

- Cell Probes* 2002;16:231-6.
- Sugiyama H, Morishima Y, Rangsiruji A, *et al.* Molecular discrimination between individual metacercariae of *Paragonimus heterotremus* and *P. westermani* occurring in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(suppl 4):102-6.
- Sugiyama H, Morishima Y, Rangsiruji A, Binchai S, Ketudat P, Kawanaka M. Application of multiplex PCR for species discrimination using individual metacercariae of *Paragonimus* occurring in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37(suppl 3):48-52.
- Sugiyama H, Morishima Y, Binchai S, Rangsiruji A, Punsin K. New form of *Paragonimus westermani* discovered in Thailand: morphological characteristics and host susceptibility. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38 (suppl 1):46-50.
- Tsuzuki T, Kawashima K, Higo H, *et al.* Molecular genetics in *Paragonimus westermani* complex in Asia [Research accomplishment report, Project Number: 07041163]. Database of Grants-in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan. [Cited 2007 Dec 31]. Available from: URL: <http://seika.nii.ac.jp/search/pjno.html?PJNO=07041163>

# MOLECULAR ANALYSIS OF JAPANESE *ANISAKIS SIMPLEX* WORMS

Azusa Umehara<sup>1,2</sup>, Yasushi Kawakami<sup>2</sup>, Jun Araki<sup>3</sup>, Akihiko Uchida<sup>2</sup> and Hiromu Sugiyama<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo;

<sup>2</sup>Laboratory of Medical Zoology, College of Environmental Health, Azabu University, Kanagawa;

<sup>3</sup>Meguro Parasitological Museum, Tokyo, Japan

**Abstract.** In this study, we used sequence and RFLP analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region to identify the sibling species of *Anisakis simplex* worms isolated in Japan as third stage larvae (L3) from fish and patients and as adults from marine mammals. Worms from North Pacific Ocean were identified as *A. simplex* s. str., while those from the southern Sea of Japan were *A. pegreffii*. Worms from patients were mainly identified as *A. simplex* s. str. even though they were obtained from southern Japan. Worms of the hybrid genotype were only detected in fish and marine mammals. We also demonstrated that our newly established RFLP method for mitochondrial *cox1* enables us to unambiguously classify members of *A. simplex*, including hybrid genotype worms, into *A. simplex* s. str. or *A. pegreffii*.

## INTRODUCTION

In Japan, over 2,000 cases of human anisakiasis have been reported annually due to the high consumption of raw fish as sushi and sashimi. The nematode *Anisakis simplex* is the parasite most frequently associated with the disease. *A. simplex* is widespread worldwide with no obvious variation in morphology. However, sequencing and/or restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region [(rDNA ITS region; namely, 5.8S rDNA and flanking ITS regions (ITS1 and ITS2))] have demonstrated that *A. simplex* morphospecies comprises three sibling species: *A. pegreffii*, *A. simplex* sensu stricto and *A. simplex* C (Mattiucci and Nascetti, 2006). Parasites with hybrid genotype between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* were also detected from waters around the Iberian Peninsula (Abollo *et al.*, 2003; Martin-Sanchez *et al.*, 2005). In this paper, we have applied

molecular methods for sibling species-level identification of Japanese *A. simplex* worms isolated from fish, marine mammals and patients with anisakiasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Parasite materials

*A. simplex* worms were collected from fish as third stage larvae (L3) and marine mammalian hosts as adults, as well as from patients with anisakiasis as L3. Worms from fish and marine mammals were stored at -20 °C and those from human patients were stored in 80% ethanol at room temperature until analysis. Host animals, the geographical location of collection and numbers of worms examined are listed in Table 1. Species was confirmed by DNA sequencing and/or RFLP analysis as described below.

### DNA amplification and sequencing

We extracted DNA samples from individual worms using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen k. k., Japan). The entire ITS region (ITS1, 5.8S rDNA and ITS2) and mitochondrial cytochrome C oxidase I (*cox1*) gene was amplified by PCR using primer pairs A and B (D Amelio *et al.*, 2000) and JB3 and JB4.5 (Hu *et al.*, 2001), respectively. PCR conditions

Correspondence: Hiromu Sugiyama, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan.  
Tel: +81-3-5285-1111; Fax: +81-3-5285-1173  
E-mail: hsugi@nih.go.jp

differed for frozen and ethanol-preserved worms and were the same as those described by Umehara *et al* (2006, 2007). Amplification products were separated on agarose gels and excised bands were sequenced using BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) in an automated sequencer (ABI3100, Applied Biosystems). Sequence alignment and comparison were analyzed using GENETYX-WIN program (ver.7.0, Software Development, Japan).

#### RFLP analysis of PCR products

Amplicons of the entire ITS region were digested with *Hinf*I (D Amelio *et al*, 2000) and of mitochondrial *cox*1 with *Sf*cl. The digested samples were then separated by electrophoresis in 3.0% (w/v) agarose gels.

## RESULTS

### Sequence and RFLP analysis of rDNA ITS region

Amplification of the rDNA ITS region produced a single band of about 950 bp for all samples. Digestion of PCR products by *Hinf*I produced three different RFLP patterns, corresponding to that of *A. simplex* s. str. (ca. 610 and 230 bp, Fig 1 lane 1), *A. pegreffii* (ca. 330, 280 and 230 bp, Fig 1 lane 2) or the hybrid genotype (ca. 610, 330, 280 and 230 bp, Fig 1 lane 3). The RFLP pattern produced by the hybrid genotype was identical to the combination of the RFLP patterns of *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*.

Sequences of the ITS amplicons were almost identical among samples; only two

Table 1  
Identification of *A. simplex* at the sibling species-level.

Sources of parasites	Collection site <sup>a</sup>	Life cycle stage	No. of parasite identified <sup>b</sup> as		
			As	Ap	H
Fish					
Arabesque greenling	North	L3	20	0	0
Alaska pollack	North	L3	19	0	0
Chub mackerel	North	L3	16	0	0
Surf smelt	North	L3	10	0	0
Chub mackerel	South	L3	0	37	1
					(Ap-type)
Marine mammal					
Minke whale	North	Adult	45	0	3
					(2: As-type)
					(1: Ap-type)
Human					
5 patients	NJpn	L3	5	0	0
80 patients	SJpn	L3	94	1	0

<sup>a</sup> North = North Pacific Ocean; South = Southern Sea of Japan; NJpn = Northern Japan; SJpn = Southern Japan

<sup>b</sup> Identification for sibling species was based on rDNA RFLP patterns. For the hybrid genotype, mtDNA RFLP patterns were used.

