

カイウサギにおける実験的小型膵蛭症

安田宣紘・間世田和久*・清水 孜

(家畜病理学研究室)

平成2年7月27日受理

Experimental Eurytremiasis, *Eurytrema coelomaticum*, in Rabbits

Nobuhiro YASUDA, Kazuhisa MASEDA and Tsutomu SHIMIZU
(Laboratory of Veterinary Pathology)

結 言

膵蛭属 (*Eurytrema*) は槍形吸虫と同じ二腔吸虫科 (*Dicrocolidae*) に属し、牛・羊・山羊・豚などの家畜及びその他の動物の膵管内に寄生する。その種類も多く、反芻家畜に寄生する主要なものは膵蛭 (*Eurytrema pancreaticum*) と小型膵蛭 (*Eurytrema coelomaticum*) の2種である。*E. pancreaticum* は牛・羊・山羊・フタコブラクダ・水牛・豚・サル・ノウサギ・ウサギ・ヒトから、*E. coelomaticum* は牛・羊・山羊・フタコブラクダから報告され、他にも *E. ovis*, *E. media* など現在まで14種が知られている^{3,15,17,22}。

1979年、河野ら¹⁰や坂本ら¹²は、鹿児島県北部の高地にある2牧場の育成牛 (黒毛和種) に削瘦・泡沫性流涎を特徴的な臨床症状とする疾病の集団発生に遭遇し、これらについて調査した結果、*E. coelomaticum* の重度感染による寄生虫性疾患であることを明らかにし、さらに、この膵蛭症について詳細な臨床的、寄生虫学的及び病理学的研究を行った。この過程で、調査した膵蛭汚染牧野から入手した2頭のキュウシュウノウサギ (*Lepus brachyurus brachyurus* Temminck et Schlegel) に *E. coelomaticum* の寄生を認め、ノウサギにも広く蔓延している可能性を示唆した^{13,14,16}。

本症が発生した牧場では毎年継続的に発生が見られるが、同牧場の飼育形態や中間宿主であるササキリの *metacercaria* 保有率の動向などから膵蛭感染牛のみが次期導入牛への感染源となる可能性は低いものと思われ、この牧野に本症の感染源となりうる牛

以外の動物、すなわち保虫宿主の存在が疑われる。

本研究は、この観点から牛の小型膵蛭症における保虫宿主としてのノウサギの関与の可能性を検討するために、膵蛭発生牧野から採取したノウサギの糞便の膵蛭虫卵の検出、中間宿主ササキリの年間月別感染率の調査を行い、さらに、カイウサギを用いた実験的感染試験を試み、臨床的、血液学及び血清生化学的検査、膵臓機能検査、皮内反応検査、虫卵検査、回収膵蛭虫体と自然感染牛、実験感染山羊から得られた虫体との形態的比較、脱嚢子虫に対する血清反応試験などを行ったところ、興味ある成績が得られたのでここに報告する。

材 料 と 方 法

1. 牧野調査

今回の調査の対象とした牧場は、鹿児島県北部の標高300mの高地に位置し、1979年春に *E. coelomaticum* 感染症が集団発生した牧場である。現地での聞き取り調査で牧野に多数のノウサギが生息していることが判明したため、牧野内に多数散在するノウサギの糞便を採集し、膵蛭虫卵の検出を行い、さらに中間宿主であるササキリ類の生息状況、*metacercaria* の保有状態についての調査を行った。

(1) 牧野内ウサギ糞便の寄生虫学的調査

調査対象牧場に散在する比較的新鮮なノウサギの糞便を採取し、沈澱集卵法による虫卵の検出を行った。

(2) ササキリの種類と *metacercaria* の保有状況調査

1988年10月と1989年7月から10月にかけて調査対象牧場に生息するキリギリス科のササキリ類及びツムシ類など直翅目昆虫を採集、種類同定後、実体

*現在 中村愛犬病院、860 熊本市清水亀井町19-19

Nakamura Animal Hospital, 19-19 Shimizukameicho
Kumamoto 860

顕微鏡下でmetacercariaの保有の有無を観察し、それぞれの昆虫のmetacercariaの保有数を計数した。採取したmetacercariaはウサギへの感染試験に用いた。

2. 実験的感染試験

実験にはカイウサギを用い、投与metacercariaは前述の調査対象牧野のササキリより得られたmetacercariaを用いた。投与量はササキリ1匹当たりの平均保有数200個を最少とし、最大投与量は2000個とした。それぞれについて臨床的、血液学的及び血清生化学的検査、膵機能検査、皮内反応、虫卵検査、病理学的検査を行った。また、感染ウサギより得た血清を用いてmetacercariaから脱囊させた子虫に対する反応を観察した。

(1) 供試動物

自家生産した3ヶ月～12歳、体重0.7～2.7kgのカイウサギ雄8頭、雌8頭、計16頭を使用した。栄養状態は全て良好で、臨床的にも血液学的にも特に異常は認めず、糞便検査で蠕虫類の寄生のないことを確認した後、実験に供した。飼料はウサギ用ペレット「ラビットエース」(日本農産工業株式会社)、飲用水は水道水を自由摂取させ、飼育室内でケージ飼いといた。

これらのウサギを4群に分けた。

- 第1群(metacercaria200個投与群) : No.1～9(9頭)
- 第2群(metacercaria1000個投与群) : No.10, 11(2頭)
- 第3群(metacercaria2000個投与群) : No.12, 13(2頭)
- 第4群(対 照 群) : No.14, 15, 16(3頭)

(2) metacercaria投与方法

ササキリから集めたmetacercariaは生理食塩水浮遊液とし、第1群に200個、第2群に1000個、第3群に2000個を経口投与した。また、第4群には同量の生理食塩水を投与し、対照群とした。

