

## 喀痰から虫卵が検出され塩基配列から 種同定した宮崎肺吸虫症の1例

日本赤十字社和歌山医療センター 呼吸器内科部

田尻智子・堀川禎夫・西山秀樹

国立感染症研究所 寄生動物部

森嶋康之・川中正憲・山崎 浩・杉山 広

**Key Words** : 肺吸虫症, 宮崎肺吸虫, 虫種同定, 塩基配列

### 結 言

タイ人女性の喀痰から虫卵が検出され, 形態と塩基配列を精査して宮崎肺吸虫と同定した。胸部X線で結節影を認め, 喀痰に検出した虫卵を用いて, 塩基配列から宮崎肺吸虫が原因と同定された症例報告は少なく, 本例は貴重な症例と考えられた。

症例: 37歳, タイ人女性。

現病歴: 1991年(17年前)に来日し, 千葉県に10年間, 和歌山県に7年間在住している。この間に4回里帰りをしている。2007年11月下旬に胸痛を自覚し, 近医を経て, 精査加療目的で当院を紹介受診した。

生活歴: 喫煙歴(10本/日×25~28歳)。

既往歴: 高血圧。

現症: SpO<sub>2</sub> 98% (室内気), 咳嗽・喀痰なし, 呼吸音に異常なし。

検査: WBC 9,800/ $\mu$ l (Neut 68.7%, Eo 9.4%, Baso 0.1%, Lymph 16.3%, Mono 5.6%), CRP 1.39mg/dl, ALP 138 IU/l, AST 21 IU/l, ALT 17 IU/l, LD 176 IU/l,  $\gamma$ -GTP 66 IU/l, BUN 15mg/dl, Cr 0.5mg/dl, Na 140mEq/l, K 4.0mEq/l, Cl 105mEq/l, 非特異的IgE 8467.0 IU/ml

画像: (胸部X線) 右肺に不整な結節影を認め, 左肺に浸潤影を認めた(図1a)。

(胸部CT) 右肺に蛇行した構造を認め, 左肺に浸潤影を認めた(図1b)。

### A Case of Paragonimiasis miyazakii : Detection of Eggs in Sputum for Morphological and Molecular Identification

Tomoko Tajiri\*

Sadao Horikawa\*

Hideki Nishiyama\*

Yasuyuki Morishima\*\*

Masanori Kawanaka\*\*

Hiroshi Yamasaki\*\*

Hironu Sugiyama\*\*

\*Department of Respiratory Diseases, Wakayama Medical Center of Red Cross Society

\*\*Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

論文請求先: 田尻智子 〒640-8558 和歌山市小松原通四丁目20番地 日本赤十字社和歌山医療センター  
呼吸器内科部

Clinical Parasitology Vol. 19 No. 1 2008

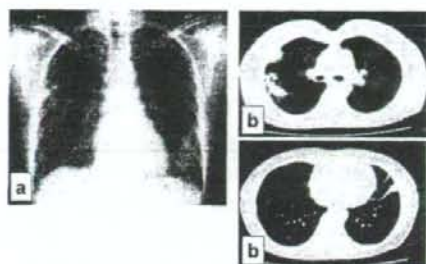


図1 胸部単純写真および胸部CT所見

- a. 右上肺の結節影, 左下肺の浸潤影  
b1. 右肺上葉の蛇行した構造, 左肺下葉の浸潤影

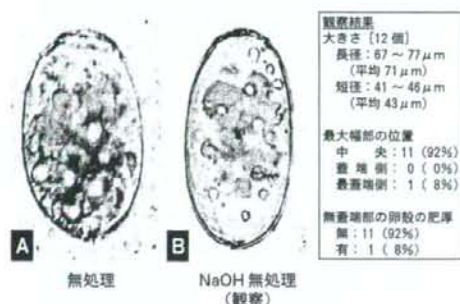


図2 喀痰中の虫卵の形態

経過: 血液検査および画像所見より肺吸虫症を疑い, 喀痰および糞便を検査した。喀痰から虫卵を検出し, 虫卵の形態から宮崎肺吸虫を疑ったが, 免疫血清学的検査では, 宮崎肺吸虫抗原およびウエステルマン肺吸虫抗原ともに抗体反応陽性を示した。プラジカンテル (75mg/kg/日 $\times$ 3日間) で治療を行い, 自覚所見ともに改善した。患者に食歴を尋ねると, 地元のタイ料理店や日本の自宅で, サワガニ入りパパイアの千切りサラダ (ソムナム・プー) を頻りに摂食していたことが判り, 不完全加熱のサワガニが感染源になったと考えられた。

#### 虫卵の形態学的特徴

原因虫種を推定するため, 喀痰中の虫卵 (12個) について計測・観察した (図2)。まず虫卵の大きさは, 長径が67~77 $\mu$ m (平均71 $\mu$ m), 短径は41~46 $\mu$ m (平均43 $\mu$ m) であった。次に最大幅



図3 制限酵素による切断パターンの解析 (PCR-RFLC)

S: 検索対象の肺吸虫; W: ウエステルマン肺吸虫 (2倍体型); M: 宮崎肺吸虫; 各DNAを用いて増幅されたPCR産物 (ITS2領域)

検索対象の肺吸虫に由来するPCR産物は, ウエステルマン肺吸虫の配列を認識する制限酵素 (*Bso*BI) では切断されず, 宮崎肺吸虫の配列を認識する制限酵素 (*Bss*SI) で切断され, しかもそのバンドパターンは宮崎肺吸虫のものと一致した。塩基配列解読の結果もこの結論を支持した。検索対象の肺吸虫を宮崎肺吸虫と同定。

部の位置は, 中央が11個 (92%), 蓋端側は0個 (0%), 無蓋端側は1個 (8%) であった。また無蓋端部における明かな卵殻の肥厚は, 「認めない」が11個 (92%), 「認める」が1個 (8%) であった。長径が長くなく, 最大幅部が概ね中央部にあるという特徴から, 本例の虫卵は宮崎肺吸虫ないし2倍体型ウエステルマン肺吸虫の可能性が高いと考えられた。免疫血清学的検査では種同定できず, 分子生物学的手法を用い, 検討を加えることにした。

#### 塩基配列の解読と比較検索

虫卵を用い, 既報<sup>1)</sup>に準じてDNA抽出とPCR, 制限酵素による切断パターンの解析, 塩基配列の解読・解析を行った。PCR産物の制限酵素による切断パターンは宮崎肺吸虫のパターンを示し (図3), 塩基配列解読の結果もこれに一致した。

#### 考察

宮崎肺吸虫は, ヒトの体内で成熟し排卵することはきわめて稀であると言われる<sup>2)</sup>。しかし, ヒトの

肺実質に虫嚢を形成し、喀痰や胸水から排卵を認める症例も報告されるようになってきた<sup>3)~6)</sup>。その機序として、複数の虫体が寄生し、長期間駆虫されない場合に、生じる病態であることが示唆されている。本例でも、頻回の摂食で複数のメタセルカリアが取り込まれ、長期間駆虫されなかったため、虫体が肺実質で成熟し、排卵を認めたものと考えられた。

また、本例は、胸部写真に関しても稀な所見を呈した。一般に、宮崎肺吸虫症では、胸膜所見が目立ち、胸部写真もそれを反映して胸水貯留や気胸を呈することが多く、肺内所見は少ないと言われる<sup>2)7)</sup>。本例は、胸膜所見が目立たず、肺野の結節・浸潤影といった肺内所見を発現し、宮崎肺吸虫症としては、非典型的な経過を辿った。

以上のような病態や胸部写真から、本例は当初、宮崎肺吸虫よりも3倍体型ウエステルマン肺吸虫を想起させるものであったが、虫卵を用いた分子生物学的検査を行うことで、宮崎肺吸虫と確定診断するに至った。本例の様に、非典型的な臨床経過を辿る肺吸虫症例もあるので、寄生虫材料を確保しての種同定は、原因を明かにするためにきわめて重要であると考えられた。

