

総説

家畜・野生動物における肝蛭寄生バイオマーカーを用いた血清診断法の開発とその応用

関 まどか

要約

肝蛭症は世界中で畜産業に甚大な経済被害を与えており、家畜衛生上、最も重要な寄生虫病の一つである。また、感染動物のレバーを生食することにより感染する人獣共通感染症としても重要である。獣医師の努力により家畜の肝蛭症は減少し続けてきた。一方で、シカなどの肝蛭のレゼルボアとなりうる野生動物の急増が肝蛭症のリスクを高めている。近年、シカなどの有害野生鳥獣を食肉資源として活用しようという試みがはじまっていることから、食用に供される野生動物の肝蛭保有率を正確に把握する必要がある。そこで、本稿では肝蛭症の診断法とその問題点について整理する。さらに、肝蛭寄生バイオマーカーに着目したりコンビナント抗原を用いた血清診断法の開発とその応用について解説する。

キーワード：肝蛭，寄生バイオマーカー，ELISA，血清診断

1. 序論

肝蛭 (*Fasciola* 属の吸虫) が主に反芻類の胆管に寄生することにより引き起こされる肝蛭症は、家畜の肝障害の原因となるために世界中で畜産業に甚大な影響を与えている。国内では肝蛭の中間宿主はヒメモノアラガイで、終宿主は幼虫に汚染された稲わらや牧草などの飼料の経口摂取により感染する (図1)。また、肝蛭症は人獣共通感染症でもあり、ヒトへの感染源としては、幼虫が付着した水耕野菜や、感染した反芻家畜の腸管・肝臓 (レバー) に寄生する幼虫を摂取することがあげられる。

肝蛭症は国内では主に放牧牛で感染が知られており、最盛期には家畜ウシの感染率が80%を超えた地域もあった。1990年代以降、駆虫薬としてトリクラベンダゾール (商品名：ファシネックス、ノバルティスアニマルヘルス) が承認されてから、家畜ウシの肝蛭症は激減し、と畜場における検出率は本州では1%を下回るようになった [1]。一方、北海道では放牧を主体にした畜産農家が多いので、未だに肝蛭の寄生率が高い地域が存在する。また、全国的にシカの個体数増加が問題となっているが、著者の直近の研究により、北

海道では同じ遺伝子型を示す肝蛭がエゾシカとウシで検出されたため、肝蛭症の野生動物と家畜の間で肝蛭症が相互伝播していることが示された (論文投稿中)。すなわち、これまで家畜ウシが主体であった肝蛭症が最近ではエゾシカの疾患になりつつあるといえる。エゾシカは野生動物なので投薬ができないため、今後、



図1 肝蛭のライフサイクルとヒトへの感染様式

ウシやシカは幼虫に汚染された稲わらや牧草などの経口摂取により感染する。ヒトは感染した動物の肝臓に寄生する幼虫を摂取することでも感染する。

エゾシカの肝蛭保有率は上昇し続けると予想される。さらに、牧野に侵入するエゾシカが肝蛭を持ち込むことにより、肝蛭が家畜ウシの再興感染症として猛威を振るうことが懸念される。また、本誌第42巻1号で紹介されたように、最近、有害野生鳥獣を食肉資源として活用しようとする試みが始まっている。そのため、野生動物における肝蛭保有率を正確に把握することは重要な課題である。このような現状から、肝蛭症に対して簡便かつ信頼性の高い診断法を確立することが求められている。本総説では、肝蛭症の診断法の現状と肝蛭寄生バイオマーカーを用いた診断法の開発と応用について解説する。

2. 肝蛭症の診断法と各診断法の難点

1) 目視検査

目視による肝蛭症の検査は家畜および野生動物を食肉として処理する際に行われる。我が国では食肉衛生検査所で獣医師による検査が実施されており、肝蛭症に罹患した家畜ウシの肝臓は摘発・廃棄される(図2)。しかしながら、感染初期の幼虫は非常に小さい(数百



図2 肝蛭の濃厚感染例(海外の一例)
矢印は寄生している虫体を示す。

μm) ため(図3)、獣医師であっても摘発は難しい。また、シカなどの野生鳥獣は、と畜場法の対象動物ではなく、獣医師による検査が義務付けられていない。そのため、肝蛭に感染したレバーが見逃されて市場に出回る可能性は否定できない。

