

短 報

福岡県のと畜場に搬入された馬にみられた肝臓灰白色硬結節と多包虫感染との関連性

一二三達郎^{1),2),3)†} 池田加江¹⁾ 江藤良樹⁴⁾ 井河和仁¹⁾ 西村耕一¹⁾
 小川卓司¹⁾ 川口博明^{2),3)} 三好宣彰^{2),3)}

- 1) 福岡県食肉衛生検査所 (〒818-0072 筑紫野市二日市中央4-5-34)
 2) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)
 3) 山口大学大学院連合獣医学研究科 (〒753-8511 山口市吉田1677-1)
 4) 福岡県保健環境研究所 (〒818-0135 太宰府市向佐野39)

(2014年11月6日受付・2015年2月16日受理)

要 約

2012年7月から12月の6カ月間に福岡県のと畜場に搬入された馬610頭中53頭において肝臓に灰白色硬結節が認められた。硬結節の病理組織学的及び遺伝子検査を実施し、多包虫の感染状況を調査した。これらの検査結果から、39頭が多包虫症と診断された(感染率6.4%)。過去に報告されている軽種馬だけでなく、ポニー種、日本輓系種、北海道和種などのさまざまな品種で多包虫感染が確認された。疫学調査では、4頭が多包虫症の有病地である北海道での飼養歴が確認され、北海道で感染した可能性が考えられた。一方で、本研究の多包虫感染馬の多くは北海道での飼養歴は不明であり、これらの馬は感染地の特定が困難であった。しかし、日本での多包虫の地理的分布や馬の生産状況を考慮すると、これらの馬も北海道で感染した可能性を完全には否定できないと思われた。

——キーワード：多包虫症，馬，食肉検査。

-----日獣会誌 68, 253~257 (2015)

エキノコックス症は単包条虫，多包条虫，フォーゲル包条虫，ヤマネコ包条虫などのエキノコックス属条虫の幼虫寄生による人獣共通感染症であり，日本では北海道において犬やキタキツネを終宿主としエゾヤチネズミなどの野ネズミを中間宿主とする多包条虫の生活環が確認されている [1]。馬は人や豚と同様に多包条虫の中間宿主であり，終宿主から糞便内に排泄された虫卵の経口摂取により感染し，幼虫が肝臓に寄生して病変を形成する [1]。近年，山形県のと畜場に搬入された軽種馬の肝臓灰白色硬結節から多包虫が高率 (18.8%) に検出され，北海道で感染したと推察されており，山形県の事例は北海道以外のと畜場で初めて発見された馬の多包虫症の事例として報告されている [2]。福岡県のと畜場には毎年，年間約1,200頭の軽種馬を含めたさまざまな品種の馬が搬入され，約200頭の馬に肝臓灰白色硬結節が認められ，多包虫感染が検出される可能性が危惧されていた。

また，これまでの日本における馬の多包虫症についての報告は少ないが，そのほとんどは軽種馬に関する報告で [2-4]，ポニー種や重種などの他の品種における多包虫感染は報告されていない。今回，福岡県のと畜場に搬入されたさまざまな品種の馬から得られた肝臓灰白色硬結節を用いて病理組織学的及び遺伝子検査を行い，多包虫の感染状況についての調査を行ったので，その概要を報告する。

材料及び方法

材料：2012年7月から12月までの6カ月間に福岡県のと畜場に搬入された日本産の馬610頭 (内訳：軽種470頭，ポニー種61頭，日本輓系種41頭，北海道和種38頭) を対象とした。いずれの馬も生体検査時に異常はみられなかった。食肉検査時に肝臓に灰白色硬結節を認めた53頭の結節を採材した (図1)。肉眼的に複数個

† 連絡責任者：一二三達郎 (福岡県食肉衛生検査所)

〒818-0072 筑紫野市二日市中央4-5-34

☎ 092-923-6621 FAX 092-923-6648

E-mail : hifumi-t0938@pref.fukuoka.lg.jp

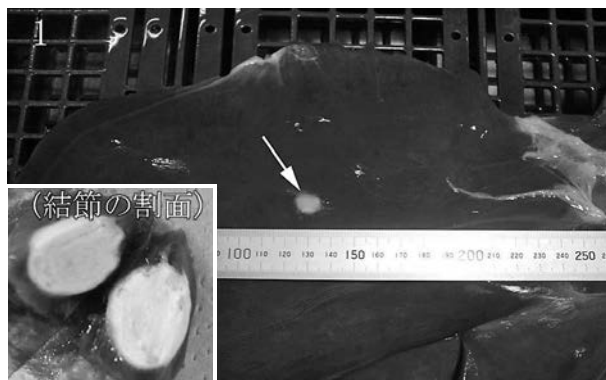


図1 馬の肝臓灰白色硬結節の肉眼写真
症例 No. 21 の肝臓において、直径約1cm大の灰白色硬結節（矢印）が認められた。断面は灰白色充実性で、石灰化がみられ、硬結であった。

