球が浸潤していた(図2)。壊死巣辺縁には好塩基性で，分岐，隔壁を持ち径が均一な真菌菌糸が存在し，壊死巣内には多核巨細胞を伴う肉芽腫性結節と染色性に乏しいための菌糸が認められた(図3)。また，菌糸を伴う血栓および血管炎が散見された。グロコット染色では壊死巣辺縁の菌糸は径が均一で隔壁を持つのに対し，壊死巣中央の菌糸は径が不均一で壁が薄く隔壁が不明瞭であった(図4，bar = 10 μm)。免疫染色では抗アスペルギルス抗体で壊

死巣辺縁および中央部の菌糸両者が陽性となったのに対し(図5，bar = 10 μm)，抗ムコール抗体陽性の菌糸は検出されなかった。肺の膿瘍には真菌は認められなかった。

診断：カルガモに見られた血管炎，病巣内の真菌菌糸(*Aspergillus flavus*)を伴う肉芽腫性髄膜脳炎

考察：本例は *Aspergillus* spp. の日和見感染と考えられるが，脳炎を原発巣とする例が2羽続いたため，1) 抗真菌薬長期投与による耐性菌の出現，2) 重複感染，3) *Aspergillus* spp. の性状について検討した。イトリゾールに対する最小発育阻止濃度試験では病巣から分離された *A. flavus* は用量依存性の感性を持ち通常範囲内であった。PCRでは接合菌 *Absidia corymbifera* に特異的なバンドが検出されたが，免疫染色の成績から病巣内の菌糸のほとんどは *A. flavus* で，慢性炎症に伴い菌糸の径が大きくなったと考えられた。以上の成績から，本例は *A. fumigatus* よりも呼吸器への病原性が弱い *A. flavus* が幼雛期に感染し血行性に脳に至り脳炎の再燃を繰り返したものと考えられた。(落合謙爾)

参考文献：

1. Richard, JL *et al.* *Avian. Dis.* 25 : 53-67 (1981).
2. Larone, DH. *Medical Important Fungi*, 2nd ed. Elsevier. (1987).

‘BAC システム’ – ヘルペスウイルスの新しい改変系

川口 寧

1 はじめに

ヘルペスウイルスは、エンベロープを有する大型の DNA ウイルスであり、牡蠣といった無脊椎動物からヒトのような高等な脊椎動物に至るまで幅広く分布している⁽¹⁾。現在までに 130 種類以上同定されているヘルペスウイルスは、ヒトおよび動物に、神経疾患、粘膜性疾患、皮膚疾患、腫瘍性疾患、呼吸器疾患等の様々な病態を引き起こすことより、医学および獣医学領域において重要なウイルス群である^(1,2)。一方、ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルス (HSV : herpes simplex virus) は、強い神経指向性や高い殺腫瘍能力を有することより、遺伝子治療やウイルス療法の分野で医学的利用が試みられている⁽³⁾。

ヘルペスウイルスの基礎研究や医学的利用には、ウイルスゲノム改変技術は極めて重要である。ウイルスの病原性発現機構や増殖機構の解析には、あるウイルス因子に改変を施した変異ウイルスの作製が、また、遺伝子治療ベクターの開発や改良には、病原性因子の不活化や外来遺伝子の搭載等が必須になってくる。ヘルペスウイルスの遺伝子改変法は、約四半世紀も前に確立されている。しかし、ヘルペスウイルスは巨大なウイルスゲノム (130~250 kbp) を有することより、その遺伝子操作の過程は煩雑であり、作製に長期間と熟練を要した。1997 年、ドイツの Koszinowski のグループは、ヘルペスウイルスの遺伝子操作系に画期的なブレイクスルーをもたらした⁽⁴⁾。‘BAC システム’である。彼らはマウスサイトメガロウイルス (MCMV : murine cytomegalovirus) のゲノムを BAC (bacterial artificial chromosome) にクローニングし、大腸菌に保持させた。そして、大腸菌の遺伝学を駆使してウイルスゲノムに変異を導入後、BAC クローンが大腸菌より抽出し、培養細胞に導入することによって変異ウ

イルスを再構築させることに成功した (Fig. 1)。この ‘BAC システム’ は、他のヘルペスウイルスにも応用され、現在では、ヘルペスウイルスの遺伝子操作系の主流になりつつある。本稿では、ヘルペスウイルス研究における ‘BAC システム’ について、筆者らの実際の実験データを含めて概説する。