2) 糞便検査

糞便検査は主に家畜臨床現場で実施される。肝蛭卵は比重が大きいために水に沈む。この特性を生かした渡辺法[2]、ビーズ法[3]などの沈澱法が検査法として推奨されている。1匹の肝蛭が1日に産卵する虫卵数は約10,000個に及ぶと推定されているが、ウシ1頭の1日当たりの糞便量を20kgとすれば、糞便1gあたりの虫卵数は0.5個と推計される[4]。したがって、少数寄生例の場合には糞便検査で虫卵が検出されないことがある。

さらに、虫卵が検出されたとしても、ウシで普通に見られる双口吸虫卵と鑑別するためには虫卵の形態に関する専門的な知識と経験が要求される(表1, 図4)。

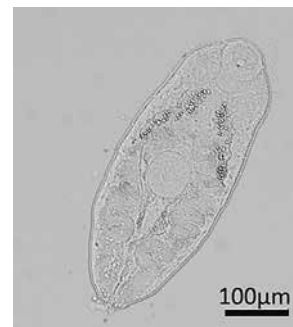


図3 肝蛭の幼虫

Newly excysted juvenile (NEJ) と呼称される感染初期の幼虫。(写真提供: 岩手大学獣医寄生虫学研究室 林慶)

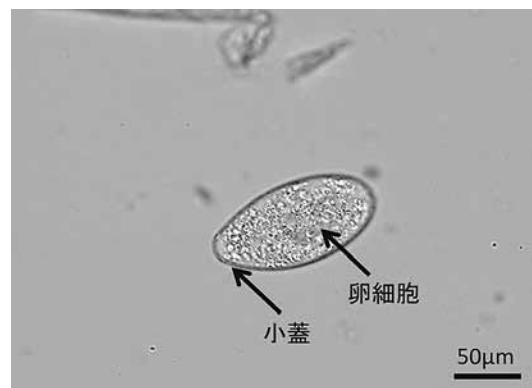
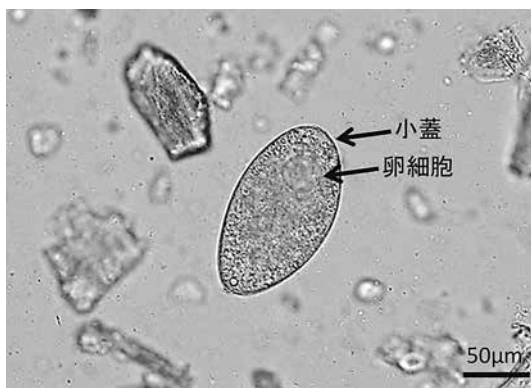


図4 肝蛭卵(左)と双口吸虫卵(右)の比較

色調(肝蛭卵は黄色、双口吸虫卵は無色)の違いの他、小蓋に対する卵細胞の位置が重要な鑑別点である。

表1 肝蛭卵と双口吸虫卵の特徴の比較

| | 色 | 卵細胞の位置 | 外観 |
|-------|-----|----------|-------------|
| 肝蛭卵 | 黄褐色 | 卵内やや小蓋寄り | 比較的大型 |
| 双口吸虫卵 | 無色 | 卵内ほぼ中央 | 肝蛭卵より概して小さい |

引用文献 [4]. 一部改変

3) 血清診断法

ELISA法やゲル内沈降反応などの血清診断法は、寄生虫学の専門的な知識や特別な手技を必要としない。国内ではこれまで肝蛭の粗抗原を用いた方法が用いられてきた [5]。しかしながら、一般的に粗抗原は感度が高いが特異度が低い欠点があり、家畜や野生動物のように種々の病原体の感染症が疑われる場合にはクロスリアクションが起こりやすく、感染している病原体を正確に診断できないことがある [6]。また、粗抗原を精製するためには、新鮮な肝蛭虫体を入手する必要があるため、日常的な診断に粗抗原を用いることは難しい。