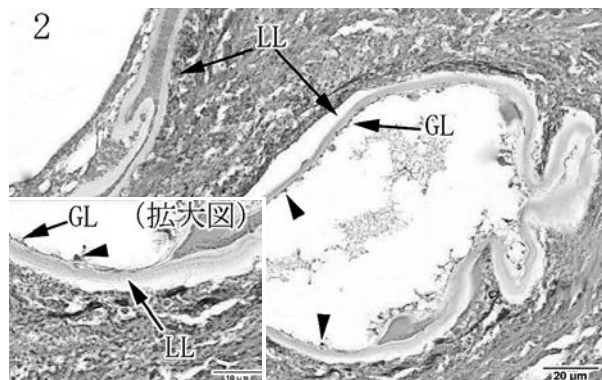


図2 HE 染色組織写真（症例 No. 21, 脱灰後検索）
好酸性の層状構造物である角皮層 (laminated layer : LL) とその内側に薄い胚層 (germinal layer : GL) の形成が認められ、胚層から突出する胚細胞（矢頭）も散見された。
(Bar = 20 μm, 拡大図 : Bar = 10 μm)

表1 Nested-PCR 検査において使用したプライマー

	プライマー名	塩基配列	サイズ (塩基)
1st PCR	P60F	5'-TTAAGATATATGTGGTAC AGGATTAGATACCC-3'	373bp
	P375R	5'-AACCGAGGGTGACGG GCGGTGTGTACC-3'	
2nd PCR	P-nest-F	5'-ATATTTTGTAAAGTTGTT CTA-3'	250bp
	P-nest-R	5'-ACAATACCATATTACAAC AATATTCCTATC-3'	

の結節が認められた症例については任意の1個を採材した。結節を二分割し、それぞれを用いて病理組織学的及び遺伝子検査を実施した。

疫学調査：調査対象馬を搬入した家畜商に対して最終肥育地などの飼養歴についての聞き取り調査を行った。

馬の年齢の推定方法：文献 [5] に従い、切歯における永久歯の萌出と摩耗の程度により年齢を推定した。

病理組織学的検査：結節を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、脱灰液（カルキトックスTM、和光純薬工業(株)、大阪）に4℃で一晩浸して脱灰処理を行い、さらに5%硫酸ナトリウム溶液（和光純薬工業(株)、大阪）に室温で一晩浸して中和処理を行った。その後、定法にしたがってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色及び過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を実施した。

遺伝子検査：-20℃で凍結保存した検体から市販キット（QIAamp DNA Mini Kit, (株)キアゲン、東京）を用いてDNAを抽出した。Nested-PCR検査はDinkelら [6] の方法に準じて多包条虫に特異的なミトコンドリア12S rRNA領域を増幅した。Nested-PCR検査において使用したプライマーは表1に示す。PCRの反応液は、いずれもDNA溶液2.0 μlに2×PCR buffer 12.5 μl,

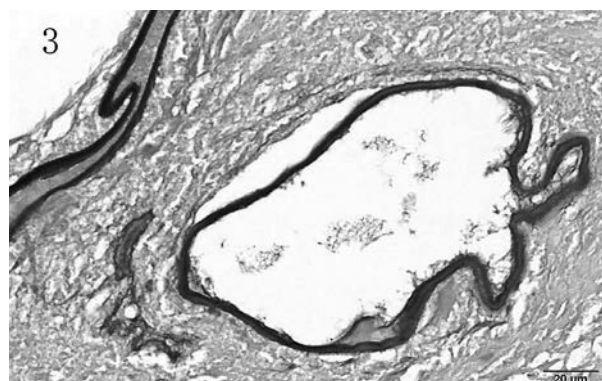


図3 PAS 染色組織写真（症例 No. 21, 脱灰後検索）
PAS 染色において角皮層は赤紫色に染色された。
(Bar = 20 μm)

2mM dNTPs 5.0 μl, 10pM 各プライマー0.3 μl, 市販PCR用酵素（KOD FX neo, 東洋紡(株)、大阪）0.3 μl (1U/μl) を加え、滅菌蒸留水を加えて全量を25.0 μlとした。PCR反応は、いずれも94℃2分間の反応後、98℃10秒間、58℃30秒間、68℃30秒間を35サイクル実施した。電気泳動により250bpのバンドを確認した検体についてはダイレクトシーケンスを実施して塩基配列を決定し、日本DNAデータベース（DDBJ）のデータベースを用いてBLAST検索により登録株との相同性検索を実施した。