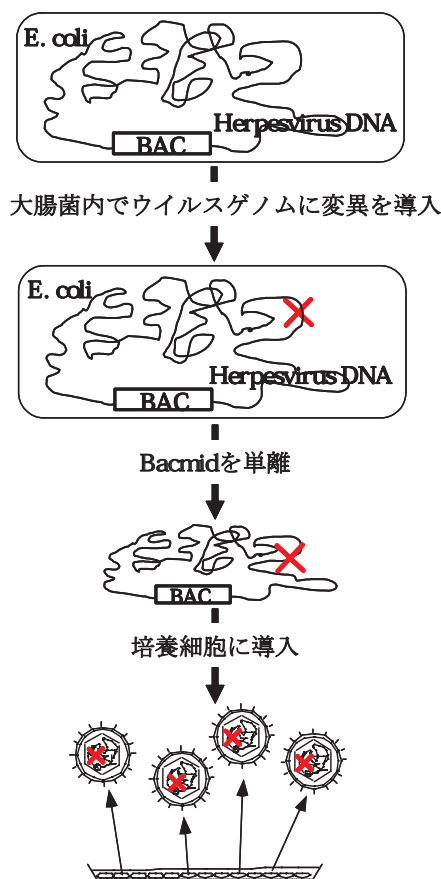


Fig. 1 BAC システム。ヘルペスウイルスゲノムを BAC にクローニングし、それを保持する大腸菌を用いる。まず、大腸菌の遺伝学を利用してウイルスゲノムに変異を導入する。その後、大腸菌より BAC クローンを抽出し、培養細胞に導入すると変異ウイルスが産生される。

2 BAC (bacterial artificial chromosome) システム

BAC は F 因子プラスミドのレプリコンに基づくクローニングベクターであり、300 kbp を超える DNA 断片のクローニングが可能である⁽⁵⁾。ヒトを

はじめとするゲノム研究に広く利用されている。F 因子のレプリコンは、大腸菌内で BAC クローンを単一コピーで保持させることを可能とする。よって、BAC クローンは大腸菌内で極めて安定に維持される。さらに、BAC クローンの改変には、大腸菌の遺伝学、つまり、大腸菌ゲノムの改変系がそのまま利用できる。大腸菌のゲノム改変系は、recombinase を利用した 'allelic exchange' やトランスポゾンを用いたランダム変異導入など、簡便かつ効率的な遺伝子改変系が開発されている (Fig. 2)。

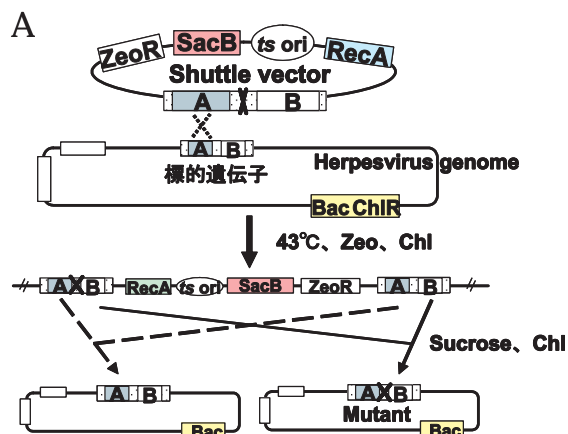


Fig. 2 大腸菌遺伝学を用いた BAC クローンへの変異導入の実例 (A) RecE 法。シャトルベクターの正の選択マーカーとしてゼオシン耐性遺伝子、負の選択マーカーとして SacB 遺伝子を用いる例 (正の選択マーカーとは、選択剤存在下ではそのマーカー遺伝子がなく大腸菌が生存しえないもので、負の選択マーカーとは、選択剤存在下ではそのマーカー遺伝子が大腸菌に致死的に働くものである)。シャトルベクターには RecA の発現カセットも挿入されている。また、BAC はクロラムフェニコール耐性遺伝子を有している。目的の変異を導入した DNA 断片 (変異両端の相同配列は 1~2 kbp が必要) をクローニングしたシャトルプラスミドを、BAC を保持する大腸菌に導入し、非許容温度 (43 °C) 下でゼオシンおよびクロラムフェニコールを含む培地で選択する。すると、ts Ori を有するシャトルプラスミドは 43 °C では複製ができないので、ゼオシン・クロラムフェニコール含有培地では BAC にシャトルベクターが組み込まれる。次に、その大腸菌を sucrose 添加培地で選択すると、SacB 遺伝子産物は致死的に働くので、SacB 遺伝子は除去される。こうして、理論上 50% の確率で目的の変異が導入された BAC を得ることができる。

3 ヘルペスウイルスゲノムの BAC へのクローニング

ヘルペスウイルスゲノムを BAC にクローニングするためには、まず、従来の培養細胞における相同組み換え法を用いて、BAC がウイルスゲノムに挿入された組み換えウイルスを作製する必要がある。BAC は約 7 kbp と大きな DNA 断片であるので、その挿入部位によってはウイルスの性状 (培養細胞での増殖や病原性) に影響を与える場合がある。つまり、BAC の挿入部位によっては、改変系の用途が

