

組織寄生性回虫類幼虫の感染経路および
体内移行
(Transmission and migration of ascaridoid larvae
in paratenic host)

指導教官 黄 鴻堅 教授

平 健介 准教授

2021 年 2 月

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 博士課程
動物疾病制御学分野 生体疾病制御学 寄生虫学研究領域
DV1508 岡田夏樹 (Natsuki OKADA)

目次

| | |
|-----------------|----|
| 論文要旨 | 1 |
| Abstract | 4 |
| 緒論および論文総括 | 7 |
| 第 1 章 | 11 |
| 1. 緒論 | 12 |
| 2. 材料と方法 | 14 |
| 3. 結果 | 17 |
| 4. 考察 | 19 |
| 第 2 章 | 22 |
| 1. 緒論 | 23 |
| 2. 材料と方法 | 25 |
| 3. 結果 | 27 |
| 4. 考察 | 28 |
| 第 3 章 | 30 |
| 1. 緒論 | 31 |
| 2. 材料と方法 | 33 |
| 3. 結果 | 36 |
| 4. 考察 | 38 |
| 総括ならびに結論 | 40 |
| 謝辞 | 41 |
| 引用文献 | 42 |
| 表および図 | 52 |

論文要旨

動物寄生性線虫の幼虫には宿主の臓器や筋肉などの組織に寄生するものがあり，寄生部位によっては宿主に障害を起こす．トキソカラ属回虫は各種動物を待機宿主にとり，幼虫が宿主の組織に寄生する．また，幼虫がヒトに寄生するとトキソカラ症を起こすことが知られている．他方，トキソカラ属回虫幼虫の宿主への移行経路や宿主間における伝播については不明な点が多く，さらに，ヒトへの感染経路も不詳である．そこで，本研究の目的をトキソカラ属回虫幼虫の待機宿主における体内移行動態および経済動物でのトキソカラ属回虫幼虫の感染状況を調べることにした．

第 1 章：胎盤感染によるマウス胎仔への猫回虫幼虫の移行

猫回虫 *Toxocara cati* は終宿主において経乳感染することが確認されているが，胎盤感染や子宮内感染はしないとされている．今回，妊娠および非妊娠マウスへの猫回虫の感染実験を行い，幼虫の組織分布における妊娠の影響および胎盤感染または子宮内感染の有無について再検討した．猫回虫含仔虫卵 5,000 個を妊娠マウス 7 匹にそれぞれ妊娠 4 日および 9 日の 2 回，すなわちマウス 1 匹あたり合計 10,000 個の虫卵を経口投与し，同週齢の非妊娠マウス 7 匹にも同様に投与した．初回の虫卵投与後 12 日(妊娠 16 日)に全てのマウスを剖検し，骨格筋，内臓，子宮，胎盤，臍帯および胎仔を摘出し，塩酸ペプシン消化法を用いてそれぞれの組織内の幼虫数を調べた．猫回虫幼虫はすべての妊娠および非妊娠マウスの組織から回収された．幼虫の大部分は骨格筋から回収され，一部は内臓，子宮，胎盤および胎仔から回収された．骨格筋，内臓，子宮の幼虫数および総回収幼虫数に妊娠と非妊娠マウス間に統計学的な差異は認められなかった．妊娠マウス 7 匹から合計 103 匹胎仔が得られ，71.8%にあたる 74 匹の胎仔から合計 196 匹の猫回虫幼虫が回収され，感染胎仔 1 匹あたり平均 2.6 匹の幼虫が回収された．また，調べた 103 個の胎盤のうち，16.5%にあたる 17 個の胎盤から合計 26 匹の幼虫が回収された．本研究は，ほとんどのマウス胎仔が子宮内感染によって猫回虫幼虫に感染すること示した．また妊娠および非妊娠マウス間の各組織における回収幼虫数に統計学的な差異が認められなかったことから妊娠は猫回虫幼虫の垂直感染に直接影響しないことが示唆された．本成績により，トキソカラ属回虫幼虫の待機

宿主における胎盤感染について新しい知見が提供された．

第 2 章：平飼い養鶏場の採卵鶏の筋肉組織からの猫回虫および狸回虫幼虫の検出

トキソカラ属回虫は各種動物を待機宿主にとり，幼虫がヒトに寄生するとトキソカラ症を起こす．ヒトへの主な感染源は，土壌や砂場の虫卵あるいは食肉に寄生する幼虫で，国内では，鶏や牛の食肉の生食が原因とされるヒトのトキソカラ症例は少なくない．しかしながら，経済動物でのトキソカラ属回虫幼虫の感染実態についてはほとんど知られていない．今回，鶏における回虫幼虫の寄生を調査するために，神奈川県内の養鶏場一戸の平飼採卵鶏 50 羽を供試し，胸肉，もも肉および肝臓から塩酸ペプシン消化法を用いて回虫幼虫の検出を試みた．また，検出した幼虫は PCR 法を用いて分子生物学的に種を確認した．50 羽の鶏のうち 1 羽の胸肉および別の 1 羽のもも肉からそれぞれ猫回虫幼虫および狸回虫幼虫が 1 匹ずつ検出された．本調査は，国内の養鶏場の鶏から実際にトキソカラ属回虫の幼虫を検出した初めての報告であり，狸回虫幼虫が家禽に寄生する事実を初めて明らかにした例となった．狸回虫がヒトのトキソカラ症を起こす可能性についてはほとんど知られておらず，さらなる研究が必要である．今後，検査数を増やして，国内の養鶏におけるトキソカラ回虫感染の実態をより詳細に把握することは必要であるが，本調査により，鶏肉の加熱不十分調理や生食はヒトのトキソカラ症の原因となりうることが示唆された．

第 3 章：マウスにおける狸回虫幼虫の組織分布および感染力

狸回虫 *Toxocara tanuki* はタヌキの小腸に寄生する線虫で，寄生率は概して高い．一方，狸回虫の待機宿主や幼虫の組織移行についてはほとんど知られてない．今回，狸回虫のマウスへの感染実験を行い，幼虫の組織移行および感染力について検討した．狸回虫含仔虫卵 1,000 個を BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウスに経口投与後 7, 31, 91 および 182 日に剖検し，中枢神経系，心臓，肺，腎臓，脾臓，胃腸管，肝臓および骨格筋を分離し，それぞれの組織における幼虫数を塩酸ペプシン消化法を用いて調べた．また，これらのマウスの肝臓から得られた幼虫を別の ICR 系統マウスに経口投与し，投与後 21 日に剖検して体内の幼虫数を調べた．その結果，虫卵を投与した全てのマウスから幼虫が検出され，幼虫の 88.7%以上は肝臓から回収された．BALB/c

系統および C57BL/6 系統マウス間で肝臓の幼虫の分布に統計学的な差異は認められず， BALB/c 系統マウスと C57BL/6 系統マウスはほぼ同様の組織分布を示したが，回収幼虫総数は，BALB/c 系統マウスよりも C57BL/6 系統マウスの方が多く，統計学的に差異が認められた．ICR 系統マウスからの BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウスの肝臓由来の幼虫の回収率は，組織内 7-182 日齢の幼虫で，それぞれ 15.7-46.0%および 20.1-57.7%であった．本研究は，マウスにおいて狸回虫幼虫の多くは肝臓に寄生し，少なくとも半年間高い感染力を維持することを示した．また本成績で待機宿主内の狸回虫幼虫が新たな待機宿主へと感染が成立した事実は，狸回虫幼虫がヒトのトキソカラ症の原因となる可能性を示唆するものであると考える．

【総括】

本研究は，第 1 章にて猫回虫幼虫のマウス胎仔への子宮内感染を実証し，トキソカラ属回虫幼虫の待機宿主における胎盤感染について新しい知見を提供した．第 2 章にて待機宿主である養鶏場の鶏からトキソカラ属回虫幼虫を実際に検出し，野外の経済動物の筋肉においてトキソカラ属回虫幼虫が寄生する事実を明らかにした．また家禽からの狸回虫幼虫の検出例は初の報告となった．第 3 章では野外の待機宿主から得られた狸回虫についてマウスを用いた感染実験を行い，幼虫が長期間高い感染力を維持し，ヒトのトキソカラ症の潜在的なリスクがある事示した．以上の成績はヒトのトキソカラ症の発症リスクの把握と予防対策の検討に関連する公衆衛生および家畜衛生の向上に貢献するものである．

Abstract

Certain nematode larvae migrate to tissues of host organs and muscles, causing major disorder to the host at the site of predilection. Roundworms of the genus *Toxocara* use various animals as paratenic hosts, and the larvae migrate to the viscera and other host tissues. It is also known that *Toxocara* spp. larvae can cause human toxocariosis. However, there is little knowledge on the migration of *Toxocara* spp. larvae in the paratenic host, transmission between hosts, and the infection route to humans is also not clear. Therefore, the aim of this study is to investigate the infection route of the toxocarid larvae, their distribution in the various organs of paratenic host, and the prevalence of *Toxocara* spp. larvae in livestock, which serve as food for humans.

***Toxocara cati* larval migration to mouse fetuses through transplacental infection**

Toxocara cati has been demonstrated to show transmammary infection to the neonate, but little information on vertical transmissions, namely transplacental or intrauterine infections, are available. In the present study, we examined whether transplacental infection do occur in *T. cati* infection in mice or not. We orally inoculated *T. cati* embryonated eggs into the pregnant mice (n=7) twice on day 4 and 9 of gestation (10,000 in total/mouse). Twelve days after the first inoculation (16th day of gestation), necropsy was performed, and the internal organs, skeletal muscle and uterus, placenta, umbilical cord and fetus were removed separately. The number of larvae in each of the organs were counted. A total of 103 fetuses were obtained from 7 pregnant mice, and a total of 196 *T. cati* larvae were recovered from 74 (74/103, 71.8%) fetuses. In addition, a total of 26 larvae were recovered from 17 (17/103, 16.5%) placenta. This study showed that when mice were exposed to *T. cati* during pregnancy, the larvae migrate into the fetus in the maternal mouse, demonstrating that intrauterine infection of *T. cati* could be easily established.

Detection of larvae of *Toxocara cati* and *Toxocara tanuki* from the muscles of free-ranging layer chickens

There are many cases of toxocariosis in humans caused by the consumption of visceral organs of chickens, cattle and other ruminants. However, little is known about the actual infection of *Toxocara* larvae in livestock. In this study, we tried to detect nematode larvae by digesting breast meat, thigh meat, and liver of 50 free-range chickens in Kanagawa prefecture. The detected nematodes were subjected to species identification using the PCR method. Of a total of 50 chickens that were examined, one *T. cati* larva and one *T. tanuki* larva were detected in the breast meat of one chicken and the thigh meat of another chicken, respectively. This is the first report that *T. tanuki* larvae do infect chickens in the natural environment. It will be necessary to increase the number of chickens to be examined to understand the prevalence of *Toxocara* spp. larvae in domestic poultry in more detail. In conclusion, it is suggested that consumption of raw or uncooked chicken might be the cause of human toxocariosis.

***Toxocara tanuki* larval distribution in mice and the infectivity of tissue larvae**

Toxocara tanuki is a nematode that parasitizes in the small intestine of raccoon dogs, and its prevalence is generally high. However, only little is known about the organ distribution of its larvae in the paratenic host and there is no information on its infectivity. In this study, we orally inoculated mice with *T. tanuki* embryonated eggs and examined their larvae distribution in the various organs of the host and their infectivity after some time. BALB/c and C57BL/6 mice (n=5 in each group) were inoculated with 1,000 *T. tanuki* embryonated eggs. Necropsy was performed on days 7, 31, 91 and 182 postinfection. The central nervous system (cerebrum, cerebellum and spinal cord), heart, lungs, kidneys, spleen, gastrointestinal tract, liver, and carcass were separated, and the number of larvae in each of the organs was counted. Larvae recovered from the liver of these mice were inoculated into ICR strain mice (n=6 in each group), which were later necropsied at days 21 postinoculation. Infectivity of larvae was evaluated from the ratio of the number of larvae inoculated to ICR mice and the number of larvae recovered from the same mouse. Larvae were recovered from all the ICR mice inoculated with *T. tanuki* eggs. Over 88.7% of the larvae were recovered from the liver. The larval recovery

from ICR mice that inoculated with 182-day-old larvae recovered from the two strains of mice (BALB/c and C57BL/6) liver were 46.0 and 57.7%, respectively. The range of infectivity of *T. tanuki* larvae was 15.7-75.2% throughout the study. In this study, we have demonstrated that the most optimal site of predilection of *T. tanuki* larvae in mice was the liver in mice and they could maintain their infectivity for at least half a year.

In this thesis, we presented new findings on the transmission route and larval migration of *Toxocara* spp. in the paratenic host tissues. In addition, we also demonstrated that not only *T. cati* but also *T. tanuki* could be detected from domestic chickens. These new findings will contribute to the improvement of public health and livestock hygiene as related to understanding the risk of human toxocariosis and examining the avenues of preventive measures.

緒論および論文総括

トキソカラ属(Genus *Toxocara*)の回虫は動物界(Kingdom Animalia), 線形動物門(Phylum Nematoda), 双腺綱(Class Secernentea), 回虫目(Order Ascaridia), 回虫上科(Superfamily Ascaridoidea), 回虫科(Family Ascarididae), トキソカラ亜科(Subfamily Toxocarinae)に分類される寄生虫で Stiles and Hassall, (1905)によって命名された. 現在までにおよそ 26 種が知られており, 人獣共通感染症として確立されている *Toxocara canis*, *T. cati* および単一の報告でヒトのトキソカラ症の原因が示唆されている *T. pteropodis* の 3 種と人獣共通感染症として確立されていない 14 種(*T. vitulorum*, *T. alienata*, *T. apodemi*, *T. genettae*, *T. indica*, *T. leonine*, *T. mackerrasae*, *T. malaysiensis*, *T. paradoxura*, *T. pearsei*, *T. sprengi*, *T. suricattae*, *T. tanuki*, *T. vajrasthira*)と単一の報告のみの 9 種(*T. canarisi*, *T. cynonycteridis*, *T. elephantis*, *T. herpestum*, *T. hippopotami*, *T. lyncis*, *T. manzadiensis*, *T. vincenti*, *T. warreni*)が知られており, イヌ科, ネコ科, ジャコウネコ科, マングース科, ウシ科, アライグマ科, コウモリ科およびげっ歯類など多様な固有宿主を持つ (Ziegler and Macpherson, 2019).

トキソカラ属回虫の成虫は白黄色から薄茶色の大型で太い円筒形の線虫で, 矢印状の頭部を持ち, 雌雄異体で完全な消化器系と含菌性隆起を伴う 3 つの口唇を持つ. 食道に球状の膨大部はなく, また, 雄成虫に尾翼はない. 雄成虫の 2 本の交接刺は同形同大である. 虫卵は類円形で卵殻の周囲に蛋白膜を持つ (Sommerfelt et al., 2004; Ziegler and Macpherson, 2019). トキソカラ属回虫の種の分類は形態学的または分子生物学的な特徴に基づいて決定されている. すなわち, 頭部の形状および体長, 交接刺の長さ, 食道腺の有無, 頸翼の形状および幅と長さに基づいて同定される (Ziegler and Macpherson, 2019).

