千葉県勝浦市小羽戸地区のサワガニにおける ウェステルマン肺吸虫メタセルカリアの感染状況

坂西 梓里^{1),3)} 佐々木 健²⁾ 杉山 広³⁾ 川上 泰^{*,1)}

¹⁾ 麻布大学生命・環境科学部環境生物学研究室 (〒252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71)

²⁾ アベックス産業株式会社 (〒105-0014 東京都港区芝2-23-4)

³⁾ 国立感染症研究所寄生動物部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

(受領: 2017年6月7日; 登載決定: 2017年12月1日)

Infection status of *Paragonimus westermani* metacercariae in the Japanese freshwater crab *Geothelphusa dehaani* from the Kobado area of Chiba Prefecture, Japan

Azusa BANZAI^{1),3)}, Takeshi SASAKI²⁾, Hiromu SUGIYAMA³⁾ and Yasushi KAWAKAMI^{*,1)}

* Corresponding author: yasushi@azabu-u.ac.jp

¹⁾ Laboratory of Environmental Biology, School of Life and Environmental Science, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara-shi, Kanagawa 252-5201, Japan

²⁾ Apex Pest Control Co., Ltd., 2-23-4 Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan

³⁾ Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

(Received: 7 June 2017; Accepted: 1 December 2017)

Abstract: In 1983, four paragonimiasis cases were diagnosed in people who had consumed uncooked freshwater crabs captured from the Yourou River in Otaki-machi, Chiba Prefecture, Japan. Although a field survey conducted about 30 years ago demonstrated that the diploid form of *Paragonimus westermani* was extensively distributed in Otaki-machi, its prevalence in other areas was not well examined. In this study, we examined the infection status of *Paragonimus* metacercariae in the Japanese freshwater crab *Geothelphusa dehaani* collected from the Kobado area of Katsuura City in Chiba Prefecture from 2011 to 2014. Our findings indicated that the prevalence was 82.1% in 2011 and reached close to 100% between 2012 and 2014. Additionally, the average rate of metacercariae infection in freshwater crabs for four years was 94.3%, with the number of metacercariae per infected crab ranging from 1 to 329 (mean: 27.8). The lung flukes examined were identified as the diploid form of *P. westermani* based on both the morphological features of the metacercariae and molecular analyses of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 region and mitochondrial 16S rRNA genes. These results suggested that the natural life cycle of the diploid form of *P. westermani* remained well-preserved in Chiba Prefecture. In addition, the Kobado area was added as a new prevalent locality of this lung fluke in Japan.

Key words: lung fluke, *Paragonimus westermani*, diploid form, *Geothelphusa dehaani*

緒 言

わが国における肺吸虫症は、ウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) と宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii* Kamo, Nishida, Hatsushika, and Tomimura, 1961 の感染によるものが主である (杉山, 2010; Nagayasu et al., 2015). 前種は、染色体数の異なる2倍体型、3倍体型および4倍体型が存在し (Blair et al., 1999), 日本では2倍体型 (両性生殖型) と3倍体型 (単為生殖型) の分布が報告されている (宮崎, 1978). 人体症例はウェステルマン肺吸虫によるものが大半を占め、主としてサワガニ *Geothelphusa dehaani* (White, 1847) やモクズガニ *Eriocheir japonicus* (De Haan, 1835) の生食, それらの不十分な調理またはイノシシ *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758) の肉の生食で感染することで発症する.

1983年に千葉県大多喜町養老溪谷で採集したサワガニを

生食し、ウェステルマン肺吸虫に感染した4症例が報告されるとともに、養老川のサワガニの調査がなされ、ウェステルマン肺吸虫2倍体型のメタセルカリアが確認された (神崎ら, 1985). さらに、Kanazawa et al. (1986) は、前述の養老川に加えて、大多喜町内を流れるもう一つの主要河川の夷隅川においてサワガニを採集し、肺吸虫の検出を試みた結果、両河川のサワガニで肺吸虫のメタセルカリアを見出し、全てウェステルマン肺吸虫の2倍体型であることを報告した. これより、千葉県では、ウェステルマン肺吸虫2倍体型が大多喜町以外の地区にも生息すると予想されたが、他地区における調査報告はない. そこで、千葉県における本虫の寄生現況を明らかにするために、大多喜町に隣接する勝浦市小羽戸地区でサワガニを採集し、検査を行った. その結果、Kanazawa et al. (1986) の報告よりも勝浦市小羽戸地区で採集したサワガニのメタセルカリア寄生率が高いことを認めたので、成績を報告する.