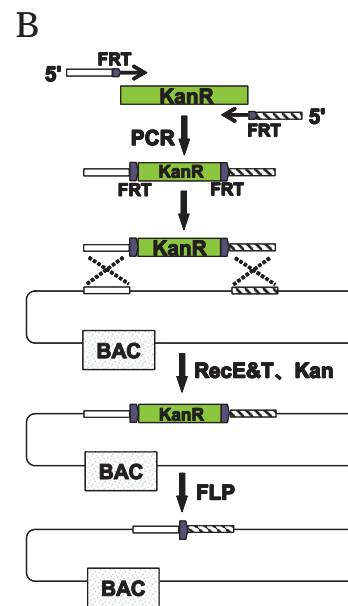


Fig. 2 大腸菌遺伝学を用いた BAC クローンへの変異導入の実例 (B) RecE/RecT 法。薬剤耐性遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子を、また、部位特異組み換え法として Flp/FRT を用いる例。まず、BAC を保持する任意の大腸菌に、RecE および RecT を誘導発現するプラスミドを導入する。目的の欠失変異の外側約 50 b (相同配列)、FRT 配列、薬剤耐性遺伝子の両端約 20 b からなるオリゴヌクレオチド対を用いて、相同配列および FRT 配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子を PCR で増幅する。増幅された直鎖状の PCR 産物を、RecE/RecT 誘導下で BAC を保持する大腸菌に導入し、カナマイシンを含む培地で選択すると、目的の領域にカナマイシン耐性遺伝子が挿入される。その後、Flp recombinase を発現する温度感受性プラスミドを大腸菌に導入し、Flp/FRT の部位特異的な組み換えによりカナマイシン耐性遺伝子を除去する。カナマイシン耐性遺伝子除去後は、大腸菌を非許容温度で培養することによって Flp 発現プラスミドを大腸菌よりの除くこともできる。

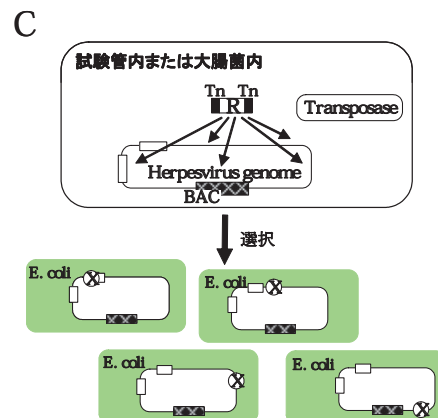


Fig. 2 大腸菌遺伝学を用いた BAC クローンへの変異導入の実例 (C) トランスポゾンを用いた変異導入法。トランスポゼース、トランスポゾン (薬剤耐性遺伝子が含まれている)、ヘルペスウイルスの BAC クローンを試験管内で反応させた後、大腸菌に導入する。すると、変異ウイルスゲノムライブラリーが構築可能である。

限定されてしまう場合がある。例えば、感染性の HSV ゲノムの BAC へのクローニングは、1999 年 Horsburgh らのグループによって報告された⁽⁶⁾。しかし、この系では、BAC を TK (thymidine kinase) 領域に挿入したことより TK の機能は破壊され、再

構築された HSV はマウス動物モデルにおける病原性を失っている。また、TK 遺伝子産物は、抗ヘルペスウイルス剤アシクロビルの標的である。増殖型の HSV を遺伝子治療ベクターとして用いる際、アシクロビルは予期せぬ事態に対する *safe guard* として有用である。Horsburgh らの系で作製された HSV ベクターにはアシクロビルという *safe guard* が有効でない。

我々は、「全ての組み換えウイルスおよび遺伝子治療ベクターは野生株に由来する」という事実を鑑み、完全長のウイルスゲノムを有し、かつ、再構築されたウイルスが野生体の性状（培養細胞での増殖や、マウス動物モデルにおける病原性）を保持する感染性 HSV ゲノムのクローニングを試みた。野生体の性状を保持した完全長の感染クローンを得ることによって、あらゆる研究に応用できる HSV 遺伝子改変系の確立が可能になる。そのために、我々は BAC を HSV UL3 および UL4 遺伝子の遺伝子間領域に挿入した (Fig. 3A)。また、BAC を loxP 配列で挟み、Cre/loxP の部位特異的組み換え系で、BAC をウイルスゲノムより除去できるように工夫した (Fig. 3A)⁽⁷⁾。HSV に外来遺伝子を搭載する際、その許容量はゲノムサイズの 10~20% であると考えられている。比較的大きな DNA 断片である BAC の除去を可能にすることによって、外来遺伝子の搭載許容量が格段に増えることが期待される。

我々は、UL3、UL4 遺伝子間領域に、loxP 配列で挟まれた BAC を挿入した組み換え HSV (YK303) を、従来の培養細胞内での相同組み換え法を利用して構築した。HSV は感染細胞中で環状の DNA になることが知られているので、YK303 感染細胞より Hirt 法で環状ウイルスゲノムを抽出し、大腸菌 DH10B に保持させた (YEbac102)。大腸菌 YEbac102 より HSV-BAC (pYEbac102) を抽出し、制限酵素切断パターンを野生体と比較したところ、同じパターンを示した (Fig. 3B)⁽⁷⁾。また、pYEbac102 を培養細胞に導入すると感染性ウイルス (YK304) が再構築された⁽⁷⁾。さらに、Cre recombinase を発現する非増殖型アデノウイルス (AxCANCre) と YK304 を培養細胞に共感染させたところ、BAC が除去されたウイルス (YK311) を容易に得ることが可能であった (Fig. 3A)⁽⁷⁾。再構築された YK304 および YK311 の性状を解析した結