トキソカラ属回虫の生活環は直接発育型で, 終宿主への感染経路には水平もしくは垂直感染がある. 水平感染には環境中の含仔虫卵または無脊椎動物, 鳥類, げっ歯類, ウサギまたはブタなど待機宿主の組織に寄生した第 3 期幼虫(L3: 感染幼虫)の摂取がある (Ziegler and Macpherson, 2019). 垂直感染は, 胎盤感染または経乳感染が犬回虫, 猫回虫, 牛回虫など一部の宿主で実証されている. 胎盤感染については, 犬回虫では終宿主および待機宿主であるマウスで実証され (Shillinger and Carm, 1923; Augustine 1927; Oshima, 1961; Lee et al.,

1976), 牛回虫では終宿主でその可能性が示唆されている(Herlich and Porter, 1953). 一方で, 猫回虫は胎盤感染をしないとされているが(Sprent, 1956; Swerczek et al., 1971; Coati et al., 2004), 現在は猫回虫と同種とされている *T. mystax* (Ziegler and Macpherson, 2019)では待機宿主であるマウスで胎盤感染が示されている(Schön and Stoye, 1986). 経乳感染については, 犬回虫が終宿主および待機宿主であるマウスで実証され(Burke and Roberson, 1985; de Souza Aguiar et al., 2015), 猫回虫および牛回虫ではそれぞれ終宿主で示されている(Swerczek et al., 1971; Roverts, 1989). また, Schön and Stoye (1986)はマウスにおいて *T. mystax* の経乳感染が成立したと報告している.

宿主体内におけるトキソカラ属回虫幼虫の移行経路には, 気管型移行と全身型移行の2型があり, 終宿主体内では主に気管型移行が起こる. 含仔虫卵が終宿主に摂取されると, 小腸で孵化し, 幼虫は腸壁を貫通して循環器系に入る. 感染後, 約24時間でリンパ管や毛細血管から門脈循環を介して肝臓に到達する(Webster, 1958). 肝臓到達後, 約12時間で幼虫は心臓に移行し, 肺動脈を介して肺に到達する(Strube et al., 2013). その後, 幼虫は肺胞壁を貫通し, 細気管支と気管を通して咽頭に移動し, 嚥下と共に飲み込まれ, 食道および胃を経て小腸に達し, 約7-15日後に成虫に発育する(Strube et al., 2013). 終宿主に第3期幼虫が摂取された場合, 気管型移行はせず, 小腸で直接成虫に発育する(Overgaauw, 1997). 雌成虫は糞便中に1日あたり最大200,000個の虫卵を排泄し, 虫卵は温度, 湿度, 光, pH, 土壌環境など周囲の環境の影響を受けるが約3-6週間で発育する. その間に単細胞の未胚卵で排泄された卵は成熟し, 含仔虫卵となり, 第1期幼虫(L1)から第2期幼虫(L2)に成長し, 最終的には感染性を有する第3期幼虫まで発育する(Strube et al., 2013).

一方, 待機宿主に含仔虫卵もしくは第3期幼虫が摂取された場合は全身型移行が起こる. 宿主体内に侵入した幼虫は腸壁を貫通し, 気管型移行と同じく, 肝臓に移行後, 肺に移行する. そこから組織および体循環系を介して様々な組織に移行する(Strube et al., 2013). 幼虫は組織内に長期間とどまり, 発育はしないとされている.

トキソカラ属回虫の移行経路および幼虫の組織分布には動物種差があるとされている(Strube et al., 2013). トキソカラ属回虫幼虫の待機宿主での体内移行に関しては, 犬回虫および猫回虫の報告が比較的多く, 犬回虫ではマウス, ラットにおいて幼虫が全身型移行を行い, 主

に脳や筋肉に分布し，ラットでは肝臓にも分布し(Fan et al., 1998; dos Santos et al., 2017)，マウスにおいてはその分布に系統による差異があることが報告されている(Epe et al., 1994; Hamilton et al., 2006)．また同虫はニワトリ，ブタ，キツネにおいても全身型移行を行うことがわかっている(Taira et al., 2003a,b; Saeed et al., 2005)．猫回虫ではマウス，ラット，ニワトリにおいて全身型移行を行い，幼虫が主に筋肉に分布し，長期間高い感染性を維持する(Dubey, 1968; Taira et al., 2011,2013a,b)．また同虫はスナネズミにおいても全身型移行を行う(Zibaei et al., 2010)．その他のトキシカラ属回虫幼虫では，牛回虫はマウスにおいて全身型移行を行い(Warren, 1971; Moyo, 2004)，狸回虫はマウスにおいて全身型移行を行い，主に幼虫が肝臓に分布すると報告されている(Okamoto, 1986)．

トキシカラ属回虫のうち，*T. canis*，*T. cati*，*T. pteropodis* の3種が人獣共通感染症として報告されているが(Moorhouse, 1982; Mitsugi et al., 1988; Morimatsu et al., 2006)，*T. pteropodis* の報告は感染疑いのある1症例のみの報告であり，分子生物学的な同定がされていない(Ziegler and Macpherson, 2019)．ヒトの抗トキシカラ抗体陽性率は高く，世界全体では約19.0%であると報告されている(Rostami et al., 2019)．先進国のヒトの抗体陽性率は3-22%，発展途上国では10-92%で，世界に広く蔓延している寄生虫病の1つである(Ziegler and Macpherson, 2019)．ヒトのトキシカラ症は，その症状から内臓幼虫移行症，眼幼虫移行症，神経トキシカラ症，不顕性トキシカラ症の4つの病型に分けられる(Pawlowski, 2001)．

ヒトへの感染経路には含仔虫卵の経口摂取および第3期幼虫が感染した待機宿主の摂取が考えられる(Strube et al., 2013)．近年では伴侶動物という概念の普及からヒトと動物が密接に関係して生活する機会が多くなり，人獣共通感染症のリスクの増加が懸念されている(Beugnet et al., 2014; de Souza et al., 2017)．実際に，公園の砂場の砂からトキシカラ属回虫卵が検出され(Macuhova et al., 2013)，ペットの被毛からもトキシカラ属回虫卵が検出されている(Öge et al., 2014)．ヒトにおける含仔虫卵の直接的な経口摂取は，汚染された土壌からの偶発的な摂取，虫卵が付着した野菜や果物などを摂取することによると考えられる(Ismail, 2016; Amoah et al., 2018; Kłapeć and Borecka, 2012)．また，第3期幼虫が寄生した食肉の生食や加熱不十分調理の摂取もトキシカラ症の原因となることが示唆されており(Beaver, 1956;

Strube et al., 2013), 食肉が原因と考えられるトキソカラ症の症例が報告されている(Ito et al., 1986; Nagakura et al., 1989; Salem and Schantz, 1992; Morimatsu et al., 2006).

ヒトのトキソカラ症のリスクは伴侶動物, 経済動物および野生動物などの終宿主の腸内成虫による環境の虫卵汚染, 待機宿主および終宿主組織内の幼虫の存在が考えられる. ヒトのトキソカラ症の予防対策を検討するにあたり, トキソカラ属回虫の終宿主や待機宿主における生態, すなわち, 体内移行動態や組織に寄生する幼虫の感染力を把握することおよび経済動物における感染実態の把握が重要と考える.

本研究は, 第 1 章で猫回虫幼虫の待機宿主における胎盤感染の頻度と組織分布における妊娠の影響について調べ, 第 2 章では待機宿主である野外の経済動物の組織内に実際に寄生している線虫の検出を試みた. 第 3 章では第 2 章で検出された狸回虫について, 待機宿主における幼虫の組織分布および組織内幼虫の感染力を評価した.

第 1 章

胎盤感染によるマウス胎仔への猫回虫幼虫の移行
Toxocara cati larval migration to mouse fetuses through
transplacental infection

1. 緒論

猫回虫 *Toxocara cati* は、世界的に広く分布し、猫の小腸に寄生する比較的普通にみられる内部寄生虫である。幼猫における感染率は、成猫と比較して概して高率であるが、成猫においても少数匹による慢性的な感染が認められる (Mircean et al., 2010; Barutzki and Schaper, 2013; Capári et al., 2013)。猫回虫は犬回虫 *Toxocara canis* と同じくヒトのトキソカラ症の原因となることが知られている (Shimokawa et al., 1982; Fisher, 2003; Akao and Ohta, 2007)。ヒトのトキソカラ症は先進国でもしばしば見られる人獣共通感染症の一つである (Rostami et al., 2019)。近年、「伴侶動物」という概念の普及からヒトと動物が密接に関係して生活をする機会が増えてきていることで、伴侶動物を介した人獣共通感染症のリスクが危惧されている (Beugnet et al., 2014; de Souza et al., 2017)。

トキソカラ属回虫の垂直感染については経乳感染と胎盤感染が知られている。経乳感染は犬回虫、牛回虫 *Toxocara vitulorum*、猫回虫でそれぞれ終宿主において実証されている (Stone and Girardeau, 1967; Warren, 1969; Swerczek et al., 1971)。猫回虫の終宿主である猫への主な感染経路は、1. 水平感染：含仔虫卵の経口摂取および猫回虫幼虫が感染した待機宿主の捕食と 2. 垂直感染：経乳感染であると考えられてきた (Dubinský et al., 1995)。しかしながら、Coati et al. (2004) は猫回虫実験感染猫に保育された仔猫から幼虫がほとんど検出されなかったと報告し、経乳感染は猫回虫の感染経路として一般的ではないと結論づけた。待機宿主であるマウスにおける猫回虫実験感染における経乳感染の評価については Schön and Stoye (1986) が、出産 0-160 日前の雌マウス 10 匹に 1,000 個の *T. mystax* 含仔虫卵を投与し、2 週間保育させた場合、マウスの新生仔への猫回虫の経乳感染が成立したと報告している。

トキソカラ属回虫の胎盤感染については、犬回虫が終宿主である犬において実証され (Shillinger and Carm, 1923; Augustine 1927)、牛回虫が終宿主である牛においてその成立が示唆されている (Herlich and Porter, 1953)。一方、猫回虫では終宿主である猫では胎盤感染は起こらないと考えられてきた。猫回虫の胎盤感染については、Sprent (1956)、Swerczek et al. (1971) および Coati et al. (2004) は自然感染猫の胎仔から猫回虫幼虫は検出されなかったと報告し、否定している。ま

た，猫回虫実験感染猫においては，Sprent (1956)が合計 30,000 個の猫回虫含仔虫卵を妊娠後期の母猫に投与し，仔猫からは幼虫が検出されなかったと報告している．また，Swerczek et al. (1971)は 300-2,000 個の猫回虫含仔虫卵を分娩前 2-56 日間投与した 7 匹の母猫から，帝王切開および自然分娩で得られた 14 匹の仔猫において幼虫は検出されなかったと報告している．さらに，Coati et al. (2004)は合計 14,000-24,000 個の猫回虫含仔虫卵を妊娠後期に投与した母猫から得られた生後 3 日齢の仔猫から幼虫は検出されなかったと報告している．このように，終宿主の猫においては猫回虫の垂直感染について，経乳感染は成立するものの頻度は少なく，胎盤感染は成立しないと考えられてきた．

一方，待機宿主であるマウスのトキシカラ属回虫実験感染における胎盤感染は過去に犬回虫および猫回虫で実証されている(Lee et al., 1976; Oshima, 1986; Schön and Stoye, 1986)．しかしながら，猫回虫の胎盤感染の情報は極めて少なく，不詳である．Schön and Stoye (1986)は，母マウス 1 匹の同腹胎仔を全て合わせて評価しており，個々の胎仔および妊娠による母マウスの子宮や胎盤の影響の評価は行なわれていなかった．

本研究は，待機宿主における猫回虫幼虫の子宮内感染を調べることを目的とし，妊娠マウスに猫回虫含仔虫卵を投与し，幼虫の組織分布と胎仔への移行について調べた．

2. 材料と方法

供試した虫卵および動物

2.1 猫回虫含仔虫卵

猫回虫の虫卵は猫回虫自然感染猫の糞便から浮遊法を用いて採集した．虫卵は 1%ホルマリン溶液中で室温 25℃下で 4 週間培養を行なった(Taira et al., 2013)．虫卵は投与まで 6 ヶ月間 10℃下で保存した．虫卵の幼虫形成率は 67.0%であった．虫卵懸濁液はホルマリンを取り除くために投与前に水道水を用いて 2 回洗浄を行なった．

2.2 マウス

実験に用いたマウスは ICR 系統マウス(Outbred) 9 週齢の妊娠 3 日目の雌(n=7)を用いた．幼虫の体内移行動態における妊娠の影響を調べる対照として ICR 系統マウス 9 週齢の非妊娠雌(n=7)を用いた．これらのマウスは実験動物生産供給業者(日本エスエルシー株式会社，静岡)から購入した．マウスは不断不休の自由飲水および採餌で管理し，食餌はマウス・ラット・ハムスター用 CLEA Rodent Diet CE-2(日本クレア株式会社，東京)を与えた．実験動物の取り扱いは，麻布大学動物実験指針に則り，適切に行った．

2.3 実験デザイン

妊娠マウスの妊娠 4 日目および 9 日目に猫回虫含仔虫卵約 5,000 個($5,004.8 \pm 484.42$ SD, 20 μ L の虫卵懸濁液を 10 回計数した)を含んだ虫卵懸濁液約 0.4ml をゾンデで胃内投与した．非妊娠マウスも妊娠マウスと同じ条件で同数の猫回虫含仔虫卵を投与した．

すべてのマウスは初回の猫回虫含仔虫卵投与から 12 日後(妊娠マウスは妊娠 16 日目)にイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安落殺し，剖検した．

Schön and Stoye (1986)の報告により，マウスの胎仔に移行する幼虫数と相対的分布が低いことが推定されたため，マウス 1 匹あたり，合計約 10,000 個の猫回虫含仔虫卵を投与することとした．またマウスへの猫回虫含仔虫卵の投与時期と剖検時期は，Schön and Stoye (1986)の報告および犬回虫のマウスでの胎盤感染の報告(Lee et al., 1976)を基に決定した．

2.4 剖検

皮膚，尾，手足の先端と鼻の先端を除く骨格筋等，胃腸を除く内臓と子宮，妊娠マウスの場合は胎盤と胎仔を個別に分離した．これらの組織は塩酸ペプシン消化法を行うため，外科剪刀または市販のフードプロセッサー(MK-K48P，パナソニック，大阪)を用いて細切した．胎盤と臍帯は組織を2枚のスライドガラスの間に圧平し，光学顕微鏡(BX-50，オリンパス株式会社，東京)で観察して幼虫検索を行った．

羊水または血液による胎仔の汚染を防ぐため，すべての胎仔は個別に生理食塩水(0.83%NaCl 溶液)を用いて十分に洗浄した．採集した羊水および胎仔洗浄後の生理食塩水の沈渣を光学顕微鏡で観察して幼虫検索を行った．