3. 肝蛭の寄生バイオマーカー

1) 肝蛭が分泌するタンパク質群

肝蛭の幼虫が宿主に経口的に摂取されたのちに、自らの分泌する消化酵素（タンパク質）により、宿主の腸粘膜を破壊し、粘膜筋層および漿膜を貫通して腹腔に出る（図5）。このような体内移行期をはじめ、肝蛭が宿主の体内で分泌するタンパク質群のライブラリー [7] が報告されている（表2）。これらのタンパク質群（寄生バイオマーカー）は診断用抗原の候補として有望である。

2) 診断用抗原としての応用

遺伝子組み換え技術を用いれば、肝蛭の遺伝子を導入した大腸菌に肝蛭のタンパク質を作製させて精製し、それを診断用抗原として用いることができる。このようなリコンビナントタンパク質を用いた血清診断は、粗抗原よりも特異性が高くなることが期待される。

ヨーロッパなど肝蛭の高度汚染地域では肝蛭寄生バイオマーカーの中でも分泌量の多いCathepsin Lを抗原としたELISA法が開発され、家畜の疫学調査に用いられている [8-13]。現在、著者の研究チームは肝蛭寄生バイオマーカーのリコンビナント抗原を用いたELISA法の確立に取り組んでいる。これまでのところ、良好な予備試験結果が得られており、近々、国内ではじめて疫学調査に応用できるようになる。

3) 簡易診断キットの開発

前述したように、現行の肝蛭症診断法には難点が多い。著者らが開発に取り組んでいるリコンビナント抗

原を用いたELISA法は、特異性が高く、大規模な疫学調査に適している。しかしながら、ELISA法は試薬・機材を備えた研究機関では実施できるが、ジビエ処理業者などの食肉処理現場や、家畜臨床現場で実施することは難しい。そこで、特別な機材や肝蛭に対する専門知識がなくても実施できる簡易診断キットが求められている。簡易診断キットの一例（イムノクロマト法）を示した（図6）。この診断法では、ストリップ上に診断用リコンビナント抗原を吸着させてあり、血清中に含まれる肝蛭抗体と反応すると発色する原理を用いている。ストリップ上に血清を添加するだけで検査できる非常に簡便な方法である。このような簡易診断キットを開発し、普及させることで、肝蛭感染個体の簡便かつ正確な摘発が可能になると考えている。

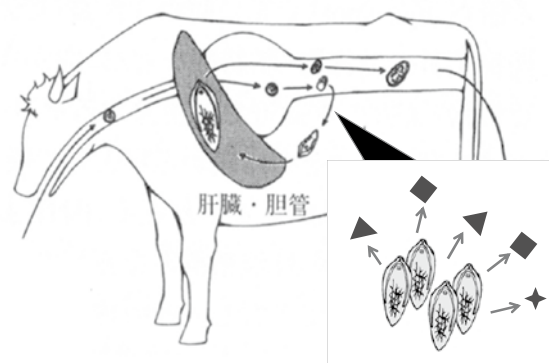


図5 肝蛭の体内移行経路（原図. 家畜寄生虫病学一部改変）

肝蛭の幼虫は宿主の消化管を貫通して腹腔に出た後に肝臓に到達する。このとき、肝蛭が分泌する消化酵素（タンパク質）が重要な役割を果たす。これらのタンパク質群は診断用抗原の候補として重要である。

表2 肝蛭寄生バイオマーカーの例

| タンパク質名 | 発現時期 |
|----------------------------|-------------|
| Cathepsin L | 幼虫, 幼若虫, 成虫 |
| Cathepsin B | 幼虫, 幼若虫 |
| Legumain | 幼虫, 幼若虫 |
| Peroxiredoxin | 幼虫, 幼若虫, 成虫 |
| Fatty acid-binding protein | 幼虫, 幼若虫, 成虫 |
| Glutathione S-transferase | 幼若虫 |
| Thioredoxin | 成虫 |