果、培養細胞での増殖やマウスモデルにおける病原性は、野生体と同等であった⁽⁷⁾。以上、我々は、野生体の性状を保持する完全長の感染性 HSV ゲノムのクローニングに成功した。

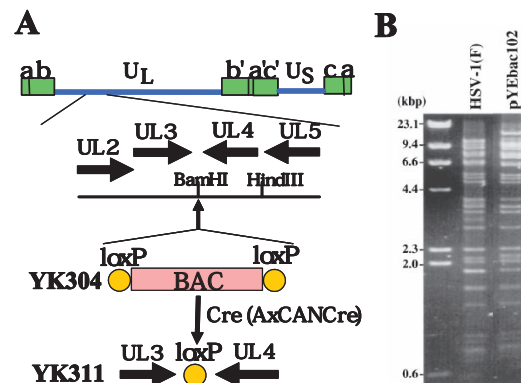


Fig. 3 ヘルペスウイルスゲノムの BAC へのクローニングの実際。(A) HSV-1 の UL3 および UL4 遺伝子間領域に loxP 配列で挟まれた BAC を挿入した。BAC は、Cre recombinase によって容易にウイルスゲノムから除去することが可能である。(B) 完全長の感染性 HSV-1 クローン (pYEbac102) と野生体ゲノムとの制限酵素 (BamHI) 切断パターンの比較。

BAC システムが様々なヘルペスウイルスに導入されているが、BAC をウイルスゲノムに挿入するために、特定のウイルス遺伝子を破壊してしまう場合が多い。また、遺伝子間領域に BAC を挿入したとしても、多くの場合、培養細胞での増殖や *in vivo* での病原性が低下する。これは、7 kbp と比較的大きな外来遺伝子である BAC の挿入によって、近隣のウイルス遺伝子の発現やウイルスゲノムの安定性、ウイルスゲノムのビリオンへのパッケージングに影響がでるためだと思われる。我々が開発した系のように、完全長のゲノムを有し、かつ、野生体の性状を保持するといった理想に近い系はほとんどなく、今後、各ヘルペスウイルスにおいて、改良が必要である。

4 おわりに

ヘルペスウイルスの基礎研究やベクター開発に、BAC システムが導入された波及効果は大きい。特に、培養細胞における増殖が著しく遅かったり、増殖が一定の条件下でしか行われないことが理由で組み換え変異ウイルスの作製が困難であったある種のヘルペスウイルス (ベーターおよびガンマヘルペスウイルス) 研究においては有効であり、今後、これらのウイルスの増殖機構・病原性発現機構の解析が急速に進むと考えられる。また、従来は熟練のヘル

ペスウイルス研究者のみが可能であったヘルペスウイルスベクターの開発が、BACシステムの導入によって著しく簡便化された。これはヘルペスウイルスベクターの普及に大きく貢献すると考えられる。

(川口 寧：東京大学医科学研究所感染症国際研究センター感染制御部門ウイルス学分野)

引用論文

1. Roizman B, Pellett PE. : The Family Herpesviridae: a brief introduction, p. 2381-2397. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A., 2001.
2. 川口 寧 (2003) ヘルペスウイルス感染症 pp203-208. 獣医微生物学第2版 見上 彪 監修 文英堂出版
3. 川口 寧: 単純ヘルペスウイルスを用いた 'human therapy' *Mebio* 21 : 24-33, 2004.
4. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. : Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 14759-63, 1997.
5. Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. : Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8794-8797, 1992.
6. Horsburgh BC, Hubinette MM, Qiang D, MacDonald ML, Tufaro F. : Allele replacement : an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther* 6 : 922-930, 1999
7. Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y. : Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1 : viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* 77 : 1382-1391, 2003.

学会発表演題

第 99 回日本繁殖生物学会

期 日：2006年9月7日～9日

開催地：愛知県名古屋市（名古屋大学）

発表演題：レトロウイルスインテグラーゼ遺伝子を利用したプラスミドのニワトリ胚への遺伝子導入

○勝俣 淳, 伊原武志, 星 澄夫, 岩田 晃 (日生研)

第 15 回日独原虫病シンポジウム

期 日：2006年9月16日～21日

開催地：北海道帯広市（帯広畜産大学）

発表演題：Splenic Interleukin-12p70 Concentration, Delayed Type Hypersensitivity, Helper T cell differentiation in C57BL/6, CBA, DBA/1, and BALB/c Mice Infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*.

○大森崇司¹, 嶋田照雅³, 松木直章², 小野憲一郎² (¹日生研, ²東京大, ³帯畜大)

第 142 回日本獣医学会学術集会

期 日：2006年9月22日～24日

開催地：山口県山口市（山口大学）

発表演題：豚の関節炎から分離された豚丹毒菌の *spaA* 遺伝子高変異領域の塩基配列分析に基づく株型別

○トーホー, 長井伸也 (日生研)

発表演題：イヌパルボウイルスに対するイヌ化抗体の作製

○山元 哲¹, 藤野美由紀¹, 清水輝夫², 細川朋子¹, 勝俣 淳¹, 加納 壘², 長谷川篤彦², 岩田 晃¹ (¹日生研, ²日本大)

発表演題：鶏の実験的アミロイド症の病理学的解析

○平井卓哉, 布谷鉄夫, 永野哲司 (日生研)

4th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields

期 日：2006年10月16日～20日

開催地：Crete, Greece

発表演題：Effects of 50 Hz circularly polarized magnetic fields on chemically induced lymphoma/leukemia in CD-1 mice.

