

原 著

シカ肉の生食による肺吸虫感染の可能性

松尾加代子^{1,2)†} 森部絢嗣²⁾ 高島康弘²⁾ 粕谷志郎³⁾ 吉田彩子⁴⁾
 阿部仁一郎⁵⁾ ウィラチャイ・サイジュンタ⁶⁾ 吾妻 健⁷⁾

- 1) 岐阜県飛騨家畜保健衛生所 (〒506-8688 高山市上岡本町7-468)
- 2) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 3) 華陽診療所 (〒500-8156 岐阜市祈年町1-24-3)
- 4) 宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)
- 5) 大阪健康安全基盤研究所(天王寺センター) (〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34)
- 6) Walai Rukhvej Botanical Research Institute, Mahasarakham University (Mahasarakham, 44150, タイ)
- 7) 高知大学医学部 (〒783-8505 南国市岡豊町小蓮)

(2017年9月23日受付・2017年11月30日受理)

要 約

岐阜県内3地域(A~C)で捕獲されたホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* 148頭中2地域(B, C)の計4頭から抗肺吸虫抗体が確認された。B, C地域ではシカ肉が原因と疑われる人の肺吸虫症が報告されている。また、B地域のサワガニ *Geothelphusa dehaani* からウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (2倍体)のメタセルカリアが検出された。シカの第1胃内容を食物アレルギー物質スクリーニングキット(甲殻類用)で検査したところ、B地域のシカ1頭で陽性を示した。この胃内容物から発見された甲殻類の脚様異物から抽出したDNAはサワガニと一致した。このことから、シカがサワガニを食しウェステルマン肺吸虫の待機宿主になり得ることが示唆された。

——キーワード：サワガニ, ウェステルマン肺吸虫, ホンシュウジカ。

-----日獣会誌 71, 449~453 (2018)

肺吸虫症は、人の寄生虫症例が激減している現在の日本においても、いまだ年間数十例が本症と診断される食品由来寄生虫症の1つである [1]。原因食品としては、感染サワガニやモクズガニ、あるいは待機宿主としてのイノシシ肉が知られている。近年、増えすぎた野生動物をジビエとして食品利用しようとする試みが全国的に広がっている。われわれは、これまで岐阜県内のシカやイノシシが保有する人獣共通寄生虫症について調査を行ってきた [2-4]。県内では、これまでシカ肉が原因と疑われる人の肺吸虫症例が報告されてきたが [5-7]、実際にシカ肉が感染源となる可能性については、草食であるシカがサワガニを捕食するのといった観点から疑問視されていた。そこで、これまで想定されてこなかった

シカが肺吸虫の待機宿主になり得るのか、調査を行った。

材料及び方法

2013年5月~2016年3月に岐阜県内3地域(図1:A, B, C)で捕獲されたホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* 148頭(A:74頭, B:56頭, C:18頭)について、血液を採取し、肺吸虫に対する抗体を競合ELISA法により検査した。抗原の調整、競合ELISAの詳細については、Yoshidaら [2]と同様に行った。この結果を受け、肺吸虫抗体陽性シカが確認された地域に生息する中間宿主であるサワガニ *Geothelphusa dehaani* を捕獲した。調査を行った沢は十数カ所であり、各沢1~20個体程度のサワガニが得られた。採取

† 連絡責任者：松尾加代子(岐阜県飛騨家畜保健衛生所)

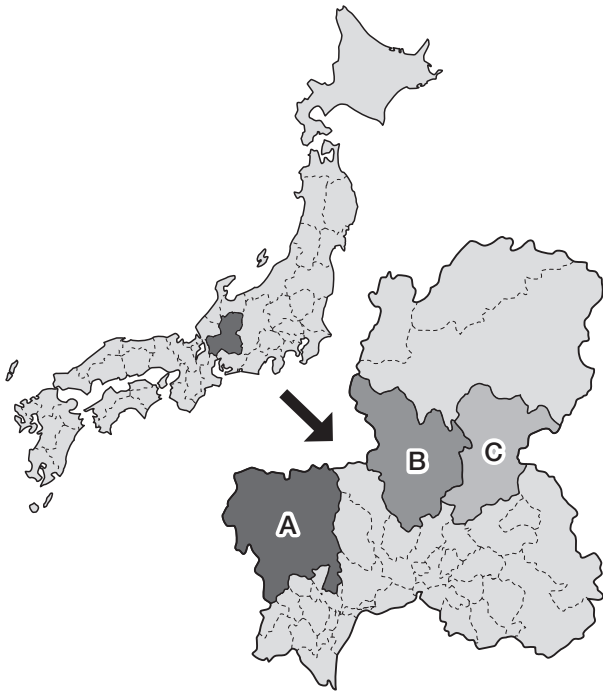


図1 採材地：岐阜県内3地域 (A～C)