2.5 人工消化と幼虫検索

組織からの幼虫検索は塩酸ペプシン消化法を用い，Taira et al. (2013b)によって報告された方法を改変して行った．細切した組織を37℃の塩酸ペプシン溶液 [1%HCl(37%)，1%ペプシン(1：10,000 N.F.)を水道水に溶解した溶液] を用いて37℃で1.5時間，個別に人工消化を行った．組織(g)と消化液(mL)の比率は約1:10で，胎仔組織はキャップ付き13.5mLガラス瓶に入れ，シェーカー(シェーカーSR-1，アズワン株式会社，大阪)で震盪混和を行い，他の組織は500mLガラスビーカーに入れ，スターラー(KSI-12，アズワン株式会社，大阪)を使用して絶えず攪拌しながら消化を行った．消化後，37℃の生理食塩水を満載し，37℃で1時間静置して幼虫を沈殿させた．上清を除去し，再び37℃の生理食塩水を満載し，さらに1時間静置した．静置後，沈渣を60メッシュの金網でろ過し，60 mLのガラス製の遠心分離管に移し，30分間静置した．上清を除去し，プラスチック製の長方形(外寸：6.8cm×3.9cm×1.5cm)の容器(スチロール角型ケース2型，アズワン株式会社，大阪)に移し，光学顕微鏡下で観察して幼虫検索を行った．

2.6 分子生物学的同定

NucleoSpin®TissueXS (タカラバイオ株式会社，滋賀)を用いて，胎仔から回収された幼虫のDNAを抽出し，幼虫の種同定に用いた．抽出されたDNAの5.8SrDNAおよびITS-2rDNA領域は，フォワードプライマーとして5'-CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC-3'(LC1)，リバーズプ

ライマーとして 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'(HC2)を使用し，PCR によって増幅した(Navajas et al., 1992). PCR 反応は，98℃で 1 分間，続いて 98℃で 10 秒間，55℃で 30 秒間，72℃で 1 分間を 30 サイクルで行い，72℃で 10 分間の最終伸長反応を行った．PCR 産物を 2.0%アガロースゲルで電気泳動し，エチジウムブロマイド溶液で染色し，トランスイルミネーター(NTM-40, UVP 株式会社, USA)で可視化して標的領域の増幅を確認した．

増幅された DNA 配列をダイレクトシーケンス法(マクロジェンジャパン株式会社, 京都)により分析した．シーケンス反応で用いたプライマーは PCR 増幅で使用したプライマーと同じものを使用した．MEGA-X(Molecular Evolutionary Genetics Analysis-X)および Clustal W(マルチプルアラインメントプログラム)を使用し，複製された配列から単一の塩基配列を作成した．最終的に BLAST(National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine)を使用して BLAST 検索を行い，種同定を行った．

2.7 統計解析

妊娠マウスと非妊娠マウスについて，骨格筋等，内臓器，子宮から回収された幼虫数および回収された幼虫の総数をマンホイットニーU 検定で有意水準 5%($P < 0.05$)の両側検定を行った．分析は統計プログラム Statcel 4(OMS 出版, 東京)を使用した．

3. 結果

研究期間を通して全てのマウスで猫回虫感染によると考えられる臨床徴候の変化や行動の変化は認められなかった。剖検時，猫回虫含仔虫卵を投与した全てのマウスの肺に幼虫が移行した際に出来たと思われる点状出血が認められた。

母マウスから回収された猫回虫幼虫数およびその組織分布：

マウス 1 匹あたり合計 10,000 個の猫回虫含仔虫卵を投与した母マウスにおける猫回虫幼虫の組織分布と胎仔から回収された幼虫数を表 1 に示した。幼虫はすべてのマウスから回収された。ほとんどの幼虫は骨格筋等(平均 $1,233.1 \pm 312.9$ SD)に認められ，次いで内臓(平均 41.3 ± 20.1 SD)，胎盤(平均 3.7 ± 6.3 SD)，子宮(平均 1.4 ± 2.0 SD)の順に多く認められた。また幼虫は全ての母マウスの胎仔(平均 28.0 ± 16.0 SD)に認められた。子宮または一腹の胎盤から回収された幼虫数の範囲(最小-最大)はそれぞれ 1-6 匹と 1-18 匹であった。母マウスおよび胎仔から回収された幼虫の総数は平均 $1,307.6 \pm 345.6$ SD であった。

猫回虫含仔虫卵を同じ条件で投与した 7 匹の非妊娠雌マウスの幼虫の組織分布は，妊娠マウスの分布と同様の分布と回収幼虫数を示した。骨格筋等，内臓，子宮，および総幼虫の平均幼虫数 \pm SD はそれぞれ $1,267.7 \pm 465.7$ ， 98.6 ± 103.7 ， 2.0 ± 0.5 および $1,368.3 \pm 548.3$ であった。妊娠マウスと非妊娠マウスから回収された幼虫数に統計学的に差異は認められなかった(総幼虫数，骨格筋等，内臓および子宮の P 値はそれぞれ $P=0.95$ ， $P=0.95$ ， $P=0.48$ および $P=0.10$ であった)。

各胎仔から回収された猫回虫幼虫数：

各胎仔から回収された猫回虫幼虫数を表 2 に示した。7 匹の妊娠マウスから合計 103 匹の胎仔が得られた。103 匹の胎仔のうち 71.8%にあたる 74 匹に幼虫の感染が認められた。感染胎仔から合計 196 匹の幼虫が回収され，感染胎仔 1 匹あたり平均 2.6 匹(最小-最大：1-9)の幼虫が回収された。胎仔から回収された幼虫を図 1 に示した。

検査を行った 103 個の胎盤のうち，17 個に幼虫の感染が認められ，合計 26 匹(最小-最大：1-4)の幼虫が回収された。幼虫が感染した胎盤 1 個あたり平均 $1.5 \pm$ SD 1.0 匹の幼虫が認められた。また羊水中から幼虫が 1 匹回収された。一方，臍帯および胎仔の洗浄に使用した生理

食塩水からは幼虫は回収されなかった.

胎仔から回収した幼虫の分子生物学的同定：

猫回虫含仔虫卵を投与した母マウスから得られた胎仔から回収された幼虫の 5.8SrDNA および ITS-2rDNA 領域の部分配列(488bp)の BLAST 検索は，猫回虫の配列(GenBank Accession Number KY003092; He et al.2018)と 100%の相同性を示した.

4. 考察

本研究では母マウスから回収された猫回虫幼虫のほとんどは骨格筋等に分布していた．この結果はマウスで報告された過去の研究結果と一致した(Cardillo et al., 2009; Janecek et al., 2014)．妊娠および非妊娠にかかわらず，母マウス(雌マウス)体内の猫回虫幼虫分布に統計学的に差異は認められなかった．さらに，妊娠マウスおよび非妊娠マウスの両方の子宮から幼虫が回収された．この結果はマウスにおける猫回虫の移行が宿主の妊娠による影響を受けないことを示唆している．Oshima (1961)と Lee et al. (1976) は妊娠マウスに犬回虫含仔虫卵を投与した研究で，母マウスの子宮から少数の幼虫を回収したと報告している．一方，Lee et al. (1976)は犬回虫含仔虫卵を 1,000 個投与した非妊娠マウスの子宮から幼虫は回収されなかったと報告している．他方，Lee and Min (1974)は，コルチゾンの投与下で犬回虫含仔虫卵 1,000 個投与した非妊娠マウスの子宮から少数の幼虫を回収したと報告している．マウスにおける犬回虫の胎盤感染は，ステロイドホルモンなどのホルモンもしくは免疫抑制の影響を受けることが示唆されている．本研究の結果からマウスにおける猫回虫の子宮への移行は犬回虫とは異なり、妊娠の影響を受けないと推測された．しかしながら，本研究の投与虫卵数は犬回虫の研究と比較して多いため，子宮へ移行した幼虫数に関しては投与数の違いを考慮する必要があると思われる．

本研究では猫回虫幼虫はすべての母マウスの胎仔から回収された．これは本研究で認められたマウスにおける猫回虫の子宮内感染が偶発的な移行ではないことを強く示唆しており，Schön and Stoye (1986)が *T. mystax* で報告した結果を裏付けるものである．猫回虫幼虫は 103 匹の胎仔のうちに 71.8%あたる 74 匹で回収され，感染胎仔 1 匹あたり平均 2.6 匹の幼虫が認められた．この結果は猫回虫幼虫がマウス胎仔へ容易に感染し，子宮内の特定の胎仔に起こる事象ではなく，子宮内の全ての個々の胎仔で発生しうる事象である可能性が高いことを示している．羊水中から 1 匹の幼虫が回収されたが，胎仔を洗浄した生理食塩水からは幼虫は回収されなかった．一方，103 個の胎盤のうち 17 個の胎盤から 26 匹の幼虫が回収された．この結果は猫回虫幼虫のマウス胎仔への感染が胎盤を経由した感染であることを示唆している．本研究では、妊娠 4 日目および/または 9 日目に猫回虫幼虫の子宮内

感染が観察された．Schön and Stoye (1986)は，分娩の 5 日前と 10 日前に *T. mystax* 含仔虫卵 1,000 個を 10 匹の母マウスに投与し，帝王切開で得られた同腹子からそれぞれ 12.1 匹と 5.4 匹の幼虫を回収したと報告し，マウスにおける猫回虫の子宮内感染は妊娠期のみに起こると結論づけている．また Lee et al. (1976) も犬回虫幼虫は妊娠期間にのみマウスの胎盤を介して感染する可能性があると報告している．本研究では，猫回虫幼虫のマウス胎仔に感染する時期は 1 回目または 2 回目の投与の区別がされていないため，不詳のままであるが，他の報告と同様に猫回虫幼虫のマウスにおける胎仔への子宮内感染は妊娠期の猫回虫の暴露で成立した．

本研究では猫回虫幼虫は母マウスの子宮分布に妊娠の影響を受けなかったため，胎仔への移行も妊娠の影響を受けなかった可能性が高い．すなわち，マウスにおける胎仔への猫回虫幼虫の子宮内感染は，全身型移行の初期段階に伴って起こることが示唆された．犬における犬回虫の垂直感染は，妊娠関連ホルモンによる組織内休眠幼虫の再活性化と子宮への血流増加の結果として起こると考えられている (Lewert, 1958; Oshima, 1961; Lee et al., 1976)．しかしながら，Lee et al. (1976) は，犬回虫がマウスにおいて胎盤感染をする可能性があるのは妊娠期のみであると報告している．他方，猫回虫も猫においては犬回虫と同様に妊娠関連のホルモンと乳腺への血流の増加が原因で，乳腺での幼虫の集合が起こると考えられていた (Swerczek et al., 1971)．しかしながら，Coati et al. (2004)は，8 匹の母猫とその仔猫における猫回虫の自然および実験感染の研究で，成猫において組織内休眠幼虫の再活性化の証拠はないと結論付けている．一方，Schön and Stoye (1986) は，マウスにおける猫回虫の経乳感染は，急性感染と休眠幼虫の再活性化の両方によって引き起こされると報告している．本研究では妊娠マウスと非妊娠マウスにおける幼虫の組織分布には差が認められなかったことから，妊娠による休眠幼虫の再活性化は，猫回虫のマウスにおける胎盤感染に関与しないと思われる．そのため，猫回虫幼虫の垂直感染の成立条件は今後さらなる詳細な研究が必要であると考える．

猫回虫幼虫は，待機宿主であるマウスでは全身型移行を行う (Dubey, 1968; Cardillo et al., 2009;). 一方，犬回虫幼虫は，犬とマウスの両方で胎仔に移行することが報告されている (Shillinger and Carm, 1923; Augustine 1927; Oshima, 1961; Lee et al., 1976)．本研究では猫回虫幼虫

もマウスにおいて胎仔へ移行することが明らかとなった．犬と猫の胎盤の構造はほぼ同じであるため，猫回虫も猫において胎仔に移行する可能性があるかもしれない．しかしながら，犬回虫と猫回虫は同属ではあるが，幼虫の全身型移行の組織分布にも種差が認められる．さらに，猫とマウスの胎盤構造は大きく異なるため，この仮説を証明するには猫を実験モデルとしたさらなる研究が必要である．

結論として，本研究により，マウスにおける猫回虫幼虫の子宮内感染はマウスの妊娠期の猫回虫含仔虫卵の曝露後に成立し，幼虫の胎仔への感染は胎盤を介している可能性が高いことが示唆された．

第 2 章

平飼い養鶏場の採卵鶏の筋肉組織からの猫回虫および狸回虫
幼虫の検出

Detection of larvae of *Toxocara cati* and *Toxocara tanuki* from
the muscles of free-ranging layer chickens

1. 緒論

ヒトのトキソカラ症は、世界で蔓延している人獣共通感染症である (Rostami et al., 2019). トキソカラ症は主に犬回虫と猫回虫の幼虫によって引き起こされ、犬回虫と猫回虫の成虫はそれぞれイヌ科とネコ科の動物の小腸に寄生する (Azizi et al., 2007; Yoon et al., 2009). トキソカラ属回虫幼虫のヒトへの感染経路は、含仔虫卵の直接摂取またはトキソカラ属回虫幼虫に感染した待機宿主の摂取が考えられている (Despommier, 2003; Hoffmeister et al., 2007). 虫卵の摂取によるヒトへの感染はトキソカラ属回虫卵で汚染されたペット被毛、野菜あるいは果物および公園の砂場の砂や土壌の虫卵の経口摂取によるものと報告されている (Kłapeć and Borecka, 2012; Macuhova et al., 2013; Öge et al., 2014). 待機宿主内の幼虫の摂取によるヒトへの感染は、トキソカラ属回虫幼虫に汚染された家畜の肉または内臓の生食または加熱不十分調理の摂食によって起こるとされている (Rubinsky-Elefant et al., 2010). ヒトへの感染事例は今までにアヒル (Hoffmeister et al., 2007), ニワトリ (Nagakura et al., 1989; Morimatsu et al., 2006), ダチョウ (Noh et al., 2012), ブタ (Stürchler et al., 1990), ヒツジ (Salem and Schantz, 1992), ウシ (Yoshikawa et al., 2010) などで、主に肝臓の摂取が原因であると報告されているが、ほとんどの報告では、実際に動物組織から幼虫は検出されておらず、感染源は特定されていない.

ヒトの抗トキソカラ抗体陽性率は約 19.0%と報告されている (Rostami et al., 2019). しかし、待機宿主における抗体陽性率に関する報告はほとんどない. Campos-da-Silva et al. (2015)は自然感染したニワトリの 12.7%がトキソカラ属回虫に対して非常に高い抗体価を有していると報告しているが、トキソカラ症の血清学的診断は、他の線虫と交差反応があることから、確定的なトキソカラ感染の診断にはならないことも報告している (Jacquier et al., 1991; Özkoç et al., 2012).