過去の報告 [2] に従い、病理組織学的検査で多包虫に特徴的なPAS染色陽性の角皮層が確認された症例、または遺伝子検査で多包条虫遺伝子が確認された症例を「多包虫症」とした。

成 績

病理組織学的検査：53頭中49頭は石灰化を伴う線維

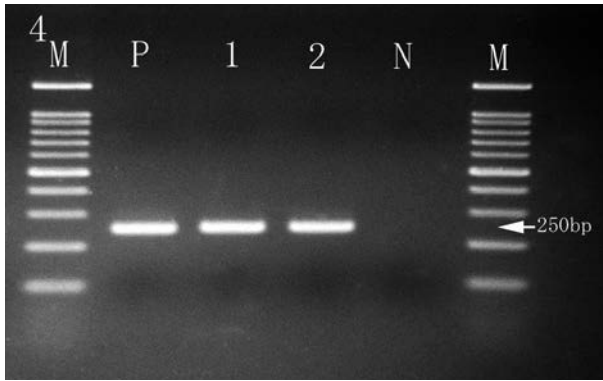


図4 多包虫症と診断された症例のNested-PCR検査写真
 M : DNA マーカー
 P : 陽性コントロール
 1 : 症例 No. 21 の検体
 2 : 症例 No. 37 の検体 (北海道での飼養歴がある個体)
 N : 陰性コントロール (DW)

性結節よりなる肉芽腫で、好酸球浸潤や壊死がみられ、そのうちの13頭は病変の中心部においてHE染色で好酸性の層状構造物として認められ、PAS染色陽性の多包虫に特徴的な角皮層がみられた(図2, 3)。1頭において角皮層の内側に薄い胚層と胚細胞の形成がわずかに認められたが(図2)、繁殖卵や原頭節はみられなかった。また、53頭中3頭は間質性肝炎、1頭は胆管嚢胞であった。

遺伝子検査: 組織学的に石灰化を伴う線維性結節が認められた49頭に対してNested-PCR検査を実施した。組織学的に角皮層が認められた13頭中10頭から多包条虫遺伝子が検出され、また組織学的に角皮層が認められなかった36頭中26頭においても多包条虫遺伝子が検出された(図4)。これら36頭のPCR増幅産物はシーケンス解析を実施したところ、すべて多包条虫北海道根室株(Accession No. AB024424)と一致した。

以上の結果から、病理組織学的検査で角皮層が認められた13頭と組織学的には角皮層は確認できなかったが遺伝子検査により多包条虫遺伝子が確認された26頭のあわせて39頭(39/610, 感染率6.4%)を多包虫症と診断した。また、表2において多包虫症と診断された馬39頭の品種、最終肥育地、性別、年齢、病理組織学的検査成績、遺伝子検査成績についての情報を示した。年齢は4~6歳、性別は雄12頭、雌25頭、去勢雄2頭であった。最終肥育地は福岡県16頭、佐賀県13頭、熊本県4頭、高知県3頭、北海道3頭であった。品種の内訳は軽種26頭、ポニー種6頭、日本輓系種5頭、北海道和種2頭で、品種別の感染率はそれぞれ5.5%(26/470), 9.8%(6/61), 12.2%(5/41), 5.3%(2/38)であり、さまざまな品種で感染が認められた。