(3) 実験期間

Metacercaria投与から剖検までの期間は、第1群が投与後32日間3頭、60日間3頭、90日間3頭、第2群が投与後130日間2頭、第3群は投与後130日間2頭、対照の第4群は130日間1頭、90日間2頭とした。

(4) 臨床、血液学的及び血清生化学的検査

実験期間中、毎日、朝夕一般症状を観察し、体重は1週間間隔で測定した。採血は耳静脈から行い、塗抹標本はペルオキシダーゼ・ギムザ染色にて白血球分画を検査した。また、血清アマラーゼはコグック「エクタムDT60アマラーゼ」(アミロペクチン色

素法)を用いてKODAKエクタムDT60(長瀬産業株式会社)で測定した。

(5) 虫卵検査

虫卵検査は、metacercaria投与70日目から午後5時に糞便を採取し、沈澱集卵法で用いてEGP(Eggs per gram)を求めた。

(6) 膵臓外分泌機能検査

ゼラチンフィルム法を用いた。フィルムはX線フィルムを使用し、37℃で1時間、または室温で2時間放置後のゼラチンの融解の度合いを見て判定を行った。

(7) 虫体の形態学的検査

虫体は剖検後直ちに取出し、生理食塩水に約12時間入れ虫体を伸展させた後、5%緩衝ホルマリン液で固定した。その後、虫体をスライドグラスに挿み、50gの負重を加え圧平し、顕微鏡下で体長、体幅、口吸盤、腹吸盤の大きさを計測した。同様の操作で計測した牛、山羊由来の*E. coelomaticum*虫体100匹と比較した。

(8) 皮内反応検査

Metacercaria投与後104、124日目のウサギ4頭(No.10～13)と対照の1頭(No.14)、計5頭を使用して*E. coelomaticum*に対する皮内反応について検査を行った。抗原は牛の膵臓より得られた膵蛭虫体(*E. coelomaticum*)の懸濁乳剤を用い、剃毛したウサギの背側中央部皮内に0.2mlを注射した。判定は注射5分、10分、15分、30分後と経時的に観察し、腫脹、硬結の発現の有無を判定の基準として陽性、陰性を判定した。

(9) 脱囊子虫の血清反応

ササキリの体腔より得られたmetacercariaを0.2%ペプシン液に入れ37℃の孵卵器内で24時間作用させ、さらに0.5%トリプシンを加え脱囊させた後、3等分し、それぞれに第2群のNo.10(metacercaria1000個投与、130日目)の血清、第3群のNo.13(metacercaria2000個投与、130日)の血清、対照群No.14の血清を加え、37℃の孵卵器内で24時間反応させた後、顕微鏡下で脱囊子虫に対する反応を観察した。

(10) 病理学的検査

第1群で、No.1～3は、metacercaria投与後32日目、No.4～6は、metacercaria投与後60日目、No.7～9は、metacercaria投与後90日目に、第2、3群(No.10～13)は、metacercaria投与後130日目に、第4群のNo.14は実験開始130日目、No.15、16は90日目に、安楽死させ、直ちに剖検した。

膵臓は生理食塩水に浸し実体顕微鏡下で膵蛭虫体の有無を観察した後に、その他の臓器は肉眼的観察の後に、10%緩衝ホルマリン溶液で固定した。全臓器は法の如くパラフィン包埋、薄切標本となし、hematoxylin-eosin(H-E)染色を施した。特に膵臓は左葉右側部、左葉中央部、左葉左側部、右葉右側部、右葉中央部、右葉左側部の6箇所から組織を切り出し、必要に応じてMasson trichrome染色、periodic acid-Schiff(PAS)染色等の各染色を施し、病理組織学的検査を行った。

実験成績

1. 牧野調査結果

(1) ノウサギの糞便の寄生虫学的検査成績

牧野にはノウサギの糞便が広い範囲にわたって散在していたが、3~5個体分が狭い範囲に集中してみられる場所もあった。これらの糞便の中、比較的新鮮なもの18個体分を採取し、沈澱集卵法で寄生虫卵を検査した。1検体当たりの糞便重量は6.5~18g、平均13.5gで12検体中に膵蛭虫卵が認められ、1検体中の膵蛭虫卵数は163~328個、平均225個であった。今回の調査結果から本牧場に生息するノウサギにかなり高率に膵蛭が感染していることが判明した。

(2) ササキリの種類とmetacercariaの保有率

膵蛭汚染牧場に生息する昆虫相を調査するため1988年10月~1989年10月にかけて、計10回昆虫採集を行った。採集には目の細かい捕虫網を用い、なるべく広い範囲から均等に採集した。採取した昆虫類の中、膵蛭の中間宿主としての可能性が考えられる直翅目に属するものは、ミヤマフキバッタ(*Parapodisma mikado*)、ヒシバッタ(*Acrydium japonicum*)、ショウリョウバッタモドキ(*Gonista bicolor*)、ダイミョウバッタ(*Locusta migratoria*)、ツユムシ(*Phaneroptera falcata*)、コウロギ(*Cryllulus japonicus*)、ホシササキリ(*Conocephalus maculatus*)、コバネササキリ(*C. japonicus*)、オナガササキリ(*C. gladius*)などであった。これら全てを実体顕微鏡下で解剖し、metacercariaの保有の有無、保有数について検査した。その結果、metacercariaが見られた虫種は、ササキリ亜科(Conocephalinae)に属するホシササキリ、コバネササキリ、オナガササキリの3種のみであった。

それぞれのmetacercaria保有率(metacercaria保有ササキリ数/採取ササキリ総数)は1988年10月採集分ではホシササキリが39.7%(1匹当たりの平均保有数169個)、コバネササキリが86%(196個)、オ