引用文献 [7] に基づく

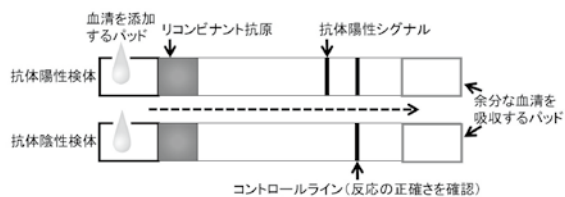


図6 簡易診断キットのイメージ

ストリップ上に血清を添加するだけで、血清中の抗体の有無をバンドパターンで簡単に検査できる。

4. 今後の展望

序論で述べたように、かつて国内の家畜ウシの肝蛭感染率は極めて高かったが、効果的な駆虫薬の普及や、感染予防のための飼料給餌法の指導などの獣医師の努力により、家畜の肝蛭感染率は低下し続けてきた。一方で、肝蛭のレゼルボアとなりうるシカの個体群の増加が再興感染症としてのリスクを高めている。本稿で述べた肝蛭バイオマーカーを用いた診断法により、今後、以下の2つの観点からの課題に取り組むことができると期待している。

1) 家畜衛生の観点から：疫学情報の把握と対策の提言
シカの個体群が特に多い地域では、家畜ウシの感染率だけでなく、シカの感染率も正確に把握する必要がある。シカの感染源としてのリスクに応じて、牧野への侵入防止対策や中間宿主が生息する水場への侵入防止対策を取る必要について考慮し、対策を提言することができる。これらの疫学調査に開発したELISA法を用いて取り組む予定である。

2) 食肉衛生の観点から：ジビエ処理現場での安全性の確保

前述したイムノクロマト法のような、寄生虫に対する専門知識の無い人でも正確に肝蛭感染の有無を判定できる簡易診断キットをジビエ処理現場に提供する。ヒトへの感染ステージであり、目視での発見が困難なために特に注意を払うべき幼虫の感染を検出できるレベルまで診断キットの精度を上げることを目指して研究を進めていきたい。

謝 辞

肝蛭バイオマーカーを用いた診断法の開発にあたり、多大なるご指導を賜りました岩手大学公衆衛生学研究室 鎌田 洋一 教授、山崎 朗子 助教に深謝いたします。また、コントロール血清の入手にご協力を頂きました岩手大学産業動物内科学研究室の 一條 俊浩 准教授、岩手県食肉衛生検査所の 藤森 亜紀子 先生をはじめ関係の皆様にご心より感謝の意を表し

ます。さらに、本研究に一生懸命に取り組んでいる岩手大学獣医寄生虫学研究室の 佐藤 浩庸 君、実験にご協力を頂いている岩手大学公衆衛生学研究室の 平谷 寛樹 君をはじめ学生の皆様に心より感謝いたします。

引用文献

- [1] Okajima J, Shibata K, Takahashi E, Nagafuchi T, Okajima K, Nonaka N : Current status and its epidemiological consideration of *Fasciola* and *Eurytrema* infections in beef cattle of Japan, J Vet Med Sci, 78, 785-790(2016)
- [2] 渡辺昇蔵, 永山文昭, 岩田神之助 : 肝蛭卵の簡易糞便検出法について, 日獣会誌, 45, 176(1953)
- [3] 岩田神之助 : 糞便検査改良法と従来の簡易検出法との比較実験, 第56回日本獣医学会記事
- [4] 石井俊雄 : 吸虫類, 獣医寄生虫学・寄生虫病学2 蠕虫 他, 石井俊雄編, 第1版, 183-232, 講談社, 東京 (1998)
- [5] Itagaki T, Ohta T, Hosaka Y, Iso H, Konishi M, Chinone S, Itagaki H : Diagnosis of *Fasciola* sp. Infections in Cattle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Jpn J Vet Sci, 51, 757-764(1989)
- [6] Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, de Larrard B : Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis, J Clin Microbiol, 30, 2269-2274(1992)
- [7] Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S : An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host, Mol Cell Proteomics, 8, 1891-1907(2009)
- [8] O'Neill SM, Parkinson M, Dowd AJ, Strauss W, Angles R, Dalton JP : Short report: Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase, Am J Trop Med Hyg, 60, 749-751(1999)
- [9] Cornelissen JB, Gaasenbeek CP, Borgsteede FH, Holland WG, Harmsen MM, Boersma WJ : Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica*