調査場所および方法

2011～2014年に、千葉県勝浦市小羽戸の夷隅川付近の水路（緯度経度：35°11'18" N, 140°15'22" E）で、目視にて甲幅約2cmのサワガニを採集した（Fig. 1）。サワガニからのメタセルカリアの検出は、Sugiyama et al. (2013)の方法を参考にして行った。すなわち、サワガニの背甲を体部より剥がし、鰓と内臓（心臓、中腸腺、生殖腺、腸など）を摘出した後、内臓をガラス板で圧平して実体顕微鏡下でメタセルカリアの寄生の有無を調べた。さらに、筋肉内のメタセルカリア検出のため、残りの体部および脚部を1個体ずつミキサーで粉碎し、金網を用いて濾過後沈澱させ、上澄みを除去して沈澱を実体顕微鏡下で観察した。見出されたメタセルカリアについては、形態学的観察を行った。2012年と2014年に採取した虫体には、Sugiyama et al. (2009)の方法に従い、分子生物学的同定を併せて試みた。メタセルカリアからのDNA抽出は、QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN社製）を用いて行った。各虫体由来するDNAをテンプレートとし、フォワードプライマー 3S（5'-GGT ACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3'）とリバースプライマー A28（5'-GGGATCCTGGTTAGTTTC TTTTCCTCCGC-3'）を用いて、リボゾームDNAのinternal transcribed spacer 2（ITS2）領域をPCR増幅した。増幅された産物は制限酵素*Sna*BIで消化し、得られた切断パターンに基づき、既報（Sugiyama et al., 2009）と比較して宮崎肺吸虫とウェステルマン肺吸虫との判別を試みた。さらに、ウェステルマン肺吸虫については、フォワードプライマー T7-1（5'-ATT TACATCAGTGGG CCGTC-3'）とリバースプライマー SP6-1（5'-GATCCA AAA GCA TGT GAA AC-3'）を用いて、ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、増幅産物を制限酵素*Sna*BIで消化後、得られた切断パターンに基づき既報（Sugiyama et al., 2009）と比較して、2倍体型と3倍体

型との判別を試みた。なお一部の虫体については、更に未消化のPCR産物を用いて塩基配列を解読し、同定結果を確認した。

結 果

2011～2014年の4年間に、合計230個体のサワガニを採集・検査した結果、217個体のカニがメタセルカリア陽性で、寄生率（（メタセルカリアの寄生していたサワガニの個体数／検査したサワガニの個体数）×100）は94.3%であった。陽性ガニ1個体あたりのメタセルカリア平均寄生数（検出されたメタセルカリアの総数／メタセルカリアの寄生していたサワガニの個体数）は27.8個で、最少寄生数は1個、最多寄生数は329個であった。メタセルカリア寄生率は毎年高率であったが、メタセルカリア寄生数は2011年の42.1個と2014年の44.8個に対し、2012年と2013年はそれぞれ17.4個、15.8個と少なかった（Table 1）。2013年および2014年に採集したサワガニのうち、メタセルカリアが見出された145個体について体内分布を詳しく調べたところ、筋肉に1,803個、肝臓に1,322個、生殖腺に199個、心臓に174個、鰓に156個で、筋肉と肝臓を中心にメタセルカリアは寄生していた。見出したメタセルカリアを顕微鏡下で観察したところ、いずれも球形を呈して、薄い外膜と厚い内膜を有し、内膜の外径（50個）は390～450μmであった。中心には黒色に見えるI字状の大きな排泄嚢とその両側をとりまく螺旋状の腸管が認められたことから、*Paragonimus*属のメタセルカリアと判定した（Fig. 2）。2012年と2014年に採取したメタセルカリア152個については、リボゾームDNA ITS2領域のPCR- restriction fragment length polymorphism（RFLP）解析を行ったところ、約520bpのPCR産物は、制限酵素*Sna*BIで2本のバンド（約420bpおよび約100bp）に切断された。この切断パターンは宮崎肺吸虫ではなく、ウェステルマン肺吸虫2倍体型およ