ニワトリにおけるトキソカラ属回虫の感染実験については、犬回虫は幼虫のほとんどが肝臓に移行し、そこに留まり、 (Galvin, 1964; Dutra et al., 2014; Taira et al., 2003), 猫回虫は幼虫ではほとんどが筋肉に移行し、そこに留まる (Azizi et al., 2007; Oryan et al., 2010; Taira et al., 2011). また Taira et al. (2011)はニワトリの筋肉組織内の猫回虫幼虫が、宿主の生涯を通じて感染性を維持することを報告しており、さらに Taira et al. (2012)はニワトリの筋肉組織内の猫回虫幼虫は、4℃で

28 日間保存した後も高い感染力を維持すると報告している．

動物組織内からのトキシカラ属回虫幼虫の実際の検出は，Marucci et al. (2013)が 6 羽の肉食性鳥類および 1 頭の家畜のブタの筋肉組織から猫回虫幼虫を，1 匹のアナグマの筋肉組織から犬回虫幼虫を検出している．また Zibaei et al. (2017)は 33 羽のブロイラー鶏から実際に犬回虫と猫回虫の幼虫を消化法で検出し，その感染率は合わせて 15.2%であったと報告している．

本研究の目的を，養鶏場のニワトリにおけるトキシカラ属回虫幼虫の寄生率を調べることにした．そこで，農場周囲に野良猫が時々目撃されている平飼いの養鶏場一戸について，鶏における線虫幼虫の感染の有無の調査を行なった．

2. 材料と方法

2.1 供試ニワトリと剖検

ニワトリは、神奈川県平飼いで放飼いの養鶏場一戸から購入した。この養鶏場では、野良猫が農場の周りで時々確認されていた。

イソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安落殺した約 1.5 歳齢の 50 羽の廃鶏(レイヤー烏骨鶏)から肝臓、胸肉およびもも肉を個別に分離した。これらの組織は、塩酸ペプシン消化法を行うため、外科剪刀または市販のフードプロセッサー(MK-K48P, パナソニック, 大阪)を用いて約 5mm³未満の小片に細切した。

2.2 人工消化と幼虫検索

組織からの幼虫検索は塩酸ペプシン消化法を用い, Taira et al. (2013b)によって報告された方法を改変して行った。細切した組織を 37°Cの塩酸ペプシン溶液 [1% HCl (37%), 1%ペプシン(1 : 10,000 N.F.)を水道水に溶解した溶液] を用いて 37°Cで 1.5 時間, 個別に人工消化を行った。組織(g)と消化液(mL)の比率は約 1:10 で, 組織は 500mL ガラスビーカーに入れ, スターラー(KSI-12, アズワン株式会社, 大阪)を使用して絶えず攪拌しながら消化を行った。消化後, 37°Cの生理食塩水を満載し, 37°Cで 1 時間静置して幼虫を沈殿させた。上清を除去し, 再び 37°Cの生理食塩水を満載し, さらに 1 時間静置した。静置後, 沈渣を 60 メッシュの金網でろ過し, 60 mL のガラス製の遠心分離管に移し, 40 分間静置した。上清を除去し, プラスチック製の長方形(外寸: 6.8cm×3.9cm×1.5cm)の容器(スチロール角型ケース 2 型, アズワン株式会社, 大阪)に移し, 光学顕微鏡下で観察して幼虫検索を行った。

2.3 分子生物学的同定

NucleoSpin®TissueXS(タカラバイオ株式会社, 滋賀)を用いて, ニワトリ組織から検出された線虫幼虫の DNA を抽出し, 幼虫の種同定に用いた。抽出された DNA の 5.8SrDNA および ITS-2rDNA 領域は, フォワードプライマーとして 5'-CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC-3'(LC1), リバースプライマーとして 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'(HC2)を使用し, PCR によって増幅した(Navajas et al., 1992)。PCR 反応は, 98°Cで 1 分間, 続いて 98°Cで 10 秒間, 55°Cで 30 秒間, 72°C

で 1 分間を 30 サイクルで行い，72℃で 10 分間の最終伸長反応を行った．PCR 産物を 2.0%アガロースゲルで電気泳動し，エチジウムブロマイド溶液で染色し，トランスイルミネーター(NTM-40，UVP 株式会社，USA)で可視化して標的領域の増幅を確認した．

増幅された DNA 配列をダイレクトシーケンス法(マクロジェンジャパン株式会社，京都)により分析した．シーケンス反応で用いたプライマーは PCR 増幅で使用したプライマーと同じものを使用した．MEGA-X(Molecular Evolutionary Genetics Analysis-X)および Clustal W(マルチプルアラインメントプログラム)を使用し，複製された配列から単一の塩基配列を作成した．最終的に BLAST(National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine)を使用して BLAST 検索を行い，種同定を行った．

2.4 系統解析

系統解析は，MEGA-X(Molecular Evolutionary Genetics Analysis-X)を用いて行った．狸回虫 *T. tanuki* (GenBank Accession Number : KF811024, AB027152, AB245965)，猫回虫 *T. cati* (KY003090, KJ777179, MT341314) 犬回虫 *T. canis* (AB743617)，牛回虫 *T. vitulorum* (EU189085)，*T. malaysiensis* (AM231609)，豚回虫 *Ascaris suum* (KY964447)，および人回虫 *A. lumbricoides* (AB571301)の 5.8SrDNA および ITS-2rDNA 領域は，系統発生解析の比較のために GenBank からダウンロードした．豚回虫 *A.suum* と人回虫 *A.lumbricoides* は比較のための外群として使用した．分子系統樹推定には近隣結合法 (NJ 法 : neighbor-joining method) と最大節約法 (MP 法 : maximum parsimony method) を用いた．作成した系統樹はブートストラップテストが行われ，ブートストラップ値は 1,000 回で設定した．

3. 結果

50羽のニワトリのうち2羽(4.0%)から線虫幼虫が検出された。1匹の線虫幼虫は胸肉から検出され、別の1匹は別のニワトリのもも肉から検出された(図2および3)。肝臓からは幼虫は検出されなかった。

線虫幼虫の分子生物学的同定：

胸肉およびもも肉から回収された幼虫の5.8SrDNAおよびITS-2領域の部分配列(それぞれ377bpと399bp)の一部のBLAST検索は、それぞれ、狸回虫(KF811024)と98.4%の相同性および猫回虫(KY003092; He et al.2018)と100%の相同性を示した。

系統解析：

胸肉およびもも肉から回収された線虫幼虫の系統解析は、5.8SrDNAおよびITS-2領域の部分配列(それぞれ164bpおよび281bp)のヌクレオチド配列に基づいて系統樹を作成した。系統樹はNJ法とMP法で作成した。NJ法およびMP法で作成した系統樹は共に同じトポロジーを示した。NJ法で作成された系統樹を図4および5に示した。これらの系統発生解析から、胸肉から検出された線虫幼虫は狸回虫と同定し、もも肉から検出された線虫幼虫は猫回虫と同定した。

4. 考察

本研究は、トキソカラ属回虫幼虫が養鶏場のニワトリに自然感染することを明らかにし、鶏肉がヒトのトキソカラ症の原因となるとする報告を裏付けるものとなった(Nagakura et al., 1989; Taira et al., 2004; Morimatsu et al., 2006).

哺乳類と鳥類はトキソカラ属回虫の待機宿主となり、実際にトキソカラ属回虫幼虫が野生動物と家畜から検出されたと報告されている(Marucci et al., 2013; Zibaei et al., 2017). 本研究ではトキソカラ属回虫幼虫を野外のニワトリ組織から検出し、それぞれもも肉から検出された線虫幼虫は猫回虫、胸肉から検出された線虫幼虫は狸回虫と同定された。ニワトリからの狸回虫幼虫の検出は、初の報告である。

狸回虫、犬回虫、猫回虫の成虫の形態的な違いとしては、猫回虫は一对の広い頸翼があるのに対し、狸回虫と犬回虫是一对の狭い頸翼をもつ。加えて雄の交接刺の長さは狸回虫が 3.00mm 以上であるのに対し、犬回虫と猫回虫の雄の交接刺の長さはそれぞれ 0.91-0.97 mm および 1.705-1.902 mm である。また犬回虫は前胃を持つが、狸回虫は前胃がないことが挙げられる(Alexander et al., 2018). しかしながら、トキソカラ属回虫幼虫の形態は類似しており、形態で同定することはできない(Mikaeili et al., 2017).

本研究では、ニワトリにおけるトキソカラ属回虫幼虫の感染率は 4.0%であった。他方、国内のヒトにおける抗トキソカラ抗体陽性率は 1.6%であると報告されている(Akao and Ohta, 2007). 同様にイランのブロイラー鶏におけるトキソカラ属回虫幼虫の感染率は 15.2%であり(Zibaei et al., 2017), イランにおけるヒトの抗トキソカラ抗体陽性率は 9.3%であると報告されている(Eslahi et al., 2020). ニワトリまたは他の家畜の幼虫の寄生率に関するデータはこれまで限定的であったが、ヒトの抗トキソカラ抗体の血清陽性率と家畜のトキソカラ属回虫幼虫の寄生率との関係を調査することは興味深い。従来の血清学的検査は、一般的に、各種寄生虫の交差反応による偽陽性がおこることから、実際の感染状況を完全に反映することはできないが(Jacquier et al., 1991; Özkoç et al., 2012), ニワトリのトキソカラ属回虫に対する抗体陽性率は一般的に高いと報告されている(Campos-da-Silva et al., 2015; de Oliveira et al., 2018; von Söhsten et al., 2017). したがって、家畜におけるトキソカラ属回虫を含む線虫幼虫の実際の感染状況を明ら

かにし，その線虫幼虫の種を特定することは，ヒトのトキソカラ症を予防するため重要と考える．

結論として，本研究により，自然感染したニワトリ組織から猫回虫および狸回虫の幼虫が検出され，鶏肉がヒトのトキソカラ症の原因となることが示唆された．また，鳥類の筋肉組織から世界で初めて狸回虫幼虫を検出し，鳥類が狸回虫の待機宿主になることが明らかとなった．

第 3 章

マウスにおける狸回虫の組織分布および感染力

Toxocara tanuki larval distribution in mice and the infectivity of
tissue larvae

1. 緒論

タヌキは日本全国に広く分布しており，ユーラシア大陸の東海岸にも生息している(Pitra et al., 2010). 近年，ヨーロッパに移入され，人獣共通感染症の媒介動物として注目されている(Al-Sabi et al., 2013; Alvarado-Rybak et al., 2016; Laurimaa et al., 2016). 都市開発が進むにつれて，ヒトの生活環境とタヌキの生息地域が重なってきており，タヌキは日本では東京を含む都市部でも生息が確認されている．狸回虫はタヌキの小腸に寄生する線虫である．日本を含む東アジアでは，都市近郊に生息するタヌキからも頻繁に検出され，アライグマからの検出報告もある(Yagi et al., 1999; Sato et al., 1999, 2006; Alexander et al., 2018).

トキソカラ属回虫はヒトのトキソカラ症の原因となる(Shimokawa et al., 1982; Fisher, 2003; Akao and Ohta, 2007). 近年，日本ではジビエが注目されており，野生動物の食肉の喫食機会が増加し，野生動物の組織に寄生する人獣共通寄生虫が注目されている(Kadohira et al., 2019). 動物組織の生食または加熱不十分調理が原因とされるヒトのトキソカラ症はアヒル(Hoffmeister et al., 2007)，ニワトリ(Nagakura et al., 1989; Morimatsu et al., 2006)，ダチョウ(Noh et al., 2012)，ブタ(Stürchler et al., 1990)，ヒツジ(Salem and Schantz, 1992)，ウシ(Yoshikawa et al., 2010)などで報告されている．さらに，犬回虫や猫回虫などのトキソカラ属回虫の含仔虫卵が付着した土壌，野菜および果物などを介してヒトが感染する可能性も示唆されている(Kłapeć and Borecka, 2012; Bastien et al., 2019; Bekele and Shumbej, 2019). また，タヌキは排便を特定の場所に行う「溜め糞」という習性があり(Akihito et al., 2016)，タヌキが狸回虫に感染していた場合，土壌や水源が高濃度に汚染される可能性がある．したがって，ヒトや野生動物が汚染された土壌，水源および植物などからの狸回虫の暴露を受ける可能性は低くない．

狸回虫幼虫がヒトのトキソカラ症の原因となることはわかっていないが，Okamoto (1986) は狸回虫が他のトキソカラ属回虫である犬回虫(Abo-Shehada et al., 1984)，猫回虫(Dubey, 1968)，牛回虫(Moyo, 2004)と同様に待機宿主体内で全身型移行を行うと報告し，狸回虫も他のトキソカラ属回虫と同様にヒトのトキソカラ症の原因となる可能性があるとしている．

体内でのトキシカラ属回虫幼虫の移行と組織分布には種差があることが知られている．犬回虫幼虫は，ニワトリ体内では肝臓に移行し (Taira et al., 2003)，マウス体内では筋肉と脳に多くの幼虫が移行する (Epe et al., 1994; Janecek et al., 2014)．猫回虫については，待機宿主では多くの幼虫が筋肉に移行する (Cardillo et al., 2009; Taira et al., 2011, 2013; Janecek et al., 2014)．狸回虫幼虫のマウスにおける組織分布はニワトリにおける犬回虫の初期段階と類似しており，多くの幼虫は肝臓に分布する (Okamoto, 1986)．

Hamilton et al. (2006) はマウスの系統による犬回虫幼虫の脳への分布に差異があったと報告している．その報告では犬回虫幼虫の脳への分布は C57BL/6 系統マウスよりも BALB/c 系統マウスの方が感受性が高く，より多くの幼虫が回収されている．

狸回虫の待機宿主における実験感染およびマウス系統における組織分布の違いについての情報はほとんどなく，組織内幼虫の感染性についての情報はこれまで報告はない．本研究は狸回虫幼虫のマウス系統による組織分布の差異を調べるために，BALB/c 系統マウスと C57BL/6 系統マウスの 2 系統のマウスに狸回虫含仔虫卵を投与し，幼虫の組織分布の評価を行った．また食肉を介して伝搬する人獣共通感染症のリスク評価の一環として，マウス組織から回収された狸回虫幼虫を別のマウスに投与し，狸回虫幼虫の感染力を評価した．

2. 材料と方法

供試した虫卵および動物

2.1 狸回虫含仔虫卵

狸回虫自然感染タヌキの直腸糞便から浮遊法を用いて採集した．収集した虫卵は 1%ホルマリン溶液中で室温 25℃下で 4 週間培養を行なった(Taira et al., 2013)．虫卵は投与まで 10℃下で保存した．虫卵の幼虫形成率は 92.3%であった．虫卵はホルマリンを取り除くために投与前に水道水を用いて 2 回洗浄を行なった．

2.2 供試マウス

虫卵投与試験には BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウス(Inbred)6 週齢(各系統 n=20)の雄を用いた．幼虫感染率試験には ICR 系統マウス(Outbred) 6 週齢の雄(n=48)を用いた．これらのマウスは実験動物生産供給業者(日本エスエルシー株式会社，静岡)から購入した．マウスは各系統で 1 ケージあたり 5-6 匹のグループにランダムに割り振り，不断不休の自由飲水および採餌で管理し，食餌はマウス・ラット・ハムスター用 CLEA Rodent Diet CE-2(日本クレア株式会社，東京)を与えた．実験動物の取り扱いは，麻布大学動物実験指針に則り，適切に行なった．

2.3 実験デザイン

虫卵投与試験：

BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウスに狸回虫含仔虫卵約 1,000 個を含んだ虫卵懸濁液をゾンデで胃内投与し，投与後 7，31，91 および 182 日にイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安落殺し，剖検した．マウス組織を中枢神経系(CNS=Central nervous system：大脳、小脳、脊髄)，心臓，肺，腎臓，脾臓，肝臓，消化管(胃から大腸)と骨格筋等の 8 つに分類した．組織内の幼虫は塩酸ペプシン消化法を用いて回収した．

幼虫感染率試験：

虫卵投与試験において BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウスの肝臓から回収した幼虫を光学顕微鏡(BX-50，オリンパス株式会社，東京)下で 30 秒間観察し，運動性を評価(20 μ L の虫卵懸濁液を 10 回以