As = *A. simplex* s. str.; Ap = *A. pegreffii*; H = Hybrid genotype

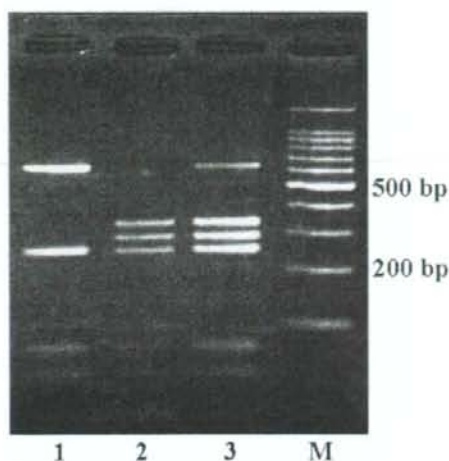


Fig 1- RFLP analysis of rDNA ITS amplicons from *A. simplex* s. str., *A. pegreffii* and hybrid genotype. Amplicons of *A. simplex* s. str. digested with *Hinf*I produced two bands (ca. 610 and 230 bp, lane 1), while those of *A. pegreffii* produced three bands (ca. 330, 280 and 230 bp, lane 2). Amplicons of hybrid genotype produced four bands (ca. 610, 330, 280 and 230 bp, lane 3). A 100-bp DNA ladder marker was used to estimate the size of the bands (lane M).

thymine to cytosine transitions in the ITS1 region were observed between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* (data not shown). Similarity searches of the GenBank/EMBL/DDBJ nucleotide database revealed that the sequences with two thymine bases and those with two cytosine bases were identical to sequence of *A. simplex* s. str. (GenBank/EMBL/DDBJ accession number: AB277822) and *A. pegreffii* (AB277823), respectively. Electropherograms of the hybrid genotype showed two double peaks at these transition sites (data not shown).

#### Sequence and RFLP analysis of mitochondrial *cox1*

PCR amplification of mitochondrial *cox1* produced a single band of about 440 bp for all samples. Sequence analysis revealed a high level of conservation among samples with base differences occurring at only seven

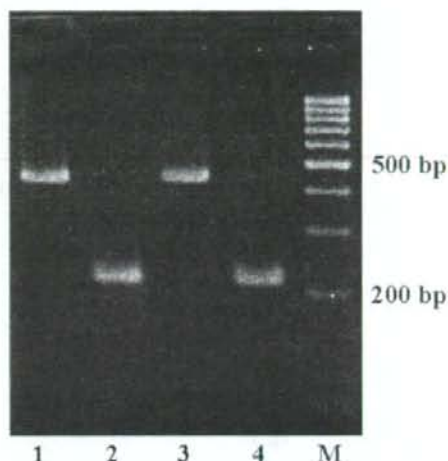


Fig 2- RFLP analysis of mitochondrial *cox1* amplicons from *A. simplex* s. str., *A. pegreffii* and hybrid genotype. Amplicons of *A. simplex* s. str. were not digested with *Sfc*I (ca. 440 bp, lane 1), whereas those of *A. pegreffii* produced a single digested band (ca. 220 bp, lane 2). Hybrid genotype amplicons were not digested (lane 3) or digested to produce two 200 bp bands (lane 4). A 100-bp DNA ladder marker was used to estimate the size of the bands (lane M).

sites between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* (data not shown). At the amino acid level, no differences were observed between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*.

Restriction enzyme *Sfc*I was selected for RFLP analysis based on the sequence differences between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*. A single undigested 440 bp band was obtained for *A. simplex* s. str. (Fig. 2, lane 1), while digested 220 bp for *A. pegreffii* (Fig 2, lane 2). Amplicons from hybrid genotype were either not digested (Fig 2, lane 3, *A. simplex* s. str.-type) or digested to produce two 220 bp bands (Fig 2, lane 4, *A. pegreffii*-type).

#### Infection rates of sibling species of *A. simplex* in Japan

The identification of the *A. simplex* worms at the sibling species-level is summarized in Table 1. L3 larvae from fish collected in North Pacific Ocean were all identified as *A. simplex*

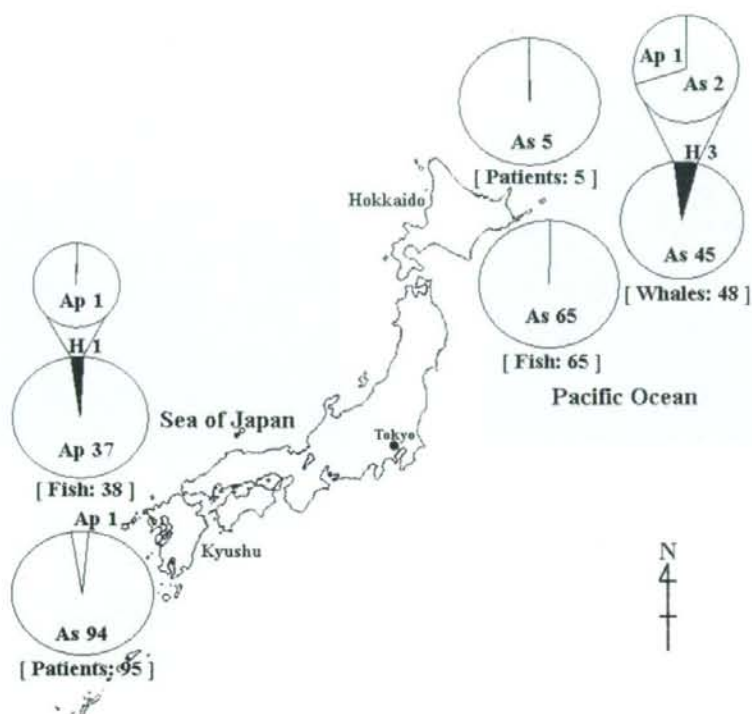


Fig 3- Distribution in Japan of *A. simplex* s. str. (As), *A. pegreffii* (Ap) and hybrid genotype (H) isolated from fish, marine mammals and patients with anisakiasis. Large pie charts show the results of identification of *A. simplex* based on analysis of the rDNA ITS region. Small pie charts show the results of typing of the hybrid genotype based on analysis of mitochondrial *cox1*. Numbers in square brackets and after the abbreviations of the species (As, Ap and H) represent the numbers of worms examined and identified, respectively.

s. str. However, almost all L3 larvae from fish captured in the southern Sea of Japan were identified as *A. pegreffii*, while only one L3 larva was identified as the hybrid genotype. However, the latter's genotype was determined to be *A. pegreffii*-type by RFLP analysis of mitochondrial *cox1*.

Adult worms from marine mammals in North Pacific Ocean were identified as *A. simplex* s. str. or the hybrid genotype. Of the three hybrid genotype worms, two were determined to be *A. simplex* s. str.-type and one *A. pegreffii*-type by RFLP analysis of mitochondrial *cox1*.

Five larvae from 5 patients in northern Japan were all identified as *A. simplex* s. str. In contrast, 94 of 95 larvae from 80 patients

in southern Japan were identified as *A. simplex* s. str., while the remaining single larva was identified as *A. pegreffii*.

Mixed infections with the hybrid genotype and either *A. simplex* s. str. or *A. pegreffii* were found in marine mammals collected from North Pacific Ocean and in fish from southern Sea of Japan. However, no example of mixed infection with both *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii* in a single host was detected.

#### Distribution of *A. simplex* sibling species in Japan

The distribution in Japan of *A. simplex* identified at the sibling species-level is shown in Fig 3. Almost all worms from fish were

classified into one of the two sibling species corresponding to the geographical location from which the samples were obtained; worms from north Pacific Ocean were all identified as *A. simplex* s. str., while almost all worms from the southern Sea of Japan were *A. pegreffii*. In contrast, worms from patients were mainly identified as *A. simplex* s. str. even though they were obtained from southern Japan where *A. pegreffii* predominates in samples isolated from fish.

#### DISCUSSION

*A. simplex* worms occurring worldwide show no obvious variation in morphology. However, Nascetti *et al* (1983, 1986) divided *A. simplex* worms isolated from Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean into two sibling species, *A. pegreffii* and *A. simplex* s. str., respectively, based on difference observed in isozyme electrophoretic patterns. In addition to these two sibling species, Mattiucci *et al* (1997) differentiated some *A. simplex* worms showing another electrophoretic pattern as *A. simplex* C. Consequently, *A. simplex* worms have come to be regarded as a complex composed of three sibling species, namely, *A. pegreffii*, *A. simplex* s. str. and *A. simplex* C.

This classification has been generally accepted because the three sibling species were also unequivocally discriminated based on nuclear rDNA sequence differences (D Amelio *et al*, 2000). In this study, we applied molecular methods for sibling species-level identification of Japanese *A. simplex* worms and confirmed the usefulness of RFLP analysis of rDNA for this purpose. Thus Japanese *A. simplex* worms were classified into *A. simplex* s. str., *A. pegreffii* or the hybrid genotype.

It is well known that mitochondrial DNA (mtDNA) evolves at a faster rate than nuclear DNA and is useful for differentiating cryptic species (Blouin, 2002). Therefore, we used mitochondrial *cox1* in developing an RFLP method that is capable of classifying *A. simplex*

into sibling species. Initially, the enzyme *HinfI* was used for this discrimination (Umehara *et al*, 2006), but based on the detection of intraspecific variations at the recognition sites of *HinfI* in mitochondrial *cox1* sequence in one of 12 *A. pegreffii* worms examined, we selected another enzyme, *SfcI*, that discriminates between *A. simplex* s. str. and *A. pegreffii*. By sequence analysis, we confirmed that there were no intraspecific variations at the *SfcI* recognition site in the sequences of 39 worms examined so far (20 *A. simplex* s. str. and 19 *A. pegreffii* worms).

The hybrid genotype worms were clearly classified into either *A. simplex* s. str.-type or *A. pegreffii*-type by the RFLP method employing *SfcI*. Since the vast majority of mitochondrial genomes are inherited uniparentally from the female parent, the results obtained with the hybrid genotype worms were as predicted. The mitochondrial genome is effectively haploid (Moore, 1995) and, thus, may be advantageous for study of the evolutionary history of *A. simplex*.

The results of this study showed that *A. simplex* s. str. is primarily distributed in fish and marine mammals in North Pacific Ocean and *A. pegreffii* is predominantly distributed in fish in the southern Sea of Japan. However, worms from patients were identified as *A. simplex* s. str. even though they were obtained from southern Japan where *A. pegreffii* is the predominant species in fish. The reason for this discrepancy between the predominant sibling species in fish and in patients remains unresolved. Studies are now in progress to identify the fish species that is responsible for human infection. This information is crucial for initiating prevention measures against human anisakiasis, especially in southern Japan.

#### REFERENCES

- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D Amelio S. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s. s. and *Anisakis pegreffii*

- (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect Genet Evol* 2003;3:175-81.
- Blouin MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 2002;32:527-31.
- D Amelio S, Mathiopoulou KD, Santos CP *et al.* Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol* 2000;30:223-6.
- Hu M, D Amelio S, Zhu X, Paggi L, Gasser R. Mutation scanning for sequence variation in three mitochondrial DNA regions for members of the *Contracaecum osculatum* (Nematoda: Ascaridoidea) complex. *Electrophoresis* 2001;22:1069-75.
- Martin-Sanchez J, Artacho-Reinoso ME, Diaz-Gavilan M, Valero-Lopez A. Structure of *Anisakis simplex* s. l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s. s. Absence of reproductive isolation between both species. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141:155-62.
- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, *et al.* Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with the evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol* 1997;83:401-16.
- Mattiucci S, Nascetti G. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 2006;13:99-113.
- Moore WS. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 1995;49:718-26.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Mattiucci S, Bullini L. Two sibling species within *Anisakis simplex* (Ascaridida: Anisakidae). *Parassitologia* 1983;25:239-41.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int J Parasitol* 1986;16:633-40.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Matui T, Uchida A. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 2006;55:267-71.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int* 2007;56:211-15.

# MOLECULAR DISCRIMINATION BETWEEN *PARAGONIMUS HETEROTREMUS* AND TWO FORMS OF *P. WESTERMANI* OCCURRING IN THAILAND

Hiromu Sugiyama<sup>1</sup>, Yasuyuki Morishima<sup>1</sup>, Sutheewan Binchai<sup>2</sup> and Acharya Rangsuriji<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan;

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

**Abstract.** In areas of central Thailand where paragonimiasis is endemic, metacercariae of *Paragonimus westermani* (large metacercarial form) and *P. heterotremus* have been detected in a single crab species. Of these two species, only the latter has been confirmed to infect humans. In southern Thailand, we have previously identified another form of *P. westermani* (small metacercarial form) in another crab species, which also acts as host for *P. westermani* (large metacercarial form). In this study, we established a new multiplex PCR method and evaluated its applicability for discriminating between *P. heterotremus* and two forms of *P. westermani* at the metacercarial stage. We found that multiplex PCR in combination with restriction enzyme digestion (PCR-RFLP with *Bsa*HI) was effective for the discrimination.

## INTRODUCTION

During an intensive field survey for lung flukes in southern Thailand, we found two forms of *Paragonimus westermani* metacercariae in a single crab species, *Phricotelphusa aedes* (Binchai *et al.*, 2007; Sugiyama *et al.*, 2007). Metacercariae of these two forms had the same shape, but were of different sizes: the diameter of metacercarial cysts of the large form is about twice that of the small one. As the nuclear ribosomal DNA (rDNA) second internal transcribed spacer (ITS2) sequences obtained from the large metacercarial form were identical to those of *P. westermani*, whose sequence was deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ nucleotide databases under the accession number of AF159604 (referred to as *P. westermani* strain Thailand), we referred to the small metacercarial form as *P. westermani*-like for descriptive purposes.

In Thailand, human infections with *P.*

*westermani* have not been confirmed, although *P. heterotremus* is known to affect humans (Srisont *et al.*, 1997; Blair *et al.*, 1998). The metacercariae of these two species have been detected in the same crab host in paragonimiasis-endemic areas (Miyazaki, 1991). Therefore, we had developed methods that could be used as reliable tools for discriminating these two lung fluke species. We demonstrated that multiplex PCR method was the most efficient because species identification involved a single round of PCR in a single tube (Sugiyama *et al.*, 2005). In this study, we modified the previously established multiplex PCR method and evaluated its applicability for discriminating between *P. heterotremus* and two forms of *P. westermani* at the metacercarial stage.

## MATERIALS AND METHODS

### Parasite material and DNA isolation

Metacercariae of *P. heterotremus* were harvested from the freshwater crab, *Larnaudia larnaudii*, captured in a mountain stream in Saraburi Province, Thailand (Kawashima *et al.*, 1989). Metacercariae of *P. westermani* and *P. westermani*-like were isolated from the freshwater crab, *Phricotelphusa aedes*,

Correspondence: Hiromu Sugiyama, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan.  
Tel: +81-3-5285-1111; Fax: +81-3-5285-1173  
E-mail: hsugi@nih.go.jp



captured in a mountain stream in Surat Thani Province, Thailand (Sugiyama *et al.* 2007). This study also includes *P. siamensis*, the species known to be closely related to *P. westermani* (Blair *et al.* 1998). Metacercariae of *P. siamensis* were harvested from the freshwater crab, *Sayania germani*, captured in paddy fields in Prachin Buri Province, Thailand (Srisont *et al.* 1997). DNA samples were prepared from the metacercariae as previously described (Sugiyama *et al.* 2002).

#### DNA amplification and sequencing

For multiplex PCR amplification, we constructed new species-specific forward primers based on the respective rDNA ITS2 sequences in order to generate the products that would remain uncut by further restriction enzyme digestion. The sequences (and alignment positions) (Fig 1) of the primers used for the multiplex PCR are as follows:

1) Interspecies-conserved forward primer (3S): 5' GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG 3';

2) Interspecies-conserved reverse primer (A28): 5' GGGATCCCTGGTITAGTTTCTTTTCCTCCGC 3' (Bowles *et al.* 1995);

3) *P. heterotremus*-specific forward primer (PhTF2): 5' CAAATCCGGGCGTATCCATGTTGTG 3' (positions 238 to 262);

4) *P. westermani*-specific forward primer (PwTF4): 5' TCTGCGTTCGATGCTGACCTACG 3' (positions 368 to 390, a sequence common between the two forms of *P. westermani*).

These four primers were included in a single-tube reaction. Multiplex PCR amplification was performed using 0.1  $\mu$ M of PhTF2 and PwTF4 primers, 0.5  $\mu$ M of 3S and A28 primers, 2.5 units of the *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) and 10 ng of DNA template. The resulting PCR products were separated by electrophoresis in 3% (w/v) agarose gels.

The amplicons were extracted from agarose gels and sequenced using the corresponding primers and BigDye Terminator Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) in an automated sequencer (ABI310, Applied Biosystems). The sequence alignment and comparison were conducted using GENETYX-WIN (ver. 7.0, Software Development, Japan) program.

#### Restriction enzyme digestion of the multiplex PCR products (PCR-linked restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP))

Amplicons (4 to 10  $\mu$ l) were also digested with five units of *Bsa*HI (New England Biolabs, USA) at 37 °C for 1 hour. The samples were then separated by electrophoresis in 3% (w/v) agarose gels.

#### RESULTS

Using multiplex PCR method with the new species-specific primers, two products were amplified from each of the metacercarial DNA samples of *P. heterotremus* (ca. 520 bp and 250 bp), *P. westermani* (ca. 520 bp and 125 bp), and *P. westermani*-like (ca. 520 bp and 125 bp) (Fig 2, lanes 1 to 3). However, a single 520-bp product was generated from the DNA samples of *P. siamensis* (Fig 2, lane 4). Sequence analysis of the amplification products (520 bp and others) revealed that the products corresponded to the rDNA ITS2 region of the respective species (Fig 1).

For species discrimination by RFLP using the multiplex PCR products, we selected restriction enzyme *Bsa*HI based on the putative restriction maps generated from ITS2 region sequences (Fig 1). Digestion of multiplex PCR products of *P. westermani*-like produced three fragments (ca. 270, 170 and 90 bp) from the 520-bp amplicon (Fig 2, lane 7). However, the 520-bp amplicons of the other 3 species (*P. heterotremus*, *P. westermani* and *P. siamensis*) produced two fragments (ca. 350 and 170 bp; Fig 2, lanes 5, 6 and 8). Multiplex PCR products of less than 520 bp in size (250-bp product for *P. heterotremus* and 125-bp products for *P.*

Ph 001:	TGTCGATSAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAAGTGCATCTGCTTGAACA	060
Pw 001:	.....C.....	060
PL 001:	.....C.....	060
Ph 061:	TCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCCACGGGTTAGCCTGTGGCCACCCCTGTCGAGGG	120
Pw 061:	.....	120
PL 061:	.....	120
	<i>Bsa</i> HI	
Ph 121:	TCGGCTTATAAACTATCGC <b>GACGCC</b> CAAAAAGTCGGGCTTGGGTTTGGCCAGCTGGCGT	180
Pw 121:	.....C.....	180
PL 121:	.....G.....	180
	<i>Bsa</i> HI	
Ph 181:	GATTTCGCCAACCGTGGCCTTGTGTCTGTGGGGTGCCAGATCTGTGGCGTTTCCCTAACAA	240
Pw 181:	...C...TC...T...C...A...T	240
PL 181:	...C...TC...T...C...C...T	240
	PhTF2-->	
Ph 241:	<u>ATCCGGCGTATCCATGTTGTGGCTGAAAGCCITGATGGGGAITGGCAACCGATCGTC</u>	300
Pw 241:	.CT..C...C..C...C...C...C...A...	300
PL 241:	.CT...C.C...C...C...C...A...	300
Ph 301:	GCTCAGTGAATGATTATGTGACCGTCCGCTGTCCCGTCATCATCTATGGTTCAAGTTG	360
Pw 301:	.....A.....G...T...G...T...T...G...C.T...	360
PL 301:	.....T..G.....G.....T...T...G...T.T...	360
Ph 361:	CCGGTGGTGTG--TCCGATGCTGACCTATATATGTGCCATGTGGCTCATTTCCTGACCT	420
Pw 361:	.....C..CG.T.....CG.....TC...C.T.....	420
PL 361:	.....C..CG.T.....CG.....T...C.....	420
	PwTF4-->	
Ph 421:	CGGATCAGACGTGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCACTAA	463
Pw 421:	.....T.....	463
PL 421:	.....	463

Fig 1. Sequences alignment of the ITS2 region from *P. heterotremus* (Ph), *P. westermanni* (Pw) and *P. westermanni*-like (PL) metacercariae. The 5' and 3' ends of the sequences include 5 BS rDNA and 28S rDNA, respectively. A dot in the *P. westermanni* and *P. westermanni*-like sequences indicates identity with *P. heterotremus* sequence. The locations of the *P. heterotremus*-specific forward primer (PhTF2, 5' CAAATCCGGCGTATCCATGTTGTG 3') and *P. westermanni*-specific forward primer (PwTF4, 5' TCTGCGTTCGATGCTGACCTACG 3') are underlined. The recognition sites of *Bsa*HI (GRVCGYC) are located in boxes. The numbers refer to the alignment positions.

*westermanni* and *P. westermanni*-like) remained undigested by *Bsa*HI.

## DISCUSSION

We previously reported that the multiplex PCR method we developed (Sugiyama *et al.*, 2005) was effective for discriminating among the five *Paragonimus* species occurring in Thailand when used in combination with *Sac*FI digestion (Sugiyama *et al.*, 2006). However, this method was not applicable for discriminating among *P. heterotremus*

and two forms of *P. westermanni* because the latter two forms showed identical PCR-RFLP patterns. Therefore, in this study, we treated the amplicons with *Bsa*HI chosen based on the sequence differences between these two forms of *P. westermanni*. In addition, new species-specific primers were constructed to generate products that would remain uncut by *Bsa*HI digestion. The improved method was shown to be effective in discriminating among *P. heterotremus* and two forms of *P. westermanni*.

Two forms of *P. westermanni* were found



Fig 2. Multiplex PCR and multi-plex PCR plus PRL analysis of ITS2 amplification products from the metacercarial DNA samples of *P. heterotremus* (lanes 1 and 5), *P. westermani* (lanes 2 and 6), *P. westermani*-like (lanes 3 and 7) and *P. siamensis* (lanes 4 and 8). After digestion of the multiplex PCR products with *Bsa*HI, three bands were observed for *P. heterotremus* (ca. 350, 250 and 170 bp, lane 5), three bands for *P. westermani* (ca. 350, 170 and 125 bp, lane 6), four bands for *P. westermani*-like (ca. 250, 170, 125 and 90 bp, lane 7) and two bands for *P. siamensis* (ca. 350 and 250 bp, lane 8). Both the 25-bp and 100-bp DNA ladders were used to estimate the sizes of the bands (lanes M1 and M2, respectively).

to occur in Surat Thani, southern Thailand, and they both used a single crab species as the second intermediate host (Sugiyama *et al.* 2007). Possible discovery of *P. westermani*-like metacercariae were reported from crabs occurring not only in Surat Thani (Shibahara *et al.* 1995) but Nakhon Si Thammarat (Tsuzuki *et al.* 1995), the neighboring province of Surat Thani. However, little attention has been paid to *P. westermani*-like and its infection of humans has not been determined. To obtain accurate epidemiological information about the prevalence of the lung fluke species and forms in Thailand, various methods for identification are needed on parasitological materials obtained from host animals. The method developed in this study has the potential for this purpose.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan on emerging and reemerging diseases (2007).

#### REFERENCES

- Binchai S, Rangsiroji A, Ketudat P, Morishima Y, Sugiyama H. Molecular systematics of a new form of *Paragonimus westermani* discovered in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38 (suppl 1): 92-96.
- Blair D, Waikagul J, Honzako Y, Agatsuma T. Phylogenetic relationships among the Thai species of *Paragonimus* inferred from DNA sequences. In: Tada I, Kojima S, Tsuji M, eds. Proceedings of the Ninth International Congress of Parasitology. Bologna: Monduzzi Editore, 1998:643-7.
- Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Mol Phylog Evol* 1995;4:103-9.
- Kawashima K, Sugiyama H, Ketudat P. *Paragonimus* infection in crabs in Thailand. In: Kawashima K, ed. *Paragonimus in Asia: biology, genetic variation and speciation (Paragonimus Research Report, Number 2)*. Fukuoka: Kyushu University School of Health Sciences, 1989:75-9.
- Miyazaki I. Paragonimiasis. In: Miyazaki I, ed. An illustrated book of helminthic zoonoses. Tokyo: International Medical Foundation of Japan, 1991:76-146.
- Shibahara T, Iwaki T, Ketudat P, Pancha U, Kawashima K. On the lung flukes found in the southern part of Thailand. *Jpn J Parasitol* 1995;44 (suppl):126 (in Japanese).
- Srisont D, Waikagul J, Yaemput S. *Paragonimus* in Thailand. In: Srisont D, Waikagul J, Yaemput S, eds. *Paragonimus*. Bangkok: Living Trans Media, 1997:65-91 (in Thai).
- Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, Kawanaka M. Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Mol*

*Cell Protein* 2002;14:231-6.

Sugiyama H, Morishima Y, Rangsiroj A, *et al*. Molecular discrimination between individual members of *Paragonimus heterotremus* and *P. heterotremi* occurring in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(suppl 4):1024.

Sugiyama H, Morishima Y, Rangsiroj A, Hinchai S, Katudat P, Kamakura M. Application of multiplex PCR for species discrimination using individual members of *Paragonimus* occurring in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37(suppl 3):48-52.

Sugiyama H, Morishima Y, Hinchai S,

Rangsiroj A, Patson K. New form of *Paragonimus westermani* discovered in Thailand: morphological characteristics and host susceptibility. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38(suppl 1):46-50.

Tsuzuki T, Kawashima K, Higa H, *et al*. Molecular genetics in *Paragonimus westermani* complex in Asia [Research accomplishment report, Project Number 0704165]. Database of Grants in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan [Cited 2007 Dec 11]. Available from URL: <http://araka.wakai-u.ac.jp/search/result/TFNSO-0704165>.

# ウェステルマン肺吸虫による食中毒事例について —発生概要と原因に関する疫学調査—

Food Poisoning Caused by *Paragonimus Westermani*  
—Epidemiology Investigation Concerning Outbreak and Cause—

佐賀県衛生事業センター  
佐賀県中部家畜保健衛生所  
佐賀県唐津保健福祉事務所  
佐賀県健康福祉本部生活衛生課  
麻布大学環境保健学部  
国立感染症研究所寄生動物部

○坂本晃子 増本久人 平野敬之 船津丸貞幸  
池添博士  
天草 務 杉元昌志  
松崎祐己 森田満雄  
山中和貴 川上 泰  
杉山 広 森嶋康之 川中正憲

## I はじめに

佐賀県唐津市内にあるホテル内の中華料理店を原因施設として、平成16年秋に肺吸虫症の集団発生があった。計4名が肺吸虫に感染し、2名は呼吸器症状を呈したが、ほかの2名は血清反応のみ陽性の無症者であった。いずれも地元産モクスガニの老酒漬を非加熱で摂食していることから、ウェステルマン肺吸虫による食中毒として、食品衛生法に基づく届出が行われた。このような事故の再発を予防するには、本事例発生の背景を明らかにするとともに、原因についての疫学調査が重要と考えられた。そこで、平成17年、18年に国立感染症研究所寄生動物部と共同で、原因施設への聞き取り調査、現地視察を改めて実施し、(1)原因食品のモクスガニが由来した河川流域の特定、(2)そこでのモクスガニおよびサワガニの捕獲、(3)そのカニからの肺吸虫メタセルカリアの検出、(4)得られたメタセルカリアの正確な種同定、などについて一連の調査を行ったので、本事例発生

の経緯と併せて調査結果を報告する。

## II 発生の概要

平成16年11月10日、神奈川県から佐賀県に「佐賀県唐津市内にあるホテルに宿泊した1人が食中毒症状を呈して入院している」との電話連絡があった。この患者は当初肺結核や肺がんが疑われていたが、検査の結果、ウェステルマン肺吸虫症と診断されており、佐賀県が当該ホテルに問い合わせたところ、ホテル内の中華料理店が平成16年9月10日から11月3日の期間に「カニフェア」を開催し、地元の河川で採取された食材を用いた「モクスガニの老酒漬」を、宿泊者・来店者に計138食提供していることが判明した。この料理は中華料理の老酒漬を模したもの(図1)で、このほかにもシナモク