Fig. 1. Map showing the survey site (Kobado in Katsuura City, Chiba Prefecture).

Table 1. Prevalence and number of *Paragonimus metacercariae* in Japanese freshwater crabs from Kobado, Chiba Prefecture.

Survey period	No. of crabs		% infected	Total No. of mc ¹⁾ detected	Intensity		No. of mc identified	Species
	Examined	Infected			Range	Average		
Sept. 2011	56	46	82.1	1,935	1–329	42.1	ND	ND ²⁾
June 2012	26	26	100	452	1–133	17.4	38	Pw (2n) ³⁾
Aug. 2013	100	98	98.0	1,547	2–69	15.8	ND	ND
Sept. 2014	48	47	97.9	2,107	3–302	44.8	114	Pw (2n)
Total	230	217	94.3	6,041	—	27.8	152	—

¹⁾ mc: metacercariae. ²⁾ ND: not done. ³⁾ Pw (2n): the diploid form of *Paragonimus westermani*.

Fig. 2. *Paragonimus metacercaria* isolated from the Japanese freshwater crab *Geothelphusa dehaani* captured in Kobado, Chiba Prefecture.

び同3倍体型の切断パターンに一致した。さらにミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子の解析では、約840bpのPCR産物は、制限酵素 *Sna*BI で2本のバンド（約550bpおよび約290bp）に切断され、2倍体型に特徴的な切断パターンに一致した（Fig. 3）。なお、両遺伝子のPCR産物の塩基配列を解読した結果からも、ウェステルマン肺吸虫2倍体型と同定された。

考 察

1983～1984年に行われた養老川および夷隅川流域におけるサワガニの肺吸虫調査（Kanazawa et al., 1986）によると、夷隅川流域の大戸で最も寄生率が高く、85.7%であった。今回我々は、Kanazawa et al. (1986) の調査場所とは異なる地点として、勝浦市の小羽戸地区を選んだところ、この地区では2011～2014年の4年間の平均で94.3%と彼らの報告を上回る高い寄生率を示した（Fig. 4）。さらに、陽性サワガニ1個体当たりのメタセルカリア最多寄生数は329個に達した。このことは、千葉県において長年にわたってウェステルマン肺吸虫2倍体型の生活環が維持されていることを示唆している。

サワガニにおけるメタセルカリアの寄生率は、2011年は82.1%、そしてそれ以降の各年では、ほぼ100%を示した。これは、セルカリアのサワガニへの感染が効率的に行われていることを示している。しかし、サワガニ1個体当たりのメタセルカリアの平均数は、2011年の42.1個、2014年の44.8個に

Fig. 3. RFLP patterns of PCR products amplified from the DNA samples of *Paragonimus metacercariae* from Japanese freshwater crabs from Kobado, Chiba Prefecture. The ITS2 PCR product (lane 1) and its products following restriction enzyme digestion with *Sna*BI (lane 2). The mitochondrial 16S rDNA PCR product (lane 3) and its *Sna*BI-digested products (lane 4). A 100-bp DNA ladder marker was used to estimate the size of the fragments (lane M). The restriction enzyme digested fragments of the samples were identical to those from the diploid form of *Paragonimus westermani*.