したサワガニは破碎し、0.1%ペプシン液で37℃、一晚消化した後、実体顕微鏡下でメタセルカリアの有無を確認し、得られた肺吸虫様のメタセルカリアを70%エタノールで固定保存した。その後、市販キット (QIAamp DNA Mini Kit, (株)キアゲン, 東京) を用いてDNA抽出を行った。得られたメタセルカリアが肺吸虫であることを確認するために、Internal transcribed spacer 2 (ITS2) の領域を3S: 5'-GGT ACC GGT GGA TCA CTC GGC TCG TG-3' と A28: 5'-GGG ATC CTG GTT AGT TTC TTT TCC TCC GC-3' プライマーペアを用いて増幅し [8]、同増幅産物の塩基配列を解読した後に、FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>) による相同性検索を行った。また、ウエステルマン肺吸虫であった場合には、その染色体型 (2倍体または3倍体) を鑑別するために、同吸虫のミトコンドリアDNA (mtDNA) 中の16S rDNA (16S) 領域をT7-1: 5'-ATT TAC ATC AGT GGG CCG TC-3' と SP6-1: 5'-GAT CCA AAA GCA TGT GAA AC-3' プライマーペアを用いて増幅し [9]、同増幅産物の塩基配列を解読後に、その配列内での制限酵素 *Sna*BI と *Bsr*DI による切断部位の有無を検索した [10]。

3地域で2015年6月～2016年8月に捕獲されたシカの第1胃内容を各個体50g、34頭分 (A: 13頭, B: 15頭, C: 6頭) 採取した。シカの胃の総重量 (第1胃～第4胃) は1.46～6.85kgであった。内容物について市販の食物アレルギー物質スクリーニングキット (FAテストEIA-甲殻類Ⅱ, 日水製薬(株), 東京) を用いて、食品と同様に1gを秤量し、測定を行った。陽性を示した

胃内容物について、メッシュでこして固形物を回収し、そこに含まれていた甲殻類の脚様破片から、前述のキットを用い、DNAを抽出した。さらに、該当地域で捕獲したサワガニについても、同様にDNAを抽出し、それぞれのmtDNAのチトクロームCオキシダーゼサブユニットI (cox1) と16S領域の塩基配列を調べた。プライマーは、cox1ではLCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' 及びHCO-2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' [11]、16Sでは1471: 5'-CCT GTT TAN CAA AAA CAT-3' と1472: 5'-AGA TAG AAA CCA ACC TGG-3' [12]を使用した。系統樹解析には、MEGA5のNJ法を用いた。

成 績

肺吸虫抗体が検出されたシカはB地域3個体、C地域1個体の計4個体であった (4/148頭, 2.7%)。抗体陽性地域 (B, C地域) の十数カ所の沢において採取したサワガニのうち、B地域の1カ所で捕獲された3個体中1個体から肺吸虫様のメタセルカリア1虫体が検出され、ITS2の塩基配列 (508bp) はウエステルマン肺吸虫の同領域とのみ98～100%のidentityを示したことから、ウエステルマン肺吸虫と同定した。さらに16S (746bp) の配列には2倍体型に存在する *Sna*BI の切断部位が1カ所存在し、509bpと237bpに切断されることが予想され、3倍体型に存在する *Bsr*DI の切断部位は認められなかったことから、2倍体型と同定した。胃内容抽出物に対する甲殻類アレルゲン検査では、6月に捕獲された抗体陽性検出地域 (B地域) のシカ1頭で陽性反応を示した。検出アレルゲン濃度は、約7μg/gであった。また、cox1 (555bp) 及び16S (466bp) 領域のmtDNA塩基配列解析でも、同地域で捕獲されたサワガニとシカ胃内容中の甲殻類脚様物は同一のクラスターに入ることが明らかとなり、シカの胃内にあった甲殻類脚様物はサワガニであることが示唆された (図2a, b)。