## 文 献

- 1) Sugiyama, H. *et al.* (2004) : A multiplex PCR for discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 35 (Suppl 1), 327-330.
- 2) 吉松哲之, 他 : 肺吸虫症. 感染症症候群II, pp488-489.
- 3) Okamoto, M. *et al.* (1993) : A case of severe paragonimiasis miyazakii with lung and skin lesions showing massive egg production in sputum and faeces. *Jpn J. parasitol*, 42, 429-433.
- 4) 今井純夫, 他 (1987) : 肺内に虫嚢を形成し、糞便、喀痰中に虫卵を証明した宮崎肺吸虫症の1例. *日内会誌*, 76, 1881-1882.
- 5) 千葉直彦, 他 (1976) : 宮崎肺吸虫症について—自験18例を中心に—. *内科*, 37, 479-486.
- 6) 森脇昭介, 他 (1976) : 喀痰細胞診で確診した宮崎肺吸虫. *日本臨床細胞学会雑誌*, 15, 28-31.
- 7) 日比谷一郎, 他 (1984) : 自然気胸、胸水貯留を伴った宮崎肺吸虫症の4例と本邦69報告例についての検討. *日胸*, 43, 289-293.

## 市販サワガニを対象とした肺吸虫メタセルカリアの寄生状況調査

国立感染症研究所 寄生動物部

杉山 広・梅原梓里・森嶋康之・川中正憲・山崎 浩

**Key Words**: サワガニ, ウェステルマン肺吸虫, 宮崎肺吸虫, 食習慣

### 緒言

わが国に長期間在住するアジア系外国人が、淡水産・汽水産のカニを食材とする出身地固有の料理を加熱せずに賞味し、肺吸虫に感染する事例が増加の傾向にある。飲食をともにした日本人の感染も報告されており、食習慣に起因する新たな肺吸虫症として、注意する必要が出てきた<sup>1)2)</sup>。これらの事例では、市販のサワガニが原因食材となった場合が多い。そこで、東京都内で販売されていたサワガニを対象に、肺吸虫の寄生状況を調べた。肺吸虫メタセルカリアが検出された場合は、形態を精査し、また塩基配列に基づく虫種同定を併せて試みた。

### サワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出状況

東京都のスーパーマーケットやデパートの鮮魚売り場、あるいは鮮魚店で、2004年4月～2008年2月の間に8回にわたり、合計266匹のサワガニを購入し、肺吸虫の寄生状況を調べた。その結果、44匹(17%)から肺吸虫メタセルカリアが検出された

(表1)。寄生率が最も高かったのは、2008年2月に購入した宮崎県産のサワガニで、その値は88%(検査した26匹中の23匹が陽性)を示し、1匹のカニから最高23個のメタセルカリアが検出された。

### 検出メタセルカリアの形態学的特徴

2007年4月に購入した宮崎県産のサワガニからは、直径(内囊の外径)が平均448ミクロンのメタセルカリアを検出した(14個を計測)。このうちの11個には、外囊の外側に膜様物の付着を認め、これらを宮崎肺吸虫と判定した。一方、2007年6月に購入した宮崎県産のサワガニからは、直径(内囊の外径)が平均352ミクロンのメタセルカリアを検出した(4個を計測)。このうちの3個には、口吸盤の背縁に穿刺棘を確認し、ウェステルマン肺吸虫と判定した。しかしながら、膜様物や穿刺棘が明かでないメタセルカリアに関しては、大きさだけで種を決定する訳にはいかず、分子同定を試みた。

## Survey of *Paragonimus Metacercariae* in Freshwater Crabs Sold at Markets in Tokyo

Hiromu Sugiyama Azusa Umehara Yasuyuki Morishima Masanori Kawanaka Hiroshi Yamasaki

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

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 東京都で販売されていたサワガニにおける肺吸虫メタセルカリアの寄生状況

購入時期	購入先	産地	検査数	陽性数	寄生率 (%)	検出数 計(範囲[平均]) <sup>a)</sup>	同定結果 <sup>b)</sup>
2004年4月	スーパーA	静岡	48	0	0	-	-
2007年4月	デパートA	宮崎	46	0	0	-	-
4月	スーパーA	宮崎	16	7	44	29(1-12[4.1])	Pm
4月	スーパーB	長崎	21	5	24	9(1-4[1.8])	Pm
6月	スーパーC	静岡	35	0	0	-	-
6月	個人商店	宮崎	44	5	11	9(1-3[1.8])	Pw(3n)
2008年1月	デパートB	宮崎	30	4	13	6(1-3[1.5])	Pm+Pw(2n)
2月	デパートB	宮崎	26	23	88	116(1-23[5.0])	Pm
合計			266	44	17	169(1-23[3.8])	

<sup>a)</sup> 検出されたメタセルカリアの合計数(陽性カニ1匹から検出されたメタセルカリア数の最小値と最大値および[被検カニ1匹から検出されたメタセルカリア数の平均値])

<sup>b)</sup> Pm: 宮崎肺吸虫; Pw(2n): ウェステルマン肺吸虫(2倍体型); Pw(3n): ウェステルマン肺吸虫(3倍体型)

## 分子同定

分子同定に当たり、PCR増幅の標的として、リボゾームDNA・ITS2領域とミトコンドリアDNA・16SリボゾームDNAの部分配列を選んだ。前者は宮崎肺吸虫とウェステルマン肺吸虫との鑑別に<sup>3)</sup>、後者はウェステルマン肺吸虫の2倍体型と3倍体型との判別に利用される配列である<sup>4)5)</sup>。メタセルカリアからのDNAの抽出、これをテンプレートとしたPCR増幅、制限酵素による切断とパターン解析(RFLP)などの一連の手技は、既報に準じた<sup>3)</sup>。制限酵素として、ITS2領域には*BssSI*(宮崎肺吸虫)と*SnaBI*(ウェステルマン肺吸虫)を、また16SリボゾームDNA配列には*SnaBI*(2倍体型)と*BsrDI*(3倍体型)を使用した。一部のPCR産物については、塩基配列を解読して、PCR-RFLPの結果を確認した。

同定の結果は表1に示すとおりで、宮崎肺吸虫と同定されたものが多かった。しかしながら、2007年6月に購入した宮崎県産のサワガニからは、ウェステルマン肺吸虫(3倍体型)が検出された。また、2008年1月に購入した宮崎県産のサワガニには、

ウェステルマン肺吸虫(2倍体型)だけが寄生するもの(1匹, 3個)と、宮崎肺吸虫だけが寄生するもの(3匹, 各1個ずつ)が混在していた。

## 考察

本邦産のサワガニからは、宮崎肺吸虫、ウェステルマン肺吸虫(2倍体型あるいは3倍体型)および大平肺吸虫(かつて佐渡肺吸虫とされたもの<sup>6)</sup>)が検出されており、前2種が人体寄生種として重要である<sup>7)</sup>。この中でも宮崎肺吸虫は、東北地方から長崎・宮崎両県を含めた九州に至る広範な地域において、サワガニからメタセルカリアが検出されている<sup>7)</sup>。市販サワガニ(名古屋市で販売)からも、すでに本虫メタセルカリアが検出されており<sup>8)</sup>、東京で購入したサワガニからの本虫検出は、ある程度予想されたものであった。

これに加えて今回は、ウェステルマン肺吸虫のメタセルカリアが検出された。サワガニからウェステルマン肺吸虫を検出したとの報告は少なく、宮崎県からは報告がなかった<sup>7)</sup>。さらに本虫の3倍体型がサワガニから検出された地区は、鹿児島県の北薩地方と屋久島に限定される<sup>9)10)</sup>。