ナガササキリ80%(112個)でコバネササキリが高いmetacercaria保有率を示し、全てのササキリから得られたmetacercariaの総数は、1988年で40,191個、1989年で4,187個、計44,278であった。Metacercaria保有ササキリ1匹当たりのmetacercaria数は1~860個とかなりの幅を示し、種類別の1匹当たりの平均保有metacercaria数は1988年では、ホシササキリが169.1個、コバネササキリが196.2個、オナガササキリが112.9個であり、コバネササキリが高い保有数を示した。また、年別に同時期のササキリ類におけるmetacercaria保有率をみると、1988年10月で53.2%、1989年10月で38.3%で年により差がみられた。月別の保有率を比較すると、1989年の7、8月で18.6%、9、10月で38.3%と秋季に増加する傾向がみられた。

2. 実験感染試験結果

(1) 臨床及び血液学的検査成績

実験期間中、全てのウサギは元気・食欲共に旺盛で、臨床的にも異常は観察されなかった。Metacercaria投与前及び投与後に経時的に行った白血球百分率検査では特に変化はみられなかった。血清アミラーゼ検査では、第1群32日目のNo.1, No.2で263U/ℓ, 177U/ℓ, 60日目のNo.3, 4, 5, 6でそれぞれ217, 171, 236, 153U/ℓであり、90日目のNo.7, 8, 9では212, 190, 196U/ℓであった。第2群のNo.10, 11は投与36日目で258, 257U/ℓ, 92日目で179, 196U/ℓ, 125日目で194, 143U/ℓであった。第3群のNo.12, 13では投与36日目で509, 215U/ℓで、92日目で826, 244U/ℓ, 125日目で313, 574U/ℓであった。第4群のコントロールでは、2頭とも常に98~157U/ℓの範囲内に入っていた。Metacercaria投与ウサギは投与32日目よりアミラーゼの上昇がみられたが、その後、下降傾向を示し投与前の値に復する個体もあった。

(2) 虫卵検査成績

ウサギがmetacercariaを摂取してから成虫となり虫卵を排出するまでの日数(prepatent period)は、No.10で86日、No.11, 13で90日、No.12で93日で、平均89.8日を要した。なお、第1群9例は実験期間中虫卵の排出はみられなかった。EPGは、投与後86~106日の間では10以下で上下したが、108日目以降は10を越えるようになった。また、それぞれのウサギにおいて86~106日目の間のEPGは0~10の範囲で日間変動がみられ、115日目からは増加傾向を示したが、排卵数の増減には一定のパターンは認められなかった。

糞便中の虫卵の大きさはNo.10で $44.01 \pm 2.35 \times 30.26 \mu$

1.72[長径±標準偏差×短径±標準偏差(μ m)], No.11で43.64±3.24×29.58±2.15, No.12で44.21±2.66×29.900±2.10, No.13で44.34±2.61×29.750±1.63であった。それぞれの虫卵は、牛寄生の*E. coelomaticum*虫卵の計測値42~53×23~38 μ mの範囲内に入っていた。

(3) 膵臓機能検査成績

Metacercaria投与後、糞便中からトリプシンが消失するまでの日数は、No.10で88日、No.11で95日、No.12で88日、No.13で95日であり、平均では91.5日であった。この消失までの期間は、prepatent periodとほぼ一致した。実験期間の短かった第1群のNo.1~9と第4群のコントロールでは膵臓機能には特に異常は認められなかった。

(4) 皮内反応検査成績

皮内反応検査は、第2, 3群及び対照のNo.14についてmetacercaria投与後104日目と124日目の2回行ったが、いずれも特異的な反応は認められなかった。

(5) Metacercariaに対する血清反応検査成績

No.10とNo.13のウサギの血清が脱嚢子虫と反応し、口端部付近の体表に微量ではあるが絮状の凝集物を形成した。これら2頭のウサギ血清の子虫に対する反応の程度には差は認められなかったが、対照としたNo.14のウサギ血清では凝集物の形成は観察されなかった。

(6) 虫体の形態学的検査成績

ウサギより回収した虫体は、体長：4.8~9.1(平均：6.60±0.66)mm, 体幅：1.9~4.0(平均：3.24±0.42)mm, 口吸盤直径：0.45~0.80(平均：0.57±0.209)mm, 腹吸盤直径：0.52~0.85(平均：0.63±0.04)mm, 腹吸盤/口吸盤比：1.045~1.178(平均：1.105±0.069)で、同様の操作における牛の寄生虫体は、体長：5.0~9.3(平均：6.47±0.99)mm, 体幅：1.8~4.2(平均：3.13±0.57)mm, 口吸盤直径：0.33~0.80(平均：0.62±0.11)mm, 腹吸盤直径：0.52~0.85(平均：0.68±0.15)mm, 腹吸盤/口吸盤比が1.050~1.308(平均：1.097±0.132)で、実験感染山羊より回収した虫体では、体長：3.5~7.5(平均：5.46±0.93)mm, 体幅：1.3~3.8(平均：2.43±0.58)mm, 口吸盤：0.45~0.75(平均：0.56±0.79)mm, 腹吸盤：0.50~0.80(平均：0.60±0.98)mm, 腹吸盤/口吸盤比が1.050~1.158(平均：1.091±0.83)であった。今回のウサギから回収した虫体は牛寄生虫体とほぼ同様の計算値を示したが、実験感染山羊の虫体よりはやや大きい値を示した。しかし、牛、山羊同様、腹吸盤に比

べ口吸盤は小さかった。

(7) 病理学的検査成績

第1群(metacercaria 200個投与群)において虫体が回収された例はNo.1, 5, 6, 8の4例であり、No.8のみが剖検時に虫体が確認され、No.1, 5, 6は組織検査で虫体を認め、虫体寄生率(虫体寄生例数/metacercaria投与例数)は44.4%であった。