考 察

今回の調査において、抗体陽性シカの捕獲地域から感染サワガニが検出され、これまで報告されているシカ肉喫食肺吸虫患者の居住地とも一致していた [5-7]。また、他地域でもシカ肉が原因食品と疑われる人の肺吸虫症例は報告されており [2, 13]、2016年には、九州産のシカ肉から肺吸虫幼虫が検出された [14]。今回、1検体ではあるが、シカの胃内容からサワガニの破片が得られた。シカが積極的にサワガニを捕食するとは考えにくいだが、これらの事実が、シカが偶発的にせよ、肺吸虫感染サワガニを捕食し待機宿主になり得ることを示唆している。国内の例ではないが、アメリカで法医学研究

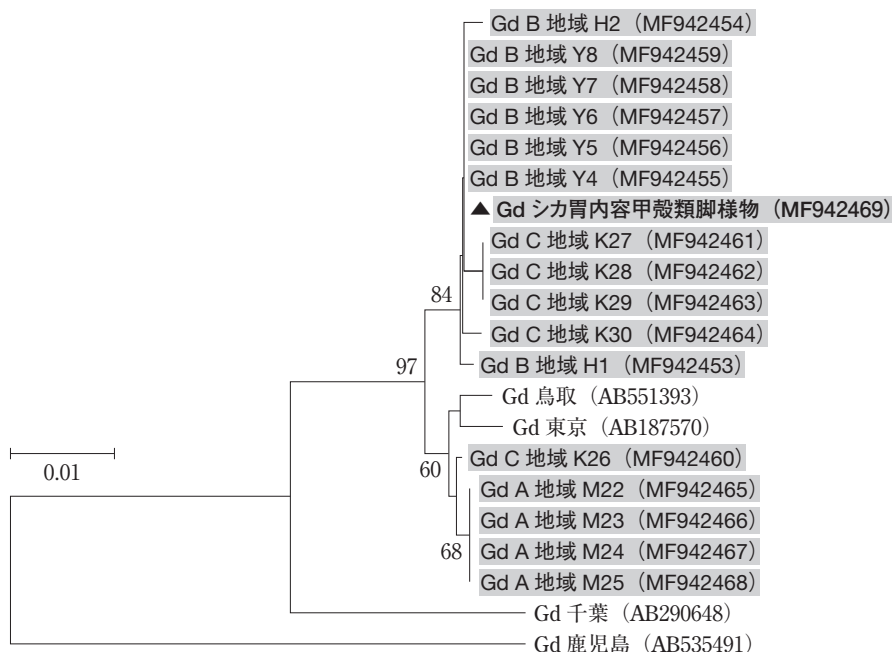


図 2a 岐阜県産と国内他地域産サワガニの近隣結合法による系統樹 : cox1
 ■ は岐阜県産サワガニ. ▲は胃内容から検出された甲殻類脚様物.
 系統樹分岐部の数値はブートストラップ値 (ブートストラップサンプリングは 10,000 回). 各括弧内の番号は, 塩基配列のアクセッションナンバー.