上計数した)した．わずかでも運動性を認めた幼虫を運動性幼虫として幼虫感染率試験の投与幼虫として計数した．幼虫懸濁液約 0.4ml を ICR 系統マウスにゾンデで胃内投与し，

投与後 21 日にイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安落殺し，剖検した．組織内の幼虫は虫卵投与試験と同じ方法を用いて回収し，ICR 系統マウスに投与した幼虫数と ICR 系統マウスから回収された幼虫数の比率を幼虫の感染力として評価した．マウス組織は中枢神経系 (CNS=Central nervus system：大脳、小脳、脊髄)，肝臓，内臓(肝臓を除く内臓器および胃から大腸)，骨格筋等の 4 つに分類した．組織内の幼虫は塩酸ペプシン消化法を用いて回収した．

2.4 人工消化と幼虫検索

虫卵投与試験および幼虫感染率試験ともに，組織からの幼虫検索は塩酸ペプシン消化法を用い，Taira et al. (2013b)によって報告された方法を改変して行った．摘出した各臓器は外科剪刀または市販のフードプロセッサー(MK-K48P，パナソニック，大阪)を用いて個別に細切した．細切した組織を 37℃の塩酸ペプシン溶液 [1% HCl (37%)，1%ペプシン(1：10,000 N.F.)を水道水に溶解した溶液] を用いて 37℃で 1.5 時間，個別に人工消化を行った．組織(g)と消化液(mL)の比率は約 1:10 で，組織は 500mL ガラスビーカーに入れ，スターラー(KSI-12，アズワン株式会社，大阪)を使用して絶えず攪拌しながら消化を行った．消化後，37℃の生理食塩水(0.83% NaCl 溶液)を満載し，37℃で 1 時間静置して幼虫を沈殿させた．上清を除去し，再び 37℃の生理食塩水を満載し，さらに 1 時間静置した．静置後，沈渣を 60 メッシュの金網でろ過し，60 mL のガラス製の遠心分離管に移し，30 分間静置した．上清を除去し，プラスチック製の長方形(外寸：6.8cm×3.9cm×1.5cm)の容器(スチロール角型ケース 2 型，アズワン株式会社，大阪)に移し，光学顕微鏡下で観察して幼虫検索を行った．

中枢神経系は組織を 2 枚のスライドガラスの間に圧平し，光学顕微鏡で観察して幼虫検索を行った．

2.5 分子生物学的同定

NucleoSpin®TissueXS(タカラバイオ株式会社，滋賀)を用いて，BALB/c 系統マウスの肝臓から回収された 182 日齢幼虫を投与した ICR 系統マウスから回収された幼虫の DNA を抽出し，幼虫の種を確

認した．抽出された DNA の 5.8SrDNA および ITS-2rDNA 領域は，フォワードプライマーとして 5'-CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC-3'(LC1)，リバープライマーとして 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'(HC2)を使用し，PCR によって増幅した(Navajas et al., 1992)．PCR 反応は，98℃で 1 分間，続いて 98℃で 10 秒間，55℃で 30 秒間，72℃で 1 分間を 30 サイクルで行い，72℃で 10 分間の最終伸長反応を行った．PCR 産物を 2.0%アガロースゲルで電気泳動し，エチジウムブロマイド溶液で染色し，トランスイルミネーター(NTM-40, UVP 株式会社, USA)で可視化して標的領域の増幅を確認した．

増幅された DNA 配列をダイレクトシーケンス法(マクロジェンジャパン株式会社, 京都)により分析した．シーケンス反応で用いたプライマーは PCR 増幅で使用したプライマーと同じものを使用した．MEGA-X(Molecular Evolutionary Genetics Analysis-X)および Clustal W(マルチプルアラインメントプログラム)を使用し，複製された配列から単一の塩基配列を作成した．最終的に BLAST(National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine)を使用して BLAST 検索を行い，種同定を行った．

2.6 統計解析

二元配置分散分析(2way-ANOVA)を用いて，虫卵投与試験における幼虫の回収総数，肝臓への組織分布および幼虫感染率試験の幼虫の感染力に対する BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウス間と投与後日数による影響の関係を調べた．マウス系統と投与後日数の一方または両方で統計学的な差異が観察された場合は，Tukey-Kramer 検定を用いて事後検定を行った．全ての統計解析は，統計プログラム Statcel 4(OMS 出版，東京)を使用し，95%信頼限界で実施した．

3. 結果

研究期間を通して全てのマウスで狸回虫感染によると考えられる臨床徴候の変化や行動の変化は認められなかった。

虫卵投与試験：

狸回虫含仔虫卵 1,000 個を投与した BALB/c 系統および C57BL/6 系統マウスの組織から回収された狸回虫幼虫の相対的な組織分布を表 3 に示した。虫卵投与 7, 31, 91 および 182 日で BALB/c 系統マウスから回収された幼虫の平均数 \pm SD は、それぞれ 227 ± 65 , 298 ± 124 , 205 ± 75 および 196 ± 100 であった。C57BL/6 系統マウスではそれぞれ 287 ± 25 , 267 ± 54 , 292 ± 17 および 308 ± 81 であった。投与後日数においては、BALB/c 系統マウスと C57BL/6 系統マウスで回収された幼虫数に統計学的に差異は認められなかった($F_{1,3}=1.36$, $P=0.27$)。一方、C57BL/6 系統マウスでは BALB/c 系統マウスよりも多くの幼虫が回収され、統計学的に差異が認められた($F_{1,3}=4.54$, $P=0.04$)。マウス系統と投与後日数の間には統計学的な相互作用は認められなかった($F_{1,3}=0.33$, $P=0.80$)。

両系統のマウスで、ほとんど(>88.7%)の幼虫が肝臓に移行し、虫卵投与後 182 日までそこに留まった。肝臓以外では、消化管および骨格筋等に少数(0.4-7.2%)の幼虫が分布し、腎臓、肺、脾臓、心臓および脳(脊髄からは幼虫は回収されなかった)から回収された幼虫数はより少数であった(0.1-1.9%)。肝臓への幼虫の分布については、マウス系統と投与後日数の間に統計学的な相互作用は認められず($F_{1,3}=0.66$, $P=0.58$)、マウス系統と投与後日数の間で肝臓の幼虫分布に統計学的に差異は認められなかった(マウス系統： $F_{1,3}=0.56$, $P=0.46$, 投与日数： $F_{1,3}=2.80$, $P=0.06$)

幼虫感染率試験：

狸回虫含仔虫卵 1,000 個卵を投与した BALB/c 系統マウスおよび C57BL/6 系統マウスの肝臓から回収された狸回虫幼虫を投与した ICR 系統マウスにおける狸回虫幼虫の組織分布および感染力を表 4 に示した。運動性幼虫数は投与後日数 7-182 日につれて経時的に減少した。BALB/c 系統マウスおよび C57BL/6 系統マウスの肝臓から回収された狸回虫幼虫の感染力は、それぞれ 15.7-46.0%および 20.1-57.7%であ

った．マウス系統間と組織内の幼虫の日齢との間に統計学的な相互作用は認められなかった($F_{1,3}=0.48$, $P=0.70$)．マウス系統間で幼虫の感染力に統計学的な差異は認められなかった($F_{1,3}=2.66$, $P=0.11$)．一方，幼虫の日齢間で幼虫の感染力に統計学的な差異が認められた($F_{1,3}=10.44$, $P<0.01$)．Tukey-Kramer 検定による事後検定では幼虫の日齢 7 日および 31 日の感染力と幼虫の日齢 31 日および 182 日の感染力との間で統計学的に差異が認められた($P<0.01$)．しかしながら，幼虫の感染力は幼虫日齢が増加しても，減少傾向は示さなかった．

BALB/c 系統マウスの肝臓から回収された 182 日齢の幼虫を投与した ICR 系統マウスから検出された幼虫を図 6 に示した．

ICR 系統マウスにおける幼虫の組織分布は，虫卵投与試験とほぼ同様の組織分布を示し，ほとんどの幼虫が肝臓から回収された．肝臓を除く内臓と骨格筋から少数の幼虫(0.2-2.0%)が回収されたが，中枢神経系からは幼虫は回収されなかった．

ICR 系統マウスから回収された幼虫の分子生物学的同定：

狸回虫含仔虫卵投与後 182 日の BALB/c 系統マウスの肝臓から回収された幼虫を投与した ICR 系統マウスの肝臓から回収された幼虫の 5.8SrDNA および ITS-2 領域の部分配列(367bp)の一部の BLAST 検索は，狸回虫 *T. tanuki* (GenBank Accession Number : KF811024) の配列と 100%の相同性を示した．

4. 考察

本研究では、狸回虫含仔虫卵をマウスに投与すると、幼虫は全身型移行を行い、ほとんどの幼虫(>88.7%)が肝臓に移行することが確認され、既報の成績と一致した(Okamoto, 1986). さらに、マウス体内の幼虫の組織分布は、BALB/c 系統マウスおよび C57BL/6 系統マウスともに経時的な変化がほとんど認められず、回収幼虫数に投与後日数による統計学的な差異は認められなかったことから、組織内の幼虫は減少することなく組織内に留まり、少なくとも 182 日間感染性を有したまま寄生することが今回初めて明らかとなった.

Hamilton et al. (2006) は犬回虫の実験的感染において、C57BL/6 系統マウスより BALB/c 系統マウスの方がより多くの幼虫が脳に分布したと報告している. 本研究では、虫卵投与試験において、BALB/c 系統マウスより C57BL/6 系統マウスの方がより多くの幼虫が回収され、統計学的に差異が認められた. 一方で両系統間の幼虫の肝臓への分布に統計学的に差は認められず、幼虫の組織分布に大きな違いは見られなかった. 本研究は狸回虫はマウス系統における組織分布に統計学的に大きな違いはないものの、BALB/c 系統マウスより C57BL/6 系統マウスの方が狸回虫幼虫の感染に対して感受性が高いことを示した. 狸回虫は、犬回虫と比較すると脳を含む中枢神経系への移行は少なかった. しかしながら、ごく少数ではあるが、脳から幼虫が回収されたことから、狸回虫もヒトの神経型トキソカラ症を引き起こす可能性があることが示唆された.

トキソカラ属回虫幼虫の組織分布に関しては、含仔虫卵を投与した場合、猫回虫では BALB/c 系統マウスと C57BL/6J 系統マウスでは筋肉に分布し(Cardillo et al., 2009; Janecek et al., 2014), 犬回虫ではさまざまな系統のマウスで脳と筋肉に分布したと報告されている(Epe et al., 1994; Janecek et al., 2014). 他方、幼虫を投与した場合、Taira et al. (2011)はニワトリ組織から回収された猫回虫幼虫を投与したマウスでは、幼虫は投与後 29 日以降は筋肉に分布したと報告している. さらに Sasmal et al. (2008)はブタから回収された犬回虫幼虫を投与したマウスでは、幼虫は筋肉、肝臓、肺、脳の降順で分布したと報告している. 本研究ではマウス組織から回収された狸回虫幼虫をマウスに投与すると幼虫は全身型移行を行い、ほとんどの幼虫が肝臓に分布することが明らかとなった. また、幼虫を投与した場合も含仔虫卵を投与し

た場合と同様に多くの幼虫が肝臓に分布し、狸回虫幼虫のマウスにおける好適寄生部位は肝臓であることを支持した。

待機宿主組織内のトキシカラ属回虫幼虫の感染性の評価に関して、Taira et al. (2013a)は、マウス組織から得られた猫回虫幼虫の42.0%が別の新たなマウスに感染したと報告している。長期間組織内に寄生していたトキシカラ属回虫幼虫の感染性の評価では、Taira et al. (2011)は、ニワトリ組織内に175-176日間寄生していた猫回虫幼虫の52.9%がマウスに感染し、Taira et al. (2013b)は、ラット組織に180日間寄生していた猫回虫幼虫の43.0%がマウスに感染したと報告している。本研究では狸回虫幼虫は182日間という長期間組織内に寄生していたが、回収された幼虫の運動性は徐々に低下した。原因として宿主の免疫反応による幼虫の損傷や塩酸ペプシン消化液に対する幼虫の耐性の低下が考えられるが、この現象を解明するためには、さらなる研究が必要であると思われる。しかしながら、182日間マウス組織に寄生していた運動性幼虫の46.0および57.7%が新たなマウスに感染したことから、狸回虫幼虫は待機宿主の組織内で長期間高い感染性を維持することが明らかとなり、マウスが狸回虫の適切な待機宿主であることが示唆された。

結論として、狸回虫含仔虫卵をBALB/c系統マウスとC57BL/6系統マウスに投与した場合、C57BL/6系統マウスの方が狸回虫に対して感受性が高いが、組織分布はマウス系統にかかわらず、ほぼ同様であることが示された。また狸回虫含仔虫卵および狸回虫幼虫をマウスに投与すると幼虫は全身型移行を行い、ほとんどの幼虫が肝臓に分布し、組織内の狸回虫幼虫は長期間高い感染性を維持することが実証された。本成績により狸回虫幼虫が犬回虫や猫回虫と同様にヒトのトキシカラ症の潜在的なリスクとなると考えた。

総括ならびに結論

第1章にて、猫回虫幼虫のマウスへの子宮内感染を実証し、マウスにおける猫回虫幼虫の子宮内感染はマウスの妊娠期の猫回虫含仔虫卵の曝露後に成立し、幼虫の胎仔への感染は胎盤を介している可能性が高いことが示唆された。この成績から猫回虫幼虫の待機宿主における子宮内感染についての新しい知見を見出し、トキシカラ属回虫幼虫がさまざまな経路で待機宿主に感染し、次世代へ受け継がれる可能性を示した。

第2章にて、さまざまな感染経路が考えられる野外の待機宿主において、実際の養鶏場のニワトリからトキシカラ属回虫幼虫を検出した。また狸回虫幼虫の家禽における自然感染例は今回が初の報告となり、鳥類が狸回虫の待機宿主になることが明らかとなった。

第3章にて、実際に野外の待機宿主における感染が明らかとなった狸回虫について、感染実験を行い、マウスを実験モデルとして確立した。また狸回虫幼虫がマウス組織内で長期間高い感染力を維持することを実証し、ヒトのトキシカラ症の潜在的なリスクがあることを示した。

以上の成績は、ヒトのトキシカラ症の発症リスクの把握と予防対策の検討に関連する公衆衛生および家畜衛生の向上に貢献するものである。

本論文の一部は、以下に公表した。

1. Okada,N., Ooi,H.K., Taira,K.,2021. *Toxocara cati* larval migration to mouse fetuses through transplacental infection. *Veterinary Parasitology*, Volume 290, 2021. doi:10.1016/j.vetpar.2021.109350

謝辞

稿を終えるにあたり，御指導ならびに御校閲を戴いた主査である麻布大学獣医学部獣医学科寄生虫学研究室 黄鴻堅教授に深甚なる謝意を表し，終始，直接御指導ならびに御鞭撻戴いた副査である平健介准教授に深謝いたします．また御校閲を戴いた副査である麻布大学獣医学部獣医学科伝染病学研究室 須永藤子教授に深謝いたします．

最後に，実験や実験動物の維持管理，様々な研究室業務をサポートしてくださった寄生虫学研究室の皆様に御礼申し上げます．

引用文献

- Abo-Shehada, M.N., Herbert, I.V., 1984. The migration of larval *Toxocara canis* in mice. II. Post-intestinal migration in primary infections. *Veterinary parasitology* 17, 75-83.
- Akao, N., Ohta, N., 2007. Toxocariasis in Japan. *Parasitology international* 56, 87-93.
- Akihito, Sako, T., Teduka, M., Kawada, S., 2016. Long-term trends in food habits of the Raccoon Dog, *Nyctereutes viverrinus*, in the Imperial palace, Tokyo. *Bulletin of the national museum of nature and science. series A, zoology* 42, 143-161.
- Al-Sabi, M.N.S., Chriél, M., Jensen, T.H., Enemark, H.L., 2013. Endoparasites of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and the red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark 2009-2012 - A comparative study. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife* 2, 144-151.
- Alexander, U., Lim, C.W., Kim, B., Hong, E.J., Kim, H.C., Park, B.K., 2018. Morphological and molecular characterization of *Toxocara tanuki* (Nematoda: Ascaridae) from Korean raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides koreensis*. *The Korean journal of parasitology* 56, 567-575.
- Alvarado-Rybak, M., Solano-Gallego, L., Millán, J., 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites and vectors* 9, 1-19.
- Amoah, I.D., Adegoke, A.A., Stenström, T.A., 2018. Soil-transmitted helminth infections associated with wastewater and sludge reuse: a review of current evidence. *Tropical medicine and international health* 23, 692-703.
- Augustine, D.L., 1927. Development in prenatal infestation of *Belascaris*. *The Journal of parasitology* 13, 256-259.
- Azizi, S., Oryan, A., Sadjjadi, S.M., Zibaei, M., 2007. Histopathologic changes and larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected chickens. *Parasitology research* 102, 47-52.