No.8では、間質結合織の増生が顕著で偽小葉の形成やリンパ球、好酸球などの炎症性細胞浸潤も顕著で、周囲膵細胞の圧迫、萎縮、チモーゲン顆粒の消失などの変状が認められたが、他の例では膵管の軽度な肥厚がみられたのみで、膵実質の変状は観察されなかった。本群では、腎臓と肝臓に病変がみられた。腎臓では、肉眼的に白斑のみられた部位に一致して間質結合織が増生し尿細管の萎縮や扁平化したものが認められ、他の部位には少量のリンパ球の巣状浸潤を伴う軽度の間質結合織増生と該部の糸球体包壁の肥厚や糸球体の萎縮が認められた。また、肝臓の間質、特に胆管周囲の結合織にリンパ球、形質細胞を主体とする軽度な円形細胞浸潤や肝細胞の軽度腫大が共通して認められた。

第2群(metacercaria1000個投与群)では、肉眼的にも虫体の寄生と膵管の肥厚、拡張が認められ、No.10から165匹、No.11から93匹の虫体が回収され、回収率(回収虫体数/投与metacercaria数)はそれぞれ16.5%, 9.3%であった。組織学的には膵臓の間質結合織の顕著な増生、リンパ球を主体とする瀰漫性細胞浸潤、膵細胞の萎縮、チモーゲン顆粒の消失、一部に導管介在部上皮による腺腔形成像がみられ、また、導管壁の虫卵結節や小導管閉塞性の虫卵結節を多数認め、導管粘膜上皮の内腔への乳頭状増生や導管粘膜固有層における微小導管の腺腫様増殖などが主病変であった。膵臓以外の変状としては、腎臓皮質にリンパ球の浸潤を伴う結合織の増生と一部尿細管の変性像を認め、糸球体の萎縮や基底部の軽度肥厚、メサングウム基質の増生を示す糸球体も認められた。また、髄質域において集合管の拡張や扁平化を示す部位もみられた。肝臓には第1群と同様な間質のリンパ球の巣状浸潤が認められたが、他の組織には特記すべき変状は認められなかった。

第3群(metacercaria 2000個投与群)は、虫体回収率が27.7%, 21.8%で、第2群よりも高率であったが、肉眼的にも組織学的にもほぼ第2群と同様な所見を示した。比較的虫卵結節が少なく、導管周囲及び間質結合織の増生と導管粘膜上皮の顕著な過形

成が特徴的病変であった。膵臓以外の共通病変としては、腎臓の肉眼的陥凹部位に結合織増生と尿細管の変性、糸球体包壁の肥厚、糸球体の萎縮などが認められ、リンパ球や形質細胞の巣状浸潤もみられた。また、肝臓の小葉間結合織内に少量のリンパ球浸潤が認められたが、他の組織には著変認められなかった。

第4群（対照群）ではいずれの例においても、膵臓には特に変状は認められなかったが、腎臓、肝臓に実験群と同様な変状が存在した。すなわち、腎臓は間質に少量リンパ球の瀰漫性浸潤、間質結合織の軽度～中等度の増生、それに伴う尿細管の萎縮あるいは拡張、糸球体包壁の肥厚、糸球体の萎縮、メサンギウムの軽度増生などが認められ、肝臓の小葉間結合織に軽度なリンパ球の巣状浸潤がみられた。しかし、その他の組織には特記すべき変状は認められなかった。

考 察

*E. coelomaticum*はその發育史上、カタツムリとササキリの二種の中間宿主が必要で、感染が成立するにはこれらの動物の生息する環境の存在が不可欠な条件となる。本研究の対象とした*E. coelomaticum*流行牧場は、これらの条件が整った環境に、たまたま感染牛が導入されたため重度な膵蛭症が蔓延したものと考えられる。

今回調査した牧野には多数のノウサギの糞便がみられ、これらを検査した結果、高率に膵蛭虫卵を認め、本牧場に生息するノウサギにかなり膵蛭が感染していることが窺えた。

ウサギに膵蛭が寄生することは、栗栖¹¹⁾のノウサギ及びカイウサギにおいて*E. pancreaticum*の寄生例の報告があり、また、坂本¹⁴⁾が今回調査した牧場においてキュウシュウノウサギ (*Lepus brachyurus brachyurus* Temminck et Schlegel)から*E. coelomaticum*を検出していることから明らかなことで、ウサギが膵蛭にとって好適な宿主であることを示している。

ササキリの*metacercaria*保有調査では、年別で1988年の方が1989年より捕獲数、保有率ともに高かった。これは本牧場を横断する道路建設工事が1989年に行われ、ササキリの生息環境が大きく変化したことや、1989年には、昆虫類の活動期に連続して台風が襲来したことなどの悪条件が重なったことが影響しているものと思われる。

ササキリの種類別の*metacercaria*保有状態につい

ては、Chinoneら²¹⁾の調査によるとウスイロササキリ78.2%、ホシササキリ74.3%、ササキリ64.7%、オナガササキリ44.4%、コバネササキリ76.2%、ツユムシ35.7%であり、本牧場における坂本ら^{13,17)}の調査では、ホシササキリとツユムシのみに寄生を認め、7月下旬と12月上旬のホシササキリの寄生率は18.3%と42.1%で、1個体における寄生数はそれぞれ31～497個と3～567個で、夏より晩秋に向かってササキリの個体数は減少するが、感染率は上昇し季節変動のあることを明らかにしている。今回の調査では、3種類のササキリに*metacercaria*が認められ、それらの保有率は、ホシササキリ39.7%、コバネササキリ86.0%、オナガササキリ80.0%でコバネササキリとオナガササキリが高い保有率を示し、坂本らの報告¹³⁾と若干の相違がみられた。これは、採集用具、採集場所の違いやコバネササキリが比較的小型の虫体であり、動作も緩慢なことなどが採集に影響したものと考えられる。寄生率の季節的変動は、7、8月で18.6%、9、10月で38.3%と夏から秋にかけて上昇するが、1個体当たりの保有数には顕著な差はみられなかった。