ウェステルマン肺吸虫の両型(2倍体型・3倍体型)は、生物学的な性状が相互に異なり、感染時の病態にも差異を認めることがある<sup>11)</sup>。このため、両型の鑑別はきわめて重要で、鑑別に正確を期すためには、メタセルカリアについての検討だけではなく、これを終宿主動物へ感染させて成虫を回収する必要がある。そして得られた成虫に関して、染色体標本として染色体数と減数分裂像の有無を調べるか、染色封入標本として精子形成の有無を調べることで鑑別する<sup>12)</sup>。われわれも、市販サワガニからウェステルマン肺吸虫のメタセルカリアを改めて分離し、さらにこのような検討を進める予定にしている。

今回の調査で寄生率が最も高かったのは、2月(初旬)に購入したサワガニであった。カニの産地である宮崎県でもこの時期は大変寒く、野外でのサワガニ採集は容易でないと聞く。そこでサワガニを購入した鮮魚売り場に尋ねると、養殖サワガニなので冬期でも安定供給できたとの回答を得た。しかしながら実際は、肺吸虫メタセルカリアが多数検出されたので、販売されていたサワガニは、養殖により作出されたのではないと考えられた。恐らく夏に野外で採集し、飼育(いわゆる蓄養)しておいて、必要に応じて出荷されたのではないかと思われる。市販のサワガニは販売の時期を問わず肺吸虫寄生の危険性がある、との考えが妥当と思われる。

本調査とは別に、福岡のスーパーマーケットでもサワガニを購入し(2008年4月・宮崎県産)、肺吸虫寄生の有無を調べた。その結果、検査した30匹のうち、15匹から宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出された(寄生率:50%)。東京以外でも食材としてサワガニが販売され、しかも肺吸虫陽性のものが混在していると云う実態が示された。肺吸虫感染の原因食品としてサワガニへの対応が必要で、関係部局との検討を始めている。

本論文の要旨は、感染症・公衆衛生関係の専門家および地方自治体の医療保健行政担当者に対する啓発情報として、「病原微生物検出情報, 29, 284-285, 2008 (<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/344/kj3441.html>)」に連絡した。

## 文 献

- 1) 川中正憲, 他(2004): 在日外国人固有の食習慣に起因する肺吸虫症, 病原微生物検出情報, 25, 121-125.
- 2) 奥山さやか, 他(2007): 感染から発症まで長期を要し, 胸水からの虫卵検出で診断されたウェステルマン肺吸虫症の1例. *Clinical Parasitology*, 18, 35-37.
- 3) Sugiyama, H. *et al.* (2002): Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Mol Cell Probes*, 16: 231-236.
- 4) Agatsuma, T. *et al.* (2003): The origin of the triploid in *Paragonimus westermani* on the basis of variable regions in the mitochondrial DNA. *J Helminthol*, 77, 279-285.
- 5) Sato, H. *et al.* (2006): *Paragonimus westermani* and some rare intestinal trematodes recovered from raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) introduced recently on Yakushima Island, Japan. *J Vet Med Sci*, 68, 681-687.
- 6) Blair, D. *et al.* (2006): Molecular evidence for the synonymy of three species of *Paragonimus*, *P. ohirai* Miyazaki, 1939, *P. iloktsuenensis* Chen, 1940 and *P. sadoensis* Miyazaki *et al.* 1968. *J Helminthol*, 71, 305-310.
- 7) 西田 弘, 他(1999): 肺吸虫症の疫学, 日本における寄生虫学の研究7, 大鶴正淵, 亀谷 了, 林 滋生監, 目黒寄生虫館, 東京, pp 189-203.
- 8) 千種雄一, 他(1988): 名古屋市で販売されているサワガニの宮崎肺吸虫寄生状況. *公衆衛生*, 52, 69-71.
- 9) 波部重久, 他(1982): 屋久島産のモクズガニおよびサワガニから得たウェステルマン肺吸虫のタイプ. *寄生虫誌*, 31, 27-32.
- 10) 佐藤淳夫, 他(1982): 鹿児島県北薩地方産サワガニより得た肺吸虫. *寄生虫誌*, 32(増), 8.
- 11) 宮崎一郎(1982): 医学上重要なベルツ肺吸虫. *福大医紀*, 9, 221-232.
- 12) 宮崎一郎(1982): アジアにおけるウェステルマンおよびベルツ肺吸虫の分布. *福大医紀*, 9, 11-22.

## Paragonimiasis in India : a newly emerging food borne parasitic disease

Department of Microbiology, Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, 5th mile, Tadong, Gangtok, Sikkim, India  
T. Shantikumar Singh

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases  
Hiromu Sugiyama

**Key Words** : human paragonimiasis, northeast India, *Paragonimus heterotremus*, clinical diagnosis

### Introduction

Paragonimiasis is a food borne parasitic zoonosis caused by trematode species of the genus *Paragonimus*. The disease, primarily affects the lungs, but can involve other organs and tissues of the body. Humans acquire the infection by ingestion of raw or undercooked fresh water crabs and/ or crayfish containing metacercariae, the infective form of the parasite. Sometimes, infection can occur by ingestion of raw or undercooked meat of pig or wild boar which serve as paratenic hosts<sup>1)</sup>. The disease is widely distributed, mainly in Asia, but also in Africa and Americas. Although India is the first known region in Asia of the oldest lung flukes such as *P. compactus* (Cobbold, 1859) and *P. westermani* (Kerbert, 1878), very little attention has been paid to this important trematode because paragonimiasis was never considered a public health problem in India until 1982 when the first case of pulmonary paragonimiasis had been reported from Manipur<sup>2)</sup>. Subsequent studies revealed paragonimiasis was indeed an important emerging food borne parasitic zoonosis endemic in the northeast states of India.

### Distribution

The disease is endemic in Manipur<sup>3)</sup>, and Arunachal Pradesh<sup>4)</sup>. A case of pulmonary paragonimiasis was also reported from Maharashtra State in 1983<sup>5)</sup>. The prevalence rates in Manipur and Changlang District of Arunachal Pradesh were 6.7% (2% to 35.6%) and 52% (in children of < 15 yrs), respectively<sup>3) 6)</sup>. In March 27–29, 2008, an investigation conducted on paragonimiasis resulted in the discovery of 7 new cases and 38 old cases of paragonimiasis in Pfutsero town of Phek district and Kohima, Nagaland, respectively (unpublished data).

### The parasite and the hosts

The *Paragonimus* species described in India numbered five : *P. compactus* and *P. westermani* from wild mammals during 19th century and *P. heterotremus*, *P. skrjabini* and *P. hueit'ungensis* during 20th century<sup>7) 8) 9) 10) 11)</sup>. *P. heterotremus* is the common causative species of human paragonimiasis in Manipur<sup>12)</sup>, Arunachal Pradesh<sup>6)</sup> and Nagaland, whereas *P. skrjabini* was also found as a causative agent of human



paragonimiasis in Manipur. The role of *P. westermani* in human paragonimiasis in India is yet to be established. The natural mammalian hosts of *Paragonimus* species in India were leopards, tigers, civet cats, toddy cats, dogs and mongoose. Whereas the second intermediate hosts were the mountainous fresh water crabs, *Potamiscus manipurensis* and *Barytelphusa lugubris*, the first intermediate molluscan hosts are yet to be determined.

### Transmission of infection

Children between 5 to 15 years of age have higher incidences of infection, which is more common among boys. The major mode of infection was consumption of undercooked/smoked freshwater crabs. Although less common, ingestion of raw crab extract for cure of fever, jaundice and allergic conditions, as practiced traditionally by certain communities in the hills, could cause severe infections. Consumption of improperly cooked or smoked meat of pig and wild bore could be another mode of infection. The traditional practice of topical application of crushed crabs to cure skin lesions could possibly cause cutaneous paragonimiasis.

### Clinical manifestations

In Manipur, paragonimiasis patients have presented in 3 distinguishable clinical groups.

1. Pulmonary paragonimiasis
2. Extra pulmonary paragonimiasis
3. Pleuropulmonary paragonimiasis

The various clinical forms of 84 patients were analyzed, and the most clinical form was pulmonary paragonimiasis followed by pleural effusion.