- Barutzki, D., Schaper, R., 2013. Age-dependant prevalence of endoparasites in young dogs and cats up to one year of age. *Parasitology research* 112, Suppl 1:119-131.
- Bastien, M., Vaniscotte, A., Combes, B., Umhang, G., Raton, V., Germain, E., Villena, I., Aubert, D., Boué, F., Poulle, M.L., 2019. Identifying drivers of fox and cat faecal deposits in kitchen gardens in order to evaluate measures for reducing contamination of fresh fruit and vegetables. *Food and waterborne parasitology* 14, e00034. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.e00034>
- Beaver, P.C., 1956. Human infections with canine and feline ascaris larvae. *The Bulletin of the tulane medical faculty* 16, 9-13.
- Bekele, F., Shumbej, T., 2019. Fruit and vegetable contamination with medically important helminths and protozoans in Tarcha town, Dawuro zone, South West Ethiopia. *Research and reports in tropical medicine* 10, 19–23.
- Beugnet, F., Bourdeau, P., Chalvet-Monfray, K., Cozma, V., Farkas, R., Guillot, J., Halos, L., Joachim, A., Losson, B., Miró, G., Otranto, D., Renaud, M., Rinaldi, L., 2014. Parasites of domestic owned cats in Europe: Co-infestations and risk factors. *Parasites and vectors* 7, 291.
- Burke, T.M., Roberson, E.L., 1985. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*: Experimental infection of the bitch at midpregnancy and at parturition. *International journal for parasitology* 15, 485–490.
- Campos-da-Silva, D.R., da Paz, J.S., Fortunato, V.R., Beltrame, M.A.V., Valli, L.C.P., Pereira, F.E.L., 2015. Natural infection of free-range chickens with the ascarid nematode *Toxocara* sp. *Parasitology research* 114, 4289–4293.
- Capári, B., Hamel, D., Visser, M., Winter, R., Pfister, K., Rehbein, S., 2013. Parasitic infections of domestic cats, *Felis catus*, in western Hungary. *Veterinary parasitology* 192, 33–42.
- Cardillo, N., Rosa, A., Ribicich, M., López, C., Sommerfelt, I., 2009. Experimental infection with *Toxocara cati* in BALB-c mice, migratory behaviour and pathological changes. *Zoonoses and public health* 56, 198–205.
- Coati, N., Schnieder, T., Epe, C., 2004. Vertical transmission of *Toxocara*

- cati* Schrank 1788 (Anisakidae) in the cat. Parasitology research 92, 142–146.
- de Oliveira, A.C., Rubinsky-Elefant, G., Merigueti, Y.F.F.B., Batista, A. da S., Santarém, V.A., 2018. Frequency of anti-*Toxocara* antibodies in broiler chickens in southern Brazil. Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria 27, 141–145.
- de Souza Aguiar, P., Furtado, R.D., de Avila, L.F. da C., de Lima Telmo, P., Martins, L.H.R., Berne, M.E.A., da Silva, P.E.A., Scaini, C.J., 2015. Transmammary infection in BALB/c mice with chronic toxocariasis. Parasitology international 64, 145–147.
- de Souza, F.B., Nakiri, I.M., Lourenço, N. de O., da Silva, G.G., Paschoalini, D.R., Guimarães-Okamoto, P.T.C., Melchert, A., 2017. Prevalence of intestinal endoparasites with zoonotic potential in domestic cats from Botucatu, SP, Brazil. Topics in companion animal medicine 32, 114–117.
- Despommier, D., 2003. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clinical microbiology reviews 16, 265–272.
- dos Santos, S.V., Santos, F.H.Y., Lescano, S.A.Z., dos Santos, D.M., Tiago, É. da S., Fonseca, G.R.E., Ribeiro, M.C.S.D.A., Chieffi, P.P., 2017. Migration pattern of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected male and female *Rattus norvegicus*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 50, 698–700.
- Dubey, J.P., 1968. Migration of *Toxocara cati* larvae in mice. Tropical and geographical medicine 20, 172–176.
- Dubinský, P., Havasiová-Reiterová, K., Peřko, B., Hovorka, I., Tomašovičová, O., 1995. Role of small mammals in the epidemiology of toxocariasis. Parasitology 110, 187–193.
- Dutra, G.F., Pinto, N.S.F., de Avila, L.F. da C., Dutra, P.C., Telmo, P. de L., Rodrigues, L.H., Silva, A.M.W.A., Scaini, C.J., 2014. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. Veterinary parasitology 203, 87–90.
- Epe C, Sabel T, Schnieder T, Stoye M., 1994. The behavior and pathogenicity of *Toxacara canis* larvae in mice of different strains,

- Parasitology research 80, 691-695.
- Eslahi, A.V., Badri, M., Khorshidi, A., Majidiani, H., Hooshmand, E., Hosseini, H., Taghipour, A., Foroutan, M., Pestehchian, N., Firoozeh, F., Riahi, S.M., Zibaei, M., 2020. Prevalence of *Toxocara* and *Toxascaris* infection among human and animals in Iran with meta-analysis approach. BMC infectious diseases 20, 1–17.
- Fan, C.K., Chung, W.C., Su, K.E., Tsai, Y.J., 1998. Larval distribution in different organs of ICR strain mice infected with *Toxocara canis*. The Kaohsiung journal of medical sciences 14, 315-320.
- Fisher, M., 2003. *Toxocara cati*: An underestimated zoonotic agent. Trends in parasitology 19, 167–170.
- Galvin, T.J., 1964. Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons. The Journal of parasitology 50, 124-127.
- Hamilton, C.M., Stafford, P., Pinelli, E., Holland, C. V., 2006. A murine model for cerebral toxocariasis: Characterization of host susceptibility and behaviour. Parasitology 132, 791–801.
- He, X., Lv, M.N., Liu, G.H., Lin, R.Q., 2018. Genetic analysis of *Toxocara cati* (Nematoda:Ascarididae) from Guangdong province, subtropical China. Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis 29, 132-135.
- Herlich, H., Porter, D.A., 1953. Prenatal infection of a calf with the nematode, *Neoascaris vitulorum*. The Journal of parasitology 39, 33-34.
- Hoffmeister, B., Glaeser, S., Flick, H., Pornschlegel, S., Suttorp, N., Bergmann, F., 2007. Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. The American journal of tropical medicine and hygiene 76, 600–602.
- Ismail, Y., 2016. Prevalence of parasitic contamination in salad vegetables collected from supermarkets and street vendors in Amman and Baqa'a - Jordan. Polish journal of microbiology 65, 201–207.
- Ito, K., Sakai, K., Okajima, T., Quchi, K., Funakoshi, A., Nishimura, J., Ibayashi, H., Tsuji, M., 1986. Three cases of visceral larva migrans due to ingestion of raw chicken or cow liver. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine 75, 759–766.
- Jacquier, P., Gottstein, B., Stingelin, Y., Eckert, J., 1991.

- Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of clinical microbiology* 29, 1831–1835.
- Janecek, E., Beineke, A., Schnieder, T., Strube, C., 2014. Neurotoxocarosis: Marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasites and vectors* 7, 194.
- Kadohira, M., Phiri, B.J., Hill, G., Yoshizaki, R., Takai, S., 2019. Game meat consumption and foodborne illness in Japan: A web-based questionnaire survey. *Journal of food protection* 82, 1224–1232.
- Kłapeć, T., Borecka, A., 2012. Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. *Annals of agricultural and environmental medicine* 19, 421–425.
- Laurimaa, L., Süld, K., Davison, J., Moks, E., Valdmann, H., Saarma, U., 2016. Alien species and their zoonotic parasites in native and introduced ranges: The raccoon dog example. *Veterinary parasitology* 219, 24–33.
- Lee, K.T., Min, H.K., 1974. Experimental study on the effect of cortisone in mice infected with *Toxocara canis*: histopathological findings of granuloma in the liver. *The Korean journal of parasitology* 12, 126–134. (In Korean with English summary)
- Lee, K. T., Min, H. K., Soh, C. T., 1976. Transplacental migration of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice. *The Journal of parasitology* 62, 460–465.
- Lewert, R.M., 1958. Invasiveness of helminth larvae. The Rice Institute Pamphlet 45, 97–113.
- Macuhova, K., Akao, N., Fujinami, Y., Kumagai, T., Ohta, N., 2013. Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. *Journal of helminthology* 87, 271–276.
- Marucci, G., Interisano, M., La Rosa, G., Pozio, E., 2013. Molecular identification of nematode larvae different from those of the *Trichinella* genus detected by muscle digestion. *Veterinary parasitology* 194, 117–120.
- Mikaeili, F., Mathis, A., Deplazes, P., Mirhendi, H., Barazesh, A.,

- Ebrahimi, S., Kia, E.B., 2017. Differentiation of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* based on PCR-RFLP analyses of rDNA-ITS and mitochondrial *cox1* and *nad1* regions. *Acta parasitologica* 62, 549–556.
- Mircean, V., Titilincu, A., Vasile, C., 2010. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. *Veterinary parasitology* 171, 163–166.
- Mitsugi, K., Umei, T., Inoue, T., Sumida, I., Hanada, M., 1988. Visceral larva migrans by *Toxocara cati* with multiple nodules in liver. *The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine* 77, 1742–1743.
- Moorhouse, D.E., 1982. Toxocariasis: A possible cause of the Palm Island mystery disease. *The Medical journal of Australia* 1, 172–173.
- Morimatsu, Y., Akao, N., Akiyoshi, H., Kawazu, T., Okabe, Y., Aizawa, H., 2006. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: Appearance of specific antibody in broncho alveolar lavage fluid of the patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75, 303–306.
- Moyo, D.Z., 2004. The migratory behaviour of *Toxocara canis* and *Toxocara vitulorum* in Balb/c mice. *Zimbabwe veterinary journal* 33, 7–13.
- Nagakura, K., Tachbana, H., Kaneda, Y., Kato, Y., 1989. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *The Journal of infectious diseases* 160, 735–736.
- Navajas, M., Cotton, D., Kreiter, S., Gutierrez, J., 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): Preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Experimental and applied acarology* 15, 211–218.
- Noh, Y., Hong, S.T., Yun, J.Y., Park, H.K., Oh, J.H., Kim, Y.E., Jeon, B.S., 2012. Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *Journal of Korean medical science* 27, 1105–1108.
- Öge, H., Öge, S., Özbakiş, G., Gürcan, S., 2014. Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Veterinary parasitology* 206, 227–231.
- Okamoto, T., 1986. Experimental studies of visceral larva migrans with *Toxocara tanuki* Yamaguti, 1941. *Japanese journal of parasitology* 35,

- 355–364. (In Japanese with English summary)
- Oryan, A., Sadjjadi, S.M., Azizi, S., 2010. Longevity of *Toxocara cati* larvae and pathology in tissues of experimentally infected chickens. The Korean journal of parasitology 48, 79–80.
- Oshima, T., 1961. Influence of pregnancy and lactation on migration of the larvae of *Toxocara canis* in mice. The Journal of parasitology 47, 657–660.
- Overgaauw, P.A.M., 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocarosis in dogs and cats. Critical reviews in microbiology 23, 233–251.
- Özkoç, S., Bayram Delibaş, S., Akisü, Ç., 2012. Evaluation of *Trichinella* cross-reactions in the serological diagnosis of toxocariasis. Mikrobiyoloji bulteni 46, 456–463.
- Pawlowski, Z., 2001. Toxocariasis in humans: Clinical expression and treatment dilemma. Journal of helminthology 75, 299–305.
- Pitra, C., Schwarz, S., Fickel, J., 2010. Going west-invasion genetics of the alien raccoon dog *Nyctereutes procynoides* in Europe. European Journal of Wildlife Research 56, 117–129.
- Rostami, A., Riahi, S.M., Holland, C. V., Taghipour, A., Khalili-Fomeshi, M., Fakhri, Y., Omrani, V.F., Hotez, P.J., Gasser, R.B., 2019. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. PLoS neglected tropical diseases 13, e0007809. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007809>
- Roberts, J.A., 1989. *Toxocara vitulorum*: treatment based on the duration of the infectivity of buffalo cows (*Bubalus bubalis*) for their calves. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics 12, 5–13.
- Rubinsky-Elefant, G., Hirata, C.E., Yamamoto, J.H., Ferreira, M.U., 2010. Human toxocariasis: Diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. Annals of tropical medicine and parasitology 104, 3–23.
- Saeed, I., Taira, K., Kapel, C.M.O., 2005. *Toxocara canis* in experimentally infected silver and arctic foxes. Parasitology research 97, 160–166.
- Salem, G., Schantz, P., 1992. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 15, 743–744.

- Sato, H., Inaba, T., Ihama, Y., Kamiya, H., 1999. Parasitological survey on wild carnivora in north-western Tohoku, Japan. *The Journal of veterinary medical science* 61, 1023–1026.
- Sato, H., Suzuki, K., Aoki, M., 2006. Nematodes from raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) introduced recently on Yakushima Island, Japan. *The Journal of veterinary medical science* 68, 693–700.
- Schön, J., Stoye, M., 1986. Präinatale und galaktogene Infektionen mit *Toxocara mystax* ZEDER 1800 (Anisakidae) bei der Maus. *Journal of veterinary medicine. Series B* 33, 397–412. (In German with English summary)
- Shillinger, J. E., Cram, E.B., 1923. Parasitic infestation of dog before birth. *Journal of the American veterinary medical association* 62, 200–203.
- Shimokawa, H., Nakashima, T., Akagi, K., Omae, T., Tsuji, M., 1982. Visceral larva migrans by *Toxocara cati*. *Fukuoka Acta Medica* 73, 64–69.
- Sommerfelt, I.E., Rosa, A., Duchene, A., Degregorio, O., López, C., Pisanú, A., De Torres, R., 2004. *Toxocara canis* in experimentally infected pigs: Migratory pattern and tissue lesions. *Veterinary parasitology* 125, 323–334.
- Sprent, J.F.A., 1956. The life history and development of *Toxocara cati* (Schrank 1788) in the domestic cat. *Parasitology* 46, 54–78.
- Stone, W.M., Girardeau, M.H., 1967. Transmammary passage of infective-stage nematode larvae. *Veterinary medicine, small animal clinician* 62, 252–253.
- Strube, C., Heuer, L., Janecek, E., 2013. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary parasitology* 193, 375–389.
- Stürchler, D., Weiss, N., Gassner, M., 1990. Transmission of Toxocariasis. *The Journal of infectious diseases* 162, 571–571.
- Swerczek, T.W., Nielsen, S.W., Helmboldt, C.F., 1971. Transmammary passage of *Toxocara cati* in the cat. *American journal of veterinary research* 32, 89–92.
- Taira, K., Permin, A., Kapel, C.M.O., 2003. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitology research* 90, 521–523.