今回調査した牧場では、膵蛭症集団発生時には繁殖用牛の育成のため春に子牛を導入、翌年カタツムリ、ササキリなどの中間宿主が活動する以前に売却して、新しい子牛と交代させる飼育形態をとっており、虫卵を排泄する感染牛が、次期導入子牛への感染源となりうる可能性は低いものと思われるが、それにもかかわらず牧野調査においてササキリの*metacercaria*保有率は夏より秋にかけて増加する傾向がみられ、しかも毎年定期的に本症が発生している。このことは、この牧野に感染源となりうる牛以外の宿主の存在を示唆するものであり、今回の調査結果からもノウサギが保虫宿主として関与している可能性が非常に大きいものと考えられる。

膵蛭症の臨床的症狀は、牛では重度寄生で栄養障害が特徴的であり、食欲不振、被毛不良、削瘦などの栄養不良がみられ、泡沫性流涎、下痢、軟便も認められる。血液及び血清生化学的所見では、赤血球数減少、ヘマトクリット値低下、好酸球数増加、低蛋白血症、血清アミラーゼ活性値の軽度低下、耐糖試験異常などが認められており、糞便のフィルム試験（トリプシン消化試験）で膵機能の異常を示すことも知られている。今回の高率感染させたウサギの実験では、第2、3群の重度感染例においてアミラーゼの上昇やトリプシンの分泌障害を認めたが、特に

異常な臨床症状は示さなかった。このような牛とウサギとの差は、解剖学的あるいは消化生理機構の違い、さらには宿主の感受性の差によることなどが考えられるが、いずれにしてもこのように高率に感染したウサギが不顕性に耐過することは膵蛭のtransmitterとしての好条件をそなえているものといえる。

*E. coelomaticum*のprepatent periodは、坂本ら^{13,17)}の報告によれば山羊で98~118日(平均112日)で、河野ら⁷⁾の山羊実験例では、90~101日(平均98.5日)であり、また、*E. pancreaticum*は、山羊で88~98日(平均93日)、ウサギで90~126日(平均107日)とされている²⁾。今回の実験では、第2群(metacercaria1000個投与群)、第3群(metacercaria2000個投与群)で86~93日(平均89.8日)で初回虫卵の排出がみられた。これらの期間の差は、宿主の種差も関係しているものと思われるが、膵蛭の虫卵排泄数が他の吸虫類と比較して極端に少なく、しかも日間変動が大きいこと、少数寄生時は検出率が低下することなども一要因として考えられる。

EPGは、2~34の範囲で日間変動がみられたが、排卵数の増減には一定したパターンは認められなかった。河野ら⁹⁾は、*E. coelomaticum*重度寄生牛でも排卵数は極めて少なく変動が大きいことを指摘しており、坂本ら¹³⁾も、牛の*E. coelomaticum*約7000個体寄生した例のEPGが0~140にわたって変動し、一定したパターンを示さないことを観察して、1回の虫卵検査でのみ寄生の有無を判定することは危険であるとしている。しかし、Chinoneら²⁾は、ウサギ、山羊への実験的*E. pancreaticum*感染例で、排卵初期には卵数は少なく、120日ごろから急激に虫卵数が増加し、排卵数の変動にはある一定のリズムが認められたとしている。今回の実験では、観察期間が短かったため寄生数と排出虫卵数との関係を明らかにすることはできなかった。さらに長期間の観察が必要と思われる。

虫体の形態学的検査では、実験ウサギ、牛、山羊の動物種による大幅な差は認められず、ウサギから回収した虫体は、重度感染牛より得られた虫体の大きさと比べると、ほぼ同範囲内に入るものの、キュウシュウノウサギからの虫体と比較するとかなり小さい。しかしながら、同牧場で採取したmetacercariaを投与した山羊とBALB/cnu/×マウスから回収した虫体がそれぞれ5.50~10.00×1.70~2.85mmおよび6.50~9.85×2.40~3.50mm^{18,19)}と大きかったことなどを考慮すると、虫体の大きさは宿主動物の種差に加

えて、虫体の寄生密度によってもかなり変動するもののように思われるが、測定値の誤差は、計測時の虫体の成熟度によるものや標本作成時の手技など種々の要因が考えられることから、俄に判断しがたい。

膵蛭の臨床的診断法の研究報告は少ないが虫体粗抗原を用いた皮内反応が試みられている。坂本ら¹³⁾は膵蛭の磷酸緩衝液の抽出液を牛と山羊の尾根部皮内に注射し、感染動物に著明な陽性反応を認め、その診断的有用性を示している。今回のウサギの皮内反応では、対照群と感染群との間に反応差が認められなかったことから、ウサギにおいては牛や山羊ほど明らかな反応を示さないものと思われるが、今後、更に精製された抗原を用い追試する必要がある。

Metacercariaに対する血清反応検査は、肝蛭については多くの報告があるが^{4,5,6,21,24)}、膵蛭に関するものは見当たらない。今回はこれらの肝蛭に用いられた方法に準じて脱嚢子虫と膵蛭感染130日目のウサギ血清と反応させ凝集物の形成をみたが、肝蛭や豚回虫での反応にみられるような明瞭な結果は得られなかった。これは、寄生虫の体内移行経路などの違いによる宿主の免疫応答の差によるものと思われる。