表2 多包虫症と診断された馬39頭の情報

症例 No.	品種	最終肥育地	性別	年齢	PAS染色陽性角皮層の有無	Nested-PCR検査成績
1	軽種	熊本県	去勢雄	5	-	+
2	軽種	高知県	雄	6	+	+
3	軽種	福岡県	雄	6	-	+
4	軽種	福岡県	雌	4	+	+
5	軽種	佐賀県	雌	5	-	+
6	軽種	福岡県	雌	4	-	+
7	軽種	福岡県	雌	3	-	+
8	軽種	佐賀県	雌	3	+	+
9	軽種	高知県	雌	5	+	+
10	軽種	佐賀県	雌	4	-	+
11	軽種	佐賀県	雄	4	+	-
12	軽種	福岡県	雌	6	-	+
13	軽種	福岡県	雌	6	-	+
14	軽種	福岡県	雌	6	+	+
15	軽種	福岡県	雌	4	+	+
16	軽種	佐賀県	雌	4	-	+
17	軽種	佐賀県	雌	6	-	+
18	軽種	高知県	雄	6	-	+
19	軽種	佐賀県	雌	4	-	+
20	軽種	佐賀県	雌	2	+	-
21	軽種	佐賀県	雌	6	+	+
22	軽種	佐賀県	雄	6	+	-
23	軽種	福岡県	雄	5	-	+
24	軽種	佐賀県	去勢雄	4	+	+
25	軽種	佐賀県	雄	3	-	+
26	軽種	佐賀県	雄	6	-	+
27	ポニー種	福岡県	雌	4	-	+
28	ポニー種	北海道	雄	4	-	+
29	ポニー種	福岡県	雌	6	-	+
30	ポニー種	福岡県	雄	3	-	+
31	ポニー種	福岡県	雌	6	-	+
32	ポニー種	福岡県	雌	6	-	+
33	日本輓系種	福岡県	雄	6	+	+
34	日本輓系種	熊本県	雌	3	-	+
35	日本輓系種	(北海道→)福岡県	雌	6	-	+
36	日本輓系種	熊本県	雌	4	+	+
37	日本輓系種	北海道	雌	6	-	+
38	北海道和種	北海道	雄	3	-	+
39	北海道和種	熊本県	雌	6	-	+

+ : 陽性 (または有) - : 陰性 (または無)

軽種 : サラブレッド, アラブ, アングロアラブなどの軽快で競走や乗用に適する馬。

ポニー種 : 体高147cm以下の馬の総称。

日本輓系種 : 純血重種馬と半血重種馬(純血重種馬同士の混血)の交配などにより生まれた混血重種馬。

北海道和種 : 北海道在来馬で、いわゆる「道産子」のこと。

参照 : (公社)日本馬事協会登録規定事務細則

(<http://www.bajikyo.or.jp/pdf/2014kitei.pdf>)

考 察

病理組織学的及び遺伝子検査の結果から、福岡県のと畜場に搬入されたさまざまな品種の馬において多包虫感

染が認められた。本研究は病理組織学的検査と遺伝子検査の検査結果が異なる症例がみられ、病理組織学的検査と比較して遺伝子検査での検出率が高かった（表2）。検査結果が異なった原因としては遺伝子が確認されても虫体が壊死や石灰化により組織学的に検出困難であったこと、虫体が死滅して遺伝子は消失していたが組織学的には角皮層が残存していたことなどが考えられた。また、組織学的に虫体が検出困難であっても遺伝子検査において遺伝子が存在すれば多包虫症の診断が可能であるため、PCR検査は多包虫症の検出に有用であると思われる。

今回の調査対象となった馬はすべて日本産であった。疫学調査で北海道での飼養歴が判明し、かつ病理組織学的検査及び遺伝子検査により多包虫症と診断された症例は4頭で、これらの馬は過去の報告 [2, 4] と同様に多包虫症の有病地である北海道で感染した可能性が考えられた。一方で、と畜場に搬入される馬は牛とは異なり、トレーサビリティが義務づけられていないため、本研究の多包虫感染馬の多くは最終肥育地以外の飼養歴は確認できず、北海道での飼養歴は不明であり、これらの馬については感染地の特定が困難であった。しかし、日本での多包虫の地理的分布が北海道に局限していることや統計（農林水産省：平成25年度馬関係資料、<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/pdf/25umtotal.pdf>）によれば日本で生産される軽種馬、輓用馬、ポニーはそれぞれ約90%が北海道産であることから、北海道での飼養歴が不明な多包虫感染馬も北海道で感染した可能性を完全には否定できないと思われる。

従来、北海道での飼育歴のある犬が多包虫症のキャリアーとして危惧されてきたが [1]、馬がキャリアーとなる可能性もあると考えられ、馬の国内移動にも注意する必要があると思われる。一般的に、馬は人や豚と同様に多包虫の非好適な中間宿主であり、生活環の成立には関与せず、終宿主への感染性を示す原頭節の形成はみられない [1]。本研究では馬の肝臓結節内に原頭節は確認されなかったため、これらの馬の肝臓に寄生した多包虫の摂食による終宿主への感染の可能性はない。しかし、北海道産競走馬の肝多包虫症において胚層に胚細胞が認められ、終宿主への感染性が保持されている可能性が示唆されており [4]、本研究の1例においても胚層に胚細胞がみられた。人の多包虫症ではまれに原頭節が形成されるが、馬では繁殖胞や原頭節が形成されたという報告は現在までない [3]。しかし、感染期間と個体の状態次第では馬においても原頭節形成が起こる可能性が指摘されており [2]、さらに症例を集積して馬における原頭節

形成の可能性を検討する必要があると思われる。

食肉検査でみられる馬の肝臓灰白色硬結節は「肝砂粒症」として部分廃棄されているが、本研究の結果からさまざまな品種の馬の肝臓硬結節の多くに多包虫症が含まれていた (39/53, 73.6%)。多包虫感染による馬の肝病変は線虫類など他の寄生虫感染による肝病変と肉眼的に類似しており [4]、多包虫症の有病地である北海道以外のと畜場では見落とされる可能性もある。したがって、馬の食肉検査では肝病変の鑑別診断として多包虫症を考慮し、多包虫が含まれる可能性がある馬の肝臓硬結節は適切に処理することが公衆衛生上、重要であると考えられた。

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

本稿を終えるにあたり、PCR検査及び病理組織学的検査において貴重な技術的助言をいただいた国立感染症研究所寄生動物部 森嶋康之主任研究官、山崎 浩研究員に深謝する。

引用文献

- [1] 神谷正男：エキノコックス症の危機管理へ向けて—現状と対策—, 日獣会誌, 57, 605-611 (2004)
- [2] Goto Y, Sato K, Yahagi K, Komatsu O, Hoshina H, Abiko C, Yamasaki H, Kawanaka M: Frequent isolation of *Echinococcus multilocularis* from the livers of racehorses slaughtered in Yamagata, Japan, *Jpn J Infect Dis*, 63, 449-451 (2010)
- [3] Ueno M, Kuroda N, Yahagi K, Ohtaki T, Kawanaka M: Analysis of antibody responses by commercial western blot assay in horses with alveolar echinococcosis, *J Vet Med Sci*, 74, 813-815 (2012)
- [4] Kaji Y, Taniyama H, Matsukawa K, Okada H, Tsunoda S, Tagami M, Akita H: First incidence of multilocular echinococcosis in a race horse in Japan, *J Vet Med Sci*, 55, 869-870 (1993)
- [5] 沖 博憲：馬の年齢の数え方, 馬の医学書, 日本中央競馬会競走馬総合研究所編, 第1版, 33, 緑書房, 東京 (2004)
- [6] Dinkel A, von Nickisch-Rosenegk M, Bilger B, Merli M, Lucius R, Romig T: Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy, *J Clin Microbiol*, 36, 1871-1876 (1998)

The Relationship between Hepatic Grayish White Solid Nodules Found
in Horses Brought to a Slaughterhouse in Fukuoka Prefecture
and Larval *Echinococcus multilocularis* Infection

Tatsuro HIFUMI^{1), 2), 3) †}, Kae IKEDA¹⁾, Yoshiki ETOH⁴⁾, Kazuhito IKAWA¹⁾,
Koichi NISHIMURA¹⁾, Takuji OGAWA¹⁾, Hiroaki KAWAGUCHI^{2), 3)}
and Noriaki MIYOSHI^{2), 3)}

- 1) *Fukuoka Prefecture Meat Safety Inspection Center, 4-5-34 Futsukaichichuo, Chikushino, 818-0072, Japan*
- 2) *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*
- 3) *The United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8511, Japan*
- 4) *Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, 818-0135, Japan*

SUMMARY

From July 2012 to December 2012 (for six months), hepatic grayish white solid nodules were observed in 53 of 610 horses brought to a slaughterhouse in Fukuoka Prefecture. We performed both histopathological and genetic examinations on these materials to investigate larval *Echinococcus multilocularis* infections. Based on the results of these examinations, 39 horses were diagnosed with alveolar hydatid disease (the infection rate was 6.4%). Infections of larval *E. multilocularis* were observed not only in light breed horses, as has been reported previously, but also in various other types of horses, including ponies, Japanese draft horses and Hokkaido ponies. In the epidemiological survey, we were able to confirm that 4 horses had been raised in Hokkaido, where alveolar hydatid disease is endemic, and they might have been infected by larval *E. multilocularis* there. On the other hand, we could not confirm that most of the horses infected by larval *E. multilocularis* in the present survey had been raised in Hokkaido, and we had difficulty in detecting where they had been infected by larval *E. multilocularis*. But, considering the regional distribution of *E. multilocularis* in Japan and the statistical analysis data of horses born in Japan, we could not completely deny the possibility that they also might have been infected by larval *E. multilocularis* in Hokkaido.

— Key words : alveolar hydatid disease, horse, meat inspection.

† Correspondence to : Tatsuro HIFUMI (*Fukuoka Prefecture Meat Safety Inspection Center*)

4-5-34 Futsukaichichuo, Chikushino, 818-0072, Japan

TEL 092-923-6621 FAX 092-923-6648 E-mail : hifumi-t0938@pref.fukuoka.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 253 ~ 257 (2015)