- Taira, K., Saeed, I., Lind, P., Murrell, K.D., Kapel, C.M.O., 2003. Population dynamics of *Toxocara canis* in pigs receiving a single or multiple infection. *Parasitology* 127, 593–602.
- Taira, K., Saeed, I., Permin, A., Kapel, C.M.O., 2004. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Veterinary parasitology* 121, 115–124.
- Taira, K., Saitoh, Y., Kapel, C.M.O., 2011. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Veterinary parasitology* 180, 287–291.
- Taira, K., Saitoh, Y., Okada, N., Sugiyama, H., Kapel, C.M., 2012. Tolerance to low temperatures of *Toxocara cati* larvae in chicken muscle tissue. *Veterinary Parasitology*, 189, 383–386.
- Taira, K., Šnábel, V., Okada, N., Saitoh, Y., 2013a. Effect of low temperatures on the infectivity of *Toxocara cati* larvae parasitized in mouse tissues. *Helminthologia* 50, 83–86.
- Taira, K., Yanagida, T., Akazawa, N., Saitoh, Y., 2013b. High infectivity of *Toxocara cati* larvae from muscles of experimentally infected rats. *Veterinary parasitology* 196, 397–400.
- von Söhsten, A.L., da Silva, A.V., Rubinsky-Elefant, G., Guerra, L.M.S. de M. e. M., 2017. Anti-*Toxocara* spp. IgY antibodies in poultry sold in street markets from Feira de Santana, Bahia, Northeastern Brazil. *Veterinary parasitology, regional studies and reports* 8, 86–89.
- Warren, E.G., 1969 Nematode larvae in milk. *Australian veterinary journal* 45, 388.
- Warren, E.G., 1971. Observations on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. *International journal for parasitology* 1, 85–99.
- Yagi, K., Asakawa, M., Ohyama, T., Okamoto, M., 1999. Molecular identification of species for an ascaroid nematode from a naturalized racoon, *Procyon lotor* in Hokkaido by Determination of 5.8S rDNA and ITS-2 rDNA. *Report of the Hokkaido Institute of public health* 49, 159–162. (In Japanese)
- Yoon, Y.S., Lee, C.H., Kang, Y.A., Kwon, S.Y., Yoon, H.I., Lee, J.H., Lee, C.T., 2009. Impact of toxocariasis in patients with unexplained patchy pulmonary infiltrate in Korea. *Journal of Korean medical*

- science 24, 40–45.
- Yoshikawa, M., Koyama, N., Hontsu, S., Yamamoto, Y., Ogawa, S., Nakamura, T., Mizuno, Y., Miura, S., Mikasa, K., Kimura, H., 2010. Clinical analysis of eight patients with pulmonary toxocariasis. The Journal of the Japanese respiratory society 48, 351–356.
- Zibaei, M., Sadjjadi, S.M., Maraghi, S., 2017. The occurrence of *Toxocara* species in naturally infected broiler chickens revealed by molecular approaches. Journal of helminthology 91, 633–636.
- Zibaei, M., Sadjjadi, S.M., Uga, S., 2010. Experimental *Toxocara cati* infection in gerbils and rats. The Korean journal of parasitology 48, 331–333.
- Ziegler, M.A., Macpherson, C.N.L., 2019. *Toxocara* and its species. CAB Reviews 14, 1-27. <https://10.1079/PAVSNNR201914053>

表および図

表1. 猫回虫含仔虫卵10,000個投与^aした母マウスから回収された幼虫数と胎仔内の幼虫数

| Maternal mouse ID | | Necropsy day DPI ^c | Number of larvae | | | | | | Recovery (%) | |
|-----------------------------------|------|----------------------------------|---------------------|---------|--------|----------|--------------------------------|------------------|--------------|-------|
| | | | Maternal mouse body | | | | Fetuses | | | Total |
| | | | Carcass | Viscera | Uterus | Placenta | Number of infected fetus/total | Larvae recovered | | |
| Pregnant ^a | 1 | 12 | 854 | 37 | 0 | 0 | (4/14) | 6 | 897 | 9.0 |
| | 2 | | 945 | 20 | 0 | 0 | (7/13) | 8 | 973 | 9.7 |
| | 3 | | 1,189 | 51 | 1 | 7 | (12/17) | 27 | 1,275 | 12.8 |
| | 4 | | 1,891 | 82 | 0 | 18 | (15/17) | 48 | 2,039 | 20.4 |
| | 5 | | 1,269 | 49 | 1 | 0 | (15/18) | 31 | 1,350 | 13.5 |
| | 6 | | 1,348 | 26 | 2 | 1 | (10/12) | 26 | 1,403 | 14.0 |
| | 7 | | 1,136 | 24 | 6 | 0 | (11/12) | 50 | 1,216 | 12.2 |
| | Mean | | 1,233.1 | 41.3 | 1.4 | 3.7 | (10.6/14.7) | 28.0 | 1,307.6 | 13.1 |
| | SD | | 312.9 | 20.1 | 2.0 | 6.3 | - | 16.0 | 345.6 | 3.5 |
| Non-pregnant control ^b | 11 | 12 | 585 | 42 | 2 | - | - | - | 629 | 6 |
| | 12 | | 823 | 11 | 1 | - | - | - | 835 | 8 |
| | 13 | | 938 | 21 | 3 | - | - | - | 962 | 10 |
| | 14 | | 1,912 | 309 | 2 | - | - | - | 2,223 | 22 |
| | 15 | | 1,622 | 199 | 2 | - | - | - | 1,823 | 18 |
| | 16 | | 1,720 | 58 | 2 | - | - | - | 1,780 | 18 |
| | 17 | | 1,274 | 50 | 2 | - | - | - | 1,326 | 13 |
| | Mean | | 1,267.7 | 98.6 | 2.0 | - | - | - | 1,368.3 | 13.7 |
| | SD | | 465.6 | 103.7 | 0.5 | - | - | - | 548.3 | 5.5 |

^a Two doses of 5,000 eggs per dose were orally inoculated into maternal mice at day 4 and 9 of gestation, respectively.

^b The age and dosage were the same with those of mice in pregnant group.

^c Days post inoculation; days after the first inoculation of eggs.

There were no statistical differences for the number of larvae in carcass, viscera and uterus and total larvae between pregnant group and non-pregnant group (Mann-Whitney U test).

表2. 猫回虫含仔虫卵10,000個投与^aした母マウスから得られた胎仔のそれぞれの幼虫数

| Fetus ID | Digestion day ^b | Maternal mouse ID | | | | | | | Total (D) | Mean (D/7) |
|---|----------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|--------------|---------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| 1 | 12 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 | 6 | | |
| 2 | | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 2 | 2 | | |
| 3 | | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 4 | | |
| 4 | | 0 | 2 | 3 | 0 | 4 | 1 | 9 | | |
| 5 | | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | | |
| 6 | | 2 | 0 | 3 | 6 | 1 | 1 | 8 | | |
| 7 | | 0 | 1 | 5 | 4 | 0 | 3 | 5 | | |
| 8 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | | |
| 9 | | 0 | 1 | 1 | 4 | 1 | 2 | 4 | | |
| 10 | | 0 | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 | 4 | | |
| 11 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 5 | 1 | | |
| 12 | | 0 | 1 | 1 | 3 | 2 | 0 | 4 | | |
| 13 | | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | | | | |
| 14 | | 1 | | 2 | 2 | 0 | | | | |
| 15 | | | | 3 | 2 | 2 | | | | |
| 16 | | | | 2 | 3 | 3 | | | | |
| 17 | | | | 2 | 0 | 2 | | | | |
| 18 | | | | | | 3 | | | | |
| Number of fetus (A) | | 14 | 13 | 17 | 17 | 18 | 12 | 12 | 103 | 14.7 |
| Number of infected fetus (B) | | 4 | 7 | 12 | 15 | 15 | 10 | 11 | 74 | 10.6 |
| Prevalence of infection (B/A x 100 = %) | | 28.6 | 53.8 | 70.6 | 88.2 | 83.3 | 83.3 | 91.7 | 71.8 | 71.8 |
| Total number of larvae (C) | | 6 | 8 | 27 | 48 | 31 | 26 | 50 | 196 | 28.0 |
| Number of larvae/infected fetus (C/B) | | 1.5 | 1.1 | 2.3 | 3.2 | 2.1 | 2.6 | 4.5 | 2.6 | 2.6 |

a Seven maternal mice were inoculated orally with 5,000 eggs and another 5,000 eggs at day 4 and 9 of gestation,

b Each fetus was artificially digested for larval count at 12 days after the first inoculation of eggs.



図 1

妊娠マウスに猫回虫含仔虫卵合計 10,000 個投与した後，胎仔から回収された猫回虫幼虫．幼虫は塩酸ペプシン消化法で回収され，多くの幼虫が運動性を有していた．

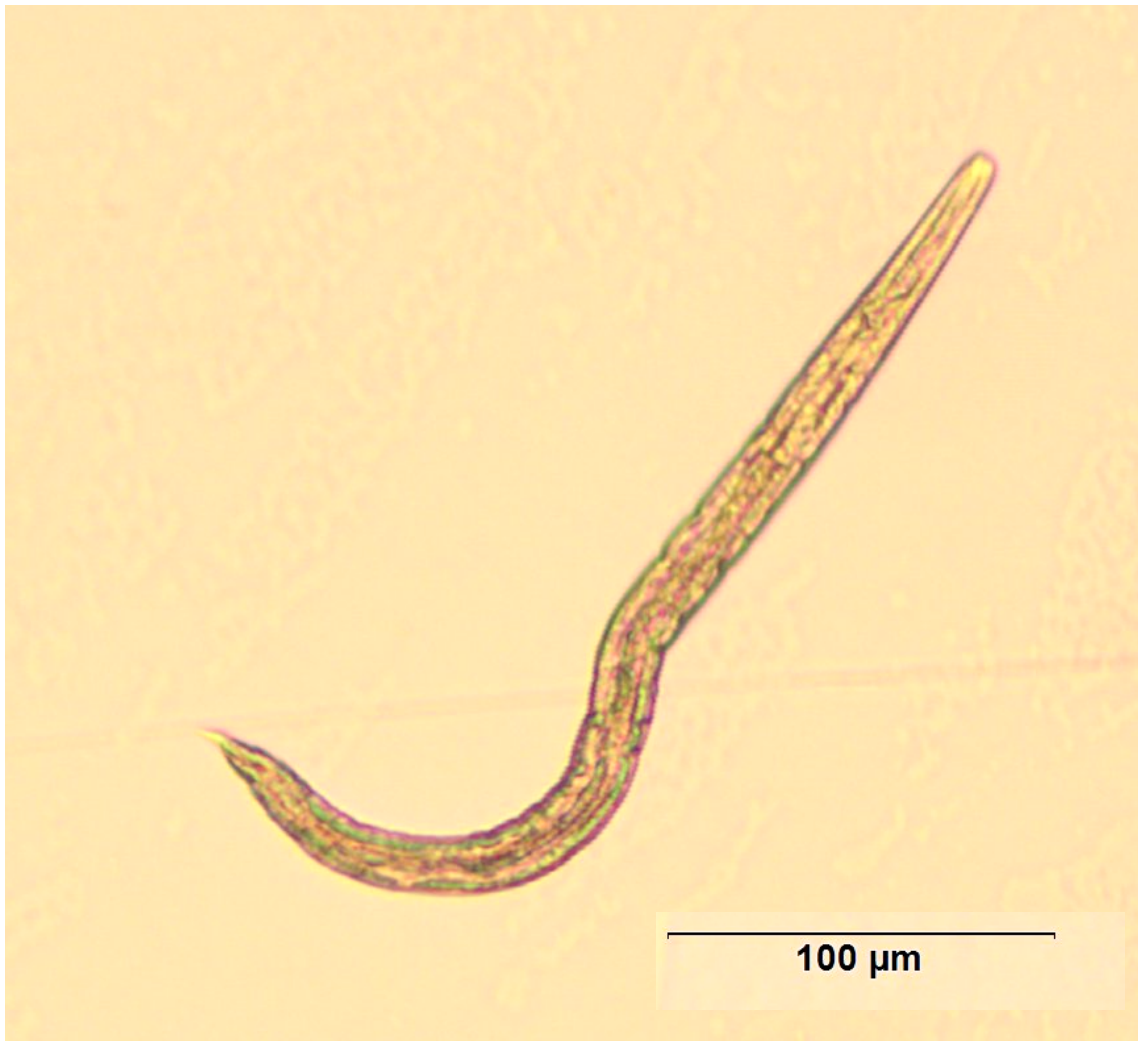


図 2

平飼い養鶏場のニワトリの胸肉から回収された狸回虫幼虫．幼虫は塩酸ペプシン消化法により回収され，5.8S ribosomal DNA および ITS-2 領域を用いて分子生物学的に同定された．