Metacercaria投与数と寄生虫体数との関係について、今回の感染実験で、第1群では200個投与し、投与後32日、60日、90日と経時的に観察を行ったが、虫体の全く認められなかった例もあり、また、寄生例でも膵臓病変は認められなかった。これはmetacercaria200個投与では、ウサギに*E. coelomaticum*の感染を成立させるには十分でないことを示し、感染例では個体数が少なく、しかも未熟虫体であったため膵臓への影響は少なかったものと思われる。坂本ら¹⁶⁾の実験でも、metacercaria800個投与例で回収率が6.2%と、metacercariaの投与数が少なくなるにつれ感染率も低くなる傾向を示しており、今回行ったmetacercaria200個投与では、十分な感染の成立は期待できないものと思われる。しかしながら、1000個投与した第2群、2000個投与した第3群では全例に寄生がみられ、平均回収率も12.9%、24.8%で、metacercariaの投与数に比例して寄生率も増加する傾向がみられた。これは2頭の山羊にmetacercaria3700個を投与し、122匹の成虫(回収率3.3%)を得たBush¹⁾の実験例よりは高い回収率である。このことから感染にはある程度以上のmetacercaria数が必要ではあるが、山羊よりウサギの方が宿主特異性が高いことが考えられる。

*E. coelomaticum*寄生による病理学的変状は、牛に

ついて坂本¹³や河野^{8,9}の詳しい報告があり、ウサギについては坂本^{14,16}の報告がある。小葉間の膵管中にそれぞれ十数匹の虫体を認めたノウサギでは、膵管の著明な拡張と付属リンパ節の著明な腫大をみており、組織学的検査では、導管末梢部の管壁内面の粘液上皮は部位により増生する部分と変性剥離する部分とをみ、管壁の軽度の肥厚を認め、導管周囲の実質細胞の萎縮と間質の増生を認めている。導管主管部では時に管内に虫体の充満をみ、粘膜の乳頭状の増生と管壁の肥厚や、導管壁周囲結合織の増生があることを認めている。しかしながら、牛で見られるような著しい膵硬変や虫卵結節は観察していない。またmetacercaria約800個感染カイウサギを85日目に剖検した例では、導管内に約50匹の成虫寄生を認め、付属リンパ節の著明な腫大をみ、組織学的に、虫体の導管粘膜への吸着による組織破壊と、それらの部位におけるリンパ球や組織球の浸潤を認めており、導管粘膜は所により増生または変性、剥離し、導管周囲結合織の著明なリンパ球および組織球の浸潤、微小導管の著明な増生と周囲リンパ組織の増生像を認めている。今回の実験例には、牛でみられた様な著しい削瘦などの臨床症状や、胆管、十二指腸にまで及ぶような虫体の寄生は認められず、膵臓が厚い結合織被膜に覆われていたのはNo.8の1例のみで、No.8と第2、3群全例で膵管の拡張がみられ、No.10では膵管の肥厚によるシスト形成がみられた。しかし、既報のノウサギとカイウサギでみられたような付属リンパ節の腫大などの変状は認められなかった。組織学的検査で、第1群の32日、60日例においては、虫体は認められたものの膵臓の変化は軽度で、導管の軽度な拡張と管周囲のわずかな結合織増生が認められる程度であった。90日例では、顕著な結合織の増生とそれに伴う膵細胞の萎縮、変性を認めた。第2、3群では、間質結合織の増生、リンパ球の浸潤、膵細胞の圧迫、萎縮、導管の拡張、粘膜上皮の増生、微小導管の腺腫様増生が主変状としてみられ、重度なものでは虫卵結節や偽小葉形成などの膵硬変像も認められた。これらは、牛の重度感染例とほぼ同様の所見を示したが、牛、山羊で認められた^{9,19,20} globule leukocyteの出現は認められなかった。また、坂本のノウサギやカイウサギとも同様所見を示したが、寄生虫体数の多かった今回の実験例の方がやや重度な変状を示していた。

今回の実験より*E. coelomaticum*はウサギに容易に感染し、しかも、ほとんど臨床症状を呈することな

く耐過し、虫卵を持続的に排泄することが明らかとなり、牧野におけるノウサギが牛の*E. coelomaticum*の感染源となりうる可能性が強く示唆された。

要 約

牛の小型肺蛭症における保虫宿主として、牧野に生息するノウサギが関与する可能性を検討するためにノウサギにおける*E. coelomaticum*寄生状況と中間宿主とされる直翅目昆虫のmetacercaria保有状況を*E. coelomaticum*汚染牧野で現地調査し、さらに、ウサギを用いて感染実験を行った。感染実験はカイウサギを用い、ササキリより採取したmetacercaria 200個を9頭に投与し、32日間、60日間、90日間、さらに、1000個、2000個を各2頭に投与し、130日間観察した。実験期間中、臨床及び血液学的検査並びに糞便検査を行い、また、適時、フィルムテスト、皮内反応試験、metacercariaの血清反応を試みた。回収した虫体については寄生虫学的検査を、膵臓病変については病理学的検査を行った。