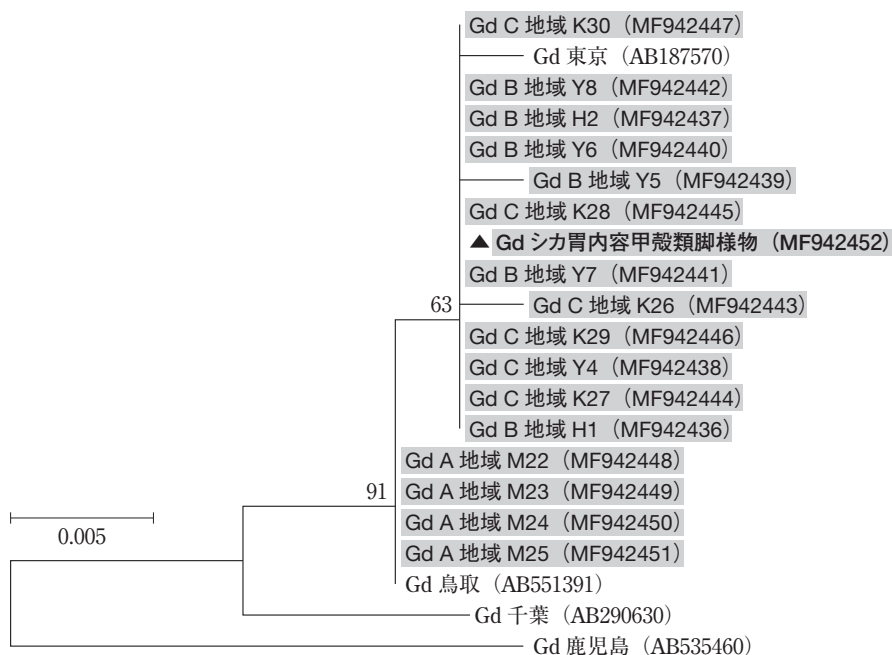


図 2b 岐阜県産と国内他地域産サワガニの近隣結合法による系統樹 : 16S 領域
 ■ は岐阜県産サワガニ. ▲は胃内容から検出された甲殻類脚様物.
 系統樹分岐部の数値はブートストラップ値 (ブートストラップサンプリングは 10,000 回). 各括弧内の番号は, 塩基配列のアクセッションナンバー.

用の死体農場に来たオジロジカが死体の骨を食べたことが報告されている [15]. 学術的な報告ではないものの, インターネット上には死体や鳥をシカが食べたという動画や画像が散見される. シカやサワガニ, それ以外の生

物も含めた個体数, 分布密度, 地域の植生, 気候などの環境要因によって, 条件がそろえば, イノシシやイタチが食べ残したサワガニの残骸の近くでシカが水や土を摂取することで感染する可能性などが考えられる. 野生

獣を食するうえで、草食獣は植物のみを食べているという思い込みを捨てて感染環を見直す必要があるのかもしれない。

今回使用した食品用アレルギー物質検査用キットは、種類は限られるものの、簡便にそこに含まれる物質がある程度特定することができる。総重量数 kg のシカ胃内容のわずか 1g から甲殻類成分が検出されたということが、キットの有用性を示している。これを、野生動物の食性分析に応用することにより、これまで報告、あるいは想定なかった新たな食性の発見につながる可能性がある。それにより、生活環が不明であった寄生虫の感染ルートが明らかになることもあるのではないだろうか。

ジビエを普及させるうえで、喫食による人の健康被害が起きてはならない。肺吸虫自体は、冷凍により死滅するが、野生鳥獣肉は E 型肝炎ウイルスなど冷凍では失活しない人獣共通感染症の病原体を保有する可能性もあることから、潜在するリスクを周知するとともに、生食を避け、十分な加熱調理をすることの重要性を繰り返し伝えていく必要がある。今回の調査では、患者発生という医師が知る情報、公衆衛生獣医師が知る野生動物の食肉化と、それに関わる病原体の情報、猟師や野生動物研究者が知る野生動物の生息環境などの情報を組み合わせ、新しい側面からのアプローチが可能となった。肺吸虫の感染環を深く探求することで、自ずとワン・ヘルスの形が出来上がっていった事例と言えらるだろう。

稿を終えるにあたり、採材、情報提供にご協力いただいた岐阜県獣医師会、ぎふジビエ推進ネットワーク加盟処理場、猟師の方々及び調査や検査に尽力してくれた岐阜県保健医療課 上津ひろな氏、岐阜県畜産研究所酪農部 可知正行氏に深謝する。