S. Imai¹, I. Nishimura¹, K. Shibuya², M. Itabashi², T. Negishi¹ (¹Central Research Institute of Electric Power Industry, ²Nippon Institute for Biological Science)

犬回虫によるヒト内臓幼虫移行症の豚を用いた 実験感染モデルの検討

平 健介

はじめに

犬回虫 *Toxocara canis* は犬科動物を終宿主とし、世界に広く分布する線虫で、哺乳類、鳥類、貧毛類等を待機宿主とすることが知られている。ヒトが感染すると、成虫には発育しないが、幼虫が諸臓器を移行することによる犬回虫幼虫移行症をひき起こすため、本虫は重要な人獣共通寄生虫として認識されている。本稿では犬回虫とその生活環、犬回虫幼虫移行症の病型と感染経路について概説し、筆者がデンマーク王立獣医農業大学・寄生虫病研究センターにて実施した、犬回虫によるヒト内臓幼虫移行症のモデルとしての豚を用いた感染実験の成績について紹介する。

犬回虫

成虫は主としてイヌとキツネの十二指腸に寄生する。体色は半透明から乳白色で、体長は雄40–100 mm、雌60–180 mmであり、頭部に3個の発達した口唇を、頸部に一対の槍状の頸翼をもつ。虫卵は長径70–90 μm 、短径60–80 μm で、厚い蛋白膜があり、表面は起伏があり平滑でない。新鮮便内の虫卵は未分割の単細胞卵で、適切な環境下では2–4週で卵内に体長350–450 μm の感染子虫(L3)を認め、感染性を持つようになる。成熟卵は抵抗性が強く、長期間感染力を維持する。