以上の調査、実験から次の結果を得た。

1. 汚染牧野から採取したノウサギの糞便に高率に*E. coelomaticum*虫卵が検出され、本虫がノウサギに広く蔓延していることが判明した。
2. 汚染牧野に生息する直翅目昆虫の中、ホシササキリ、コバネササキリ、オナガササキリの3種類に多数のmetacercariaがみられ、特にコバネササキリが高い保有率を示し、時季的には、秋季に保有率が増加する傾向が認められた。
3. 感染実験ウサギの臨床及び血液学的検査では、全例に血清アマラーゼ値の上昇傾向が認められたが、他に特に異常な所見は観察されなかった。
4. Metacercaria投与から虫卵排泄までの期間 (prepatent period) は平均89.8日で、他の動物におけるより短かったが、EPGの日間変動には一定のパターンはみられなかった。虫卵の大きさは、平均 $44.05 \times 29.87 \mu\text{m}$ で他の動物における場合とほぼ同様の計測値を示した。
5. フィルムテストによる膵臓機能検査では、1000個、2000個投与例で明らかな異常を示し、多数寄生例では膵臓機能低下を呈することが考えられた。
6. 虫体の生理食塩水懸濁液を抗原とした皮内反応検査では、感染ウサギと非感染ウサギとの間に顕著な差は認められなかった。
7. 脱嚢子虫に対する血清反応検査では、感染130日目ウサギ血清で絮状沈着物の形成が認められ、診

断の有用性が示唆された。

8. 実験感染ウサギから回収した虫体と牛および山羊由来虫体の形態、計測値の比較においては特に有意な差は認められなかった。

9. 膵臓病変は、*E. coelomaticum*の回収率(回収虫体数/metacercaria投与数)が低かった200個投与例では膵臓の病変は軽度で、16.5~27.7%の高い回収率を示した1000個および2000個投与例では、膵管の肥厚、導管の拡張、粘膜上皮の乳頭状増生、間質結合織の増生、微小導管の腺腫様増生、リンパ球の浸潤、膵細胞の圧迫、萎縮、チモーゲン顆粒の消失などが観察され、重度なものでは虫卵結節や膵硬変像も認められた。これらは、重度感染牛で観察された病変とほぼ同様であったが、牛、山羊で認められるglobule leukocyteの出現は認められなかった。

以上のことより、*E. coelomaticum*汚染牧野にはmetacercaria保有ササキリが多数生息し、これをウサギが摂取することにより容易に感染が成立することが実証され、しかも感染ウサギは、高度感染して重度な膵病変を形成してもほとんど臨床症状を呈することなく虫卵を排泄することが明らかとなった。これらの結果は、牧野に生息するウサギが牛の*E. coelomaticum*の感染源となりうる可能性を強く示唆するものである。

文 献

- 1) Bush P. F. : Completion of the life cycle of *Eurytremia pancreaticum* (trematoda: Dicrocoeliidae). *J. Parasit.*, **51**(3), 350-355 (1965)
- 2) Chinone S. and Itagaki H.: Development of *Eurytremia pancreaticum* (Trematoda) II. Development in definitive hosts. *Bull. Azabu Vet. Coll.* **1**(2), 73-81 (1976)
- 3) 板垣 博・大石 勇: 新版家畜寄生虫学. p.37-40, 朝倉書店, 東京 (1984)
- 4) 市原鶴雄・進 貞夫・蔵元虎蔵: 肝蛭症の診断に関する研究 I. 沈降反応抗原. *日獣誌*, **18** (4), 119-129 (1956)
- 5) 市原鶴雄・進 貞夫・蔵元虎蔵: 肝蛭症の診断に関する研究 II. 牛肝蛭症における沈降反応. *日獣誌*, **18** (4), 131-135 (1956)
- 6) 市原鶴雄・進 貞夫・蔵元虎蔵: 肝蛭症の診断に関する研究 III. 山羊肝蛭症における沈降反応. *日獣誌*, **18** (4), 137-140 (1956)
- 7) 河野猪三郎・石田 聡・季 建中・清水 孜・安田宣紘・坂本 司: 実験的小型膵蛭感染山羊に対するpraziquantelおよびtriclabendazoleの駆虫効果とその病理学的研究. 鹿大農学術報告, No**36**, 183-190 (1986)
- 8) 河野猪三郎・福吉成典: 膵蛭虫卵の膵管内存在とその意義について. 鹿大農学術報告, No**17**, 197-206 (1966)
- 9) 河野猪三郎・坂本 司・安田宣紘・北野良夫・戸越 剛・山本康裕: 小型膵蛭*Eurytremia coelomaticum*多数寄生牛の病理学的研究. 鹿大農学術報告, No**30**, 111-116 (1980)
- 10) 河野猪三郎・坂本 司・安田宣紘・山本康裕・中川治人: 小型膵蛭寄生牛の治療による膵臓の病理学的所見. とくにglobule leucocytesについて. 鹿大農学術報告, No**31**, 101-106 (1981)
- 11) 栗栖吉夫: 日本産野兎ニ於ケル内臓寄生虫ノ研究. 熊本医学誌, **7**, 982-1014 (1931)
- 12) 坂本 紘・田代哲之・渡辺 茂・坂本 司・河野猪三郎・安田宣紘: 小型膵蛭寄生牛の臨床検査所見について. 鹿大農学術報告, No**30**, 117-122 (1980)
- 13) 坂本 司: 反芻獣の膵蛭症と小型膵蛭症. 動薬研究, No**18**, 9-16 (1979)
- 14) 坂本 司: ノウサギより得られた小型膵蛭について. 鹿大農学術報告, No**31**, 95-99 (1981)
- 15) 坂本 司: 牛の内部寄生虫虫症(膵蛭症). 臨床獣医, No**6**, 57-63 (1984)
- 16) 坂本 司・池原公司・福田健二・田原研二・鈴木 敦・アングーソン, J. R. N.: 小型膵蛭感染ノウサギおよびカイウサギにおける膵臓病変について. 寄生虫学雑誌, **37** (2), 75 (1988)
- 17) Sakamoto T., Kono I., Yasuda N. and Yamauti C. : Studies on *Eurytremia coelomaticum* I. Preliminary observations of the biological characters of *E. coelomaticum*. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **16**, 83-192 (1980)
- 18) Sakamoto T., Kono I., Yasuda N., Yamamoto Y. and Nakagawa H. : Studies on *Eurytremia coelomaticum* II. The anthelmintic efficiency of Nitroxynil and Praziquantel against *Eurytremia coelomaticum* in cattle. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **16**, 93-101 (1980)
- 19) Sakamoto T., Kono I., Yasuda N., Mohri S., Handa S. and Yamauti C. : Studies on *Eurytremia coelomaticum* III. Development of *Eurytremia coelomaticum* in mice. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **17**, 193-199 (1981)
- 20) Sakamoto T., Kono I. and Mohri S. : Studies on *Eurytremia coelomaticum* IV. Comparison between anthelmintic effects of drugs against *Eurytremia coelomaticum* in vitro and in vivo. *J. Fac. Agr. Iwate Univ.*, **17**(2), 211-222 (1984)
- 21) 清水 晃・広岡慎吾・木村 重: 肝蛭感染家兎における沈降抗体の消長. *日獣会誌*, **38** (7), 448-452 (1985)
- 22) Tang, Z. and Tang, C. : The biology and epidemiology of *Eurytremia coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) and *Eurytremia pancreaticum* (Janson, 1889) in cattle and sheep in China. *Zoologica Sinica*, **23**, 67-282 (1977)
- 23) 渡辺昇蔵: 家畜の寄生虫病とその問題点. 畜産の研究, **14**, 979-984 (1966)