引用文献

- [1] Nagayasu E, Yoshida A, Hombu A, Horii Y, Maruyama H : Paragonimiasis in Japan: a twelve-year retrospective case review (2001-2012), *Internal Med*, 54, 179-186 (2015)
- [2] Yoshida A, Matsuo K, Moribe J, Tanaka R, Kikuchi T, Nagayasu E, Misawa N, Maruyama H : Venison, another source of *Paragonimus westermani* infection, *Parasitol Int*, 65, 607-612 (2016)
- [3] 松尾加代子, 上津ひろな, 高島康弘, 阿部仁一郎: ホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* およびニホンイノシシ *Sus scrofa leucomystax* における住肉胞子虫の高寄生率とそれらの筋肉より分離された *Sarcocystis* spp. と *Hepatozoon* sp. の遺伝子解析, *日野生動物医学会誌*, 21, 35-40 (2016)
- [4] Matsuo K, Moribe J, Abe N : Molecular detection and characterization of *Anaplasma* species in wild deer and boars in Gifu Prefecture, Japan, *Jpn J Infect Dis*, 70, 354-356 (2017)
- [5] 粕谷志郎, 今井直幸, 岡本秀樹, 今峰 徹, 荒木国興: 気胸にて発症したウエステルマン肺吸虫症の 4 例, *呼吸*, 14, 764-769 (1995)
- [6] 大井康徳, 丸山治彦, 吉田彩子, 太田伸生, 内山ふくみ, 名和行文: 好酸球性髄膜炎で発症したウエステルマン肺吸虫症, *Clin Parasitol*, 10, 124-126 (1999)
- [7] 田淵久美子, 高橋知男, 安達真也, 館林宏治, 矢嶋たえ子, 大西涼子, 鱈 稔隆, 加藤達雄, 篠田紳司, 内田 靖: シカ肉生食後にウエステルマン肺吸虫症を発症した 1 家族例, *小児科臨床*, 63, 1798-1802 (2010)
- [8] Blair D, Agatsuma T, Watanobe T, Okamoto M, Ito A : Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences, *Parasitology*, 115, 411-417 (1997)
- [9] Agatsuma T, Iwagami M, Sato Y, Iwashita J, Hong SJ, Kang SY, Ho LY, Su KE, Kawashima K, Abe T : The origin of the triploid in *Paragonimus westermani* on the basis of variable regions in the mitochondrial DNA, *J Helminthol*, 77, 279-285 (2003)
- [10] Sugiyama H, Umehara A, Morishima Y, Yamasaki H, Kawanaka M : 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 (2009)
- [11] Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R : DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol Mar Biol Biotech*, 3, 294-299 (1994)
- [12] Crandall KA, Fitzpatrick JFJ : Crayfish molecular systematics: Using a combination of procedures to estimate phylogeny, *Syst Biol*, 45, 1-26 (1996)
- [13] 大内政嗣, 井上修平, 尾崎良智, 藤田琢也, 上田桂子, 花岡 淳: 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, 44-50 (2014)
- [14] 杉山 広, 柴田勝優, 川上 泰, 御供田陸代, 森嶋康之, 山崎 浩: 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 (2016)
- [15] Meckel LA, McDanel CP, Wescott DJ : White-tailed deer as a taphonomic agent: Photographic evidence of white-tailed deer gnawing on human bone, *J Forensic Sci*, 63, 292-294 (2017)

Possibility of Paragonimiasis Due to Consumption of Raw Deer Meat

Kayoko MATSUO^{1),2)†}, Junji MORIBE²⁾, Yasuhiro TAKASHIMA²⁾,
Shiro KASUYA³⁾, Ayako YOSHIDA⁴⁾, Niichiro ABE⁵⁾,
Weerachai SAIJUNTHA⁶⁾ and Takeshi AGATSUMA⁷⁾

- 1) *Hida Regional Livestock Hygiene Service Center, 7-468 Kamiokamoto-machi, Takayama, 506-8688, Japan*
- 2) *Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagito, Gifu, 501-1193, Japan*
- 3) *Kayou Clinic, 1-24-3 Kinen-cho, Gifu, 500-8156, Japan*
- 4) *Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-kibanadai Nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan*
- 5) *Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji, Osaka, 543-0026, Japan*
- 6) *Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand*
- 7) *Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku, 783-8505, Japan*

SUMMARY

Anti-*Paragonimus westermani* antibodies were detected in 4 heads (Areas B and C) in a total of 148 Sika deer (*Cervus nippon centralis*) captured in three areas (A, B and C) in Gifu Prefecture. In Areas B and C, there are reports of human paragonimiasis suspected of being caused by consumption of deer meat. In addition, metacercaria of *P. westermani* (diploid type) was detected in a Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani*, in Area B. The contents of deer rumen were tested with a commercial food allergen screening kit (crustaceans), and it was positive in one deer from Area B. The positive rumen contents were further examined and material resembling crustacean limbs was found, from which DNA was extracted and identified as of *G. dehaani*. These results suggest that deer may eat *G. dehaani* and potentially become infected with *P. westermani* as a paratenic host. — Key words : *Geothelphusa dehaani*, *Paragonimus westermani*, sika deer.

† Correspondence to : Kayoko MATSUO (Hida Regional Livestock Hygiene Service Center)

7-468 Kamiokamoto-machi, Takayama, 506-8688, Japan

TEL 0577-33-1111 FAX 0577-32-9019 E-mail : alaeuris@violin.ocn.ne.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 449 ~ 453 (2018)