#### 1. Pulmonary paragonimiasis (59.2%)

The major clinical features comprised chronic cough, chest pain, difficult breathing and expectoration of rusty brown or blood stained sputum and/or recurrent haemoptysis. Normal chest X-rays were seen in 15% even in symptomatic patients with or without detectable *Paragonimus* eggs in the sputum. The most common abnormal findings seen in the chest X rays were usually ill defined patchy consolidations (63%), 5 to 60 mm in size, pleural thickening or blunting of costophrenic angle, pleural effusion during the early stage of infections and later nodular densities 1 to 4 cm in diameter, cavities, pleural effusion usually bilateral and unilateral or encysted small ring shadows in 7%<sup>13)</sup>.

#### 2. Extra pulmonary paragonimiasis

a) Pleural effusion (17%) : Usually bilateral, commonly seen in children, presented with chest pain, breathlessness and cough as the main clinical manifestations.

b) Cutaneous paragonimiasis (16%) : Migratory subcutaneous nodules initially appeared on the chest wall or abdominal wall then migrated downwards through the abdominal wall to the genitalia and thigh. The nodules, usually, firm, nontender contained immature worm, rarely mature adult worms and eggs may be recovered.

c) Cardiovascular paragonimiasis (4.4%) : Clinically pericarditis associated with pulmonary paragonimiasis may be observed, especially in children. Congestive heart failure with pleuropulmonary paragonimiasis was seen in a 8-year-old boy.

d) Abdominal paragonimiasis (2.2%) : Abdominal paragonimiasis was seen in, with pain and distension in abdomen, diarrhoea and hepatosplenomegally as presenting symptoms.



e) Cerebral paragonimiasis : Paragonimiasis involving central nervous system although rare may present a serious form of the disease with high mortality rate. One patient presented with epileptic fits, headache and focal muscular paresis.

### 3. Pleuropulmonary paragonimiasis (2.2%)

Patients of pleuropulmonary paragonimiasis presented with mixed symptoms of pulmonary paragonimiasis and pleural effusion, the predominant clinical symptoms were mainly dyspnoea, pain and tightness in the chest and cough with or without blood stained sputa or haemoptysis.

#### Differential diagnosis

Almost all the cases of pulmonary paragonimiasis were initially diagnosed as smear negative pulmonary tuberculosis and patients were put under antitubercular drugs therapy for a period from 6 months to one and half years. The patients who did not respond to antitubercular therapy were investigated first for fungal disease or carcinoma and in few cases for paragonimiasis. In Manipur, pulmonary paragonimiasis were often misdiagnosed as pulmonary TB or bronchitis or bacterial pneumonia or bronchiectasis or lung cancer.

#### Laboratory Diagnosis

A definitive diagnosis of paragonimiasis was made by microscopy demonstration of *Paragonimus* eggs (85%) in the wet smear of clinical specimens. The presence of charcot leydon crystals (92%) and high eosinophils count (61%) in the peripheral blood were considered as strong indications of paragonimiasis in the absence of other causes of eosinophilia. The serological tests which were used for diagnosis in the absence of *Paragonimus* eggs were intradermal test, and recently dot ELISA.

#### Treatment

Two major antihelminthic drugs, praziquantel and bithionol, were available for the treatment of paragonimiasis. Praziquantel (Biltricide, Bayer), the drug of choice of paragonimiasis, is given in doses of 25 mg per kg body weight 3 times a day for three days. However, relapse occurred in about 2% of the cases. A 100% cure rate was obtained if the praziquantel therapy was extended up to 5 days. Bithionol (M/S Marcel Quarre), another drug, was available as an investigational drug for the treatment of paragonimiasis. This drug when given in doses of 40 mg per kg body weight in two equally divided doses on alternate days for a course of 10 to 15 doses was found as effective as praziquantel but about 50% of patients developed urticaria after 2 or 3 doses.

#### Discussion

Paragonimiasis has emerged as an important food borne parasitic disease in India, mainly in the northeast states. Most common mode of transmission has been the ingestion of inadequately cooked or smoked fresh water crabs and infrequently raw crab extract. The problem of paragonimiasis is likely to continue in India unless it is included in the curriculum of medical colleges and medical practitioners change their attitude in dismissing the disease as rare parasitic infection and temptation to diagnose such condition as smear negative pulmonary tuberculosis. Failure to recognize pulmonary paragonimiasis had resulted in the overdiagnosis of pulmonary tuberculosis and unwarranted antitubercular drug therapy. Since pulmonary paragonimiasis is clinically and radiologically indistinguishable from pulmonary TB, all patients presenting with pulmonary

symptoms should be investigated for paragonimiasis before concluding a case as smear negative pulmonary tuberculosis or multidrug-resistant TB. History of consumption of fresh water crabs, finding of Charcot leyden crystals even in the absence of *Paragonimus* eggs in the clinical specimens and peripheral blood eosinophilia are sufficient justifications for a provisional diagnosis of pulmonary paragonimiasis. Once diagnosed, paragonimiasis can be effectively treated with praziquantel. Recently, triclabendazole, administered at 10 mg/kg body weight as single dose therapy has been found to have efficacy, safety, and tolerability, comparable to praziquantel at recommended dose<sup>14</sup>.

## References

- 1) Miyazaki, I. *et al.* (1976) : Immature lung flukes in the wild boar in Japan. *J Parasitol.* 62, 826-837.
- 2) Singh, Y. I. *et al.* (1982) : Pulmonary paragonimiasis in Manipur. *Indian Journal of Chest Disease and Allied Sciences*, 24, 304-306.
- 3) Singh, T. S. *et al.* (1993) : Paragonimiasis in Manipur. *Indian J Med Res (A)*, 97, 247-252.
- 4) Narain, K. *et al.* (2003) : *Paragonimus* and paragonimiasis — A new focus in Arunachal Pradesh, India. *Current Science*, 84, 985-987.
- 5) Patil, S. D. *et al.* (1984) : Paragonimiasis of the lung. *Annals Trop Med Parasitol.* 78, 445-448.
- 6) Devi Rekha, K. *et al.* (2007) : Pleuropulmonary paragonimiasis due to *P. heterotremus* : molecular diagnosis, prevalence of infection and clinicoradiological features in an endemic area of northeastern India. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 101, 786-792.
- 7) Cobbold, T. S. (1859) : On some new forms of Entozoa. *Trans Linn Soc, London*, 22, 363-366.
- 8) Kerbert, C. (1878) : Zur Trematoden-Kenntniss. *Zool Anz.* 1, 271-273.
- 9) Singh, T. S. (2002) : Occurrence of the lung fluke *Paragonimus hueitongensis* in Manipur, India. *Chinese Med J (Taipei)*, 65, 426-429.
- 10) Singh, T. S. (2003) : Occurrence of the lung fluke *Paragonimus heterotremus* in Manipur, India. *Chinese Med Sci J.* 18, 20-25.
- 11) Singh, T. S. *et al.* (2006) : Possible discovery of Chinese lung fluke, *Paragonimus skrjabini* in Manipur, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37 (suppl 3), 53-56.
- 12) Singh, T. S. *et al.* (2007) : Morphological and molecular characterizations of *Paragonimus heterotremus*, the causative agent of human paragonimiasis in India. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*, 38 (suppl 1), 82-86.
- 13) Razaque, M. A. *et al.* (1991) : Recurrent haemoptysis : Think of paragonimiasis. *Trop Doc*, 21, 153-155.
- 14) Belizario, V. Y. *et al.* (2007) : Assessment of the efficacy, safety, and tolerability of praziquantel and triclabendazole in the treatment of paragonimiasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 38 (suppl 1), 97-105.