図1 モクスガニの老酒漬

表1 感染者内訳

患者	住所	年齢	性別	喫食日	発症日	潜伏期間(日)	症状
A	神奈川	49	女	9/25	10/2	8	発熱・頭痛・悪寒 倦怠感・発咳(痰)
B	福岡	66	女	9/16	10/12	27	発熱・悪寒・倦怠感 発咳(痰)
C	福岡	62	女	9/16	11/15	61	なし
D	佐賀	35	女	9/30	12/1	63	なし

\*無症状者は検査日を発症日とした。

ズガニ(上海ガニ)も「カニフェア」の食材として使用していたが、これは輸入品であったため加熱調理してスープとして提供していた。

佐賀県では、さらに宿泊者名簿をもとに詳細な確認作業を行い、喫食の可能性のある者は191名であり、このうち確定喫食者は114名であることが確認された。喫食者には肺吸虫感染の有無について医療機関を受診するよう要請した。

その結果、感染者は4名で、呼吸器症状を呈する有症者が2名、無症者が2名であり、いずれも抗体検査陽性であった(表1)。有症者については、糞便、喀痰あるいは胸水を検査したが、喫食から検査までの期間は短く、虫卵は検出されなかった。感染者4名については、ブラジカンテルの投与を受け、血清抗体価や血中好酸球数の低下などを指標として、さらに有症者では臨床症状や画像所見の改善も参照して治療判定がされている。

原因食品特定のために、感染者4名に対してさらに詳しい聞き取り調査を行ったところ、肺吸虫感染に関連する食品は、当該ホテルの中華料理店で提供されたモクスガニだけで、それ以外にサワガニやイノシシの肉も含め、まったく口にしていないことが確認された。

以上のような状況より、本事例の原因食品がモクスガニ(老酒漬)であり、感染者4名の血清抗体検査の結果から、ウェステルマン肺吸虫による食

中毒と確定し、平成16年11月30日に食品衛生法に基づく届出が行われ、当該飲食店に2日間の営業停止処分が下された。

なお、本事例発生後地元河川のモクスガニ6匹、サワガニ10匹、カワナナ10匹を採取し検査を実施したが、ウェステルマン肺吸虫は確認されず、サワガニ1匹から宮崎肺吸虫メタセルカリア3個を検出したのみであった。

### Ⅲ 疫学調査

本事例発生の背景を明らかにするために、平成17、18年の10月に、国立感染症研究所寄生動物部と共同で原因施設への聞き取り調査と、モクスガニが採取された河川の視察を実施した。

調査の結果、原因食品とされたモクスガニは、すべて1人の川漁師が地元の玉島川の五反田地区(河口から上流に3~4kmの範囲)で採取し、ホテルへ納入していたことが判明した。

以上の状況より、平成17年に五反田地区(河口から約3.5km上流、原因モクスガニの実際の採取地)において採取したモクスガニを検索した。その結果、69匹中13匹(寄生率19%)が肺吸虫メタセルカリア陽性であった。平成18年には五反田地区と仁部地区(河口から約7km上流)で採取したモクスガニを検索し、五反田地区では21匹中4匹(寄生率19%)が、また仁部地区では28匹中1匹(寄

表2 肺吸虫メタセルカリア検出状況(平成16~18年)

採取地区	調査年度	モクスガニ (ウエステルマン肺吸虫)			サワガニ (宮崎肺吸虫)		
		検査数	陽性数	寄生率(%)	検査数	陽性数	寄生率(%)
五反田	平成16年	6	0	0.0			
	17年	69	13	18.8			
	18年	21	4	19.0	28	0	0.0
	小計	96	17	17.7			
仁部	平成18年	28	1	3.6	40	1	2.5
馬川	平成16年				10	1	10.0
	17年				16	0	0.0
	18年				57	0	0.0
	小計				83	1	1.2
荒川	平成18年				20	0	0.0
合計		124	18	14.5	171	2	1.2

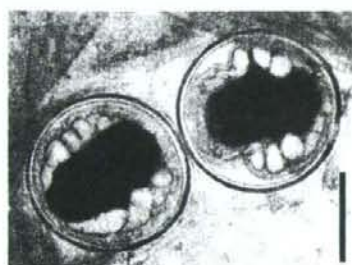


図2 ウエステルマン肺吸虫  
メタセルカリア(目盛200 $\mu$ m)



図3 ウエステルマン肺吸虫成虫  
(目盛2mm)

生率4%)が陽性であった(表2)。

このメタセルカリアとネコへの感染試験から得た成虫の形態から、虫体はいずれもウエステルマン肺吸虫(3倍体型)であると確定された。検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、直径は平均0.38mmで、体肉内には赤色の微細顆粒が多数認められた(図2)。成虫をカルミン染色・封入標本として計測したところ、その大きさは体長が平均11.7mm、体幅は平均6.9mmであった。卵巣は簡単に分岐しており、卵巣基部の受精嚢内には精子が観察されず卵黄細胞が認められた(図3)。皮棘は単生であった。

以上の形態学的所見から、今回検出した肺吸虫

は、いずれも3倍体型のウエステルマン肺吸虫と同定した。また、これらのメタセルカリアからDNAを抽出し、リボゾームDNAのITS2領域をPCR増幅して塩基配列を解読したところ、2倍体型・3倍体型に共通するウエステルマン肺吸虫の配列に一致し、さらにミトコンドリアDNAの16SリボゾームDNA領域を解析したところ、3倍体型に特徴的な配列が増幅された。以上の結果から、玉島川のモクスガニにはウエステルマン肺吸虫(3倍体型)が高率に寄生しており、平成16年に発生した食中毒の原因になったと判定された。

サワガニについても本虫の中間宿主であることから、平成18年の調査において採取し、メタセル



図4 宮崎肺吸虫メタセルカリア  
(目盛100 $\mu$ m)

カリアの検出を試みたところ、仁部地区で得た40匹のうち1匹から、ウエステルマン肺吸虫ではなく宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出された(図4)。さらに上流の馬川地区(河口から約12km上流)でも、宮崎肺吸虫のメタセルカリア陽性のサワガニ(83匹中1匹)が見出されており、形態学的所見、分子生物学的手法にて同定されている。

#### IV 考 察

国内において、モクズガニの老酒漬によるウエステルマン肺吸虫症事例は報告<sup>1-3)</sup>されており、集団感染例<sup>3)</sup>も含まれているが、食中毒として届け出されたものはない。

本事例は食品衛生法に基づき、肺吸虫を原因とする食中毒として届出・受理され、アニサキス以外の寄生蠕虫による初めての食中毒事例となった。

今回の調査では、原因食材が玉島川産のモクズガニであることを特定し、このモクズガニから高率にメタセルカリアを検出、3倍体型のウエステルマン肺吸虫であることを明らかにした。また、

サワガニからはウエステルマン肺吸虫は検出されず、宮崎肺吸虫が検出された。以上の結果から、佐賀県を流れる玉島川には、ウエステルマン肺吸虫(3倍体型)と宮崎肺吸虫がともに分布することが明らかとなった。

玉島川におけるモクズガニの肺吸虫検査は過去にも行われているが、陰性(24匹中)と報告されている<sup>4)</sup>。支流である横田川についても調査が行われているが、寄生率はわずか0.9%(109匹中1匹陽性)<sup>4)</sup>にとどまっている。今回の調査では寄生率は約15%で、可食部に多数のメタセルカリアが寄生する例もあった。地元では、「モクズガニには(寄生)虫がいるので必ず加熱調理して食べる」ことが広く知られているが、今回の飲食店の調理担当者にはこのことに関する認識が不十分で、このような事態を発生させた。

今後、同様の事例発生を予防するには、飲食店の調理関係者や一般住民に対して、寄生蠕虫症の予防に関する教育と啓発が必要であると痛感した。また、玉島川では、モクズガニ(ウエステルマン肺吸虫)だけでなく、サワガニ(宮崎肺吸虫)についても注意を払う必要があると感じた。アニサキスや本事例のようなそれ以外の寄生蠕虫による「飲食に起因する健康被害」についても、これを診断した医師が食中毒として保健所へ届け出ることにより、飲食に起因する寄生虫症の発生実態がより正確に把握されると考える。

#### 参 考 文 献

- 1) 富田弘志ほか：好酸球性髄膜炎、気胸、胸水、皮下腫瘍を呈したウエステルマン肺吸虫症の1例、日胸、46、296-301(1987)
- 2) 時松一成ほか：感染経路が推測されたウエステルマン肺吸虫症の4例、大分医会誌、19、34-38(2001)
- 3) 湯峯克也ほか：輸入上海ガニが原因と考えられるウエステルマン肺吸虫の集団感染例、日呼吸会誌、41、186-190(2003)
- 4) 岡部浩洋ほか：佐賀県北部のウエステルマン肺吸虫、久留米医会誌、24、2342-2345(1961)



同胞種レベルでみた日本産 *Anisakis simplex*

## —感染源の特定に向けた検討—

国立感染症研究所 寄生動物部

梅原梓里・杉山 広

麻布大学 環境保健学部 医動物学研究室

川上 泰・内田明彦

(財) 目黒寄生虫館

荒木 潤

Key Words : *Anisakis pegreffii*, *Anisakis simplex* sensu stricto, アニサキス症, サバ

## 緒 言

わが国では魚介類の生食が一般的であるため、これに起因するアニサキス症が多発し、年間に2,000例以上の症例が発生している。このアニサキス症の主要病原虫である *Anisakis simplex* は、アイソザイム解析の結果やリボソームDNA (以下rDNA) の介在配列 (以下, ITS領域) に認める塩基配列の相違から、これを同胞種に分けて、*A. pegreffii*, *A. simplex* sensu stricto (s. str.) (狭義の *A. simplex*), *A. simplex* C に分類するという学説が欧州の研究者から提出されている<sup>1)</sup>。これまでわれわれは、日本産 *A. simplex* にこの新しい分類が適用できるかを検討してきた。

その結果、本邦産の虫体も同様に同胞種に分類でき、北海道での患者由来の虫体と魚由来の虫体が、いずれも *A. simplex* s. str. であることを明らかにした。一方九州では、患者由来の虫種は北海道と同様に、主として *A. simplex* s. str. であったが、魚由来の虫体は *A. pegreffii* であった。このように九州では、魚と患者に由来する優占種が異なっていた<sup>2)3)</sup>。この理由は説明できていない。

われわれが従来に用いた九州の魚は、日本海産のマサバ *Scomber japonicus* (本稿では以下サバとする) であった<sup>2)</sup>。そこで今回は、市場で日本海産と同様によく流通する東シナ海産のサバを検索対象とし、*A. simplex* の検出と同胞種レベルでの同定

Identification of *Anisakis simplex* Larvae from Fish in Japanese Market at the Sibling Species Level

Azusa Umehara\* Hiromu Sugiyama\* Yasushi Kawakami\*\* Akihiko Uchida\*\* Jun Araki\*\*\*

\*Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

\*\*Laboratory of Medical Zoology, College of Environmental Health, Azabu University

\*\*\*Meguro Parasitological Museum

論文請求先: 杉山 広 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所 寄生動物部

Clinical Parasitology Vol. 19 No. 1 2008

表1 サバからの *Anisakis* I型幼虫の検出状況

サバ <sup>a)</sup> の 水揚げ地	漁獲海域	検査尾数	陽性尾数 (陽性率%)	検出虫体総数	陽性魚1尾あたりの検出虫体数		
					平均	最少	最多
福岡県	東シナ海	8	8 (100)	1,718	215	1	497
千葉県	太平洋	6	6 (100)	76	13	8	19
新潟県	日本海	16	11 (69)	32	3	1	10

<sup>a)</sup> マサバ *Scomber japonicus*

表2 サバおよび患者から得た *Anisakis* I型幼虫の分子同定結果

由来	由来地 <sup>a)</sup>	検査数	同定数			報告者
			As <sup>b)</sup>	Ap <sup>c)</sup>	At <sup>d)</sup>	
サバ <sup>e)</sup>	北海道 (太平洋)	16	16	0	0	Umehara <i>et al.</i> (2006)
	千葉県 (太平洋)	76	67	9	0	梅原ら (本報告)
	新潟県 (日本海)	32	16	16	0	梅原ら (本報告)
	福岡県 (日本海)	38	0	38	0	Umehara <i>et al.</i> (2006)
	福岡県 (東シナ海)	152	1	150	1	梅原ら (本報告)
患者	北海道	5	5	0	0	Umehara <i>et al.</i> (2007)
	九州	95	94	1	0	Umehara <i>et al.</i> (2007)

<sup>a)</sup> サバの水揚げ地 (漁獲海域) あるいは患者の居住地を示す

<sup>b)</sup> *A. simplex* s. str. : *A. simplex* に含まれる同胞種の1つ

<sup>c)</sup> *A. pegreffii* : *A. simplex* に含まれる同胞種の1つ

<sup>d)</sup> *A. typica* : *A. simplex* の近縁別種。第三期幼虫の形態では、*A. simplex* との鑑別点は認められず、両者は *Anisakis* I型幼虫として扱われてきた<sup>9)</sup>

<sup>e)</sup> マサバ *Scomber japonicus*

を試みた。また、千葉県産および新潟県産のサバも対象に、同様の検索を行った。

#### 材料および方法

福岡県 (東シナ海)・千葉県 (太平洋)・新潟県 (日本海) でおのおの水揚げされたサバを地元の鮮魚店から購入し、アニサキス虫体の検出を試みた。魚は内臓と体腔を、さらに一部については筋肉についても肉眼で検索し、虫体寄生の有無を調べた。検出された虫体は光学顕微鏡下で観察し、形態学的に *Anisakis* I型と確認され、*A. simplex* と推定した虫体のうち、約2割を選んで、常法に従いDNAを抽出した<sup>20)</sup>。

次に、各虫体に由来するDNAをテンプレートと

し、rDNAのITS領域を標的とするフォワードプライマーNC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') とリバースプライマーNC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3') を用いて、当該領域をPCR増幅した。増幅された産物は制限酵素 *Hinf*I で消化し、得られた切断パターンに基づき、D'Amelioら<sup>41)</sup> の提唱にしたがって、同胞種レベルでの同定を試みた (RFLP解析)。なお一部の虫体については、さらに塩基配列を解読して、同定結果を確認した。

この方法で種の確定ができない Hybrid Genotype (*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* との交雑により産出されたと考えられている虫体で、rDNA・ITS領域のRFLP解析で2種に認めるバンドを総て保有する<sup>31)</sup>) については、ミトコンドリア *cox1* 遺伝子



図1 サバおよび患者から得た *A. simplex* の地理的状況：同胞種レベルで調べた各虫体の寄生虫状況

〔虫体の由来：検査虫体数〕を示す。円グラフの As は *A. simplex* s. str., Ap は *A. pegreffii* で、数値は各同胞種として同定された虫体数を示す。検査に用いた魚は、いずれもマサバ *Scomber japonicus* で、サバと表記した。なお、*A. typica* (東シナ海産サバに由来する 1 虫) は、この図には含まれていない。

の RFLP 解析により、何れかの同胞種に分類した。この場合、フォワードプライマー JB 3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') およびリバースプライマー JB 4.5 (5'-TAAAGAAAGAACAT AATGAAAATG-3') を用いて *cox1* 遺伝子の一部配列を増幅し、増幅産物を制限酵素 *Sfi*I で消化して、そのパターンで種を決定した<sup>6)</sup>。

## 結果

検索に用いたサバは、福岡県(東シナ海)で水揚げされたもの 8 尾、千葉県(太平洋)のもの 6 尾、新潟県(日本海)のもの 16 尾で、それぞれの魚から、1,718 匹、76 匹、32 匹の *Anisakis* I 型幼虫を検出した(表 1)。このうち、152 匹、76 匹、32 匹の虫体から DNA を抽出し、同胞種レベルでの解析を行った。

その結果、福岡県(東シナ海)の虫体 152 匹のうち、150 匹は *A. pegreffii* と同定され、1 匹が *A. simplex* s. str. と同定された(残り 1 匹については後述)。千葉県(太平洋)の虫体 76 匹は、67 匹が *A. simplex* s.

str., 9 匹が *A. pegreffii* と同定された。新潟県(日本海)の虫体 32 匹は、16 匹が *A. simplex* s. str., 16 匹が *A. pegreffii* と同定された(表 2, 図 1)。

なお、*A. pegreffii* と同定された虫体のうち 3 匹(福岡県の 1 匹と千葉県の 2 匹)、また *A. simplex* s. str. と同定された虫体のうち 3 匹(いずれも新潟県)は、rDNA・ITS 領域の解析では同胞種レベルでの分類ができない Hybrid Genotype であった。

また福岡県(東シナ海)の虫体 152 匹中の 1 匹は、rDNA・ITS 領域の PCR 産物を制限酵素処理したところ、*A. simplex* s. str. あるいは *A. pegreffii* とは全く異なる切断パターンを示した。PCR 産物の塩基配列を解読した結果、この虫体はインドネシア産の *A. typica* (国際塩基配列データベースのアクセッション番号：EU 346092) と同一の配列を持つことが分かった。この虫体の塩基配列を登録し、アクセッション番号：AB 432908 を取得した。*A. typica* は、わが国で水揚げされた魚からの検出記録はなく、今回が初めての報告となる。

## 考察

わが国では魚介類を寿司や刺身で日常的に生食する習慣があるため、アニサキス症の発症が非常に多い。九州でも患者は多く、そこで患者由来の虫体を用いて、同胞種レベルでの虫種同定を試みた。その結果、患者由来の虫体は、北海道での患者由来の虫体と同様に、主として *A. simplex* s. str. であることが明らかとなった<sup>3)</sup>。九州の人体アニサキス症例については、藤野ら<sup>7)</sup>や飯野ら<sup>8)</sup>によって発生状況などの調査が行われている。九州における本症の原因魚種は、サバ、イワシ、アジの 3 種が上位を占め、中でもサバを原因とする症例数が最も多いという。したがってわれわれが虫体を得た九州の人体症例<sup>3)</sup>も、その多くはサバが原因であると考えられた。

先にわれわれは、福岡県で水揚げされた日本海産のサバを対象に、アニサキス虫体の検出と同胞種レベルでの解析を行った<sup>2)</sup>。その結果、これらの虫体は専ら *A. pegreffii* で、九州ではサバ由来の優占種と患者由来の優占種が異なるという知見を得ていた。そこで今回は、日本海産のサバと同様に、九州の市場でよく流通する東シナ海産のサバを検索し、人へ

の感染源の特定も視野に入れ、人体症例の優占種である *A. simplex* s. str. の検出を試みた。しかしながら結果は前報<sup>2)</sup>と同じく、*A. simplex* s. str. はほとんど検出されず、*A. pegreffii* が専ら認められた。

今回、新潟県と千葉県で水揚げされたサバも対象として、検索を行った。その結果、新潟県の魚では、*A. simplex* s. str. の割合が検出虫体の半数を占め、千葉県の魚では、*A. simplex* s. str. の割合が9割近くに達した。すでに報告した北海道のサバでは、検出虫体の総てが *A. simplex* s. str. であった<sup>2)</sup>。したがって、サバを原因とする九州地域のアニサキス症は、地元産ではなく、他の地域から搬入された *A. simplex* s. str. 陽性のサバを原因とする可能性が示唆された。

実際に九州の市場では、他の地域に由来するサバを見ることも多い。そこで今後の課題として、他の地域から搬入されて九州で販売されるサバを対象に、由来地ごとに同胞種レベルでの寄生状況を検索したいと考えている。また、アニサキス症患者の間診により得られる感染源（原因魚種）に関する情報も、改めて収集し、解析したいと考えている。感染源の特定が進めば、その情報を活用することで、アニサキス症の発生予防に役立つ様な啓発活動が展開できるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Mattiucci, S. *et al.* (2006) : Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 : an update. *Parasite*, 13, 99-113.
- 2) Umehara, A. *et al.* (2006) : Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda : Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int.*, 55, 267-271.
- 3) Umehara, A. *et al.* (2007) : Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int.*, 56, 211-215.
- 4) D, Amelio, S. *et al.* (2000) : Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda : Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction - based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol.*, 30, 223-226.
- 5) Martin-Sanchez, J. *et al.* (2005) : Structure of *Anisakis simplex* s. l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s. s. Absence of reproductive isolation between both species. *Mol Biochem Parasitol.*, 141, 155-162.
- 6) Umehara, A. *et al.* (2008) : Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39 (Suppl 1), 26-31.
- 7) 藤野隆博, 他 (1984) : 福岡県下における急性胃アニサキス症 150 例の臨床, 疫学ならびに摘出虫体の形態. *寄生虫学雑誌*, 33, 73-92.
- 8) 飯野治彦, 他 (1992) : 九州のアニサキス症 1~8 次アンケート調査・まとめ (1962年3月~1990年6月). *Clinical Parasitology*, 3, 94-98.
- 9) 影井 昇, 他 (1999) : アニサキス症 (1) 生物学. *日本における寄生虫学の研究*, 7, 大鶴正満, 亀谷了, 林滋生監, 目黒寄生虫館, 東京, pp 409-437.