比較して、2012年と2013年はそれぞれ17.4個、15.8個と1/2以下であった。また、サワガニ1個体に寄生していたメタセルカリアの最多数も2011年と2014年の両年は300個以上であったのに対し、2012年と2013年はそれぞれ133個、69個であった。サワガニにおけるメタセルカリア寄生数の変動については、行天（1983）が宮崎肺吸虫を対象に、季節的な要因とサワガニの年齢の変動から詳細に記述している。本報告では各年の6月下旬～9月上旬の時期にほぼ同じ大きさのサワガニを採集して検査したことから、今回認められた寄生数の増減が上述のような季節的な変動やその地区に分布するサワガニの年齢に起因するものとは考えにくい。そのため、小羽戸地区ではセルカリアがサワガニに侵入する機会は例年維持されているものの、第1中間宿主の貝より遊出するセルカリアの数に変動があると推測した。

メタセルカリア寄生数はカニの年齢（大きさ）が増すにし

Fig. 4. Prevalence of *Paragonimus metacercariae* in Japanese freshwater crabs along the Yourou and Isumi rivers based on the results of this study (Kobado area, underlined) and those of Kanazawa et al. (1986).

たがい増加する傾向がある（柴原，1982；行天，1983）ため、疫学や感染予防の面から本調査地におけるサワガニの甲幅とメタセルカリア寄生数の関係については今後の重要な課題である。また、勝浦市小羽戸地区のウェステルマン肺吸虫2倍体型を対象とした寄生状況の周年調査を行い、宮崎肺吸虫の報告（行天，1983）との比較検討に取り組みたいと考えている。

これまで、ウェステルマン肺吸虫2倍体型の濃厚な分布地として大分県北部、兵庫県北部、三重県伊賀地方が報告されている（波部，宮崎，1982；柴原，1982；杉山ら，1989）。これらの報告によると、大分県北部では、最高寄生率87.7%、陽性サワガニ1個体当たりのメタセルカリア寄生数は最多で199個（波部，宮崎，1982）で、兵庫県北部では最高寄生率93.6%、最多寄生数68個（柴原，1982）と、本調査より最高寄生率は低く、最多寄生数は少なかった。さらに、杉山ら（1989）によると、三重県伊賀地方では最高寄生率は87.5%、最多寄生数は144個である。高いメタセルカリア寄生率を示した地区では、カワニナ *Semisulcospira libertina* (Gould, 1859) のセルカリア寄生率も高く（Tomimura et al., 1989）、かつ自然終宿主の分布も想定されたことから、本虫の生活環が円滑に営まれていると報告されている。本調査においては、勝浦市小羽戸地区におけるウェステルマン肺吸虫2倍体型メタセルカリアの寄生率が複数年にわたり継続して高く（94.3%）、最多寄生数（329個）も従来の報告に比べてさらに多いという結果が得られたことは、特筆すべき点である。

今回、勝浦市小羽戸地区のサワガニにウェステルマン肺吸虫2倍体型の極めて濃厚な感染が認められた。調査地区は交

通の便が良く、サワガニの採集も容易であったことから、サワガニにおけるウェステルマン肺吸虫2倍体型の寄生状況調査や教育・研究材料としての本虫メタセルカリアの多数採集には、非常に好適な地区であると考えられた。筆者らが調査を実施した場所は、小高い山の麓に広がる田園地帯であり、すぐ近くにはキャンプ場があるため多数の行楽客が訪れている。市原市にある鎗田病院が発行する広報誌（医療法人鎗田病院，2005）によると、1983年の症例以降、養老溪谷でのキャンプ中に感染した肺吸虫症患者が確認されている。このことから、公衆衛生上、地域住民およびキャンプ場利用者へのサワガニの摂食について注意喚起が必要だと考えられる。また現在、日本におけるウェステルマン肺吸虫症患者の報告では、イノシシ肉の生食が感染に対する重要な原因となっている（Nagayasu et al., 2015）。シカ肉の喫食を原因とする症例（大内ら，2014；Nagayasu et al., 2015；吉田ら，2016）やシカ肉にウェステルマン肺吸虫が感染している事実も報告されている（杉山ら，2016）。勝浦市ではイノシシ、シカ等による農作物等への被害が市内全域に及んでいることから、毎年イノシシは1300頭、シカは600頭が害獣として駆除され、これらの一部は、ジビエ（狩猟肉）料理として有効利用する試みが行われている。このため、イノシシ肉やシカ肉の生食の危険性についても併せて注意を促すべきであると考えられた。