- cathepsin L-like protease, *Int J Parasitol*, 31, 728-737 (2001)
- [10] Raina OK, Yadav SC, Sriveny D, Gupta SC : Immuno-diagnosis of bubaline fasciolosis with *Fasciola gigantica* cathepsin-L and recombinant cathepsin L 1-D proteases, *Acta Trop*, 98, 145-151 (2006)
- [11] Gottstein B, Schneeberger M, Boubaker G, Merkle B, Huber C, Spiliotis M, Müller N, Garate T, Doherr MG : Comparative assessment of ELISAs using recombinant saposin-like protein 2 and recombinant cathepsin L-1 from *Fasciola hepatica* for the serodiagnosis of human Fasciolosis, *PLoS Negl Trop Dis* (2014)
- [12] Kuerpick B, Schnieder T, Strube C : Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*, *Vet Parasitol*, 193, 206-213 (2013)
- [13] Gonzales Santana B1, Dalton JP, Vasquez Camargo F, Parkinson M, Ndao M : The diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease, *PLoS Negl Trop Dis* (2013)

文献抄録

アカシカに寄生する *Sarcocystis* 種の再検討：ミトコンドリア *cox1* 配列に基づく *Sarcocystis elongata* n. sp と *Sarcocystis truncata* n. sp. の改名

Sarcocystis species in red deer revisited: with a re-description of two known species as *Sarcocystis elongata* n. sp. and *Sarcocystis truncata* n. sp. based on mitochondrial *cox1* sequences.

Gjerde Bjorn

Dept. Food Safety and Infection Biology,
Norwegian School of Veterinary Science, P.O.Box
8146 Dep., 0033 Oslo, Norway

Sarcocystis 属は2つの宿主を生活環に持ち、肉食動物が終宿主に、草食動物や雑食動物が中間宿主となる。これまで、アカシカやトナカイ、ノロジカ、ヘラジカのようなシカを中間宿主とする *Sarcocystis* 属は、サルコシストの形態、あるいはDNAシーケンス、もしくはその両方により分類されてきた。形態学的分類に限界がある *Sarcocystis* 種では、そのほとんどがリボソームDNA (rDNA) 解析によってのみ分類されている。近年、ミトコンドリアを構成するタンパク質の一つをコードする、チトクロムcオキシダーゼ遺伝子 (*cox1*) がシカやウシ、ヒツジの *Sarcocystis* 種を決定する新しいマーカーであることが実証された。しかし、これまで *cox1* は異なった宿主間の *Sarcocystis* 種の分類に用いられる程度であった。形態とrDNAの塩基配列に

基づいた調査で、ノルウェーのアカシカには5種の異なる *Sarcocystis* 種が寄生することが判明しており、これらの種はトナカイやヘラジカに寄生している種と同種であると考えられていた。そこで本研究では、アカシカに寄生する *Sarcocystis* 種名の再検討を目的に、*cox1* を指標として、これら5種の分離株を調査した。

アカシカとトナカイからそれぞれ分離された *S. tarandi*, *S. rangiferi* の分離株について、*cox1* 配列を比較した。その結果、この4種は系統樹解析により、宿主由来の4種の単独の系統であり、それぞれ独立した種であることが明らかになった。アカシカに寄生していた、*Starandi*-like, *Srangiferi*-like は形態学的情報とrDNA解析結果をあわせ、それぞれ *S. elongata*, *S. truncata* と改名された。アカシカとヘラジカに寄生している、*Shjorti*, *S. ovalis* の分離株の配列比較により、これらの種が双方の宿主に寄生していることが確認された。以上のように、アカシカに寄生するすべての *Sarcocystis* 種に関する現在の見識が見直された。*cox1* 遺伝子は将来的にも、様々な宿主の異なる *Sarcocystis* 属において分子生物学的多様性を示すだろうが、rDNA に取って代わるものではなく、補完的マーカーとしての位置づけである。糞便オーシストや腸管内スポロシストなど、rDNAの配列に多様性が考えられるような形態時の種同定をする場合は、*cox1* を指標にしてもよいだろう。

(木村裕亮, 岩手大学農学部共同獣医学科 獣医公衆衛生学研究室)