# 日本産 *Anisakis simplex* の同胞種レベルでの分類学的解析

梅原梓里<sup>1,2</sup>、川上 泰<sup>2</sup>、荒木 潤<sup>3</sup>、内田明彦<sup>2</sup>、杉山 広<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所寄生動物部、<sup>2</sup>麻布大学環境保健学部医動物教室、<sup>3</sup>目黒寄生虫館

## 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>, Hiromu Sugiyama<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup>Meguro Parasitological Museum

我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。そ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 (ITS領域) に認める塩基配列の相違から、3種類の同胞種、すなわち *A. pegreffii*、*A. simplex sensu stricto* (s. str.)、*A. simplex C* に分類することが提案されている (Mattiucci and Nascetti, 2006)。我々は日本近海に生息する魚類 (サバなど) から得た *A. simplex* について、この新しい分類を適用し、同胞種に関する解析を試みた。その結果、北日本では *A. simplex* s. str. が、また南日本では *A. pegreffii* が優占して分布することが分かった (Umehara et al., 2006)。一方、人体症例由来の虫体 (北海道と九州の85名から得た計100虫体) は、*A. pegreffii* を1虫体認めた以外、総て *A. simplex* s. str. であった (Umehara et al., 2007)。この結果は、特に南日本の症例が、今回検査しなかった魚種や地元産ではない魚介類を原因として発生する事を示唆した。また、本研究の過程で、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* の

両者の所見を併せ持つ個体 (Hybrid genotype; Martin-Sanchez et al., 2005) が検出された。ミトコンドリア *cox 1* 遺伝子の配列の相違からも *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* とが分類できる (Umehara et al., 2008) ので、この方法を Hybrid genotype に適用した。その結果、Hybrid genotype は、*A. simplex* s. str. タイプか、*A. pegreffii* タイプのいずれかに分類された。

Key words: *A. simplex*, *A. pegreffii*, sibling species

### 引用文献

Umehara, A. et al. 2008. Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 39 (Suppl.): in press.

連絡責任者: 杉山 広、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、E-mail: hsugi@nih.go.jp

Correspondence: H. Sugiyama, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640



# 病原微生物検出情報

月報

Infectious Agents Surveillance Report (IASR)

<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/index-j.html>

RSウイルス感染症の臨床像と治療 4, RS脳症 5, 急性呼吸器ウイルス感染症の検査診断法 7, RSウイルス感染症流行状況: 沖縄県 8, 呼吸器ウイルス検出状況: 山形県 9, 大阪市 11, 集団感染事例からのヒトメタニューモウイルスの検出: 福井県 12, ヒトコロナウイルス 229E 近縁ウイルスの分離と同定: 新潟県 13, 髄膜炎患者からのエンテロウイルス 71 型の分離: 大阪市 14, 食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリア検出 14, コレラ 2007年: WHO 15, BCG 接種後副反応: 台湾 16

Vol.29 No.10 (No.344)

2008年10月発行

国立感染症研究所  
厚生労働省健康局  
結核感染症課

事務局 感染研感染症情報センター  
〒162-8640 新宿区戸山1-23-1  
Tel 03(5285)1111 Fax 03(5285)1177  
E-mail iasr-c@nih.gov.jp

(禁、無断転載)

本誌に掲載された統計資料は、1)「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づく感染症発生動向調査によって報告された、患者発生および病原体検出に関するデータ、2) 感染症に関する前記以外のデータに由来する。データは次の諸機関の協力により提供された: 保健所, 地方衛生研究所, 厚生労働省食品安全部, 検疫所, 感染性肺炎研究会。

## <国内情報>

### 食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出

わが国に長期間在住するアジア系外国人が、淡水産・汽水産のカニを食材とした出身地固有の料理を加熱なして賞味し、肺吸虫に感染する事例が増加の傾向にある。飲食を共にした日本人の感染も報告されており、輸入食習慣に起因する新たな肺吸虫症が流行していることに、注意する必要がある<sup>1, 2)</sup>。これらの感染事例の中には、食用として販売されていたカニが原因となった場合があった。

そこで東京都内において、合計266匹の食用サワガニを購入し、肺吸虫の寄生状況を調べた。その結果、44匹(17%)から肺吸虫のメタセルカリア(人や動物への感染能力を持つ被囊した幼虫)が検出された(次ページ表1)。寄生率が最も高かったのは、2008年2月に購入した宮崎県産のサワガニで、その値は88%に達し(検査した26匹中の23匹が陽性)、1匹のカニから最高23個のメタセルカリアが検出された。

検出されたメタセルカリアについては、形態を精査

表 1. 東京都内において食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出状況

購入時期	産地	検査数	陽性数(%)	検出 メタセルカリア数	同定結果*
2004.4.	静岡	48	0(0)	0	-
2007.4.	宮崎	46	0(0)	0	-
2007.4.	宮崎	16	7(44)	29	Pm
2007.4.	長崎	21	5(24)	9	Pm
2007.6.	静岡	35	0(0)	0	-
2007.6.	宮崎	44	5(11)	9	Pw(3n)
2008.1.	宮崎	30	4(13)	6	Pm+Pw(2n)
2008.2.	宮崎	26	23(88)	116	Pm
合計		266	44(17)	169	

\* Pm: 宮崎肺吸虫; Pw(2n): ウェステルマン肺吸虫 (2倍体型);  
Pw(3n): ウェステルマン肺吸虫 (3倍体型)

し、また塩基配列に基づく虫種同定を試みた<sup>3,4)</sup>。その結果、多くが宮崎肺吸虫と同定された。また、ウェステルマン肺吸虫 (2倍体型あるいは3倍体型) が検出されたサワガニも認めた (表1)。これらの肺吸虫はいずれも人体寄生種で、感染により胸痛や呼吸困難をはじめとして、種々の呼吸器症状が発現する。

福岡市内でも食用サワガニ30匹を購入し (2008年4月・宮崎県産)、肺吸虫寄生の有無を調べた。その結果、15匹から宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出された。東京以外でも食用としてサワガニが販売され、しかも肺吸虫陽性のカニが混在する実態が認められた。

市販サワガニは肺吸虫感染の原因食品として危険であり、喫食するのであれば十分な加熱が必要であることを、徹底して啓発する必要がある。

#### 文 献

- 1) 川中正憲, 他, IASR 25: 121-122, 2004
- 2) 奥山さやか, 他, Clin Parasitol 18: 35-37, 2007
- 3) Sugiyama H, *et al.*, Mol Cell Probes 16: 231-236, 2002
- 4) Agatsuma T, *et al.*, J Helminthol 77: 279-285, 2003

国立感染症研究所寄生物部

杉山 広 梅原梓里 森嶋康之

川中正憲 山崎 浩

## 10 レプトスピラ

### 【病原体の特性, BSL】

*Leptospira* は BSL-2、感染症法第四類、家畜伝染病予防法の監視伝染病に指定されている。スピロヘータの一種で、細長いらせん状を呈し両端はフック状に湾曲している（図 1）。1914 年福田龍吉らにより黄疸出血性レプトスピラ病（ワイル病）患者から初めて分離された。Korthof 培地、EMJH 培地等を用いて、好氣的条件下 28~30℃、1~2 週間で増殖する。

げっ歯類をはじめ 120 種を超える多種、多様な動物から分離され、ヒトは終末宿主である。ネズミは長期間にわたりレプトスピラを腎臓に保有し、尿中に細菌を排出し、ヒトや動物は汚染された水、土壌を介して経皮、または経口感染する。高温多雨な地域に地球規模で蔓延し、時に大規模な発生がみられる。日本では古来より秋疫、用水病、七日熱等の秋季レプトスピラ病として知られていた。遺伝学的分類により *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* 等 13 遺伝種に、さらに血清型 (serovar) 分類により 250 余りに分類される。

### 【実験室のハザード及び予想されるリスク】

実験者は、培養液や感染動物の尿中に排出されるレプトスピラに経皮、経粘膜、あるいは経口的に感染する可能性がある。口によるピペット操作は厳禁である。特に、動物接種時の針刺し事故や注射針の装着不備により菌体が飛び散り、眼や皮膚の微細な傷から感染する可能性がある。また、レプトスピラは健康な皮膚からでも侵入するといわれている。患者尿中にレプトスピラが排出されるが、日常的な接触ではヒトからヒトへの感染はまず考えられない。動物では個体間で尿を介した感染が起こる。