文 献

- Blair, D., Xu, Z. B. and Agatsuma, T. 1999. Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Adv. Parasitol.*, 42: 113–222.
行天淳一. 1983. サワガニ（第2中間宿主）における宮崎肺

- 吸虫の生態学的研究. 寄生虫誌, 32: 555–575.
- 波部重久, 宮崎一郎. 1982. 大分県北部のサワガニから見出されたウエステルマン肺吸虫の有性生殖型. 寄生虫誌, 31: 275–280.
- Kanazawa, T., Hata, H., Kanzaki, T., Niimura, M., Kojima, S. and Yokogawa, M. 1986. *Paragonimus westermani*, diploid type, from Otaki-machi in Chiba Prefecture, Japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 35: 527–533.
- 神崎哲人, 田中 真, 野崎忠信, 金沢 保, 小林 仁, 横川 宗雄, 吉田 尚. 1985. ウエステルマン肺吸虫症の初期臨床像, 皮内反応の陽転時期およびプラジカンテルの有効性の検討. 日胸疾会誌, 23: 368–374.
- 宮崎一郎. 1978. いわゆるウエステルマン肺吸虫の二型について—新しい和名「ベルツ肺吸虫」の提唱. 日本医事新報, 2819: 43–48.
- Nagayasu, E., Yoshida, A., Hombu, A., Horii, Y. and Maruyama, H. 2015. Paragonimiasis in Japan: A twelve-year retrospective case review (2001–2012). *Intern. Med.*, 54: 179–186.
- 大内政嗣, 井上修平, 尾崎良智, 藤田琢也, 上田桂子, 花岡 淳. 2014. シカ生肉が感染源と考えられたウエステルマン肺吸虫症の1例. 日呼外会誌, 28: 170–176.
- 柴原壽行. 1982. 兵庫県北部におけるウエステルマン肺吸虫(二倍体型)に関する研究. I. 豊岡市と出石郡における地理的分布およびメタセルカリアの形態的特徴について. 寄生虫誌, 31: 545–559.
- 杉山 広. 2010. 食品と寄生虫感染症. 食衛誌, 51: 285–291.
- Sugiyama, H., Singh, T. S. and Rangsiruji, A. 2013. *Paragonimus*, In: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens (ed. Liu, D.), pp. 421–433, CRC Press, London, UK.
- Sugiyama, H., Umehara, A., Morishima, Y., Yamasaki, H. and Kawanaka, M. 2009. Detection of *Paragonimus metacercariae* in the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani*, bought at retail fish markets in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62: 324–325.
- 杉山 広, 奥田 稔, 富村 保, 西田 弘. 1989. 南近畿地方におけるウエステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) の地理的分布に関する研究. 三重県伊賀地方産サワガニ *Geothelphusa dehaani* におけるウエステルマン肺吸虫メタセルカリアの寄生状況について. 日本生物地理会報, 44: 165–173.
- 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 御供田睦代, 森嶋康之, 山崎 浩. 2016. 野生鳥獣肉(ジビエ)を介した肺吸虫症の感染リスク. *Clin. Parasitol.*, 27: 40–42.
- Tomimura, T., Sugiyama, H. and Yokota, M. 1989. Parasitological survey of the first intermediate host of *Paragonimus westermani* in Iga area of Mie Prefecture, Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51: 315–326.
- 医療法人鎗田病院. 2005. 広報誌はなみずき. 10: 3
- 吉田彩子, 田中龍聖, 菊地泰生, 長安英治, 丸山治彦. 2016. わが国における肺吸虫症の感染源の再検討. *Clin. Parasitol.*, 27: 49–51.