- 24) Wikerhauser, T. : Immunobiologic diagnosis of fascioliasis. *Vet. Archiv.*, **31**, 71-81 (1961)

Summary

To elucidate the parasitologic role of hares as a reservoir host in eurytremiasis of cattle, infection rate of the metacercaria in grasshoppers, the intermediate host, and vermiculous conditions of hares were investigated in a pasture polluted with *E. coelomaticum*. Further more, experimental infections of *E. coelomaticum* in rabbits were undertaken. The results obtained are as follows :

1. The parasitism of *E. coelomaticum* in hares was demonstrated evidently by the detection of eggs of the pancreas flukes in the feces of hares collected in the pasture.

2. In this pasture, 3 species of grasshoppers, *Conocephalus maculatus*, *C. japonicus* and *C. gladius*, were found to have been infected with the metacercaria of the flukes, among which *C. japonicus* showed particularly high infection-rates. The rates of infection with the metacercaria in the grasshoppers presented an increasing tendency from early summer towards late fall.

3. In clinico-hematological examinations of the rabbits experimentally inoculated with 200~2000 metacercariae, no abnormal findings were detected excepting a rising trend of serum amylase values occurring with the lapse of time. Film test for fecal trypsin in the rabbits given a larger number of metacercaria showed negative (no gelation digestion) results, and strongly suggested pancreatic enzyme deficiency.

4. Prepatent period varied with average of 89.8 days, which was slightly shorter than that in other animals. In passage of eggs to the feces, no rhythmical pattern was observed. The size of eggs in that feces showed an average of 44.05 by 29.87, being very much of a size in comparison with that in other animals.

5. In the intracutaneous reaction for saline suspension of the flukes, there was no difference between the infected and the non-infected rabbits.

6. When the excysted metacercaria was incubated with the rabbit sera obtained 130days after infection, microscopically visible precipitates were formed around the mouth. This microprecipitation proved to be a useful test for an immunobiological diagnosis of the enrytremiasis.

7. There was no significant difference between the bodysizes the flukes obtained from the rabbits and those from the naturally infected cattle or the experimentally infected goat with numerous flukes.

8. Histopathological examination of the rabbit pancreas infected with numerous flukes revealed a remarkable dilatation of the pancreatic ducts occurring with thickening of the wall occasioned by proliferation of the periductal connective tissue. There were marked papillary hyperplasia of the mucous membrane, adenomatous proliferation of the smaller ducts, lymphoid infiltration to the interstitial connective tissue, and clumps of the eggs surrounded with granulation tissue. The periductal and interlobular fibrosis involved the adjacent acinar tissues, resulting in atrophy, degeneration and disappearance of acinar cells. Thus, the pancreas manifested conspicuous findings of chronic interstitial pancreatitis, which closely resembled those in the cattle infected severely with *E. coelomaticum*.

The rabbits are easily infected with *E. coelomaticum*, form remarkable pancreatic lesions and continue to be eliminating eggs of the flukes in the feces, showing no evident symptoms. Therefore, it may reasonably be inferred that hares must play significant roles as reservoir host in the enzootic occurrence of eurytremiasis in the cattle on the pasture.

Explanation of figures

- Fig. 1. Metacercariae which flowed out of the dissected hemoncoel of *Conocephalus japonicus*. $\times 3.5$
- Fig. 2. The excysted larva incubated in sera of Rabbit No.13(130 days after inoculation). The precipitates(arrow) around the mouth are seen. $\times 46$
- Fig. 3. An immature *E. coelomaticum* without containing eggs in a pancreatic duct of Rabbit No.1(90 days after inoculation). Periductal and interlobular fibrosis is scarcely seen. H-E stain. $\times 104$
- Fig. 4. Pancreas of Rabbit No.13(130 days after inoculation). The wall of a pancreatic duct invaded by the fluke has become thickened with remarkable proliferation of periductal connective tissues. The mucous membrane of the pancreatic duct shows papillary hyperplasia. H-E stain. $\times 19$
- Fig. 5. Pancreas of Rabbit No.12(130 days after inoculation). Atrophic pancreatic lobuli divided by proliferation of interstitial and periductal connective tissues. H-E stain. $\times 19$
- Fig. 6. Pancreas of Rabbit No.13(130 days after inoculation). The granulomas surrounding eggs in the proliferated interstitial connective tissue accompanied with the numerous lymphoid cell infiltrations. H-E stain. $\times 19$