血清型 *Icterohaemorrhagiae* と *Copenhageni*

では黄疸出血性レプトスピラ症（ワイル病）、血清型 *Autumnalis*（秋疫 A 型）、*Hebdomadis*（秋疫 B 型）、血清型 *Australis*（秋疫 C 型）では秋季レプトスピラ症（秋やみ）を引き起こす。ワイル病は 3~14 日の潜伏期の後に発病する。

- ・第 1 期（発熱期）： 突然の悪寒を伴う 39~40℃ に及ぶ発熱と頭痛、腰痛、全身倦怠感、結膜の充血、腓腹筋痛が起こる。結膜の充血は最も特徴的であり、第 2~3 病日には顕著となる。
- ・第 2 期（発黄期、黄疸期）： 解熱傾向を示すが、黄疸は最高潮に達し、出血傾向が現れる。皮膚の点状出血、歯茎や口蓋の口腔内出血、鼻血、吐血、血便、眼球結膜の出血、咯血、血尿、頭痛、不眠、重症例では意識障害がみられる。
- ・第 3 期（回復期）： 衰弱と激しい貧血がみられる。

秋季レプトスピラ症は一般に軽症とされるが、重症のものはワイル病と区別できない。治療には、日本ではストレプトマイシンを 1 日 1~2 g ずつ、2~4 日間筋注が推奨されている。

### 【予防法—消毒・滅菌法—】

日本ではヒトにはワイル病秋やみ混合ワクチン (*Autumnalis*, *Hebdomadis*, *Australis*, *Copenhageni* の不活化 4 価ワクチン) が、イヌには *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* の不活化ワクチンが使用される。通常の滅菌操作のみならず、乾燥すれば死滅する。逆性石けんや消毒用アルコール等、多くの消毒液に感受性である。しかしながら、中性から弱アルカリ性の湿った土壌や地表水中では数週間から数ヶ月生存できる。 [増澤俊幸]



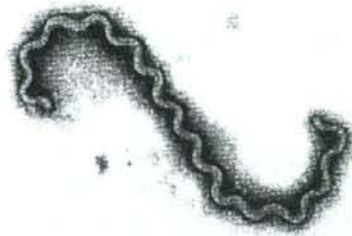


図1 レプトスピラ *Leptospira interrogans* の透過型電子顕微鏡像  
微細ならせん状を呈し、両端はフック状に曲がる。  
Interrogans の種名は“?” (インテロゲーションマーク) に由来する。

●文献

- 1) World Health Organization (WHO), International Leptospirosis Society (ILS) : Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. 以下の URL から pdf 版入手可,  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf)
- 2) レプトスピラ研究班 WHO ガイダンス翻訳チーム: ヒトのレプトスピラ症の診断, サーベイランスとその制御に関する手引き (上記の日本語訳).  
<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsb/h17update/lepto.html>
- 3) Levet P N: *Clin Microbiol Rev* **14**: 296-326, 2001.
- 4) Faine S 著, 吉井善作訳: レプトスピラ症病疫指針, 内田老鶴園, 1987.

Original Article

Investigation of Reservoir Animals of *Leptospira* in the Northern Part of Miyazaki Prefecture

Nobuo Koizumi\*, Maki Muto, Seigo Yamamoto<sup>1</sup>, Yoshitaka Baba<sup>2</sup>, Momotoshi Kudo<sup>2</sup>, Yoshinobu Tamae<sup>3</sup>, Koji Shimomura<sup>4</sup>, Ichiro Takatori<sup>1</sup>, Akira Iwakiri<sup>1</sup>, Koji Ishikawa<sup>5</sup>, Hirotoishi Soma<sup>1</sup> and Haruo Watanabe

Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640:

<sup>1</sup>Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Miyazaki 889-2155;

<sup>2</sup>Nobeoka Public Health Center, Miyazaki 882-0803; <sup>3</sup>Takachiho Public Health Center,

Miyazaki 882-1101; <sup>4</sup>Hyuga Public Health Center, Miyazaki 883-0041; and

<sup>5</sup>Department of Public Welfare and Health, Miyazaki Prefecture, Miyazaki 880-8501, Japan

(Received August 8, 2008. Accepted September 29, 2008)

**SUMMARY:** We surveyed reservoir animals of leptospires in the northern part of Miyazaki Prefecture, where a cluster of human leptospirosis had occurred during the summer of 2006. *Leptospira* was isolated from 6 of 57 large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*). The serogroups of the isolates were Autumnalis (5 strains) and Hebdomadis (1 strain) and the partial nucleotide sequences of their *flaB* genes suggested that the isolates belonged to *L. interrogans*. The human patient sera reacted specifically with the *Leptospira* strain isolated from the mice captured around the area where each patient occurred, suggesting that mice are the source of human infection. We also detected leptospiral DNAs by *flaB*-polymerase chain reaction in the kidneys of large feral animals; wild boars (positive ratio 10.3%; 4 of 39) and deer (19.2%; 10 of 52). The *Leptospira* spp. harbored by these animals were deduced to be *L. interrogans* (in 5 animals) and *L. borgpetersenii* (in 9 animals) by the nucleotide sequences of the amplicons. Anti-*Leptospira* antibodies were also detected among symptomatic hound dogs. These results suggest that these feral animals may cause leptospirosis and pose a potential risk to hunters and workers in the meat processing industry.

INTRODUCTION

Leptospirosis, which is caused by infection with pathogenic *Leptospira*, is a globally important zoonotic disease that affects humans in both rural and urban settings, and in both industrialized and developing countries (1-3). In particular, leptospirosis has become an important public health problem in Asia and Latin America. In these tropical areas, large outbreaks of leptospirosis are most likely to occur after floods, hurricanes, or other disasters, which affect both rural and urban areas (4-7). In Japan, although the number of the leptospirosis patients has decreased, sporadic cases of leptospirosis still occur in various areas, especially in Okinawa Prefecture, the southernmost part of Japan. Outbreaks of leptospirosis were also reported in Okinawa Prefecture (8,9).

Leptospires infect the proximal renal tubules of various mammals and are excreted in the urine of carrier animals. Any mammal can be a carrier and excretor of leptospires (10). Important leptospirosis reservoir animals in human transmission are rats and mice living near human habitats, domestic animals such as cattle and swine, companion animals, especially dogs, and wild animals, especially rodents. Leptospirosis in humans is caused by infection with leptospires after direct contact with infected animals or exposure to water or soil contaminated by the urine of infected animals (10).

In August and September of 2006, a cluster of human

leptospirosis occurred in Miyazaki Prefecture. Eight cases of human leptospirosis were reported; seven of these 8 cases occurred in the northern part of the prefecture during the period (see Fig. 1), whereas only 2 cases had been reported in the prefecture from November 2003 to July 2006. In this study, in order to identify the reservoir animals of leptospires in the northern part of Miyazaki Prefecture, we carried out the isolation of leptospires and the detection of leptospiral DNAs from the kidneys of feral animals captured in these areas.

MATERIALS AND METHODS

**Isolation of leptospires from mice:** Mice were captured by using live traps in November and December 2006. For the isolation of leptospires, the kidneys of the mice were inoculated into liquid modified Korthof's medium with 10% rabbit serum and cultivated at 30°C (10).

**Polymerase chain reaction (PCR):** DNAs were extracted from the *Leptospira* isolates and the kidney tissues of wild boars, deer, and a raccoon dog, respectively, by using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The extracted DNAs were subjected to PCR (isolates' DNA) or nested PCR (kidneys' DNA) for the detection of *Leptospira flaB* gene (*flaB*-PCR). The conditions of PCR were as follows: the 1st PCR was performed using the primers described previously (11). After an initial 25 s denaturation step at 94°C, the reaction mixture was subjected to 25 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 50°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min. The 2nd PCR was done by using the sense primer L-flaB-F1 (5'-TGTGCAACAAGACAGTGAAGAG-3') and the antisense primer L-flaB-R2 (5'-AACATTGCCGTACCACTC

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81-3-7338-1111 ext. 2224, Fax: +81-3-5285-1163, E-mail: nkoizumi@nih.go.jp



TG-3'). The mixture was subjected to an initial denaturation step at 94°C for 25 s, then 30 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 50 s. Sequencing of the amplicons was performed by the dideoxynucleotide chain termination method using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). The *flaB* sequences were aligned in MEGA4 (12) using CLUSTALW, and phylogenetic distances were calculated in MEGA4 using the neighbor-joining method.