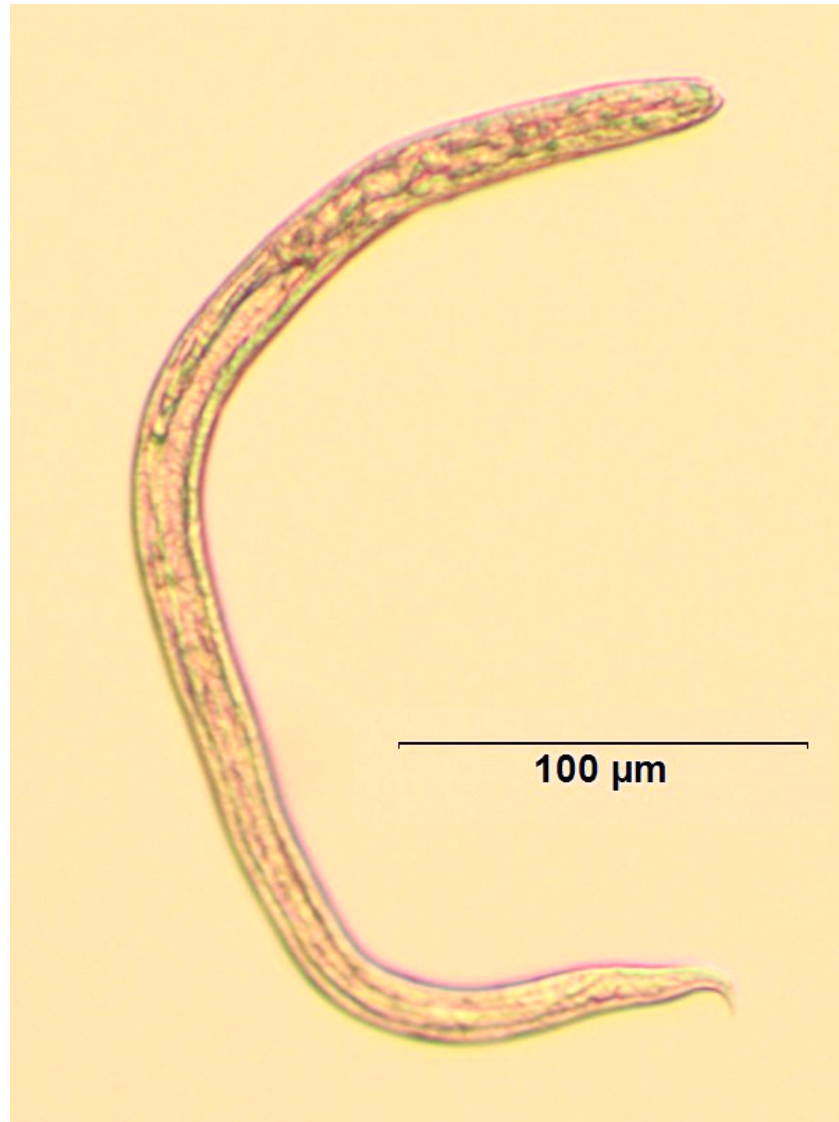


図 3

平飼い養鶏場のニワトリのもも肉から回収された猫回虫幼虫．幼虫は塩酸ペプシン消化法により回収され，5.8S ribosomal DNA および ITS-2 領域を用いて分子生物学的に同定された．

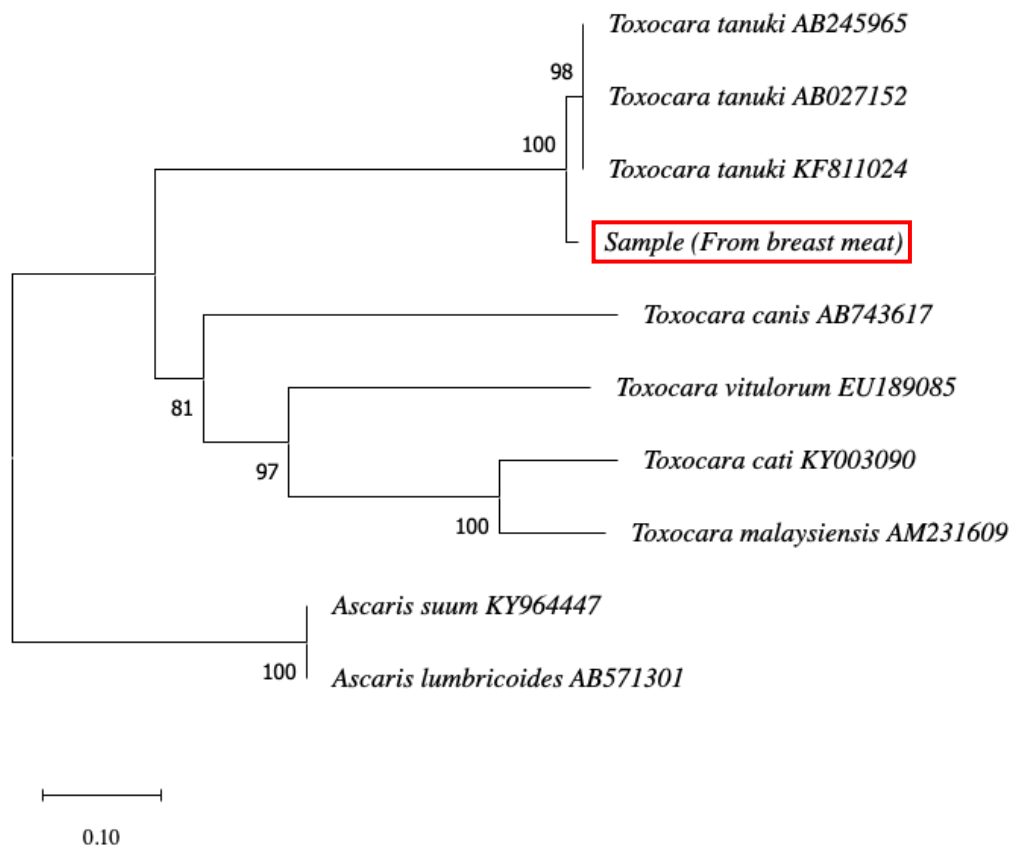


図 4

平飼い養鶏場のニワトリの胸肉から得られた線虫幼虫の 5.8S ribosomal DNA から ITS-2 領域の部分配列を用いて近隣結合法(NJ 法)で作成した分子系統樹. *Sample(From breast meat)*が本研究で得られた線虫幼虫を示す. 分子系統解析には MEGA-X を使用した. 分子系統樹は, 胸肉から得られた線虫幼虫が *T. tanuki* として同定されたことを示している. 最大節約法(MP 法)で作成した系統樹も NJ 法と同じトポロジーを示した.

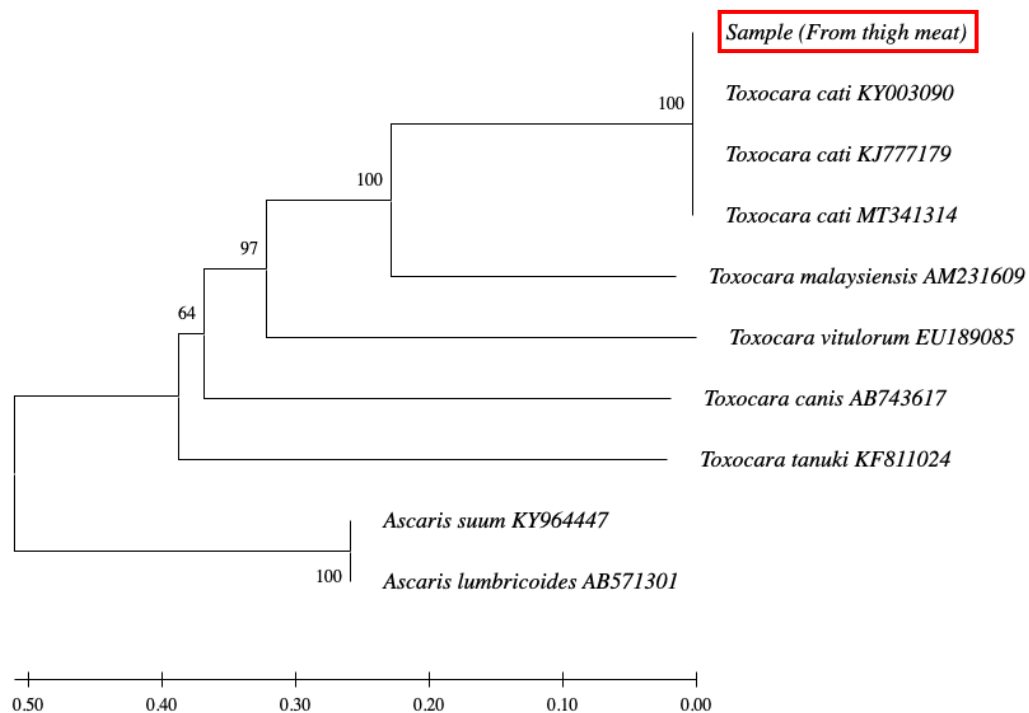


図 5

平飼い養鶏場のニワトリのもも肉から得られた線虫幼虫の 5.8S ribosomal DNA から ITS-2 領域の部分配列を用いて近隣結合法(NJ 法)で作成した分子系統樹. *Sample(From thigh meat)*が本研究で得られた線虫幼虫を示す. 分子系統解析には MEGA-X を使用した. 分子系統樹は、胸肉から得られた線虫幼虫が *T. cati* として同定されたことを示している. 最大節約法(MP 法)で作成した系統樹も NJ 法と同じトポロジーを示した.

表3. 狸回虫含仔虫卵1,000個投与したBALB/c系統およびC57BL/6系統マウスの組織から回収された狸回虫幼虫の相対的な組織分布 (%)

| Mouse strain | Dpi ¹ | n | Egg dose | Mean number of larvae detected | | Relative larval distribution (%) | | | | | | | | |
|--------------|------------------|---|----------|--------------------------------|-----|----------------------------------|-----------------|---------|---------|-------|--------|------------------|-------|-------|
| | | | | Total | SD | Liver | GI ² | Carcass | Kidenys | Lungs | Spleen | CNS ³ | Heart | Total |
| BALB/c | 7 | 5 | 1,000 | 227 | 65 | 90.8 | 2.9 | 2.9 | 1.9 | 0.5 | 0.4 | 0.5 | 0.0 | 100 |
| | 31 | | | 298 | 124 | 93.9 | 2.3 | 2.6 | 0.7 | 0.4 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 100 |
| | 91 | | | 205 | 75 | 94.4 | 0.7 | 1.9 | 1.7 | 1.1 | 0.3 | 0.0 | 0.1 | 100 |
| | 182 | | | 196 | 100 | 97.3 | 1.2 | 0.9 | 0.4 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 100 |
| C57BL/6 | 7 | 5 | 1,000 | 287 | 25 | 88.7 | 7.2 | 2.7 | 0.8 | 0.3 | 0.3 | 0.1 | 0.0 | 100 |
| | 31 | | | 267 | 54 | 94.3 | 3.8 | 1.4 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 100 |
| | 91 | | | 292 | 17 | 95.8 | 2.1 | 0.4 | 1.3 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 100 |
| | 182 | | | 308 | 81 | 97.4 | 1.3 | 1.1 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 100 |

¹: Days post inoculation

²: Gastrointestinal tract: Stomach and intestines without contents

³: Central nervous system: Total number of larvae detected from the cerebrum, cerebellum and spinal cord

表4. 2系統のマウスの肝臓から得られた狸回虫幼虫を投与したICR系統マウスにおける狸回虫幼虫の感染力

| Donor mice and larvae inoculated | | | | Recipient ICR mice and larvae recovered | | | |
|----------------------------------|--|---|--|---|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Mouse strain | dpi ¹ with eggs (Age of larvae in tissues) | Motility of recovered larvae (%) ² | Number of motile larvae inoculated to a recipient mouse (a) | n | Necropsy day ³ | Total larvae recovered (b) | Recovery (%: b/a×100) |
| BALB/c (n=5/group) | 7 | 80.5 | 41.3 | 6 | 21 | 19.5 | 47.2 |
| | 31 | 79.5 | 38.3 | | | 6.0 | 15.7 |
| | 91 | 44.0 | 41.3 | | | 15.0 | 36.3 |
| | 182 | 6.8 | 2.9 | | | 1.3 | 46.0 |
| C57BL/6 (n=5/group) | 7 | 61.4 | 43.8 | 6 | 21 | 28.5 | 65.1 |
| | 31 | 57.4 | 41.4 | | | 8.3 | 20.1 |
| | 91 | 30.5 | 40.8 | | | 30.7 | 75.2 |
| | 182 | 6.1 | 2.6 | | | 1.5 | 57.7 |

¹ : Day post inoculation

² : Average percentage of motile larvae in 20mL suspension (10 trials).

³ : Days post infection with larvae

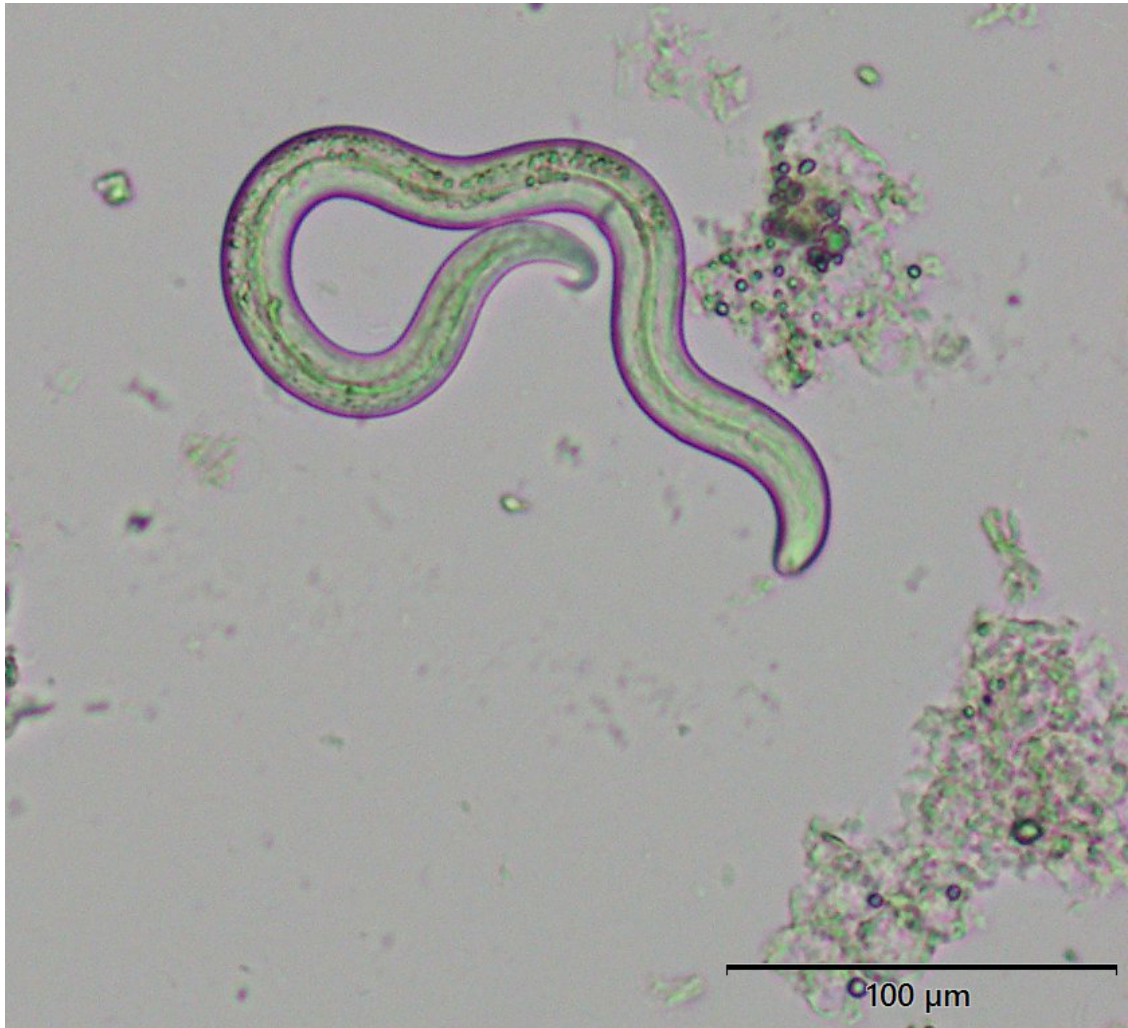


図 6

BALB/c 系統マウスの肝臓から回収された 182 日齢幼虫を投与した ICR 系統マウスの肝臓から検出された狸回虫幼虫．幼虫は塩酸ペプシン消化法で回収され，多くの幼虫が運動性を有していた．