生活環

犬回虫の生活環は複雑であるが、成熟卵または幼虫のいずれかが終宿主に感染することにより成立す

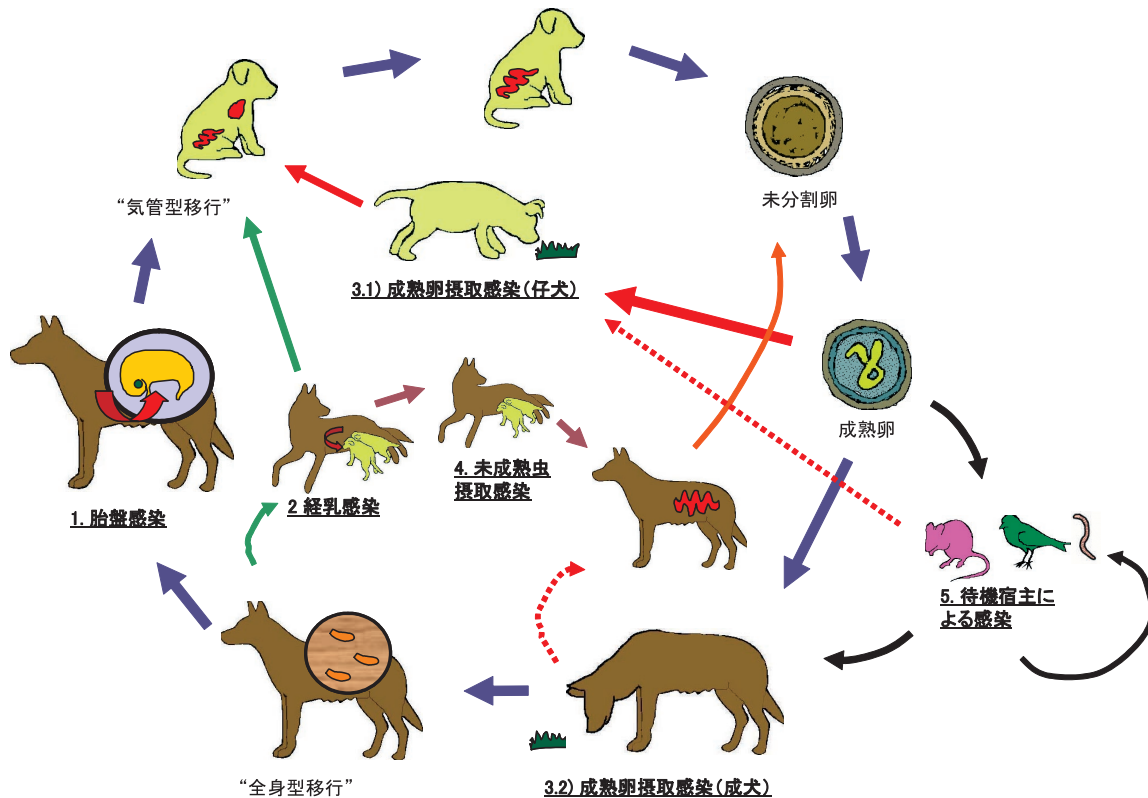


図1 *Toxocara canis* の生活環

る（図1）。主な感染経路は、1. 胎盤感染、2. 経乳感染、3. 成熟卵摂取感染、4. 未成熟虫摂取感染、5. 待機宿主による感染である。

1. 胎盤感染：雌犬の臓器や組織に宿る幼虫が、妊娠42日頃から活動を開始し、胎盤を介して胎仔へ移行する経路である。雌犬が妊娠30-45日頃に成熟卵を摂取した場合にも、腸壁を通過した幼虫が胎仔へ移行する⁵⁾。新生犬が娩出されると、幼虫は数時間以内に、肺から気管を経て咽喉頭まで移行する「気管型移行」³⁾を行い、嚥下された後小腸で発育し、出生後14日以降には糞便中に虫卵がみられるようになる。

2. 経乳感染：組織内幼虫が雌犬の妊娠後期および泌乳初期に乳腺に移行し、母乳を介して新生犬に移行する経路である。この経路で胎仔に移行する幼虫数の割合は比較的少なく、胎盤感染で移行する幼虫数の2%以下とされる。

3. 成熟卵摂取感染：イヌの年齢により、幼虫は異なる体内移行の形をとる。

1) 仔犬における成熟卵摂取感染：成熟卵がイヌに摂取されると、虫卵は小腸上部で孵化し幼虫となり、腸管粘膜を突破し、主に肝を通過し肺へ移行する。その後の幼虫の移行経路はイヌの年齢により異なってくる。一般に5週齢以下の幼犬においては、幼虫は気管型移行を行い、小腸に達し成虫になり、感染後約35日で糞便内に虫卵がみられるようになる⁷⁾。

2) 成犬における成熟卵摂取感染：5週齢以上のイヌにおいては、気管型移行を行なう幼虫は減少する。多くの幼虫が、心臓を経て大循環にのり、筋肉や腎等の各臓器・組織へ移行する「全身型移行」³⁾を行い、幼虫のまま成長することなく、各臓器・組織に寄生する。このように、一般には成犬における犬回虫成虫の寄生はほとんどみられないが、稀に成犬にも成虫の寄生がおり、糞便中に虫卵が認められることもある。

4. 未成熟虫摂取感染：免疫能が低下している泌乳期等の母犬では、仔犬の場合と同様な犬回虫の感染がみられ、糞便中に虫卵を排泄する⁵⁾。感染源は主に仔犬から排泄された未成熟虫とされる。すなわち、仔犬が犬回虫の濃厚感染を受けた場合、発育中途の犬回虫の一部は、仔犬の小腸に定着できずに、未成熟虫の形で糞便中に排泄される。この未成熟虫を、母犬が摂食すると感染が成立する⁵⁾。このよう

な感染は、仔犬から母犬への感染ばかりでなく、仔犬から仔犬への感染にも関与しているものと推測される。

5. 待機宿主による感染：待機宿主内に宿る幼虫が終宿主に捕食されることにより感染する経路である。哺乳類、鳥類および貧毛類等各種の動物が待機宿主となる⁶⁾。待機宿主が犬回虫成熟卵を摂食すると、幼虫は全身型移行によって各臓器・組織に移行し、発育することなくそこに留まり、終宿主であるイヌやキツネ等への感染源となる。

III Toxocara 属回虫によるヒトの幼虫移行症の病型

内臓幼虫移行症 Visceral larva migrans (VLM)¹⁾ は、寄生線虫の幼虫がヒトの諸臓器を移行することにより、移行部位に応じて様々な症状を示す疾病の総称である。寄生線虫の幼虫が眼内を移行することによる眼疾患は、眼幼虫移行症 Ocular larva migrans (OLM)¹²⁾ と呼ばれる。Toxocara 属回虫による VLM と OLM は比較的古くから知られており、Visceral toxocarosis (VT)、眼幼虫移行症を Ocular toxocarosis (OT) と記述することもある⁴⁾。

VT は子供に多くみられ、重症の場合、神経障害等を起こして死亡することもある²⁾。OT は年齢に関わらず、成人においても発症し、重症では失明に至ることもある¹⁰⁾。しかしながら、ほとんどの場合、感染があっても無症状であるか、症状があっても自然治癒する。1988年、Taylor ら¹¹⁾ は、このような比較的軽度の症状を示す抗体陽性者の内、その症状の特徴が VT や OT のいずれにも当てはまらない場合を Covert toxocarosis (CT：潜伏トキソカラ症) として区別し、犬回虫幼虫移行症の定義を広めた。

III 犬回虫のヒトへの感染経路

犬回虫のヒトへの感染は、一般に、公園の砂場や土壌中の成熟卵を経口摂取することによっておこると考えられている。一方、犬回虫は広範な動物を待機宿主とするため、鶏や豚等の畜産動物に幼虫が寄生すれば、鶏肉や豚肉を介して犬回虫がヒトに感染することは容易に想像できる（図2）。実際、食肉の生食を原因として犬回虫幼虫移行症を発症したとされる症例報告は少なくない。

近年、先進諸国の一部において、豚を放牧形態

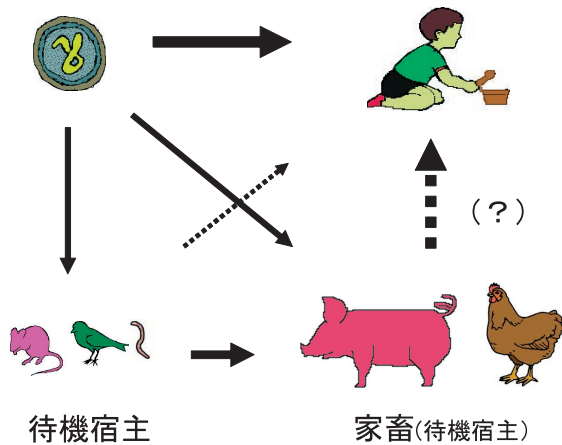


図2 *Toxocara canis* の人への感染経路

(フリーレンジ)で飼育する有機畜産が普及しつつある。その放牧地には、イヌやキツネが容易に侵入できることから、豚等の家畜が犬回虫の待機宿主となる機会が増加することが懸念される。したがって、家畜における犬回虫の感染状況を調べ、食肉中に存在する犬回虫幼虫の感染力を調べることは、公衆衛生上重要である。

豚を用いた犬回虫の感染試験

ヒトの犬回虫幼虫移行症は臨床症状が多様であり、また、患者からの幼虫検出が困難であること等から、本症については不明な点が多い。犬回虫幼虫移行症に関する基礎的知見を得るためには、モデル動物を用いた感染試験が必要となる。一方、犬回虫幼虫の体内移行経路は動物種により異なるため、使用する動物の選択が重要となる。ヒトのモデルとしては、一般にサル等の霊長類が使用されるが、費用等の面から難がある。これに対して、豚は入手しやすく、また、ヒトと類似する生理機能をもつことが知られている。また、前述したように、豚が待機宿主となって食肉である豚肉が幼虫を宿し、人への感染源となる可能性もある。そこで、豚における犬回虫の実験感染は、ヒトの犬回虫幼虫移行症解明の一助となると考え、以下に述べる2つの感染試験を行った。

1) 犬回虫成熟卵 50,000 個を 1 回投与した豚における検出幼虫数の推移

犬回虫成熟卵が感染した場合の、豚における幼虫の体内分布と消長を調べるため、感染実験を行った。犬回虫成熟卵 50,000 個を 8~10 週齢の SPF 豚 35 頭に 1 回経口投与後、感染後 49 日まで 7 日毎に 5 頭を経時的に剖検し、各臓器中の幼虫数を調べた⁸⁾。

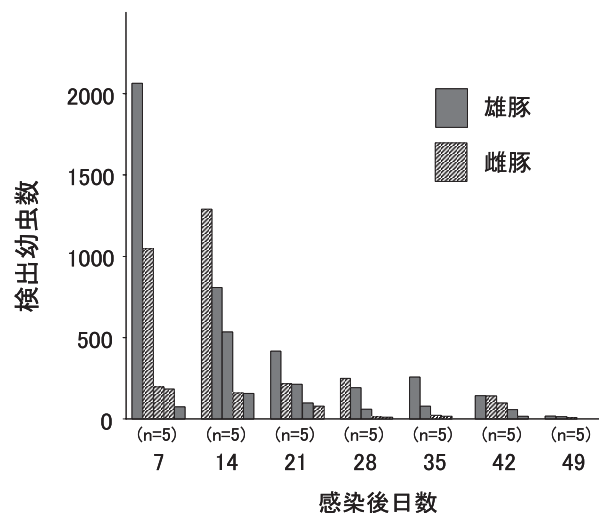


図3 *Toxocara canis* 成熟卵 50,000 個を 1 回投与された豚における各種臓器からの検出幼虫数 (合計) の推移

成熟卵感染後、各臓器から検出された幼虫数の合計値の推移を図3に示した。幼虫数は各群内で個体差がみられたものの、幼虫数の平均は、感染後7日に712匹と最も多く、その後漸減し、感染後49日では8匹に減少した(図3)。幼虫の臓器別分布については、感染後42日まで多くの幼虫は肺にみられ、小数が筋、心、腎、脳および眼に散発的にみられた。

2) 豚肉および鶏肉に寄生した犬回虫幼虫の豚への感染性

食肉に寄生する犬回虫幼虫の感染力を調べるため、幼虫が寄生する豚肉または鶏肉の豚への摂食感染実験を行った。その際、肉の冷蔵保存の影響も併せて調べた。3日齢幼虫約3,500匹が寄生する豚または鶏の臓物のミンチを豚肉または鶏肉として準備し、これを4℃下で1日保存したものを新鮮肉および7日間保存したものを保存肉とした。SPF豚24頭を用い、6頭ずつ4群に分け、それぞれ新鮮豚肉、新鮮鶏肉、保存豚肉または保存鶏肉を摂食させた。摂食感染後14日に剖検し、各臓器から幼虫を検索した⁹⁾。

その結果、検出した平均幼虫数および感染率は、それぞれ幼虫寄生の新鮮豚肉を摂食した群で2,570匹、75.3%、新鮮鶏肉摂食群では2,291匹、63.6%で、保存豚肉摂食豚では1,453匹、42.6%および保存鶏肉摂食群では676匹、18.8%であった。

ヒトの犬回虫幼虫移行症解明のためのモデル動物としての豚の意義

犬回虫成熟卵による豚への感染試験において、幼

虫の諸臓器への移行が認められた。肺まで移行した幼虫は、その後特定臓器に集積するような傾向をみせず、ほとんどの幼虫が比較的早期に消滅することがわかった(図3)。ヒトの本症における臨床症状は多様であり、また、一般に自然治癒することから、今回みられた豚における犬回虫幼虫の体内分布と消長は、ヒトの犬回虫幼虫移行症の病態発生様式との関連性を示唆するという見方もできる。

今回の犬回虫幼虫の寄生する豚肉および鶏肉による豚への感染試験において、豚肉・鶏肉内に寄生する幼虫が強い感染力を示し、さらに、これらの豚肉・鶏肉を4℃で7日間保存後も幼虫は強い感染力を維持することが判明した。これは、犬回虫幼虫が食肉を介してヒトへ感染する可能性を示唆するものである。犬回虫幼虫が家畜に感染する頻度はそれほど高くはないと思われるが、感染犬の糞便を摂食すること等によって、家畜が偶発的に濃厚感染する場合も考えられる。もしこのような家畜由来の食肉をヒトが生で喫食する機会があれば、重篤な症状を伴う犬回虫幼虫移行症を罹患する恐れがある。

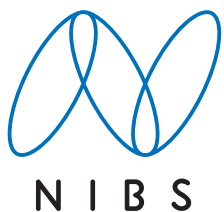
以上の豚を用いた犬回虫の実験感染の成績は、ヒトの犬回虫幼虫移行症を解明するための一助となるものであり、実験モデル動物として豚を応用する価値は高いと考える。

本試験研究において終始ご指導を賜りました、デンマーク王立獣医農業大学・寄生虫病研究センターのChristian Kapel教授、元所長Darwin Murrell先生および現所長Stig Thamsborg先生に深謝いたします。また、研究課題を授かった元所長であられた故Peter Nansen先生に心より感謝いたします。

(研究員)

引用文献

- 1) Beaver, P. C. 1956. Parasitological reviews. Larva migrans. Exp. Parasitol. 5 : 587-621.
- 2) Dent, J. H., Nichols, R. L., Beaver, P. C., Carrera, G. M., and Staggers, R. J. 1956. Visceral larva migrans with a case report. Am. J. Pathol. 32 : 777-803.
- 3) 石井俊雄. 1998. 獣医寄生虫学・寄生虫病学2(蠕虫他), 講談社サイエンティフィク, 東京
- 4) Lloyd, S. 1998. Toxocarosis. pp. 841-854. In : Zoonoses. ed., Palmer, S. R., Soulsby, L., and Simpson, D. I. H. Oxford University Press Inc., New York.
- 5) Lloyd, S., Amerasinghe, P. H., and Soulsby, E. J. L. 1983. Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. J. Small Anim. Pract. 24 : 237-247.
- 6) Taira, K., Permin, A., and Kapel, C. M. 2003. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. Parasitol. Res. 90 : 521-523.
- 7) Taira, K., Saeed, I., and Kapel, C. M. 2002. Dose-dependent egg excretion in foxes (*Vulpes vulpes*) after a single infection with *Toxocara canis* eggs. Parasitol. Res. 88 : 941-943.
- 8) Taira, K., Saeed, I., Lind, P., Murrell, K. D., and Kapel, C. M. 2003. Population dynamics of *Toxocara canis* in pigs receiving a single or multiple infection. Parasitology. 127 : 593-602.
- 9) Taira, K., Saeed, I., Permin, A., and Kapel, C. M. 2004. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. Vet. Parasitol. 121 : 115-124.
- 10) Taylor, M. R. H. 2001. The epidemiology of ocular toxocariasis. J. Helminthol. 75 : 109-118.
- 11) Taylor, M. R. H., Keane, C. T., O'Connor, P., Mulvihill, E., and Holland, C. 1988. The expanded spectrum of toxocaral disease. Lancet. I : 692-695.
- 12) Wilder, H. C. 1950. Nematode endophthalmitis. T. Am. Acad. Ophthalmol. 55 : 99-109.



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを心よいリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻541号) 平成18年10月25日印刷 平成18年11月1日発行(第52巻第6号)
 発行所 財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL 0428(33)1056(企画・学術部) FAX 0428(31)6166
 発行人 井土俊郎
 編集室 委員/細川朋子(委員長), 小山智洋, 大森崇司
 事務/企画・学術部
 表紙題字は中村稔治博士
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)