**Microscopic agglutination test (MAT):** Serogroups of the isolates were identified by MAT using a panel of anti-*Leptospira* rabbit sera for serovars of Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, and Icterohaemorrhagiae (10). The MAT for the detection of anti-*Leptospira* antibodies in canine serum samples was performed using a battery of reference strains of serovars Australis (Akiyami C), Autumnalis (Akiyami A), Bataviae (Van Tienen), Canicola (Hond Utrecht IV), Castellonis (Castellon 3), Copenhageni (Shibaura), Grippotyphosa (Moskva V), Hebdomadis (Akiyami B), Icterohaemorrhagiae (Ictero No. 1), Javanica (Veldrat Batavia 46), Kremastos (Kremastos), Poi (Poi), Pomona (Pomona), Pyrogenes (Salinem), and Rachmati (Rachmat). These reference strains were cultivated under the conditions described above.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, in order to identify reservoir animals of leptospires in the northern part of Miyazaki Prefecture, where a cluster of human leptospirosis had occurred during the summer of 2006, we carried out the isolation of leptospires and detection of leptospiral DNAs from the kidneys of feral animals captured in these areas.

Leptospirosis in humans is transmitted by direct contact with infected animals or by exposure to water or soil contaminated by the urine of infected animals (10). Rats and mice are the most important animal reservoirs of leptospirosis for human transmission. We captured 57 large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*, throughout 4 districts in the northern part of Miyazaki Prefecture, where the human infection occurred in 2006 (Fig. 1, Table 1). Leptospires were isolated from 6 mice; 1 in Nobeoka and 5 in Takachiho (Table 1). Five mice from which leptospires were isolated in Takachiho were captured in the field where the patient used to work. Serogroups of the isolates were identified as Autumnalis (5 strains in Takachiho) and Hebdomadis (1 strain in Nobeoka) by reactivity with the reference antisera (data not shown). The *Leptospira* spp. of all the isolates were deduced to be *L. interrogans* by a comparison of the partial nucleotide sequences of their *flaB* genes with those of the reference strains (Fig. 2). The restriction patterns of the genomes of the isolates by the restriction enzyme *NotI* on pulsed-field gel electrophoresis (13) were different between the strains isolated in Nobeoka and Takachiho, but identical among the Takachiho strains (data not shown). The patient sera reacted specifically with the isolates; the serum of patient No. 5 reacted with the strain TM-3 isolated from a mouse captured in the field where the patient used to work, and sera from patients No. 1 and No. 3 reacted with the strain NM-9 (data not shown). All of the patients in 2006 were thought to have contracted leptospirosis through agricultural work (our unpublished data). Leptospirosis has been considered to be an occupational disease associated with activities involved in rice agriculture and other



Fig. 1. Map of Miyazaki Prefecture where human leptospirosis occurred in the summer of 2006. Filled circles indicate the place where the patients were infected.

Table 1. Results of isolation of *Leptospira* spp. from large Japanese field mice *Apodemus speciosus* captured in the northern part of Miyazaki Prefecture

Place	No. of mice captured	No. of mice <i>Leptospira</i> isolated (%)	Strain ID <sup>1)</sup>
Nobeoka	16	1 (6)	NM-9
Hinokago	6	0 (0)	
Takachiho	9	5 (56)	TM-1, 2, 3, 7, 8
Kadogawa	26	0 (0)	
Total	57	6 (11)	

<sup>1)</sup> Strains' name of the isolates.

forms of agriculture in Japan. These results, thus, suggest that mice are the source of human infection in these areas.

We detected leptospiral DNAs by *flaB*-PCR in the kidney tissues of large feral animals (Table 2). The *flaB* was detected in wild boars (positive ratio 10.3%; 4 of 39) and deer (19.2%; 10 of 52). The *Leptospira* spp. harbored by these animals were deduced to be *L. interrogans* (in 5 animals) and *L. borgpetersenii* (in 9 animals) by the nucleotide sequences of the amplicons (Fig. 2). Some of the patients said that they had seen wild boars in their fields (our unpublished data), suggesting that wild boars are also an important reservoir in these areas. The importance of wild boars in human transmission has also been suggested in Germany (14). In Japan, *L. borgpetersenii* has been isolated from rodents in Okinawa and Amami so far (15). Thus, this study demonstrated for the first time that *L. borgpetersenii* exist in Kyushu. For the accurate diagnosis of leptospirosis in Kyushu, it is necessary to isolate and characterize *L. borgpetersenii* harbored by these wild animals.

High titers of anti-*Leptospira* antibodies were detected by the MAT among 6 of 8 hound dogs suspected of leptospiral infection at a veterinary clinic located in Nobeoka, indicating the occurrence of acute infection not only in humans but also in dogs in this region. Outdoor dogs such as hounds and herding dogs have been identified as at-risk groups for clinical leptospirosis (16). Reactive leptospiral serogroups included Australis (1 animal), Castellonis (2 animals), and Hebdomadis (4 animals). One of the dogs showed equal reactivity against both Castellonis and Hebdomadis. The fact that large feral animals harbor leptospires and that hound dogs are infected with leptospirosis suggests that these reservoir animals may



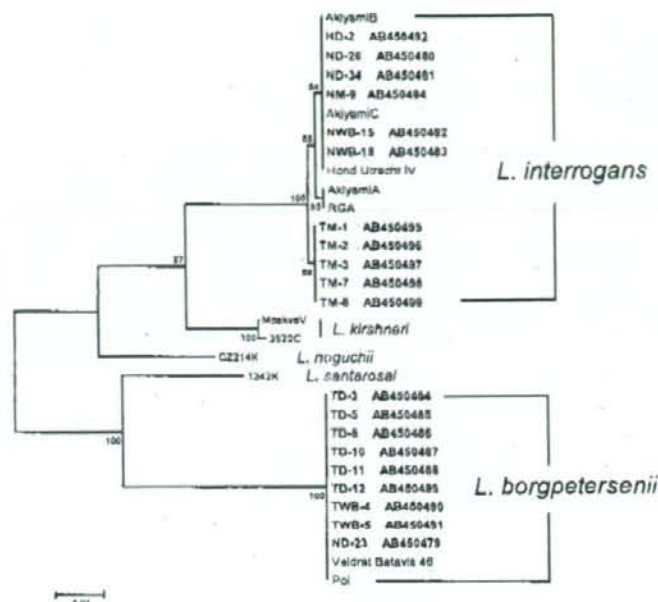


Fig. 2. Phylogenetic tree based on the *Leptospira flab* gene sequence. The sequences obtained in this study were indicated in bold type and have been deposited in DDBJ/GenBank/EMBL with accession number indicated.

Table 2. Results of *flab*-PCR on DNAs extracted from large feral animals captured in the northern part of Miyazaki Prefecture

Animal	Place	No. of animals captured	No. of animals PCR positive (%)	Seq ID <sup>1)</sup>
Wild boar	Noboka	22	2 (9.1)	NWB-15, 18
	Takachiho	14	2 (14.3)	TWB-4, 5
	Hyuga	3	0 (0)	
	Total	39	4 (10.3)	
Deer	Noboka	36	3 (8.3)	ND-23, 26, 34
	Takachiho	14	6 (42.9)	TD-3, 5, 8, 10, 11, 12
	Hyuga	2	1 (50)	HD-2
	Total	52	10 (19.2)	
Raccoon dog	Noboka	1	0 (0)	

<sup>1)</sup> IDs of PCR positive animals.

cause canine leptospirosis. As vaccines of leptospirosis for dogs are available, it is important to vaccinate dogs for the prevention of leptospirosis. These findings also indicate a potential risk of leptospirosis for hunters and people who are engaged in the processing of deer meat, although there has been no report of human leptospirosis among these people in Japan to date. In this study, acute canine leptospirosis infection was revealed. Dogs are known to become carriers of leptospirae after recovery from acute infection (10). Thus, it is important to investigate whether dogs carry leptospirae in their kidneys.

In conclusion, many feral animals were identified as reservoir animals in the northern part of Miyazaki Prefecture. With regard to the occurrence of leptospirosis, much attention should be paid not only to agricultural workers but also to hunters, workers in meat processing, and hound dogs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Noboka Public Health Center, Takachiho Public Health Center, Hyuga Public Health Center, and Miyazaki-ken Ryooyukai for capturing mice and providing kidney tissues of wild boars, deer and a raccoon dog, respectively. We also thank T. Masuzawa for the design of primers of the nested PCR and T. Suzuki, R. Takahashi, H. Sato, K. Nakajima, and Y. Shioyama for epidemiological data of human leptospirosis.

This work was supported in part by a Health Sciences Research Grant-in-Aid for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (1118-Shinkou-Ippan-008) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

#### REFERENCES

- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 296-326.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., et al. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.*, 3, 757-771.
- McBride, A.J.L., Adnanaz, D.A., Rees, M.G., et al. (2005). Leptospiro-

- sis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 18, 376-386.
4. Ko, A.I., Reis, M.G., Dourado, C.M., et al. (1999): Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*, 354, 820-825.
  5. Trevejo, R.T., Rigau-Pérez, J.G., Ashford, D.A., et al. (1998): Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J. Infect. Dis.*, 178, 1457-1463.
  6. Sanders, E.J., Rigau-Pérez, J.G., Smith, H.L., et al. (1999): Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 399-404.
  7. Maskey, M., Shastrri, J.S., Saraswathi, K., et al. (2006): Leptospirosis in Mumbai: post-deluge outbreak 2005. *Indian J. Med. Microbiol.*, 24, 337-338.
  8. Nariia, M., Fujitani, S., Haack, D.A., et al. (2005): Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yucama Islands, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73, 652-656.
  9. Nakamura, M., Taira, K., Itokazu, K., et al. (2006): Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the northern part of Okinawa Main Island. *J. Vet. Med. Sci.*, 68, 83-85.
  10. Faine, S., Adlor, B., Bolin, C., et al. (1999): *Leptospira* and *Leptospiro-*
  11. Kawabata, H., Danco, L.A., Villanueva, S.Y., et al. (2001): *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol. Immunol.*, 45, 491-496.
  12. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., et al. (2007): MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.
  13. Koizumi, N., Kawabata, H. and Watanabe, H. (2003): Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. *Microbiol. Immunol.*, 47, 305-306.
  14. Jansen, A., Luge, E., Guerra, B., et al. (2007): Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 739-742.
  15. Kawabata, H., Sakakibara, S., Imai, Y., et al. (2006): First record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami Islands, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 50, 429-434.
  16. Ward, M.P., Glickman, L.T. and Gupta, L.F. (2002): Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220, 53-58.

## Epidemiological Study on BSE Outbreak in Japan

Yasuhiro YOSHIKAWA<sup>1)</sup><sup>1)</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

(Received 15 January 2008)

**ABSTRACT.** The aim of this study is to identify, as hypotheses, all feasible sources and routes of infection for the BSE cases in Japan, and to study the probability of each hypothesis. The strategy of this epidemiological study is as follows. 1) BSE risk status in Japan is tentatively divided into 3 stages, i.e., before 1996 April when administrative guidance for feed ban of cattle MBM introduced. After that to 2001 September, the first case of BSE in Japan, then, after 2001 October with real feed ban in the law. 2) Make hypotheses depending on the invasive risk scenarios and propagation risk of BSE in Japan, and they are checked by evidences, case control study or statistics. 3) Grouping of BSE cattle was conducted time sequentially and spatially; that is Group-A (1995-96, born in Hokkaido, Kanto), Group-B (1999 in Kyushu), Group-C (1999-2001 in Hokkaido), Group-D (young cattle born after real feed ban) and Pre-A, Post-D groups. As a result, a milk replacer was considered one of the most probable cause of group-A contamination, and group-C outbreak might be caused by an indigenous BSE propagation of group-A in Hokkaido. If the hypothesis of Holland animal fat as causative material was accepted, however, there are several unexplainable points. Collection of scientific evidences on animal fat impurity and age dependent susceptibility to BSE will be needed to clarify the true causative material.

**KEY WORDS:** BSE, counter measures, epidemiology, risk scenario, vCJD.

*J. Vet. Med. Sci.* 70(4): 325-336, 2008

## 1 GENERAL ASPECT OF ANIMAL HUSBANDRY IN JAPAN

The total number of cattle reared in Japan is about 4.4 million and they are consisted of dairy cow, beef cattle, and hybrid cattle. Among them, as for a breeding purpose, 2.7 million heads are beef cattle and 1.7 million are dairy cow. Distribution of these cattle species is different in areas, i.e., in the north island (in Hokkaido), one-third of cattle in Japan are reared, and two-third of them is dairy cow. Actually, 860,000 heads are dairy cow and 450,000 heads are beef cattle in Hokkaido. On the contrary, in the south island (Kyushu), about one-third of cattle in Japan are fed, and 87% are beef cattle and only 13% are dairy cow. Thus, in Kyushu 158,000 heads are dairy cow and 1,089,000 heads are beef cattle (data on 2005). The number of dairy cow in Japan was decreased by 400,000 but that of beef cattle was increased by 100,000 over the recent decade. Besides in Hokkaido, the rate of beef cattle is higher than that of dairy cow (in Tohoku, Kanto, Chubu, Kansai, Chugoku-Shikoku and Kyushu).

The sum of new born cattle in Japan is about 1.5 million and they are 600,000-700,000 Holstein species, 300,000-400,000 hybrid cattle, and 500,000 Japanese black cattle. Every year, 15,000-25,000 heads are imported from foreign countries, mainly from Australia.

The total number of slaughtered cattle is 1.2-1.3 million per year, and the fallen stocks (> 24 months of age) in farm are about 90,000-100,000 head of cattle per year. The male Holstein species is slaughtered around 20 months of age,

and female one is mainly slaughtered at 3-9 years old after several deliveries. The hybrid cattle of both sexes are slaughtered around 25 months of age and Japanese black cattle of both sexes are slaughtered 27-32 months of age.

The survival curve of the dairy cow in Japan is estimated as follows. About 330,000 dairy cows are born every year and dead by 35,000 heads within one year. From 2 to 8 years of age, about 15,000-35,000 heads are slaughtered, and in the farm 9,000-12,000 heads are died from 2 to 7 years of age in every year. Therefore, the number of the survival dairy cow at 4.5 years old is about 200,000 heads, and 100,000 heads at 7 years old, 10,000 heads at 11.5 years old, and about 500 heads at 15 years old, respectively.

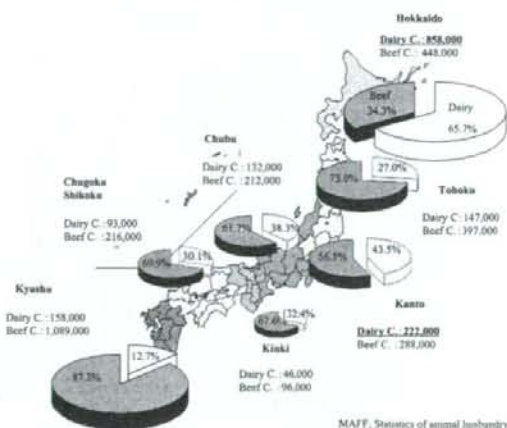


Fig. 1. General aspects of animal husbandry in Japan.

\* CORRESPONDENCE TO: YOSHIKAWA Y., Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.  
e-mail: ayoshi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp