

肺吸虫症の診断法の改良および
ウエステルマン肺吸虫伝播における
イノシシ猟犬の関与

山口大学大学院連合獣医学研究科

入江 隆夫

2018年3月

目次

略語一覧	i
表一覧	ii
図一覧	iii
概要	1
緒言	3
第1章 MGL法による肺吸虫卵検査法の検討	
背景および目的	6
材料および方法	8
結果	17
考察	25
第2章 イノシシ猟犬を指標としたウエステルマン肺吸虫症疫学調査の予備的研究	
背景および目的	28
材料および方法	29
結果	34
考察	39
第3章 ウエステルマン肺吸虫検出地域におけるサワガニ、イノシシにおける調査	
背景および目的	43
材料および方法	44
結果	47
考察	50

第4章 イヌ肺吸虫症に対するプラジカンテル投与量の検討	
背景および目的	54
材料および方法	54
結果	55
考察	55
第5章 血清学的手法による感染肺吸虫種の推定法の検討	
背景および目的	57
材料および方法	58
結果	60
考察	64
第6章 近畿・中国・四国地方におけるイノシシ猟犬の肺吸虫感染状況調査	
背景および目的	66
材料および方法	66
結果	70
考察	77
総括	81
謝辞	85
参考文献	86

略語一覧

AMS III 法: army medical school III method

ANOVA: analysis of variance

BLAST: basic local alignment search tool

BSA : bovine serum albumin ウシ血清アルブミン

COI: cytochrome *c* oxidase subunit 1

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay 酵素標識免疫吸着測定法

EPG: eggs per gram of feces 糞便 1 g あたりの虫卵数

FEA 法: formalin-ethyl acetate sedimentation method

ITS2: second internal transcribed spacer

MGL 法: medical general laboratory method (別称: ホルマリンエーテル法)

OD 値: optical density 吸光度

PBS: phosphate buffered saline リン酸緩衝化食塩水

PBST: 0.05% Tween 20 加 PBS

PCR: polymerase chain reaction ポリメラーゼ連鎖反応

SDS: sodium dodecyl sulphate

SS 法: simple sedimentation method 簡易沈殿法

表一覧

第1章

表1	本研究に使用した各種肺吸虫の由来およびイヌへの感染方法	10
表2	宮崎肺吸虫および大平肺吸虫実験感染犬糞便における MGL 法および簡易沈殿法 (SS 法) による虫卵陽性検体数および EPG の中央値	21
表3	MGL 法および簡易沈殿法 (SS 法) により得られた EPG の比率	22
表4	4種肺吸虫卵における MGL 法最終遠心後の上層および沈渣それぞれから検出された虫卵数の中央値、および上層から検出された虫卵の割合	23

第2章

表5	宮崎市周辺の主な狩猟地点と、各地点での猟犬のウエステルマン肺吸虫抗原に対する抗体陽性率、および虫卵 DNA の解析により同定された感染肺吸虫種	37
表6	猟犬のイノシシ肉生食経験とウエステルマン肺吸虫に対する抗体保有状況	38

第6章

表7	ウエステルマン肺吸虫感染犬の検出地域 (Pw^+ 地域) および非検出地域 (Pw^- 地域) における抗体保有に関連する猟犬の背景および飼育状況に関する質的変数ごとの関連性	75
表8	ウエステルマン肺吸虫感染犬の検出地域 (Pw^+ 地域) および非検出地域 (Pw^- 地域) における抗体陽性犬および陰性犬ごとの猟犬の背景および飼育状況に関する量的変数ごとの中央値 (および四分位数)	76

図一覽

第1章

- 図1 MGL法における最終遠心操作後に分離した層構成14
- 図2 MGL従来法による沈渣(左)およびTween 80添加によるMGL改良法による沈渣
(右)24

第3章

- 図3 実験感染ネコから回収されたウエステルマン肺吸虫成虫の精巢49
- 図4 成虫から産卵されたウエステルマン肺吸虫卵49

第5章

- 図5-A ウエステルマン肺吸虫抗原(PwAg)、宮崎肺吸虫抗原(PsmAg)および大平肺吸虫抗原(PoAg)に対するウエステルマン肺吸虫感染犬(10頭)の段階希釈血清のOD値の中央値61
- 図5-B PwAg、PsmAgおよびPoAgに対する宮崎肺吸虫感染犬の段階希釈血清のOD値62
- 図5-C PwAg、PsmAgおよびPoAgに対する大平肺吸虫感染犬(3頭)の段階希釈血清のOD値の中央値63

第6章

- 図6 主な狩猟地点の位置および猟犬から検出された肺吸虫種74

概要

ウエステルマン肺吸虫症の流行に関わるイノシシ猟犬の役割の評価およびリスク因子の特定を目的に、猟犬を指標とした調査の妥当性評価、検査手法の検討、そして西日本地域での疫学調査を実施した。

まず、宮崎県下のイノシシ猟犬を対象とした肺吸虫症の疫学調査により、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する高率な抗体保有状況（55%）が示され、また、糞便内虫卵 DNA の遺伝子解析によりウエステルマン肺吸虫を含む 3 種の肺吸虫に猟犬が感染していることを示した。加えて、猟犬がウエステルマン肺吸虫卵を排泄していた周辺地域では、サワガニ（第二中間宿主）においても本種肺吸虫の感染を認め、猟犬が終宿主として働き、その生活環境維持に関与していることを示唆した。このようなイヌからの肺吸虫卵の排泄を防ぐため、イヌに対する肺吸虫駆虫法としてプラジカンテルの用法を検討し、従来よりも低用量（20 mg/kg）の単回投薬により十分な駆虫効果が得られることを示唆した。

糞便内の虫卵検査法として一般的に用いられる MGL 法において、大多数の肺吸虫卵がエーテル糞便層に捕捉されるため検出感度が極めて低いことを明らかにし、改善のためにはエーテル糞便層を鏡検対象とすること、もしくは集卵操作時に界面活性剤を添加することの有効性を示した。また感染虫種鑑別のための血清学的手法について検討した結果、ウエステルマン肺吸虫に感染している場合には、他種の肺吸虫抗原に対してよりも本寄生虫抗原に対して高い抗体価（OD 値）がみられることを示した。この特徴を利用することで、虫卵を排出していない場合であってもウエステルマン肺吸虫感染を血清学的に推定できる

可能性を示した。

上記の糞便内虫卵および血清学的検査法を用いて、中国、四国、近畿地方のイノシシ猟犬における肺吸虫症の流行状況調査を実施した。その結果、**44.2% (195/441)** が抗体陽性を示し、このうち **28 頭 (14.4%)** が虫卵陽性であった。このうち 8 頭については虫卵 DNA の遺伝子解析によりウエステルマン肺吸虫感染であることが確認され、また抗体陽性であるが虫卵陰性のイヌのうち、上記の血清学的試験により 7 頭についてウエステルマン肺吸虫に感染していることが推定された。これら 15 頭のイヌは中国および近畿地方内で猟に参加しており、同地域内の猟犬の抗体保有に関して、オーナーによりイノシシの生肉を給餌されることが特に重要なリスク因子であることが示唆された (オッズ比 3.35)。

本研究を通じて、西日本の広い範囲に依然としてウエステルマン肺吸虫が分布していること、およびその生活環の維持において、猟犬に対するイノシシ生肉の給餌という人為的な活動が重要であることが示唆された。本寄生虫症の流行制御のためには、猟犬については積極的に検査、駆虫を行い、また訓練などでイノシシ肉を給餌する際には、一度凍結し幼若虫を殺滅させるなど、イノシシ猟犬を介したウエステルマン肺吸虫の生活環を断ち切る終宿主対策が必要と考えられた。

緒言

肺吸虫症は *Paragonimus* 属に属する肺吸虫によりおこる食品媒介寄生虫症のひとつである。現在までに記載された 40 種を超える肺吸虫種のうち、7 種については人への感染が知られている (Blair et al., 1999, 2007)。現在、世界中で約 20 万人が肺吸虫に感染していると試算されており、その 90%以上はアジアにおけるウエステルマン肺吸虫によるものである (Toscano et al., 1995)。

日本においては 3 種の肺吸虫種、すなわちウエステルマン肺吸虫 (*Paragonimus westermanii*)、終宿主体内で有性生殖を行う 2 倍体、および精子を造らず無性生殖を行う 3 倍体)、宮崎肺吸虫 (*P. skrjabini miyazakii*) および大平肺吸虫 (*P. ohirai*) が報告されており (西田, 1989)、イヌを含む様々な雑食および肉食性の動物が終宿主となる (Blair et al., 1999)。このうち前 2 種は人獣共通寄生虫であり、とりわけウエステルマン肺吸虫による人の感染が問題視されてきた。ウエステルマン肺吸虫は主に西日本地域 (九州、中国、近畿、および四国地方) に分布するとされている (西田, 1989; Miyazaki, 1991; Nawa, 2000)。1950 年代初期には、国内のヒトの肺吸虫症例は 30-50 万人とも推定され (横川, 1958; Kawanaka et al, 1999)、当時はヒトがウエステルマン肺吸虫の主要な終宿主となっていた (Yokogawa, 1965)。しかし近年では、年間 50 例ほどのヒトの肺吸虫症例がかつての流行地域を中心に散見されているが (Uchiyama et al, 1999; Nakamura-Uchiyama et al, 2003; 丸山・名和, 2007; 杉山, 2010; Nagayasu et al., 2015)、症例数は明らかに減少

しており、ヒトは本寄生虫の生活環維持に関わる主要な終宿主ではないと考えられる。また、肺吸虫症と認知される件数が減少したため、現在のウエステルマン肺吸虫の分布域は正確には把握されていない。

肺吸虫はその生活環に第一および第二中間宿主を必要とする。ウエステルマン肺吸虫については、第一中間宿主は淡水産巻貝のカワナナであり、第二中間宿主は淡水産のカニおよびザリガニ等である。またウエステルマン肺吸虫の生活環においては、待機宿主としてイノシシが関与することが知られている。第二中間宿主体内のメタセルカリアが待機宿主に摂取されると、幼若虫が筋肉へと移行し、未成熟なままで長期に渡り筋肉内にとどまる (Miyazaki and Habe, 1976; Miyazaki and Hirose, 1976)。そして、イノシシ肉とともに未成熟虫が終宿主に摂取されると、その宿主体内で発育が再開し成熟する (Miyazaki et al., 1978)。そのため、ヒトやイヌなど終宿主への感染は、第二中間宿主体内のメタセルカリア、もしくは待機宿主であるイノシシ体内の幼若虫の経口摂取によりおこる。特にイノシシについては、狩猟および有害捕獲による捕獲頭数が年々増加しており、平成 25 年には 41 万頭ものイノシシが捕獲され (環境省, 2013)、このうち一部は市場やインターネット通信販売を通じて食用流通している。近年の国内のヒトの肺吸虫症例においては、このようなイノシシ肉を加熱不十分な状態で摂食したことが主要な感染原因とされている (Uchiyama et al., 1999; Nakamura-Uchiyama et al., 2002; Nawa and Nakamura-Uchiyama, 2005)。宮崎肺吸虫や大平肺吸虫も、第一中間宿主として淡水産巻

貝、第二中間宿主として淡水産カニをその生活環に必要とする。ウエステルマン肺吸虫と同様にイノシシを介した終宿主への伝播の報告やそれを疑う症例も知られるが(山口ら, 1988; 西田, 1989; Uchiyama et al., 1999)、イノシシ体内ではこれらの種は成虫にまで発育するため、幼若虫を介した感染は体内移行途中の虫体を偶然摂食したためとするのが妥当と考えられる。そのため、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫については、イノシシは待機宿主とはならず、終宿主への感染経路は第二中間宿主であるサワガニを捕食することによる。

近年、宮崎県ではイノシシ猟に使役される犬が集団でウエステルマン肺吸虫に感染していた事例が発生しており (Kirino et al., 2008; Nakano et al., 2009)、それを受けて実施された九州地方での調査により、イノシシ猟犬における抗肺吸虫抗体の高率な保有状況が報告されている (Kirino et al., 2009)。イノシシ猟犬は、給餌や訓練時にイノシシの生肉を与えられることがあり、また猟の際には自由に行動するためイノシシを捕食する機会もあるため、感染を受けやすい状況にあると考察されている。そのため、イノシシ猟犬はウエステルマン肺吸虫の現在の分布状況を知るためのよい指標となると考えられる。

本研究では、現在の西日本地域における肺吸虫症の流行状況の把握、特にウエステルマン肺吸虫症の流行に関わるリスク因子の特定を目的に、糞便を用いた虫卵検査法の改良、宮崎県内のイノシシ猟犬を指標とした調査の妥当性評価、駆虫方法の評価、そして西日本での調査を実施し、ウエステルマン肺吸虫の伝播におけるイノシシ猟犬の重要性について考察した。

第1章 MGL法による肺吸虫卵検査法の検討

第1節 背景および目的

肺吸虫に感染しているヒトや他の終宿主動物の検査において、喀痰や糞便内の虫卵を検出することは、現在の感染を示す確定診断となる (Blair et al., 1999; Fried and Abruzzi, 2010)。喀痰を用いた検査は、夾雑物が少なく鏡検が容易であるため、ヒトの肺吸虫症例においては比較的一般的に適用されるが、一方で動物においては自発的に喀痰を排出することがないため、検査対象とするにはしばしば困難を伴う。通常、蠕虫感染のための糞便内の虫卵検査には、medical general laboratory method (formalin-ether method: (MGL法) (Ritchie, 1948) や army medical school III method (AMS III 法) (Hunter et al., 1948) などの沈殿法が一般的に用いられる (Singh et al., 2012)。MGL法については、ホルマリンの使用により虫卵の形態が保持されること、また操作が容易であることなどの利点があり、一方で AMS III 法は操作の煩雑性はあるものの、夾雑物をより効率的に除去できるといふ利点がある (Hunter et al., 1948)。

これらの集卵法の検出感度については、まず MGL 法による肺吸虫卵の検査では、皮内反応陽性者のうち虫卵検出例は 21.7%とする報告や (Joo et al., 1985)、特異抗体の検出により肺吸虫症と診断された 26 名において虫卵は全く検出されなかった報告もあり (Nkouawa et al., 2009)、本法による糞便を用いた集卵では検出感度が低い可能性が示唆されている。一方、AMS III 法については、皮内反応陽性者のうち 40.0-43.9%で虫卵を検出

した報告や (岡田, 1959; 片峰ら, 1960, 1972)、65.1%とする報告もある (Komiya and Yokogawa, 1953)。しかしながら、両者を横断的に比較検討した例はなく、それぞれの虫卵検出感度の高低を述べることはできない。なお、MGL 法に用いるジエチルエーテルには可燃性があるため、その代替として酢酸エチルを用いる formalin-ethyl acetate sedimentation method (FEA 法) が近年は利用されるようになってきている (Young et al., 1979)。この方法についても、様々な吸虫卵の検査において適用されており、その感度は MGL 法と同等と報告されている (Truant et al., 1981; Goodman et al., 2007; Songserm et al., 2012; Itoh et al., 2013; Patel et al., 2013)。

さらに、肝蛭や腭蛭、住血吸虫など、様々な吸虫卵の検査には簡易沈殿法 (simple sedimentation method: SS 法) が適用されている (Conceição et al., 2002; Abebe et al., 2010; Habtamu and Mariam, 2011)。簡易沈殿法は特別な試薬を必要とせず、さらに比較的信頼性の高い集卵法とされているが、操作時間および操作時の作業占有面積が大きいという欠点がある。

そこで本研究では、肺吸虫卵検査における各種沈殿法の感度の比較を行い、特に MGL 法の集卵効率について評価し、その改良方法を検討した。評価に際しては、観測された結果が肺吸虫属に共通する性質であるか評価するため、肺吸虫卵として国内に分布する 3 種および本邦に分布はしないがアジア広域における流行種のひとつである *P. harinasutai* の虫卵を試験に用いた。

第2節 材料および方法

1-2-1. 各種肺吸虫卵の収集と添加回収試験に用いる虫卵含有イヌ糞便の調整

本研究に用いた4種の肺吸虫感染犬の情報の要約を表1に示した。まず、宮崎肺吸虫卵を含有するイヌ糞便は、岩国市のサワガニより得た本虫のメタセルカリア20個を実験感染させたイヌから回収した。次に、大平肺吸虫卵を含有するイヌ糞便は、宮崎市のサワガニより得た本虫のメタセルカリア20個を実験感染させたイヌから回収した。これらのイヌに対する実験感染は、宮崎大学の動物実験委員会の許可を得た上で実施し（承認番号2006-043-6）、それぞれのイヌは自由採餌および飲水が可能な個別のケージで飼育し、取り扱いにあたっては宮崎大学動物実験規則を遵守した。

さらに、ウエステルマン肺吸虫卵を含有するイヌ糞便は、宮崎市内で飼育されていたイノシシ猟犬（自然感染例）から得た。感染虫種の同定にあたっては、糞便内の虫卵を回収し、そのうち5個について個別に second internal transcribed spacer (ITS2) 領域のDNAの増幅および塩基配列解析を実施し（Doanh et al., 2007, 2011）、ウエステルマン肺吸虫感染であることを確定した。*P. harinasutai* 虫卵を含有するイヌ糞便は、ベトナムの Quang Binh 省で回収されたメタセルカリア200個を用いて、2008年に福岡大学で実験感染されたイヌ（承認番号0711197）由来のものについて譲渡を受けた。

各糞便は、糞便内の虫卵の分布が均一になるよう十分に攪拌し、プラスチックチューブに分注し、直ちに使用したか、もしくは使用まで4°Cで保存し1ヵ月以内に使用した。

上記に加え、虫卵添加回収試験に使用するため、一定量の糞便内に既知量のウエステルマン肺吸虫卵を含むサンプルを調整した。まず、ウエステルマン肺吸虫自然感染犬の糞便から虫卵を金網およびナイロンメッシュを用いて回収した。すなわち、感染犬の糞便を十分量の水に溶き、これを目開き 150 μm の金網を用いて濾過し、次にこの濾液を目開き 80 μm のナイロンメッシュ (Nytal, Heiden, Switzerland) を用いてさらに濾過した。さらにこの濾液を目開き 30 μm のナイロンメッシュ (Nytal, Heiden, Switzerland) を通過させ、このメッシュ上に捕捉された不通過物を回収した。実体顕微鏡下で虫卵数を計測し、肺吸虫非感染犬の糞便 1 g に対して 500 個の虫卵を添加した。

1-2-2. 横川吸虫卵および肝吸虫卵

横川吸虫卵および肝吸虫卵は、北里大学 医学部 寄生虫学研究室の中村健博士および坪川大悟博士から分与を受けた。これらは、横川吸虫 (*Metagonimus yokogawai*) および肝吸虫 (*Clonorchis sinensis*) に感染していたラットおよびイヌの糞便から AMS III 法を用いて回収した虫卵を、10%ホルマリンで固定したものである。

表 1 本研究に使用した各種肺吸虫の由来およびイヌへの感染方法

肺吸虫種	感染方法	メタセルカリア	
		入手地	投与数
宮崎肺吸虫	実験感染	岩国市 (山口県)	20
大平肺吸虫	実験感染	宮崎市 (宮崎県)	20
ウエステルマン肺吸虫	自然感染 (宮崎市内で飼育)	不明	不明
<i>P. harinasutai</i>	実験感染	Quang Binh (Vietnam)	200

1-2-3. 簡易沈殿法 (SS 法)

Conceição et al. (2002) による簡易沈殿法に一部改良を加え、糞便内虫卵の検査を実施した。

まず、糞便 1 g に対して 500 ml の水を加え、よく混和後、これを目開き 150 μm の金網を用いて濾過した。この濾液を 30 分以上静置した後、上清を廃棄した。再び水を 500 ml まで加え 30 分以上静置し、上清を廃棄する操作を 3 回繰り返した。最終沈渣に水を 5 ml までメスアップし、懸濁液 100 μl に含まれる虫卵数を顕微鏡下でカウントした。カウント操作を 5 回行い、懸濁液 100 μl あたりの平均虫卵数を算出し、これに 50 を掛けることで、簡易沈殿法を用いた際の糞便 1g あたりの虫卵数 (eggs per gram of feces: EPG) を算出した。

1-2-4. MGL 法

Ritchie (1948) による MGL 法に一部改良を加え、糞便内虫卵の計数を行った。まず、糞便 0.5 g を 7 ml の 10%ホルマリン液に懸濁し、これを目開き 150 μm の金網を用いて濾過した。この濾液を 15 ml 遠心管に回収し、3 ml のジエチルエーテルを加えてフタをし、約 30 秒間力強く振盪した。室温下で 1,000 rpm (190 $\times g$) (LC-220, Tomy, Tokyo)、10 分間遠心分離し、沈渣を除く上部の 3 層 (上層から順にエーテル層、エーテル・糞便層およびホルマリン層) を廃棄した。沈渣に少量の水を加え、懸濁液全量に含まれる虫卵数をカウ

ントし、これに 2 を掛けることで、MGL 法を用いた際の EPG を算出した。

1-2-5. FEA 法

MGL 法による糞便検査において、ジエチルエーテルの代替として酢酸エチルを用いる検査法が FEA 法 (Young et al., 1979) である。有機溶媒として酢酸エチルを用いて 1-2-4 と同様の操作をすすめ、遠心後の沈渣を得た。沈渣の懸濁液全量に含まれる虫卵数をカウントし、これに 2 を掛けることで、FEA 法を用いた際の EPG を算出した。

1-2-6. AMS III method

Hunter et al. (1948) による AMS III 法に一部改良を加え、糞便内虫卵の計数を行った。まず糞便 0.5 g を 7 ml の 10%ホルマリン液に懸濁し、これを目開き 150 μm の金網を用いて濾過した。濾液を回収し、室温下で 1,500 rpm (440 $\times g$)、2 分間遠心分離した後、上清を廃棄した。沈渣に 7 ml の AMS III 液 (A 液: 37% v/v 塩酸水 および B 液: 9% w/v 硫酸ソーダ水溶液 を等量ずつ混ぜたもの) を加えて懸濁し、Tween 80 を 2 滴、およびジエチルエーテルを 3 ml 加えてフタをし、約 30 秒間力強く振盪した。室温下で 1,500 rpm (440 $\times g$)、2 分間遠心分離し、沈渣を除く上部の 3 層 (上層から順にエーテル層、エーテル・糞便層および AMS III 層) を廃棄した。沈渣に少量の水を加え、懸濁液全量に含まれる虫卵数をカウントし、これに 2 を掛けることで、AMS III 法を用いた際の EPG を算出した。

1-2-7. MGL 法および FEA 法の上層に含まれる虫卵の検査

MGL 法および FEA 法の操作手順では、各試薬を加えた後の遠心により、図 1 に示すように 4 層（上層から順にエーテル層、エーテル・糞便層、ホルマリン層および沈渣）に分離される。精製した虫卵を用いた試験ではこの各層を個別に処理し、虫卵を含む糞便を用いた試験ではこの上部 3 層（上層から順にエーテル層、エーテル・糞便層およびホルマリン層）をまとめて処理し、虫卵が存在するか検査した。

上層 3 層を個別に検査する際には、遠心後の上層部分を、上の層から順にパスツールピペットを用いて別々に回収し、顕微鏡下で虫卵を検査した。

上層 3 層に含まれる虫卵をまとめて検査する際には、まず遠心後の上層部分を新しいチューブに傾瀉で回収し、これを目開き 80 μm のナイロンメッシュを用いて濾過し、さらにこの濾液を目開き 30 μm のナイロンメッシュを通過させ、このメッシュ上に捕捉された不通過物を回収し、顕微鏡下で虫卵を計数した。

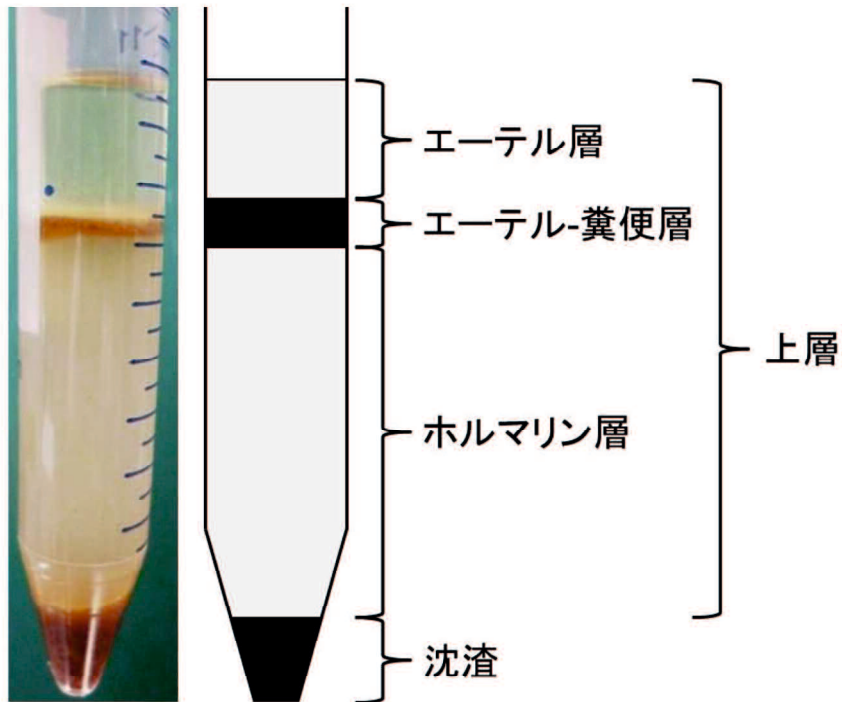


図1 MGL法における最終遠心操作後に分離した層構成

1-2-8. 各虫卵検査操作後の沈渣の乾燥重量の測定

各虫卵検査操作後の鏡検対象物の量を比較した。すなわち、20頭のイヌから回収した糞便各0.5gを用いて、MGL法、MGL法の操作過程で界面活性剤(Tween 80)を添加した方法、FEA法、FEA法の操作過程で界面活性剤(Tween 80)を添加した方法、簡易沈殿法およびAMS III法を実施し、それぞれについて遠心後の沈渣を得た。これらを70℃のインキュベータに静置し、完全に水分がなくなるまで乾燥させ、乾燥重量を測定した。

1-2-9. MGL法による横川吸虫卵および肝吸虫卵の検査

10%ホルマリン液に固定されていた横川吸虫卵および肝吸虫卵を、まず目開き40μmのナイロンメッシュを用いて濾過し、さらにこの濾液を目開き10μmのナイロンメッシュを通過させ、このメッシュ上に捕捉された虫卵を回収した。回収した各虫卵を、糞便1gあたり1,000個になるようにイヌの糞便に添加した。調製した糞便0.5gに対してMGL法を実施し、1-2-7の方法により、上層部分および沈渣それぞれに含まれる虫卵数をカウントし、検出された虫卵数の合計に対する沈渣に含まれる虫卵数の割合を算出した。

1-2-10. 統計処理

得られた各データについて、まずKolmogorov-Smirnov testによる正規性の確認およびF-testにより等分散性を確認した。そして、差の有意性および相関性を以下の方法により

解析した。MGL 法、簡易沈殿法、および AMS III 法を用いたウエステルマン肺吸虫卵の添加回収試験については、analysis of variance (ANOVA) および Scheffe's paired comparison を実施した。MGL 法および簡易沈殿法による実験感染犬糞便における検出虫卵数の比較（ペア検体）においては Wilcoxon signed-rank test を実施した。EPG の相関関係の評価には Spearman's rank correlation coefficient を用いた。各種肺吸虫卵に対して MGL 法を実施し、遠心後の上層から検出された虫卵の割合を比較する際には、角変換した値を用いて Kruskal-Wallis test を実施した。Tween 80 添加により改良した MGL 法および FEA 法により沈渣から検出された虫卵の割合を、従来の MGL 法および FEA 法と比較する際には、角変換した値を用いて Student's *t*-test を実施した。各虫卵検査操作処理後の乾燥重量の比較には、Scheffe's paired comparison を併せた Friedman test を用いた。

これらの統計処理には、Windows の Microsoft Excel 2010 ソフトウェアである Excel statistics 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo) および Program R version 3.1.1 (R Development Core Team, 2014) を用い、 $P < 0.05$ を有意性ありと判定した。

第3節 結果

1-3-1. MGL 法、SS 法、AMS III 法によるイヌ糞便におけるウエステルマン肺吸虫卵の添加回収試験結果

イヌ糞便 1 g あたりにウエステルマン肺吸虫卵 500 個を含む検体を用い、MGL 法、SS 法、AMS III 法を各 5 回実施したところ、各集卵法による EPG の平均値（および標準偏差）はそれぞれ 17.2 (8.4)、324.0 (37.8) および 505.6 (38.1)であった。3 つの手法間($P < 0.001$, ANOVA)および各 2 手法間 ($P < 0.001$, Scheffe's paired comparison) の EPG の差に有意性を認めた。

1-3-2. 宮崎肺吸虫および大平肺吸虫感染犬糞便に対する MGL 法および SS 法による検出虫卵数の比較結果

宮崎肺吸虫感染犬糞便 63 検体、および大平肺吸虫感染犬糞便 135 検体に対し、MGL 法および SS 法を実施した。各集卵法で、虫卵陽性であった検体数および陽性であった際の EPG の中央値（および 10-90%tile）を表 2 に示した。いずれの肺吸虫種においても、MGL 法による検出 EPG の中央値は、SS 法に対し有意に低かった ($P < 0.001$, Wilcoxon signed-rank test)。また、SS 法ではすべての検体において虫卵が検出できたのに対し、MGL 法では宮崎肺吸虫感染犬糞便の 4 検体で虫卵の検出ができなかった。この 4 検体について SS 法による EPG は、それぞれ 50、108、108、133 であった。また、2 つの集卵

法による EPG には弱い相関関係がみられ、相関係数は、宮崎肺吸虫卵で 0.465、大平肺吸虫卵で 0.614 であった (Spearman's rank correlation coefficients)。このとき、検体ごとに 2 法間の EPG を比較すると、1 検体を除く他のすべての検体で MGL 法による EPG は SS 法に対し低く、特に 10 分の 1 以下の EPG であるものが 67.2%みられた (表 3)。

1-3-3. MGL 法による操作後の上層に含まれる肺吸虫卵数の計数結果

精製したウエステルマン肺吸虫卵約 100 個に対して MGL 法を実施し、最終遠心操作後に形成された 4 層 (上層から順にエーテル層、エーテル・糞便層、ホルマリン層および沈渣) それぞれに含まれる虫卵数をカウントした。5 試行繰り返し、各層について中央値 (および最小-最大値) を求めた。その結果、検出された虫卵数は上層から順に 0 (0-0)、96 (83-106)、1 (0-5)、そして 1 (0-1) であり、98%の虫卵はエーテル糞便層から検出された。

次に、ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、大平肺吸虫、*P. harinasutai* に感染している犬糞便に対して MGL 法を実施し、最終遠心操作後の上層 (エーテル層、エーテル・糞便層、ホルマリン層) および沈渣に含まれる虫卵数をそれぞれカウントした。各肺吸虫種について 5 試行繰り返して中央値を求め、また上層部分に含まれる虫卵数の割合を算出した (表 4)。その結果、すべての虫種において、95%以上の虫卵は上層部分から検出され、その割合に虫種間に差は認めなかった ($P=0.0581$, Kruskal-Wallis test)。

1-3-4. MGL 法の操作過程に界面活性剤を添加する効果

糞便 1 g あたりにウエステルマン肺吸虫卵 500 個を含むよう調整した検体を用いて、MGL 法におけるホルマリン糞便懸濁液に界面活性剤 (Tween 80) を 2 滴添加した上で以降の操作をすすめ、最終遠心操作後の上層および沈渣に含まれる虫卵数をそれぞれカウントした。比較対象として、同じ調整検体を用いて従来の MGL 法を実施した。各試行を 3 回繰り返し、その沈渣から検出された虫卵の割合 (および標準偏差) を求めた。その結果、従来法では 5.2% (3.2) の虫卵のみが沈渣から検出されたが、改良法では沈渣から 98.7% (1.6) の虫卵が検出され、有意な差を認めた ($P < 0.01$, Student's t test)。

各操作後、鏡検対象物となる最終沈渣を 5 ml の水に懸濁し、直径 10 cm のペトリ皿に移し、虫卵の分布が均一になるよう攪拌した後、静置して虫卵を沈めた (図 2)。改良法において、より多くの夾雑物がみられるが、虫卵も多数みられた。

1-3-5. FEA 法による肺吸虫卵検出結果

糞便 1 g あたりにウエステルマン肺吸虫卵 500 個を含むよう調整した検体に対して FEA 法を実施した結果、MGL 法と同様に、最終遠心後の上層から大多数の虫卵が検出され、沈渣に含まれる虫卵の割合の平均値 (および標準偏差) は 9.1% (5.4) であった。

FEA 法の操作過程で界面活性剤 (Tween 80) を 2 滴添加したところ、沈渣に含まれる虫卵の割合は 99.0% (0.7) に上昇した ($P < 0.01$, Student's t test)。

1-3-6. 各虫卵検査操作後の沈渣の乾燥重量

20頭のイヌから回収した糞便各 0.5 g に対して、MGL 法、Tween 80 添加 MGL 法、FEA 法、Tween 80 添加 FEA 法、簡易沈殿法および AMS III 法を実施し、鏡検対象物である沈渣の平均乾燥重量（および標準偏差）を算出した。それぞれ順に、0.062 (0.015)、0.081 (0.016)、0.071 (0.012)、0.101 (0.021)、0.052 (0.013) および 0.047 (0.013) g であった。AMS III 法実施時に沈渣の重量は最小となり、FEA 法に対して有意な差を認めた ($P < 0.05$, Scheffe's paired comparison)。また、MGL 法および FEA 法において、界面活性剤 (Tween80) の添加により沈渣の増加がみられた。

1-3-7. MGL 法による横川吸虫卵および肝吸虫卵の検査結果

糞便 1 g あたり 1000 個の横川吸虫卵もしくは肝吸虫卵を含むよう調整した検体に対して Tween80 を添加しない MGL 従来法を実施し、沈渣から検出された虫卵の割合（および標準偏差）を算出したところ、それぞれ 62.8% (4.1) および 95.6% (5.1) であった。

表 2 宮崎肺吸虫および大平肺吸虫実験感染犬糞便における MGL 法および簡易沈殿法

(SS 法) による虫卵陽性検体数および EPG の中央値

	宮崎肺吸虫 (n=63)		大平肺吸虫 (n=135)	
	MGL	SS	MGL	SS
陽性検体数 (%)	59 (93.7)	63 (100)	135 (100)	135 (100)
EPG の中央値*	8	108	16	292
(10th/90th percentile)	(1/50)	(50/398.4)	(3.4/119.2)	(67/1051.6)

*兩種肺吸虫卵について、MGL 法により得られた EPG は SS 法によるものよりも有意に少量であった ($P < 0.001$)

表 3 MGL 法および簡易沈殿法 (SS 法) により得られた EPG の比率

	宮崎肺吸虫 (n=63)	大平肺吸虫 (n=135)	合計 (n=198)
EPG 比 (MGL/SS)	検体数 (%)	検体数 (%)	検体数 (%)
> 1.0	1 (1.6)	none	1 (0.5)
0.5 - 1.0	3 (4.8)	7 (5.2)	10 (5.1)
0.1 - 0.5	19 (30.2)	35 (25.9)	54 (27.3)
< 0.1	36 (57.1)	93 (68.9)	129 (65.2)
MGL 法 陰性	4 (6.3)	none	4 (2.0)

表 4 4 種肺吸虫卵における MGL 法最終遠心後の上層および沈渣それぞれから検出された虫卵数の中央値、および上層から検出された虫卵の割合

	検出虫卵数の中央値 (最小値/最大値)			
	ウエステルマ ン肺吸虫	宮崎肺吸虫	大平肺吸虫	<i>P. harinasutai</i>
上層	154 (132/193)	72 (56/84)	319 (246/390)	263 (229/461)
沈渣	4 (1/8)	2 (1/4)	12 (12/30)	3 (1/13)
上層から検出 された割合	95.6 (92.0/96.4)	97.5 (95.0/99.5)	96.6 (95.3/98.8)	98.7 (97.3/99.6)

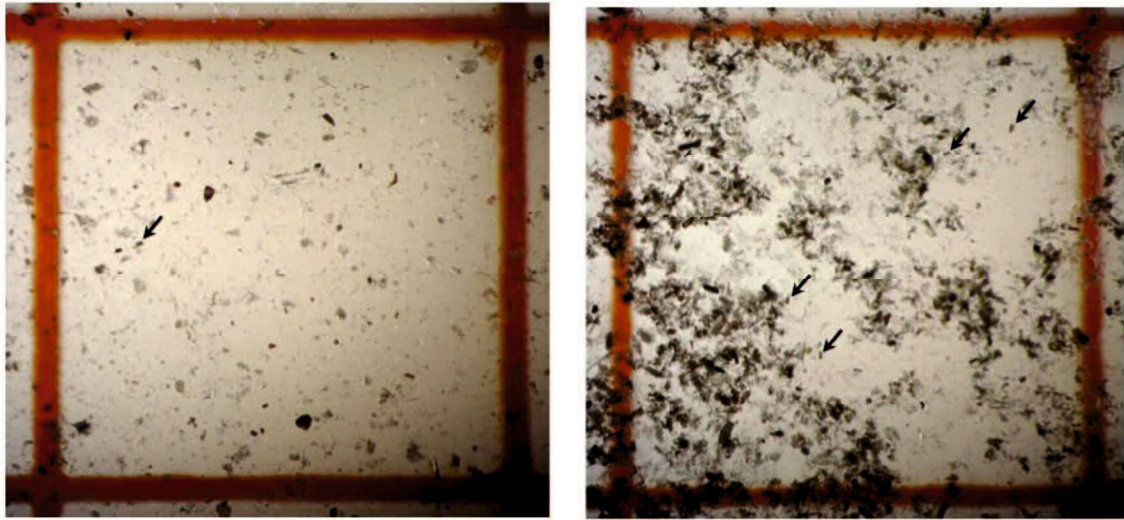


図2 MGL従来法による沈渣（左）ならびに Tween 80 添加による MGL 改良法による沈渣（右）

枠線は 5 mm 、虫卵を矢印で示す

Note: MGL 改良法においてより多くの虫卵および夾雑物がみられる

第4節 考察

MGL 法は、肺吸虫卵の検出法として、医療および獣医療の分野で広く使用されている蠕虫類の集卵法である (Soh et al., 1961; Min, 1981; Lee et al., 1994)。しかしながら、本研究の結果により、MGL 法による肺吸虫卵の検出効率は簡易沈殿法や AMS III 法に比べて明らかに劣るということが示された。MGL 法を用いた検査時には沈渣の全量ではなく一部のみを鏡検することもしばしばあるため、今回明らかとなった集卵効率の低さを鑑みると、偽陰性判定となっている症例も多いと考えられる。また、ヒトや動物における肺吸虫症の流行状況調査においても、MGL 法による検査のみを実施した場合、肺吸虫症の流行状況を過少評価している例があると考えられる。実際、血清学的に陽性となった患者における虫卵検出状況は、AMS III 法を実施した場合と比べ MGL 法の実施時には低い傾向がみられる (岡田, 1959; 片峰ら, 1960, 1972; Joo et al., 1985)。加えて、肺吸虫の成虫 1 虫体から産出される虫卵数は少なく、とりわけ虫卵排出期の初期には顕著に少量であること (木原ら, 1980)、および糞便から検出される虫卵数は検体採取のタイミングにより変動することが知られている (横川, 1955; 富村ら, 1958; Fan et al., 1998)。そのため本研究の結果と併せ、肺吸虫卵の検査においては MGL 法は最適な手法とは言えず、簡易沈殿法や AMS III 法など、より信頼性の高い手法を用いることを推奨する。特に、AMS III 法においては、タンパク質や脂質の除去効率が高く鏡検対象となる沈渣の重量も少なく済むことから、全沈渣を検査する場合にも鏡検に費やす時間を軽減できるものと考えられる。

また、MGL 法実施後に分離する各層のうち、エーテル糞便層において大多数の虫卵が検出され、沈渣には少量の虫卵のみが存在することも明らかとなった。これが、MGL 法による肺吸虫卵検査における低検出効率の最大の原因であると考えられる。このような現象は肺吸虫種に共通してみられており、一方で、横川吸虫や肝吸虫の虫卵においては確認されなかったことから、肺吸虫属の虫卵に特異的な性質であると考えられた。

MGL 法を実施する際に界面活性剤を添加することにより、肺吸虫卵は沈渣部分に沈降するようになったことから、肺吸虫卵の表面に疎水性質が備わっていることが示唆される。肺吸虫は肺の虫嚢内に寄生して産卵し、その虫卵は虫嚢から出た後、気管内を上行する。喀痰の主成分が dipalmitoylphosphatidylcholine などの脂質であることから (Shaheen et al., 2009)、虫卵表面に疎水性質を持つことで、喀痰と容易に絡まり、肺から気管への上行が効率的になるのだと予測される。ヒトにおいて喀痰内から肺吸虫卵が検出されやすいのもこの性質のためと考えられる (Komiya and Yokogawa, 1953)。一方で、本研究において示された通り、AMS III 法において MGL 法よりも肺吸虫卵の検出効率が高いことも、操作過程に界面活性剤の添加があるためと解釈できる。

MGL 法においては、タンパク質および脂質除去のための有機溶媒としてジエチルエーテルが使用されているが、近年、その可燃性の危険により、代替として酢酸エチルなど他の有機溶媒の使用が検討されている (Young et al., 1979; Truant et al., 1981; Goodman et al., 2007; Ahmadi and Damraj, 2009; Songserm et al., 2012; Itoh et al., 2013; Patel et

al., 2013)。酢酸エチルを用いる FEA 法は、既にヒトの肺吸虫症検査に適用された例もあるが(Waree et al., 2001)、本研究により、MGL 法と同様にエーテル糞便層に多数の虫卵が残留するため低検出効率であることが示された。また、界面活性剤の添加により沈渣への集卵が改善することも明らかとなった。

一般的な蠕虫類の虫卵浮遊法に用いる浮遊液に対し、吸虫類の虫卵は大きな比重を持っているため、吸虫卵の検査においては本研究に用いたような沈殿法による集卵が選択される(平, 1997)。一方で、浮遊液の比重を吸虫卵よりも大きく(1.31-1.35 ほど)することで、肺吸虫卵や肝蛭卵、住血吸虫卵などを浮遊法により検出する手法も報告されている(木原, 1976; Duthaler et al., 2010; Glinz et al., 2010)。肺吸虫卵表面の疎水性質のため、有機溶媒を用いる沈殿法では検出効率の低下がみられるが、比重のみを利用したこのような浮遊法は、肺吸虫卵検査の代替として検討する価値があるかもしれない。

結論として、MGL 法による肺吸虫卵検査においては、大部分の虫卵がエーテル糞便層に残留するため、沈渣の鏡検では検出効率が低下していることが明らかとなった。その改善のためには、界面活性剤の添加が有効であることが示された。一方で、95%以上の虫卵がエーテル糞便層に存在することから、この層を対象として検査を行うことも、研究利用時など、肺吸虫卵のみを検出対象として試験をする際には有効であると考えられた。

第2章 イノシシ猟犬を指標としたウエステルマン肺吸虫症疫学調査の予備

的研究

第1節 背景および目的

宮崎県内では、人の症例が増加傾向にあり、近年では年間約 30 例診断されている (Uchiyama et al., 1999)。また、その原因虫種はウエステルマン肺吸虫が大部分を占め、イノシシ肉の摂食によるものが多いとされている。一方、県内において、イノシシ猟に使役される犬が集団でウエステルマン肺吸虫に感染していた事例が発生しており (Kirino et al., 2008; Nakano et al., 2009)、それを受けて実施された九州地方での調査により、イノシシ猟犬における抗肺吸虫抗体の高率な保有状況が報告されている (Kirino et al., 2009)。イノシシ猟犬は、給餌や訓練の際にウエステルマン肺吸虫の待機宿主であるイノシシの生肉を与えられることがあるため、感染を受けやすい状況にあると考察されている。一方で、九州地方での調査においては、虫卵の検査は一部のイヌについてしか実施されておらず、分子学的な虫種の同定はされていない。加えて、肺吸虫種間では血清学的な交差性があることも知られているため (万納寺, 1952; Joo et al., 1989; Dekumyoy et al., 1998)、抗体陽性が常にウエステルマン肺吸虫感染を示すわけではない。

そこで、ウエステルマン肺吸虫症の流行状況調査を発展させるために、イノシシ猟犬が本虫の分布を調査する際の指標となり得るかの評価、および調査手法 (特に虫卵検査およびそれに続く DNA 解析による種同定) の課題点の探索を目的とし本研究を行った。すな

わち、宮崎市周辺でイノシシ猟をする猟犬を対象に、血清疫学調査を実施するとともに、糞便内虫卵の検査および遺伝子解析による感染肺吸虫種の同定を行った。また、猟犬オーナーへ飼育状況についての聞き取り調査を行い、抗体保有に関連する要因について予備的検討を行った。

第2節 材料および方法

2-2-1. イノシシ猟犬の血清および糞便検体

宮崎県内の2軒の小動物病院の協力の元、宮崎県内でイノシシ猟を行う47人のオーナーに飼育されていた猟犬100頭の血液および直腸便を採取した。採取した血液は、3,500 rpm (2,150 g) で15分間遠心分離し、上清を回収し血清サンプルとした。使用までの間、血清サンプルは-30 °C、糞便サンプルは4 °Cで保存し1ヵ月以内に使用した。

2-2-2. 分子同定に用いるための各種肺吸虫成虫

ウエステルマン肺吸虫は福岡大学より分与された。この虫体は、中国吉林省の淡水産カニより得られたメタセルカリアをネコに実験感染し、肺から成虫として取得したものである(承認番号0711197)。宮崎肺吸虫は山口県岩国市において淡水産カニより得られたメタセルカリアを宮崎大学農学部獣医寄生虫病学研究室でラットに実験感染させ肺から回収した成虫である。また、大平肺吸虫は宮崎県宮崎市において淡水産カニより得られたメタセル

キャリアを同研究室でラットに実験感染させ肺から回収した成虫である。これらの感染実験ラットは、宮崎大学の動物実験規則に基づき飼育し、自由に市販の餌と水を摂取できるように、各々個別に飼育していた（承認番号2006-043-6）。それぞれの成虫個体は、回収後、使用までは-30°Cで保存した。

2-2-3. 猟犬のオーナーへの猟犬の背景および飼育状況についての聞き取り調査

猟犬に関する以下の項目について猟犬オーナーに聞き取り調査を行った。

1) 犬の年齢、2) 主な狩猟地点、3) 猟犬が淡水産カニやザリガニを捕食するのを見たことがあるか、4) 猟犬に対しイノシシの生肉を給餌したことがあるか、5) 1年あたりのイノシシの生肉の給餌回数、および 6) 猟犬が猟の際にイノシシを捕食することがあるか。

2-2-4. 酵素標識免疫吸着測定法(ELISA) に用いる肺吸虫抗原の調整

ウエステルマン肺吸虫成虫（前述2-2-2）を用い、以下の方法により粗抗原を作製した。

まず、成虫を細切後、冷却PBS (pH 7.4) 中でソニケーター（目盛3.5、BRANSON Sonifier 150, BRANSON, Danbury, CT, U.S.A.）を用い破碎した。これを4°C下で一晩攪拌し、破碎液を15,000 × g、4°C、5分間遠心分離し、上清を回収した。上清のタンパク質濃度を、bovine serum albumin (BSA) を基準としてBio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) により算出した。PBSで1 mg/mlに調整したものを粗抗原液とし、

使用まで-30℃で保存した。

2-2-5. 猟犬の肺吸虫感染スクリーニング検査のためのELISA法 (スクリーニングELISA)

イノシン猟犬の血清のウエステルマン肺吸虫抗原に対するIgG抗体価 (OD値) を、Kirino et al. (2008) のマイクロプレートELISA法により測定した。まず、96ウェルマイクロプレート (Nunc MaxiSorp flat-bottom immuno 96 microwell plate; Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) に、10 µg/ml に調整したウエステルマン肺吸虫粗抗原液を50 µlずつ加え、4℃で一晩静置した。次に、0.05% Tween 20加PBS (PBST) で4回洗浄したのち、ブロッキングバッファー(1% casein in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6: casein buffer) を200 µlずつ加え、37℃に1時間静置した。ブロッキングバッファーを廃棄し、各ウェルに1000倍希釈した検体血清を50 µlずつ加え、37℃に1時間静置した。PBSTで4回洗浄したのち、casein buffer で2000倍希釈した二次抗体 horseradish peroxidase-labeled goat anti-canine IgG1 (g-chain-specific; Bethyl Laboratories Inc., Texas, USA) を各ウェルに50 µlずつ加え、37℃に1時間静置した。PBSTで5回洗浄したのち、各ウェルに発色試薬 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) peroxidase substrate (one component type; Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Maryland, USA) を50 µlずつ加え、37℃で10分間反応させた。その後各ウェルに1% sodium dodecyl sulphate (SDS) を50 µlずつ加え反応を停止させた。そして450 nmでの吸光度 (OD値) をELISA reader (Benchmark Plus; BIO-RAD, California, USA) により測定し、Kirino et al. (2008) に従

いOD値 0.200 をカットオフ値とし判定を行った。

2-2-6. 糞便内肺吸虫卵検査

スクリーニングELISAにおいて陽性を示した猟犬の直腸便に対し、簡易沈殿法（前述 1-2-3.）により糞便内虫卵検査を行った。検出された虫卵は実体顕微鏡下で回収し、すみやかに分子同定に用いるか、もしくは使用まで70%エタノール中で保存した。

2-2-7. 虫卵DNAを用いた肺吸虫種の分子同定

肺吸虫卵を 1 個ずつ PCR チューブに移し、実体顕微鏡下でシリンジ針を用いて機械的に破碎した。これに 0.5 μ l の溶解液（10% Proteinase K, 100 mM Tris-HCl, 12.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, and 1% SDS）を加え、55°C で 2 時間溶解し、ゲノム DNA を抽出した。

この抽出液をそのままテンプレートとし、ITS2 領域についての PCR/シーケンス解析を行った。PCR 反応のプライマーには、3S (forward, 5'-CGC TGG ATC ACT CGG CTC GT-3') および A28 (reverse, 5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3') (Bowles et al., 1995) を用いた。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製し、Big-Dye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, U.S.A.) を使用したダイレクトシーケンスにより塩基配列

を解析した (sequencer: Model 3100, Applied Biosystems)。種の同定は、the National Center for Biotechnology Information の GenBank に登録された配列に対する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) homology search (Altschul et al., 1997) を行い、相同性を確認した。

また、入手した各種肺吸虫成虫 (前述 2-2-2.) については、虫体の後端を約 20 mg ほど切り取った後、細切し、QIAamp DNA Mini kit (Qiagen Inc., California, USA)を用いて DNA を抽出し、PCR/シーケンス解析を行い塩基配列の参考とした。

2-2-8. 抗体陽性に影響を与える猟犬の背景および飼育状況の解析

Microsoft Excel 2010 のプログラムであるエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、猟犬の生物学的背景および飼育状況と抗体陽性状況との関係を解析した。抗体陽性に影響を与える因子を推定するために、聞き取り調査により得られた項目 (前述 2-2-3.) それぞれについて、カイ 2 乗検定により抗体保有状況との関係を検討した。

第3節 結果

2-3-1. イノシシ猟犬の抗肺吸虫抗体保有状況（スクリーニング ELISA）

47人のオーナーにより飼育されていた100頭のイノシシ猟犬の血清検体のうち、55検体（55%）がスクリーニング ELISA において陽性を示した。検査した猟犬の頭数はオーナーごとに異なり、1頭から12頭であり、平均2.1頭であった。このうち猟犬1頭のみが検査対象であったオーナーの割合は55.3%（26/47）であり、抗体陽性を示した猟犬はそのうち42.3%（11/26）であった。猟犬2頭以上が検査対象であったオーナーは残りの44.7%（21/47）であり、このうち少なくとも1頭が抗体陽性を示したオーナーの割合は66.7%（14/21）であった。

2-3-2. 抗体保有に関与する猟犬の生物学的背景および飼育状況

抗体保有に影響を与える猟犬の因子を推定するため、カイ2乗検定により、聞き取りによって得られた猟犬の背景ごとに抗体保有状況との関係性を評価した。

1) 年齢: 調査対象の猟犬の年齢は0.5歳から15歳であった。年齢により猟犬を3群に分け、それぞれについて抗体陽性率をみたところ、幼犬（1歳未満）30.8%（4/13）、若犬（1歳以上5歳未満）58.3%（35/60）および成犬（5歳以上）59.3%（16/27）であった。このとき年齢群による独立性は認められなかった（ $P=0.169$ ）。

2) 主な狩猟地点: 猟師は猟犬を連れていくつかの地点にイノシシ猟に行くが、そのうち

で最も猟に訪れる地点を聞き取った。その結果、主な狩猟地点として、宮崎市を中心にみて、中心部（宮崎市周辺）、北部（西都周辺）、西部（田野周辺）および南部（日南周辺）の4地点が挙げられた。また、1オーナー（検査対象犬5頭）は北部と西部の両地点において同頻度でイノシシ猟を行っていた。狩猟地点ごとの猟犬頭数および抗体陽性率を表5に示した。

3) 猟犬の淡水産カニやザリガニの捕食の有無: 47人すべてのオーナーが、猟犬が淡水産カニやザリガニを捕食するところをみたことがないと回答した。

4) 猟犬のイノシシ肉の生食経験の有無: 47人のオーナーのうち28人(59.6%)が、彼らの飼育する猟犬に給餌や訓練でイノシシの生肉を与えたことがあると回答した。また、31人(66.0%)が彼らの飼育する猟犬が猟の際にイノシシを捕食したことがあると回答した。合計で、40人(85.1%)のオーナーにより飼育される86頭(86%)の猟犬がイノシシ肉を生食した経験があることが分かった。イノシシ生肉の給餌の有無、猟でのイノシシの捕食の有無、およびいずれかの方法によりイノシシの生肉を摂食することの有無による、Pw抗原に対する抗体保有状況を表6に示した。このうち、オーナーにより生肉を給餌される猟犬は、給餌を受けない猟犬に対して有意に抗体保有率が高かった($P=0.0045$)。

2-3-3. 糞便内虫卵検査、および虫卵DNAを用いた肺吸虫種の分子同定

スクリーニングELISAにおいてウエステルマン肺吸虫抗原に対し陽性を示した55頭の

うち、46頭の直腸便検体が採取可能であった。簡易沈殿法により、このうち9検体(19.6%)で虫卵が検出され、虫卵DNAからITS2領域の塩基配列の解析を行った。9頭の猟犬由来の虫卵DNAのITS2領域の塩基配列は、同一の猟犬から得られた虫卵はすべて同一の配列を示した。また、6頭および2頭の猟犬の糞便内虫卵由来DNAのITS2配列は完全に一致しており、他の1頭の猟犬由来の配列は異なるものであった。得られた3つの塩基配列について、BLAST検索によりGenBank登録配列との相同性を調べたところ、それぞれ*P. westermanii* (98.9% similarity: 458/463, AB354217)、*P. s. miyazakii* (99.8%: 460/461, AB629937) および *P. ohirai* (100%: 363/363, U96911) に対し高い相同性を示した。また、虫卵DNAのITS2領域の塩基配列を肺吸虫成虫（前述3-2-2.）から得た配列と比較したところ、それぞれウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の成虫由来の配列と完全に一致した。以上の結果、6頭の猟犬がウエステルマン肺吸虫、2頭が宮崎肺吸虫、そして1頭が大平肺吸虫に感染していることが明らかとなった（表5）。

表 5 宮崎市周辺の主な狩猟地点と、各地点での猟犬のウエステルマン肺吸虫抗原に対する抗体陽性率、および虫卵 DNA の解析により同定された感染肺吸虫種

狩猟地点	検査頭数 (頭)	抗体陽性 (頭)	抗体陽性率 (%)	虫卵陽性 (頭)	感染虫種 (頭)
中心部（宮崎市周辺）	2	0	0	0	—
北部（西都周辺）	73	33	45.2	3	Psm (2) Po (1)
西部（田野周辺）	18	16	88.9	4	Pw (4)
南部（日南周辺）	2	1	50	0	—
北部および西部	5	5	100	2	Pw (2)

Pw: ウエステルマン肺吸虫、Psm: 宮崎肺吸虫、Po: 大平肺吸虫

表6 獵犬のイノシシ肉生食経験とウエステルマン肺吸虫に対する抗体保有状況

		検査頭数	抗体陽性	抗体保有率	<i>P</i> 値
		(頭)	(頭)	(%)	
生肉給餌経験	有	66	43	65.2	0.0045
	無	34	12	35.3	
捕食経験	有	67	36	53.7	0.7163
	無	33	19	57.6	
生肉給餌 もしくは 捕食経験	有	86	48	55.8	0.6851
	無	14	7	50	

第4節 考察

宮崎市周辺で猟をするイノシシ猟犬 100 頭について、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する抗体保有状況を調査したところ 55 頭 (55%) が陽性を示し、先の事例が示す通り (Kirino et al., 2008, 2009)、イノシシ猟犬において高率に肺吸虫感染が起きていることが示唆された。特に、宮崎市西部で猟を行うイヌの抗体保有率は比較的高く (88.9%: 16/18)、虫卵 DNA の解析により実際にウエステルマン肺吸虫感染犬も見つかっていることから、同地域ではウエステルマン肺吸虫の生活環が維持されていることが明らかとなった。

感染経路について調査したところ、今回の調査対象の中には肺吸虫の第二中間宿主である淡水産カニやザリガニを捕食するものは見つけられなかった。一方で、大多数の猟犬がウエステルマン肺吸虫の待機宿主であるイノシシの生肉を摂食する機会を持っており (86%: 86/100)、特にオーナーによりイノシシの生肉を給餌される猟犬では、給餌を受けない猟犬に対し有意に高い抗体陽性率を示していた。そのため、猟犬への肺吸虫感染はイノシシ肉を介して起きているであろうことが示唆された。これは九州地方での調査において推察されていた知見を裏付けるものとなる (Kirino et al., 2009)。サワガニ等の第二中間宿主における肺吸虫メタセルカリアの保有状況は同一地域内でも生息する沢ごとに異なることが知られているが (Sugiyama et al., 1983)、イノシシは日に数キロを移動し (Janeau et al., 1995)、様々な沢でサワガニ等を捕食する。そのため、ウエステルマン肺吸虫分布地においてはその幼若虫を筋肉内に蓄積していくことになる。実際に九州産イノシシにおいて、

高率な抗ウエステルマン肺吸虫抗体の保有 (Kawanaka et al., 1999) および筋肉からの幼若虫の検出 (杉山ら, 2016) が報告されており、イノシシは本虫の待機宿主として重要な役割を果たしている。近年、国内のヒトの肺吸虫感染例の多くがイノシシ肉の摂食によるウエステルマン肺吸虫の感染であるといわれており (Uchiyama et al., 1999)、今回の結果はイノシシ肉によるウエステルマン肺吸虫の感染リスクを改めて示すものとなった。このことから、ウエステルマン肺吸虫の分布状況を調査するにあたり、イノシシ猟犬は待機宿主を介した感染機会を頻繁に持ち、かつ実際に抗体保有および虫卵の排出をしていることから、分布調査の指標として十分に機能すると考えられた。

一方で、糞便から得られた肺吸虫卵の DNA 解析により虫種の同定を行った結果、イノシシ猟犬において、ウエステルマン肺吸虫のみならず、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の感染も起きていることが確認された。宮崎県内におけるこれら 3 種肺吸虫の分布は知られていたが (西田, 1989)、イノシシ猟犬において、3 種いずれも感染し得ることが明らかとなり、疫学調査においては感染虫種の鑑別が重要であることが示された。しかしながら、抗体陽性犬においても糞便内に虫卵が検出できたのは一部 (19.6%) であり、感染虫種が特定できた個体が限られてしまった。虫卵排出の変動を考慮すると偽陰性である可能性は否定できないが (横川, 1955; 富村ら, 1958; Fan et al., 1998)、採材機会が限られる調査の際には、複数日に渡って繰り返し採便することは困難である。そのため、吸収試験などの血清学的な手法による感染肺吸虫種の鑑別方法を検討していく必要があると考えられる。

宮崎肺吸虫および大平肺吸虫については、多くの肉食および雑食の動物が自然界での終宿主としてよく知られており (Shibahara and Nishida, 1985)、特に宮崎肺吸虫についてはテンやアナグマなどのイタチ科動物 (片峰・本村, 1962; 芦沢ら, 1976, 1977, 1980)、大平肺吸虫については野鼠やタヌキ (竹山, 1962; 芦沢ら, 1974) において高率な虫体保有状況が知られている。一方で、イヌは日本に生息する 3 種肺吸虫すべてに感受性をもつことが知られているが (Blair et al., 1999)、猟犬や野犬における各種肺吸虫の自然感染例の報告は限られている (三浦, 1952; 一色, 1954; 田中ら, 1955, 波部ら, 1977; 菅野ら, 1989; Madarame et al., 2009)。これらの終宿主への伝播経路は、イノシン体内を移行途中の幼若虫を摂食することでの感染例も報告されてはいるが (山口ら, 1988; 西田, 1989)、第二中間宿主を介したものが一般的とされる。宮崎県内では以前から 3 種の肺吸虫いずれもの分布が確認されており (西田, 1989)、近年でも、第二中間宿主のひとつであるサワガニにおいてウエステルマン肺吸虫以外の虫種も確認されている (Sugiyama et al., 2009)。そのため、今回の猟犬については、狩猟の最中にオーナーの視認できる範囲外で、猟犬が淡水産カニ等を摂食した可能性がある。今後の調査において、第二中間宿主の捕食の有無は重要な聞き取り項目であるが、オーナーの認知していない場面で猟犬が摂食している可能性にも十分に留意する必要がある。

今回の調査により、イノシン猟犬は肺吸虫感染機会を高率にもつことが示唆され、ウエステルマン肺吸虫症の疫学調査における指標として十分に機能すると考えられた。一方で、

猟犬において国内に分布する 3 種の肺吸虫種がいずれも検出されており、感染虫種を同定
／推定するための手法の検討が今後必要であると考えられた。

第3章 ウエステルマン肺吸虫検出地域におけるサワガニ、イノシシにおける調査

第1節 背景および目的

ウエステルマン肺吸虫の主たる終宿主として、かつては人間が大きく貢献し、その生活環が維持されていた (Yokogawa, 1965)。近年は国内のヒトの感染事例も年間 50 例ほどに限られ (Uchiyama et al., 1999; Nakamura-Uchiyama et al., 2003; 杉山, 2010)、また衛生環境の向上のため虫卵を含む糞便が自然界に流入する可能性は低いものと考えられる。

一方で、既報 (Kirino et al., 2008, 2009; Nakano et al., 2009) および第2章の調査により、宮崎県内のイノシシ猟犬における抗肺吸虫抗体の高い保有状況が明らかとなり、中でもウエステルマン肺吸虫の虫卵を排出している犬が実際に確認された。このような感染犬から散布された虫卵が周辺環境に流出することで、ウエステルマン肺吸虫の感染源として機能し、生活環の維持に関与している可能性が考えられる。そこで、先の調査によりウエステルマン肺吸虫感染を確認した宮崎市西部の地域において、イノシシ猟犬および肺吸虫の生活環に関与する宿主として淡水産カニ (第二中間宿主) およびイノシシ (ウエステルマン肺吸虫の待機宿主、および宮崎肺吸虫と大平肺吸虫の終宿主) を対象に、肺吸虫感染状況を調査し、またそれぞれの宿主から検出された虫体について分子学的手法により種を同定した。

第 2 節 材料および方法

3-2-1. 調査地

前述第 2 章の調査によりイノシシ猟犬のウエステルマン肺吸虫感染が確認された宮崎県山之口町を調査地とし、猟犬、サワガニおよびイノシシにおけるウエステルマン肺吸虫の保有状況調査を実施した。

3-2-2. 猟犬の血清、糞便の採取および飼育状況の聞き取り調査

2011 年 3 月、イノシシ猟を共に行う 2 人のオーナーにより飼育されている 15 頭の猟犬から、血液および直腸便を採取した。血液は血清分離を行い、使用まで -30°C で保存した。糞便は 4°C で保存し 1 ヶ月以内に使用した。

またオーナーに対し、1) 犬舎の形状、2) 猟犬の糞便の処理方法、3) 犬舎周辺の環境、4) 猟犬の淡水産カニの捕食経験、5) 猟犬へのイノシシ生肉の給餌経験および 6) 猟犬のイノシシの捕食経験について聞き取り調査を行った。

3-2-3. イノシシの内臓の入手および解剖検査による肺吸虫の検査

2011 年から 2012 年にかけて、狩猟および罟猟により捕獲されたイノシシ 7 頭の内臓(肺、肝臓、胃および腸管)の提供を受けた。これらのイノシシは主に犬舎から 10 km の範囲にある、高度 300 m ほどの山間部で捕獲された個体であった。提供された臓器は細切

し、肉眼的に肺吸虫の探索を行った。

3-2-4. 淡水産カニ類の採集およびメタセルカリア検査

2011年11月、猟犬の犬舎から約100 mに位置する東岳川の支流において、約30匹の淡水産カニ（サワガニ、*Geothelphusa dehaani*）を採集した。肺吸虫のメタセルカリアを検査するため、まずサワガニの甲殻をはずし、エラ、肝臓、筋肉を摘出した。これを乳鉢ですりつぶし、水に懸濁し、目開き1 mmの金網メッシュを通過させた。通過物に対して簡易沈殿操作を3回繰り返し、沈渣に含まれるメタセルカリアを実態顕微鏡下で検査した。検出されたメタセルカリアは1個ずつ回収し、PCR/シーケンス解析、および感染実験に使用した。

3-2-5. 肺吸虫メタセルカリアのネコへの実験感染、および成虫の回収

実験感染は、福岡大学において実施し、福岡大学の動物実験規則に基づき、自由に市販の餌と水を摂取できるように個別飼育した（承認番号0711197）。

サワガニから検出されたメタセルカリア30個をネコ1匹に対して経口投与した。投与243日後に安楽殺し、肺から肺吸虫成虫を回収した。回収した成虫を生理食塩水中に室温でしばらく静置し、虫卵を産出させ、100個の虫卵について長径および短径を計測した。その後、虫体は70%アルコール中で圧扁固定し、形態観察のためにヘマトキシリンで染色した。

3-2-6. イノシシ猟犬の抗肺吸虫抗体検査 (ELISA)

15頭の猟犬(前述 3-2-2.)の血清を用いて、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する抗体を前述 2-2-5. の手法により判定した。

3-2-7. 猟犬糞便内の肺吸虫卵検査

15頭の猟犬(前述 3-2-2.)の糞便を用いて、簡易沈殿法(前述 1-2-3.)により糞便内肺吸虫卵の検査・回収を行った。

3-2-8. 虫卵、メタセルカリアおよび成虫の分子学的解析による種同定

虫卵およびメタセルカリアの DNA の抽出は、前述 2-2-7. の虫卵 DNA の抽出手法により実施した。成虫 DNA は前述 2-2-7. の虫体 DNA の抽出手法により抽出した。ITS2 領域(463 bp)の解析を前述 2-2-7. の手法により実施した。あわせて、ミトコンドリア cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) 領域(399 bp)について、プライマーとして COI-1 (forward, 5'-TCT TTT GGG CAT CCG GAG GTG-3') および COI-2 (reverse, 5'-AGA TGA CAA AGG AAC GAT AAT GAA AAT G-3') を用いて PCR/シーケンス解析を実施した (Thaenkham and Waikagul, 2008)。

第3節 結果

3-3-1. イノシシ猟犬における肺吸虫感染状況および猟犬の飼育状況

検査した 15 頭のうち、14 頭がウエステルマン肺吸虫抗原に対する ELISA に陽性反応を示した。このとき、抗体陽性犬の OD 値の中央値は 1.472 (最低値 1.359 - 最大値 1.589) であった。この 14 頭のうち 10 頭の糞便から肺吸虫卵が検出され、虫卵 DNA の ITS2 領域および COI 領域の塩基配列の解析により、いずれも GenBank に登録されているウエステルマン肺吸虫の塩基配列と完全に一致した (ITS2; JQ354935 および COI; AF219379)。

これらのイノシシ猟犬は、プレハブの建物内で、1 頭ごとに柵により個別に隔てられた空間を得て飼育されていた。犬舎内で排出された糞便は、回収されることはなく、床面の水洗により洗い流されていた。犬舎のそばにはコンクリート製の排水溝があり、排水は東岳川の支流に直接流入していた。

感染経路については、狩猟時には猟犬たちは猟場を自由に行動するため、オーナーが直接視認したことはないが、淡水産カニを捕食する可能性があるだろうということだった。また、猟犬たちは頻繁にイノシシの生肉を給餌されており、狩猟の際にイノシシを捕食することもしばしばあるとのことだった。

3-3-2. イノシシ臓器からの肺吸虫検出

検査した 7 頭のイノシシの内臓からは肺吸虫は検出されなかった。

3-3-3. サワガニからの肺吸虫メタセルカリア検出および実験感染ネコから回収した成虫の評価

サワガニから合計 50 個のメタセルカリアが回収され、そのうち 1 個について ITS2 領域の塩基配列を解析したところ、ウエステルマン肺吸虫の塩基配列 (JQ354935) と完全に一致した。

このメタセルカリアを実験感染したネコから回収した成虫の塩基配列は、ITS2 領域および COI 領域のいずれもウエステルマン肺吸虫のものと完全に一致した (ITS2: JQ354935 および COI: AF219379)。成虫からは虫卵の産出を認めたが、形態学的には精巢内に精子形成を認めなかった (図 3)。産出された虫卵 100 個の長径 x 短径 (最小-最大) は 85.8 μm (70.7-97.8) x 48.7 μm (39.6-58.5) であり、長短径比は 1.77 であった (図 4)。

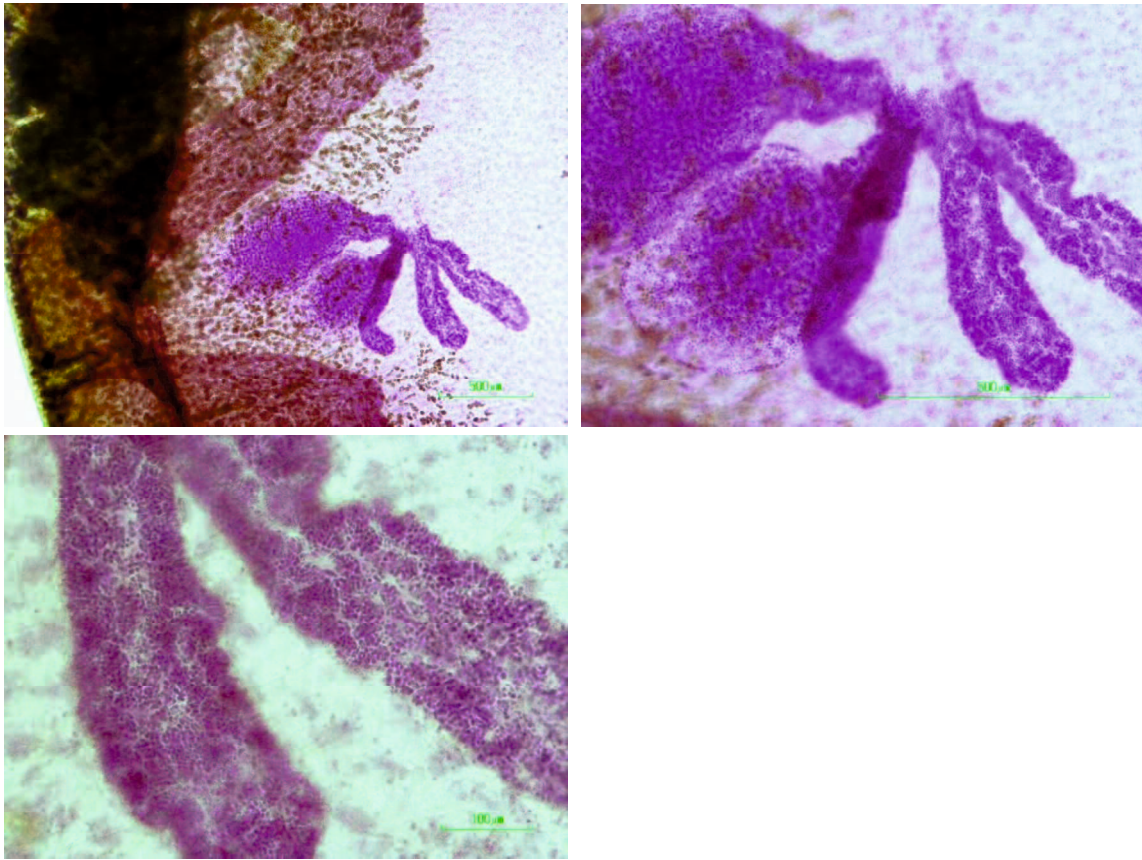


図3 実験感染ネコから回収されたウエステルマン肺吸虫成虫の精巣

左上: 弱拡大、右上: 中拡大、左下: 強拡大

Note: 精巣内には精子の形成を認めない



図4 成虫から産卵されたウエステルマン肺吸虫卵

第4節 考察

イノシシ猟犬がウエステルマン肺吸虫の生活環維持に関与しているかどうかを評価するため、イノシシ猟犬の飼育される小屋を中心とした狭い範囲内で、サワガニおよびイノシシの肺吸虫保有状況を調査した。

まず調査対象としたイノシシ猟犬において、過去に宮崎県内で報告されているイノシシ猟犬における集団感染事例と同様に(Kirino et al., 2008, 2009)、高率な抗体保有状況が確認され、虫卵の遺伝子解析によりウエステルマン肺吸虫に感染していることが明らかとなった。オーナーへの聞き取り調査により、猟犬たちは頻繁にイノシシの生肉を給餌されており、また抗体価 (OD 値) も高値を示したことから、これらの猟犬は繰り返し感染を受けていることが予測された。加えて、狩猟の際にイノシシを捕食することもしばしばあると情報が得られ、またおそらく淡水産カニも捕食しているという情報が得られた。このような習慣は、おそらくイノシシ猟に使役されるイヌにおいて共通してみられると考えられ、一般のイヌや他の野生動物と異なり、肺吸虫の中でも特にウエステルマン肺吸虫の感染を受けやすい状況にあると考えられる。

また、このようなウエステルマン肺吸虫の感染を受けている猟犬が、状況によっては実際に本種寄生虫の生活環維持に大きく関与することが示唆された。今回調査した猟犬のうち 10 頭の糞便内には虫卵の排出を認めており、この糞便を含む飼育小屋からの排水が流入する沢に生息するサワガニから多数のメタセルカリアが検出された。今回は採集・検査

は行っていないが、この沢には第一中間宿主となるカワニナの生息も確認している。肺吸虫の COI 遺伝子は同種内であっても地域により少なからず変異がみられることが知られており (Park et al., 2003)、本調査で猟犬より得た虫卵の COI 遺伝子とサワガニから得られたメタセルカリアの感染実験により得た成虫の COI 遺伝子の両者が 100%一致したことから、この沢で感染源となった肺吸虫卵は感染猟犬の糞便中に排出されたものである可能性が高い。

メタセルカリアの実験感染により回収された成虫については、虫卵の産出がみられる成熟虫体であるにも関わらず精巣内に精子形成を認めないことから、ウエステルマン肺吸虫の 3 倍体であると示唆された。また成虫から得た虫卵のサイズを過去の報告と比較すると、長径は 2 倍体と 3 倍体の観測値範囲と重複し、平均値は両者の中間ほどで、短径は後者とおおむね合致した (Miyazaki, 1991)。これらのことから、猟犬およびサワガニに感染していた肺吸虫種はウエステルマン肺吸虫 3 倍体であると判断された。サワガニにおけるウエステルマン肺吸虫 3 倍体の検出例は他の地域においても知られているが、その検出状況は本調査の結果に比べ濃厚ではない (Sugiyama et al., 2009)。また、第二中間宿主における感染状況は沢ごとに異なることから (Sugiyama et al., 1983)、サワガニが肺吸虫感染を受ける際にはその生息地における第一中間宿主の感染、すなわち肺吸虫卵の流入が必須である。今回調査したサワガニにおいては、本虫のメタセルカリアが多数検出されていること、および分子学的にもイノシシ猟犬が感染していたウエステルマン肺吸虫 3 倍体と一致する

ことから、猟犬の飼育小屋から流入した虫卵を含む廃液がこの沢の汚染源となったことが疑われた。

今回検査したイノシシの内臓からは肺吸虫は検出されなかった。近年、日本におけるヒトの肺吸虫感染例の多くはイノシシ肉の摂食によるウエステルマン肺吸虫感染と報告されており (Nakamura-Uchiyama., 2003)、待機宿主としてのイノシシが重要視されている。イノシシに感染したウエステルマン肺吸虫 3 倍体の大部分は筋肉内で幼若虫のままとどまるため (Miyazaki and Hirose., 1976; Miyazaki et al., 1978)、感染を受けていても成虫が検出されないことは大いに考えられる。また、九州地方でのイノシシにおける肺吸虫の血清疫学調査において、74.6% (44/59) のイノシシが抗体陽性であったという報告がある (Kawanaka et al., 1999)。加えて、本調査と同時期に宮崎県内の他の地域で捕獲されたイノシシ 14 頭について血中抗体を調査したところ、いずれも内臓からは虫体が検出されなかったが、2 頭が抗体陽性であった (未発表)。このことから、今回の調査地域のイノシシの筋肉内にウエステルマン肺吸虫 3 倍体の幼若虫が存在する可能性が考えられ、今後は、筋肉を入手して消化法により幼若虫を探索するなど、ウエステルマン肺吸虫 3 倍体に重点を置いた調査を行う必要があると考えられた。

以上のことから、今回の調査地では、イノシシ猟犬が終宿主として機能し、ウエステルマン肺吸虫 3 倍体が伝播されていることが強く示唆された。猟犬は、狩猟の際には山で自由に行動をし、また期せずして行方不明になり野生化してしまうこともある (私信)。国外

においてはイヌが肺吸虫の主要な終宿主動物として機能している例が既に知られていることから（Shin and Min, 1999）、同様に、猟犬や元猟犬は自然環境中に肺吸虫卵を含む糞を拡散することになり、肺吸虫の生活環維持に重要な終宿主として機能すると考えられる。獣医衛生および公衆衛生のためには、イヌの肺吸虫感染、特にウエステルマン肺吸虫感染をコントロールすることは重要である。そのために、積極的に検査、駆虫を行い、また訓練などで人為的にイノシシ肉を給餌する際には、一度凍結し幼若虫を殺滅させるなど、イノシシ猟犬を介した伝播経路によるウエステルマン肺吸虫の生活環を断ち切る終宿主対策が必要と考えられる。

第4章 イヌ肺吸虫症に対するプラジカンテル投与量の検討

第1節 背景および目的

イノシン猟犬に高率な肺吸虫感染が明らかとなる中で、これらの猟犬に対する対処の重要性も明らかとなってきた。特に、イノシン生肉を給餌される猟犬は頻繁に感染機会を持つため、定期的に検査・駆虫を行う必要性が考えられる。しかしながら、イヌの肺吸虫症に対するプラジカンテルによる駆虫にあたっては、ヒトにおける投薬方法（(25 mg/kg x 3 回/day) x 3 日間投与）を流用し、(23 mg/kg x 3 回/day) x 3 日間投与 (Bowman et al., 1991) や 78 mg/(kg day) x 2 日間投与 (Kirino et al., 2008; Nakano et al., 2009) が試されるのみであり、明確な投与方法の基準は示されていない。そこで、肺吸虫感染が確認されたイヌに対し、投与方法を変えてプラジカンテルを投与し、駆虫効果を評価した。

第2節 材料および方法

4-2-1. 調査対象犬の群分け、および駆虫薬投与と効果判定

前述第3章の調査において、ウエステルマン肺吸虫感染が確認された猟犬 10 頭を、ELISA の OD 値の分布が同等になるよう 2 群に分けて駆虫試験を実施した。各 5 頭のイヌに対して、20 mg/kg の容量で、1 群には単回投与、他の 1 群には 1 日 1 回投与を 2 日間連日で実施した。投与後、判定までの期間は猟犬に対してイノシンの生肉を給餌しないようオーナーに協力をいただいた。

駆虫薬投与前および投薬 7 ヶ月後に各犬から採血を行い、上記の ELISA 法によりウエステルマン肺吸虫抗原に対する OD 値を測定した。効果の判定は、イヌにおけるプラジカンテル投薬後の抗肺吸虫抗体価の低下までの期間を参考に (Nakano et al., 2009)、投薬前の OD 値に対して投薬後の OD 値が 40%以上低下したものを駆虫効果ありと判定した。

第 3 節 結果

投薬前の OD 値は、単回投与群では平均 (および最小-最大値) で 1.53 (1.13-1.74) であり、投薬 7 ヶ月後には 0.57 (0.19-0.856) であった。このとき OD 値の低下率は 61.9% (49.0-89.2) であった。また 2 日間連続投与群では、投薬前は 1.42 (1.18-1.59) であり、投薬後には 0.43 (0.12-0.70) であった。このとき 70.3% (48.9-91.6) の OD 値の低下がみられた。

第 4 節 考察

今回用いた両投与方法により、全頭で 40%以上の OD 値の低下があり、十分な駆虫効果が得られたと判定された。既報では、駆虫薬投与前後での OD 値の減少率は平均 (最小-最大値) で 70.7 (42.7-88.0) であったことから (Nakano et al., 2009)、ほぼ同等の結果が示唆された。ヒトにおける投与用量についても、添付書にある容量よりも 3 倍以上であるため使用を躊躇する意見もあることから (丸山, 2008)、同様にイヌにおいても、詳細を検討することで適切な投与量を決定することが重要であると考えられる。

駆虫効果の判定に関して、今回は血中抗体を基準に用いたが、ヒトの症例の場合には、投薬後に抗体価が正常範囲まで回復するのに 4-18 か月を要するという報告もあることから (Cho et al., 1989; Maleewong et al., 1992)、個体差も大きいと考えられる。また、虫卵の消失を指標とするには、そもそも糞便内への虫卵排泄は一定しておらず (横川, 1955; 富村ら, 1958; Fan et al., 1998)、また虫体死滅後も虫卵は組織内に残存しており (抗体価が長期間維持される原因とも示唆されている)(Cho et al., 1989, 2000)、これが偶発的に排出される可能性もあることから、虫体死滅の評価に用いるのは困難である。そのため、抗体の消失を待たず虫体の殺滅を確認するために、CT 画像検査などにより肺の虫嚢の消失を検査するなど他の評価方法を導入することが有効と考えられる。

また、今回は猟犬オーナーの協力を得て、試験期間中は猟犬に対してイノシシ生肉の給餌を避けることができたため、ウエステルマン肺吸虫の再感染を防ぐことができ、良好な結果につながったと考えられる。そのため、生肉以外の給餌、すなわち加熱や凍結により肺吸虫を殺滅した上での給餌は、本虫の感染予防に有効であることが示唆された。一方で、狩猟の際には猟犬がイノシシに噛みつくこともあるであろうことから偶発的な感染機会も増加すると考えられるため、猟期が終わるごとに検査をし、投薬治療を行うなど、定期的に対処をする必要があると考えられる。

第5章 血清学的手法による感染肺吸虫種の推定法の検討

第1節 背景および目的

前述第2章の疫学調査により、イノシシ猟犬において国内に分布する3種肺吸虫いずれもが検出されており、感染虫種の鑑別が必要であることが示された。一方で、ウエステルマン肺吸虫に対する抗体陽性犬においても、糞便内から虫卵を検出できた割合は低かった。これは、虫卵の排出の変動による偽陰性とも考えられるため（横川, 1955; 富村ら, 1958; Fan et al., 1998）、複数日に渡って繰り返し採材することで検出効率の向上は期待できるが、疫学調査など採材機会が限られる場合には適用できない。そのため、虫卵 DNA のみを用いた感染虫種の同定では不十分であることが示された。そこで、抗体陽性犬において、特にウエステルマン肺吸虫感染であることを推定するための血清学的手法を検討した。

ヒトの肺吸虫症例においては、ウエステルマン肺吸虫に感染している患者においては本種抗原に対する ELISA の OD 値は宮崎肺吸虫抗原に対する OD 値よりもわずかに高くなること、および宮崎肺吸虫症患者においては逆になることが報告されており（Waikagul, 1989; Ono et al., 1992）、同様に他種の肺吸虫種間においても、感染している肺吸虫種抗原に対する抗体価が他種抗原に対してよりも高くなる傾向が知られている（Knobloch, 1984）。一方で、検査に用いる患者血清の希釈倍率を上げることで、交差反応が低減する可能性について言及した報告もある（Itoh and Sato, 1990）。そこで、ウエステルマン肺吸虫感染が確認されている犬血清を用いて、検体の希釈倍率を変えた際の3種肺吸虫抗原に

対する反応性の差を評価し、本手法がウエステルマン肺吸虫感染の推定に適用することができるか検討した。

第2節 材料および方法

5-2-1. 感染肺吸虫種が明らかであるイヌの血清

第3章の調査においてウエステルマン肺吸虫感染が確認されたイノシシ猟犬10頭の血清を使用した。また、宮崎肺吸虫に実験感染させたイヌ1頭の血清、および大平肺吸虫に実験感染させたイヌ3頭の血清を、それぞれの陽性対照血清として使用した。これらのイヌに対する実験感染は、宮崎大学の動物実験委員会の許可を得た上で実施し（承認番号2006-043-6）、それぞれのイヌは自由採餌および飲水が可能な個別のケージで飼育し、取り扱いにあたっては宮崎大学動物実験規則を遵守した。

5-2-2. ELISA法による3種肺吸虫抗原に対するOD値の測定

前述2-2-4.の手法により、ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の抗原を作製し、PBSにより1 mg/mlに調整したものを粗抗原として使用した。ELISA法の手技は2-2-5.の通りとし、検体血清の希釈倍率を250、1,000、4,000、16,000倍の4段階として使用した。測定されたOD値について、抗原ごとに、それぞれの血清希釈倍率におけるウエステルマン肺吸虫感染犬血清10検体の中央値（および四分位数）を求めた。また、

各希釈倍率における、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する OD 値の、他の 2 種抗原に対する OD 値との比率を求めた。

宮崎肺吸虫および大平肺吸虫実験感染犬血清についても、同様の希釈倍率で、各種肺吸虫抗原に対する OD 値を測定した。検体数が少数であるため統計学的評価はできなかった。

第3節 結果

ウエステルマン肺吸虫感染犬の段階希釈血清を用いた、3種肺吸虫抗原に対するOD値を図5-Aに示す。いずれの血清希釈倍率においても、ウエステルマン肺吸虫抗原に対するOD値は他の2種抗原に対するものよりも有意に高かった ($P < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test)。このとき、宮崎肺吸虫抗原および大平肺吸虫抗原に対するOD値に差は認めなかった。また、ウエステルマン肺吸虫抗原に対するOD値と宮崎肺吸虫抗原に対するOD値の比率は、血清希釈倍率の低い順(250、1,000、4,000および16,000倍)に、1.46、2.43、3.71および4.03であり、大平肺吸虫抗原に対するOD値との比率は1.66、2.46、3.44および4.19であった。

宮崎肺吸虫実験感染犬については、1検体のみの測定であるが、感染虫種抗原に対して他の2種抗原よりもOD値が高い傾向がみられた(図5-B)。

大平肺吸虫実験感染犬について、3検体の中央値(および最低-最大値)を図5-Cに示した。宮崎肺吸虫および大平肺吸虫抗原に対するOD値にはほとんど差はみられなかった。またウエステルマン肺吸虫抗原に対するOD値との間では、やや高い傾向にあった。

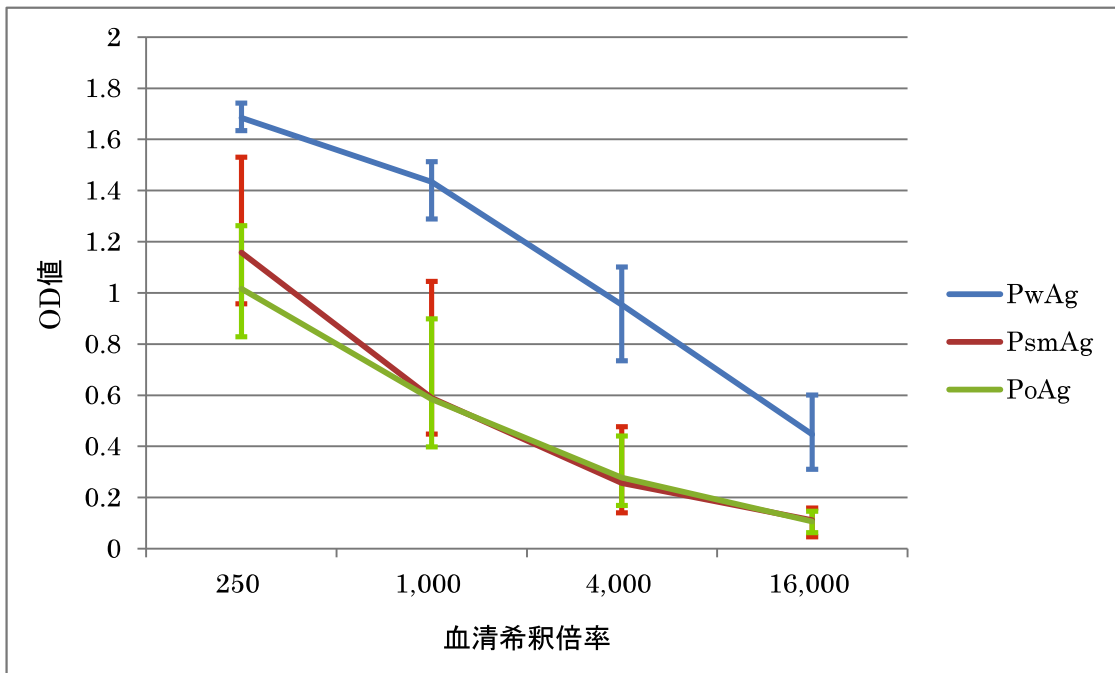


図 5-A ウエステルマン肺吸虫抗原 (PwAg)、宮崎肺吸虫抗原 (PsmAg) および大平肺吸虫抗原 (PoAg) に対するウエステルマン肺吸虫感染犬 (10 頭) の段階希釈血清の OD 値の中央値
エラーバー: 四分位数

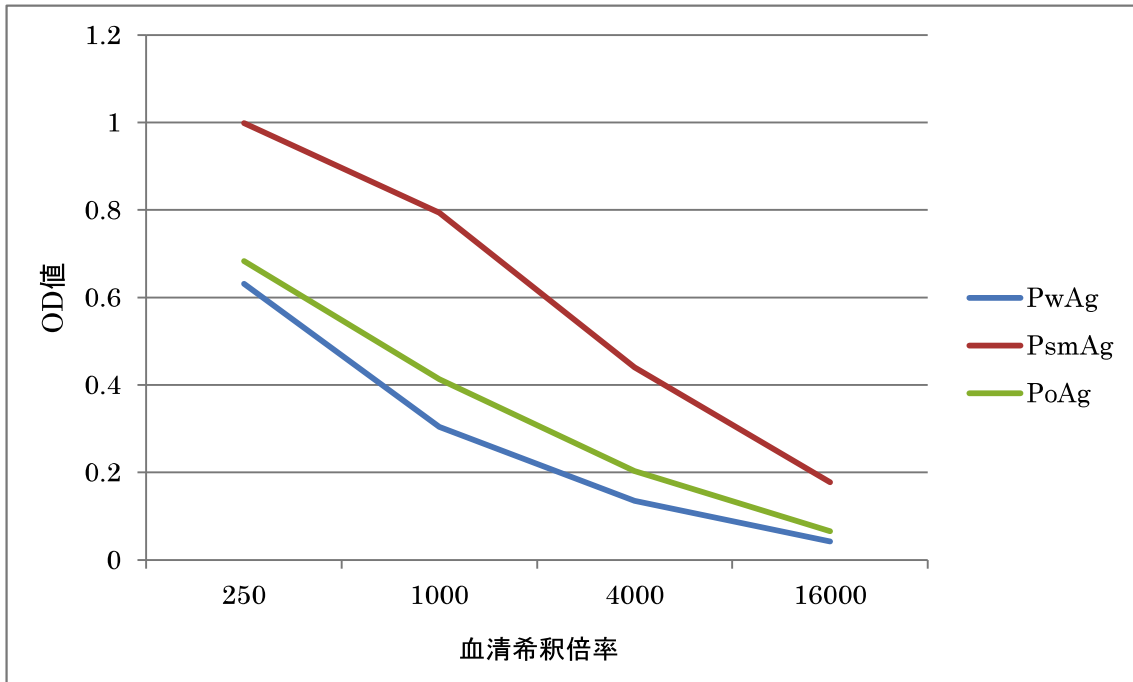


図 5-B PwAg、PsmAg および PoAg に対する宮崎肺吸虫感染犬 (1 頭) の段階希釈血清の

OD 値

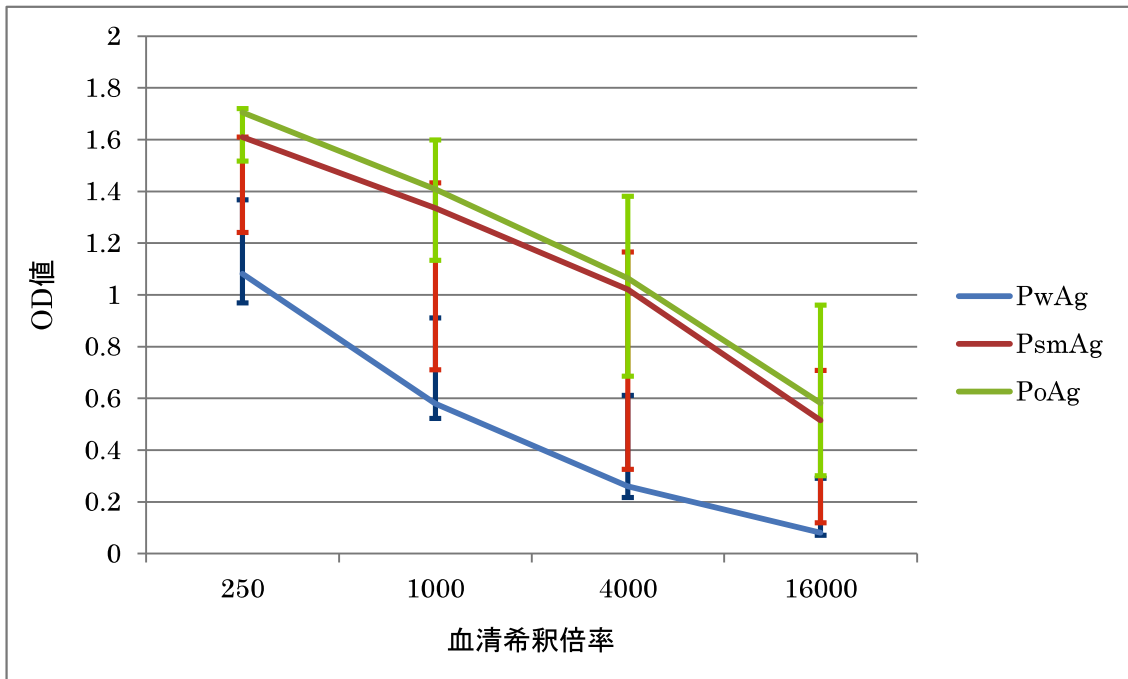


図 5-C PwAg、PsmAg および PoAg に対する大平肺吸虫感染犬 (3 頭) の段階希釈血清の

OD 値の中央値

エラーバー: 最小-最大値

第4節 考察

ウエステルマン肺吸虫感染の確認された犬血清を段階希釈し、国内に分布する3種肺吸虫抗原に対する反応性の差を評価した。その結果、先の報告が示す通り、原因虫種抗原に対し強い反応性を示した (Knobloch, 1984; Waikagul, 1989)。特にその差は、今回設定した希釈倍率の範囲内では、希釈倍率が高くなるほど大きくなった。

このことから、スクリーニング ELISA において抗体陽性であった検体について、本法を用いることで、虫卵陰性の例であってもウエステルマン肺吸虫感染を推定できる可能性が示唆された。一方で、今回用いた検体は、現在の感染が明らかである個体(虫卵排出期の最中)由来の血清であるため、今回の結果が示すような顕著な差が得られた可能性がある。少数感染時や虫卵非排出期において、本法がどの程度有効であるか検証する必要があると考えられる。今後、可能であれば実験感染により、感染初期から時系列に沿って評価をすることで、本法の妥当性がより評価できるものと考えられる。また、虫卵不検出の抗体陽性犬血清など、実際の検体に対して試験をする中で、本法の妥当性および一般化するための基準について、さらに評価していく必要があると考えられる。

また、用いる肺吸虫種抗原間で抗体の反応性に差がみられたことから、種ごとに特異的な抗原が存在する可能性が考えられる。既に、肺吸虫の粗抗原を分子量ごとに分画し、患者血清との反応性を評価し、特異的な抗原について検討した報告もある (今井, 1979; Joo et al, 1989; Kong et al, 1998)。しかしながらこれらの報告においても、肺吸虫属の共通抗

原は示唆されているが、種ごとに特異的な抗原の発見には至っていない。今回使用した陽性対照犬血清について、各種肺吸虫抗原に対してウエスタンブロット法による反応性評価を実施したが、残念ながら種特異的な反応は得られなかった（未発表）。糖タンパク質などにも着目し、また抗原の調製方法を精査することで、ウエステルマン肺吸虫に特異的な抗原を発見することができれば、感染虫種の鑑別手段が飛躍的に改良できると期待される。

宮崎肺吸虫および大平肺吸虫感染犬血清についても、少数の検体についてはあるが同様の試験を実施した。その結果、宮崎肺吸虫に感染している場合には、ウエステルマン肺吸虫感染犬と同様に、原因虫種の抗原に対してのみ高い OD 値を示したことから、血清学的に感染虫種の判別に適用できる可能性がみられた。一方、大平肺吸虫に感染している場合には、ウエステルマン肺吸虫抗原に対しては反応性の差が得られる可能性はあるが、宮崎肺吸虫抗原に対しては大平肺吸虫抗原に対するものと同等の反応がみられた。この 2 種については、今回は予備的な検討であるため、今後これらの虫種が明らかなイヌの血清を蓄積し、さらに評価をした上で、鑑別に用いることができるかどうか判断していく必要がある。

第6章 近畿・中国・四国地方におけるイノシシ猟犬の肺吸虫感染状況調査

第1節 背景および目的

ここまでの研究により、宮崎県のイノシシ猟犬が高率にウエステルマン肺吸虫の感染機会を持つこと、それにより、本虫の分布を知るための指標として有効である可能性を示してきた。

本章では、過去の分布域として知られる西日本地域（中国、四国、近畿地方）におけるイノシシ猟犬の肺吸虫保有状況について、虫卵検出およびその DNA 解析による種同定、また前章の血清学的手法によるウエステルマン肺吸虫感染の推定を試み、西日本地域におけるウエステルマン肺吸虫の現在の分布を調査した。

あわせて、第2章で実施した猟犬の感染リスクに関する解析を、より詳細に行い、この調査地域内での感染原因について検討した。

第2節 材料および方法

6-2-1. 猟犬の血清および糞便検体

猟友会および各猟師たちの協力のもと、2009年から2010年の間に、西日本地域で131人のイノシシ猟師の飼育する441頭の猟犬から血液および糞便（直腸便）を採取した（中国地方: 131頭/53オーナー、四国地方: 105/33 および 近畿地方: 205/45）。使用までの間、血清は-30℃、糞便は4℃で保存し1ヵ月以内に使用した。

6-2-2. ウエステルマン肺吸虫感染犬の血清（陽性対照血清）

ウエステルマン肺吸虫感染犬の陽性対照血清として、第3章の調査においてウエステルマン肺吸虫感染が確認されたイノシシ猟犬 10 頭の血清を使用した。各血清は、使用までの間、 -30°C で保存した。

6-2-3. 各種肺吸虫の成虫

分子同定に用いるための各種肺吸虫成虫として、前述 2-2-2. の虫体を用いた。

6-2-4. スクリーニング ELISA

ウエステルマン肺吸虫抗原に対する抗体を前述 2-2-5. の手法により検出した。

6-2-5. 血清学的手法によるウエステルマン肺吸虫感染推定（serotyping ELISA）

前述5章の手法を参考に、猟犬のウエステルマン肺吸虫感染を推定した。まず判定の基準を設定するため、4,000 倍希釈にしたウエステルマン肺吸虫の陽性対照血清を用いて、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する OD 値（PwOD_v）、宮崎肺吸虫抗原に対する OD 値（PsmOD_v）、および大平肺吸虫抗原に対する OD 値（PoOD_v）を求めた。そして、PwOD_v - PsmOD_v および PwOD_v - PoOD_v の値を算出し、陽性対照血清 10 件の平均値を得た。

スクリーニング ELISA 陽性であった猟犬の血清について、同様に 4,000 倍希釈した検体での各種抗原に対する OD 値を求め、抗原間の OD 値の差が、陽性対照血清において得られた差の平均値よりも大きい場合、その猟犬の感染虫種をウエステルマン肺吸虫と推定することとした。

6-2-6. 糞便内虫卵検査

スクリーニング ELISA 陽性であった猟犬の糞便について、前述 1-2-7. による MGL 法の上層部を検査対象とした肺吸虫卵の検査（改良 MGL 法）を行った。虫卵陽性であった場合、簡易沈殿法により糞便から虫卵を精製した。回収した虫卵は 70%エタノールで固定し、使用まで室温で保存した。

6-2-7. 虫卵 DNA による肺吸虫種同定

2-2-7. の手法により、ITS2 領域の塩基配列を解析し、種の同定を行った。

6-2-8. 猟犬のオーナーへの猟犬の背景および飼育状況についての聞き取り調査

猟犬に関する以下の項目について猟犬オーナーに聞き取り調査を行った。

1) 犬の性別、2) 犬の年齢、3) 犬種（日本系、洋系およびMix）、4) 主な狩猟地点、5) 猟犬が淡水産カニやザリガニを捕食するのを見たことがあるか、6) 猟犬に対しイノシシの生

肉を給餌したことがあるか、7) 1年あたりのイノシシの生肉の給餌回数、8) 猟犬が猟の際にイノシシを捕食することがあるか、および 8) その頻度。

6-2-9. 抗体陽性に関わるリスク因子の解析

解析にあたり、調査地域をウエステルマン肺吸虫の検出状況により、2つの地域に分割して評価した。すなわち Pw⁺地域: 猟犬においてウエステルマン肺吸虫感染を検出した地域、Pw⁻地域: 猟犬におけるウエステルマン肺吸虫感染を示唆する結果の得られなかった地域(図 6)。

統計解析にあたっては、Microsoft Excel 2010 のプログラムであるエクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、猟犬の生物学的背景および飼育状況と抗体陽性状況との関係性を評価した。検定においては *P* 値が 0.05 より小さい場合を有意性ありとした。質的変数(性別、犬種、淡水産カニやイノシシの捕食経験、イノシシ生肉の給餌経験の有無)の抗体保有に対する関係はカイ二乗検定により検定し、オッズ比を求めた。量的変数(年齢、年あたりのイノシシ生肉給餌回数およびイノシシ捕食回数)については、抗体陽性犬群および陰性犬群に分け、各変数の中央値と四分位数を算出し、Mann-Whitney U test により検定を行った。

第3節 結果

6-3-1. イノシシ猟犬における抗肺吸虫抗体保有状況

オーナー131人に飼育される441頭のイノシシ猟犬のうち、195頭(44.2%)がスクリーニング ELISA において抗体陽性を示した。各オーナーは、1頭から12頭の猟犬を飼育しており、その平均は3.4頭であった。これらの猟犬オーナーのうち74.8%(98/131)において少なくとも1頭の抗体陽性犬が検出された。

6-3-2. 糞便内虫卵検査および肺吸虫種の分子同定

スクリーニング ELISA 陽性犬195頭のうち、改良 MGL 法により糞便から肺吸虫卵が検出されたのは28頭(14.4%)であった。このとき EPG は1から169であった。しかしながら、本法により検出された虫卵からは DNA の抽出が上手くいかなかったため、改めて簡易沈殿法により虫卵の回収を試みた。その結果、17検体についてのみ虫卵の回収に成功した。簡易沈殿法で虫卵が検出できなかったのは、いずれも改良 MGL 法において EPG の少ない検体であった(1-12 個/g)。

簡易沈殿法により虫卵を回収した17検体について、各検体1-3個の虫卵から個々に DNA を抽出し、ITS2 領域について増幅・解析を行った。各検体由来の複数個の虫卵について、虫卵間で塩基配列に差はみられず、今回の検査内では混合感染はみられなかった。猟犬17頭由来の虫卵 DNA は、ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の登録配列

に一致し、その内訳は 8、3 および 6 頭であった。

6-3-3. Serotyping によるウエステルマン肺吸虫感染の推定

ウエステルマン肺吸虫感染犬の血清を 4000 倍希釈して、3 種肺吸虫抗原に対する ELISA を行った際の OD 値は、PwODv、PsmODv、PoODv の順に 1.116、0.892、0.754 であった。このとき OD 値の差 (PwODv-PsmODv および PwODv-PoODv) は 0.224 および 0.362 であった。

この値以上の OD 値の差を判定基準として、スクリーニング ELISA 陽性の 195 頭の猟犬について Serotyping を実施したところ、11 頭の血清がウエステルマン肺吸虫抗原に対して他の 2 種抗原よりも高い OD 値を示した。このとき、OD 値の比率の中央値 (および最小・最大値) は PwODv/PsmODv で 1.82 (1.35-2.70)、PwODv/PoODv で 2.39 (1.66-3.30) であった。これにより、11 頭の猟犬 (うち 4 頭は虫卵においてもウエステルマン肺吸虫感染と特定) について、血清学的にウエステルマン肺吸虫感染であることが推定された。

6-3-4. ウエステルマン肺吸虫の分布域に関する推定

猟犬オーナーへの聞き取りにより、調査対象であった猟犬がイノシシ猟を主に行っていた地点は共通する場所も多く、33 地点に分けることができた。それぞれの猟犬はこの 33 地点において肺吸虫感染を受けたと仮定し、この地域分けをもとに、ウエステルマン肺吸

虫の現在の分布域の推定に用いた。狩猟地点ごとに分けられた猟犬頭数は 2 から 35 頭であり、平均 13.4 頭であった。

ウエステルマン肺吸虫感染が示唆された猟犬（8 頭は虫卵 DNA、7 頭は Serotyping による）は、33 の狩猟地点のうちの 7 地点で猟をしている個体であった。この 7 地点は、近畿地方および島を除く中国地方に位置しており、これらの範囲をひとまとめにして、ウエステルマン肺吸虫の分布が示唆される Pw^+ 地域を設定した（図 6）。この範囲から除かれた地域、すなわち虫卵 DNA および Serotyping のいずれにおいてもウエステルマン肺吸虫感染が検出されなかった地域を Pw^- 地域とした。

猟犬から宮崎肺吸虫卵が検出された狩猟地点は 2 地点、大平肺吸虫卵が検出されたのは 4 地点であった。いずれの狩猟地点においても、2 種以上の肺吸虫の分布を示唆する結果は得られなかった。

6-3-5. 抗体保有に関連する猟犬のリスク因子

Pw^+ 地域および Pw^- 地域において猟をする猟犬の頭数は、それぞれ 295 頭および 146 頭であった。それぞれの地域について、抗体保有に関連する質的変数をカイ二乗検定により評価した（表 7）。その結果、 Pw^+ 地域において、猟犬に対するイノシシ生肉の給餌経験が抗体保有に対して有意な関連を示し、このときオッズ比は 3.35 であった。一方で、狩猟時の猟犬のイノシシ捕食の有無は、抗体保有に対して関連を示さなかった。また、 Pw^- 地域

においては、抗体保有に有意に関連する質的変数は得られなかった。

各地域について、聞き取り調査を実施した量的変数について、抗体陽性犬および陰性犬に分けて中央値を求めた（表 8）。Pw⁺地域において、猟犬に対するイノシシ生肉の給餌頻度が抗体陽性犬において有意に高く、また年齢構成も抗体陽性犬において高かった。

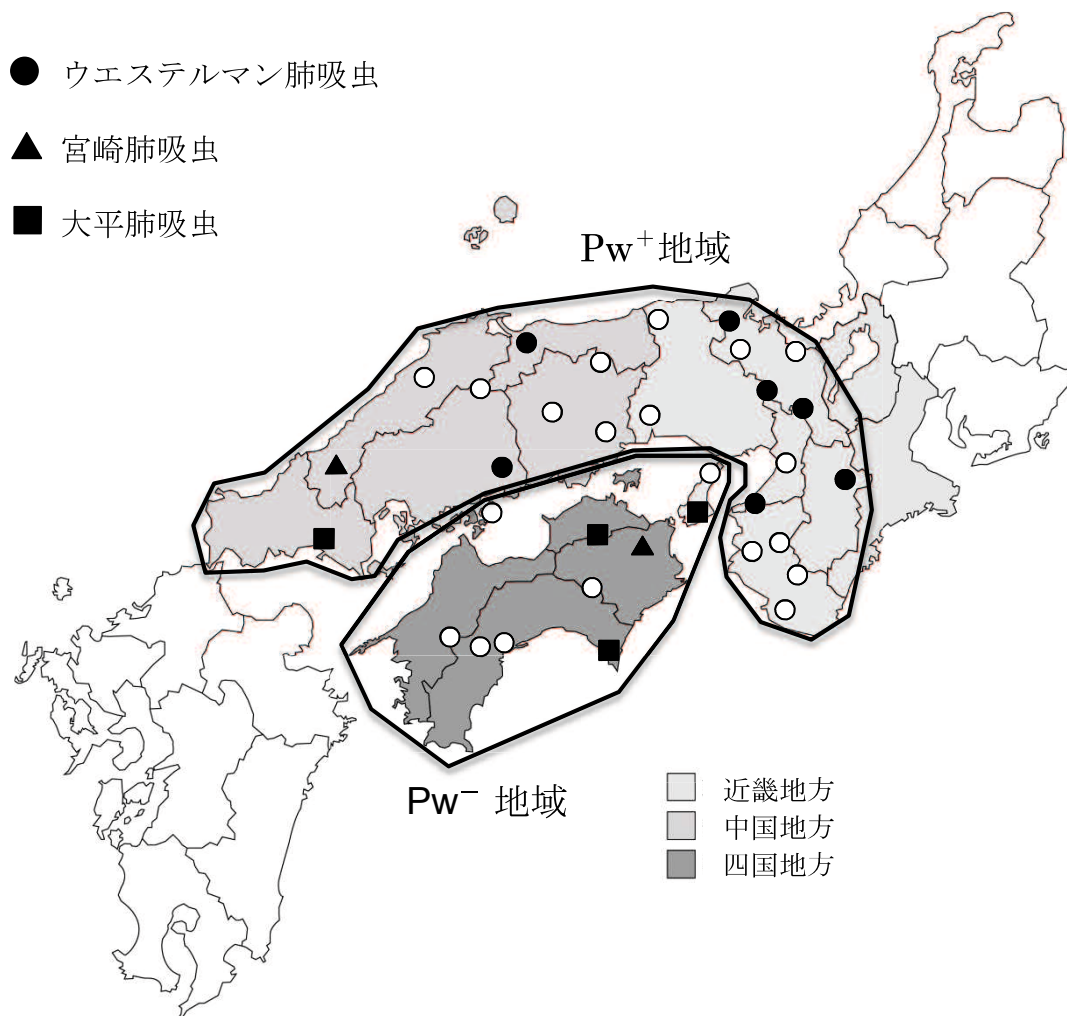


図6 主な狩猟地点の位置および猟犬から検出された肺吸虫種

○: 感染肺吸虫種が特定できなかった地点, ●: ウエステルマン肺吸虫感染犬が検出された地点, ▲: 宮崎肺吸虫感染犬が検出された地点, ■: 大平肺吸虫感染犬が検出された地点,
Pw⁺地域: ウエステルマン肺吸虫が分布すると想定される地域, Pw⁻地域: ウエステルマン肺吸虫感染犬が検出されていない地域

表 7 ウエステルマン肺吸虫感染犬の検出地域 (Pw⁺ 地域) および非検出地域 (Pw⁻ 地域) における抗体保有に関連する猟犬の背景および飼育状況に関する質的変数ごとの関連性

変数	項目	Pw ⁺ 地域		Pw ⁻ 地域	
		抗体陽性率 (陽性頭数/検査頭数)	オッズ比	抗体陽性率 (陽性頭数/検査頭数)	オッズ比
性別	オス	39.3 (66/168)	0.90	51.9 (41/79)	0.99
	メス	41.7 (53/127)		52.2 (35/67)	
犬種	日本系	41.0 (71/173)	0.83, 1.36, 1.64 ^{a)}	60.0 (33/55)	2.00, 1.59, 0.79 ^{a)}
	洋系	45.6 (26/57)		42.9 (9/21)	
	Mix	33.9 (22/65)		48.6 (34/70)	
第二中間宿主の捕食経験	有	None	NE	50.0 (6/12)	0.91
	無	40.3 (119/295)		52.2 (70/134)	
イノシシ生肉の給餌経験	有	49.2 (97/197)	3.35*	55.0 (60/109)	1.61
	無	22.5 (22/98)		46.2 (16/37)	
イノシシの捕食経験	有	46.7 (57/122)	1.57	44.4 (20/45)	0.64
	無	35.8 (62/173)		55.4 (56/101)	

a): オッズ比を算出した組み合わせは日本系・洋系、日本系・Mix、洋系・Mix の順

*: カイ二乗検定による有意性 ($P < 0.01$)

NE: not evaluated

表 8 ウエステルマン肺吸虫感染犬の検出地域 (Pw⁺地域) および非検出地域 (Pw⁻地域)

における抗体陽性犬および陰性犬ごとの猟犬の背景および飼育状況に関する量的変数ごとの中央値 (および四分位数)

変数	Pw ⁺ 地域		Pw ⁻ 地域	
	抗体陽性犬	陰性犬	抗体陽性犬	陰性犬
	119 頭	176 頭	76 頭	70 頭
年齢 (年)	4 (2.5-7) *	3 (2-6)	4 (3-7)	4 (2-6)
イノシシ生肉の給餌回数/年	10 (5-48) **	3 (0-15)	10 (4.5-20)	10 (0-30)
イノシシの捕食回数/年	0 (0-4.9)	0 (0-10)	0 (0-0.5)	0 (0-0.8)

抗体陽性犬および陰性犬の間で Mann-Whitney U test による有意性 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

第5節 考察

本研究により、九州地方における過去の報告と同様に (Kirino et al., 2009)、西日本地域のイノシン猟犬において、肺吸虫抗原に対する抗体の高率な保有状況 (44.2%) が示された。今回用いた ELISA 法については、ヒトの肺吸虫症においてよく検討されており (Nawa, 1998; Nakamura-Uchiyama et al., 2001)、イヌに対しても、過去の報告 (Kirino et al., 2009)、および前述第2章の研究結果から、十分に肺吸虫感染のスクリーニングとして機能すると考え、本研究ではウエステルマン肺吸虫の虫体粗抗原を用いた ELISA 法を採用した。一方で、肺吸虫種間での抗原の交差性についても知られており (万納寺, 1952; Joo et al., 1989; Dekumyoy et al., 1998)、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する ELISA 陽性が常に本種の感染のみを示すわけではない。実際に本研究のスクリーニング検査陽性犬の中にも、虫卵 DNA の解析により、宮崎肺吸虫および大平肺吸虫の感染であることが示されたイヌが検出されている。

ウエステルマン肺吸虫感染のみに着目すると、虫卵 DNA により本種の感染が示されたイヌは8頭のみであり、現在の分布域を推定するには不十分であった。そこで、前述6章による血清学的な鑑別法を用いて、本種感染を示唆する犬を探索した。その結果、虫卵陰性であった猟犬のうち7頭について、血清学的にウエステルマン肺吸虫感染が推定された。これにより、合計で15頭の猟犬 (調査頭数全体の3.4%) がウエステルマン肺吸虫の感染を受けていることを示した。イヌの肺吸虫症に関する国内での調査報告は限られているも

の、1950年代半ばに長崎県で実施された疫学調査では、野犬の解剖検査により0.6% (6/1005) から本種の虫体が検出されている (田中ら, 1955)。本研究で用いた虫卵検出・同定法および血清学的手法による本種寄生虫感染の推定は、解剖検査による虫体検出に比べ感度が劣るであろうことも加味すると、今回示されたイノシシ猟犬における本種保有状況は比較的高率であると推定される。

ウエステルマン肺吸虫感染が示唆された15頭の猟犬は、近畿および中国地方の7地点を猟場としていた (Pw⁺地域)。この地域内のイヌについて抗体保有のリスク因子を評価したところ、狩猟時のイノシシ捕食は抗体保有に影響を示さない一方で、猟犬オーナーによるイノシシ生肉の給餌経験が有意に抗体保有に関与を示した。加えて、そのような給餌の頻度が抗体陽性犬において有意に頻回であったことから、イノシシ猟犬におけるウエステルマン肺吸虫感染には、イノシシ生肉の給餌という人為的な活動が重要なリスク因子であることが示唆された。この地域内で年齢因子も抗体保有に相関性を示したが、これは高齢のイヌほどこのような感染機会をより高頻度に持っていたためであると考えられる。また、先に示した野犬における感染率よりも (田中ら, 1955)、本調査対象犬における感染状況が高率であることは、当時は九州北西部ではイノシシの分布は薄く (環境省, 2004)、また本研究の示すような待機宿主を介した感染とは異なる経路 (第二中間宿主を介した感染経路) が主流であった可能性、および猟犬オーナーによるイノシシ生肉給餌という人為的な感染機会が原因であるためと考えると理解しやすい。

近年、国内のヒトのウエステルマン肺吸虫感染に関して、イノシシ肉の摂食経験を伴う症例が増加している (Nagayasu et al., 2015)。本調査の結果も、動物への本種感染経路としてのイノシシ肉の関与を示すものである。また実際に九州産のイノシシにおいては、血清学的に 74.6% (44/59) が抗ウエステルマン肺吸虫抗体陽性だったという報告や (Kawanaka et al., 1999)、筋肉の消化検査により 33% (15/45) からウエステルマン肺吸虫幼若虫 (2 倍体および 3 倍体の両者) を検出した報告がある (杉山ら, 2016)。国内においては年間 15 万頭ものイノシシが狩猟されており、有害捕獲数もあわせると合計 41 万頭にも上る (環境省, 2013)。これらの肉は、市場やインターネット通信販売を通じて流通するようになり、消費者が比較的手軽に入手できる状況にある。そのため、イノシシ肉におけるウエステルマン肺吸虫感染のリスクについて十分に周知し、摂食においては、凍結保存もしくは加熱調理を徹底するなどの啓蒙が重要である。

なお、今回の調査では四国地方においてはウエステルマン肺吸虫の分布を示唆する結果は得られなかった。四国地方では、少なくとも 1970 年代までは本種肺吸虫症のヒト患者が確認されているが (西田・柴原, 1999)、現在の分布は不明である。本研究において四国地域で調査対象となった猟犬は 105 頭であり、このうち 1 頭は宮崎肺吸虫、4 頭は大平肺吸虫に感染していた。本調査全体でもウエステルマン肺吸虫感染が示唆された猟犬は 3.4% のみであったこと、および猟犬の本種感染はオーナーによる人為的要因が強く関わることから、調査対象を他のオーナーの飼育する猟犬にも拡大し、四国地方にウエステルマン肺

吸虫が分布しているかどうか判断していく必要があるだろう。また、中国地方西部および近畿地方南部においても、ウエステルマン肺吸虫感染を示唆する猟犬は検出されなかったことから、現在のウエステルマン肺吸虫の分布地域をより正確に判定するために、これらの地点についても追加の調査が必要と考えられる。

結論として、西日本のうち、近畿および中国地方で活動する猟犬においてウエステルマン肺吸虫感染が検出された。この地域では、猟犬へのイノシシ生肉の給餌という人為的行為が本種感染の最も重要なリスク因子であると考えられた。イノシシ猟犬は猟の際には自由に山地を行動するため、前述3章でも示したように、肺吸虫感染を受けている猟犬は、その地域に虫卵を散布する終宿主動物として肺吸虫の伝播を促進してしまう危惧がある。このような猟犬がウエステルマン肺吸虫の生活環維持に関わる終宿主として機能する可能性が高いことから、積極的に検査、駆虫を行い、また訓練などで人為的にイノシシ肉を給餌する際には、一度凍結し幼若虫を不活化させるなど、イノシシ猟犬を介した伝播経路によるウエステルマン肺吸虫の生活環を断ち切る終宿主対策が必要と考えられる。

総括

現在の西日本における肺吸虫症の流行状況の把握、特にウエステルマン肺吸虫症の流行に関わるリスク因子の特定を目的に、宮崎県下のイノシン猟犬を指標とした調査の妥当性評価、検査手法の検討、駆虫方法の検討、そしてより広域の西日本での調査を実施した。

まず、糞便内の虫卵検査法として一般的に用いられる MGL 法について、その集卵効率を評価したところ、他の蠕虫類の虫卵の動態とは明らかに異なり、エーテル糞便層に大多数の肺吸虫卵が捕捉され、沈渣の検査では検出感度が悪いことが明らかとなった。検査感度の向上には、鏡検対象を沈渣ではなくエーテル糞便層とすること、もしくは集卵操作時に界面活性剤を添加することで著しく改善されることを示した。

次に、西日本での肺吸虫症疫学調査に先立っての予備的検討として、宮崎県内のイノシン猟犬を対象に血清疫学調査、糞便内虫卵検査、および猟犬の生物学的背景と飼育状況の聞き取り調査などを行い、猟犬の抗肺吸虫抗体保有に関連するリスク因子の推定を行った。その結果、55% (55/100) の猟犬がウエステルマン肺吸虫抗原に対して抗体陽性を示し、また虫卵陽性犬 9 頭からの虫卵 DNA の解析により、感染虫種がウエステルマン肺吸虫 (6 頭)、宮崎肺吸虫 (2 頭) および大平肺吸虫 (1 頭) であることを示した。イヌにおいては、国内に分布するこれら 3 種の肺吸虫すべての終宿主となり得ることは知られていたが、検出例は限られており、今回のイノシン猟犬における高い感染率が示唆された。なお、ウエステルマン肺吸虫抗原に対する抗体陽性であっても、肺吸虫種間での交差反応性が確認さ

れ、感染虫種の鑑別法が必要であることが予想された。抗体保有を指標にした感染リスク因子については、猟犬オーナーのうち 85.1%が飼育する猟犬は、イノシシ生肉の給餌もしくは猟の際にイノシシを捕食する機会を持っており、特にイノシシ生肉を給餌される猟犬は給餌を受けない猟犬に対して有意に感染率が高いことが示唆された。このことから、猟犬における肺吸虫感染にはイノシシ肉の摂食が関連していると考えられた。

宮崎県内でウエステルマン肺吸虫感染犬が飼育されていたある小さな地域で第二中間宿主（サワガニ）の調査をしたところ、ウエステルマン肺吸虫のメタセルカリアが多数検出された。猟犬由来の虫卵とメタセルカリアの遺伝子配列（COI 領域）が一致したことから、猟犬が終宿主として働き、本種寄生虫の生活環維持に関与していることが考えられた。これらの猟犬に対する投薬治療は、虫卵の供給源となることを防ぐために重要な対策であるため、イヌに対する肺吸虫駆虫法として、プラジカンテルの用量の検討を行った。その結果、これまで一般的に適用されていた用量（75 mg/kg x 3 day）よりもはるかに低用量（20 mg/kg x 1 day）で十分な駆虫効果が得られることが期待された。今後さらに試験頭数を増やしての検証が必要であるが、患畜の治療のみならず、猟犬に対する定期駆虫時の負担軽減が図れるものと考えられる。

上述したように、宮崎県内での調査から、猟犬における感染肺吸虫種鑑別の必要性が示されたが、糞便内に虫卵が検出される例数は多くはないことから、より多数頭での虫種鑑別を可能とするため、血清を用いた感染虫種鑑別法について検討した。その結果、ウエス

テルマン肺吸虫感染を受けている場合には、他種の肺吸虫抗原に対してよりも原因虫種抗原に対して高い抗体価（OD 値）がみられることを示した。この特徴を利用することで、虫卵を排出していない場合であってもウエステルマン肺吸虫感染を血清学的に推定できる可能性を示唆した。

上記の血清および糞便内虫卵検査法を用いて、中国、四国、近畿地方のイノシシ猟犬 441 頭における肺吸虫症の流行状況調査を実施した。その結果、195 頭（44.2%）が血清検査で陽性を示し、さらにそのうち 15 頭（3.4%）はウエステルマン肺吸虫感染であることが推定された。狩猟を行う地域別に検討したところ、これらのイヌは中国および近畿地方内で猟に参加しており、この地域内の猟犬について、イノシシの生肉をオーナーにより給餌されることが、抗体保有の特に重要なリスク因子であることが明らかとなった（オッズ比 3.35）。猟犬におけるウエステルマン肺吸虫陽性率が過去に野犬において報告されているものよりも高いことから、イノシシ生肉の給餌という人為的な活動により、本種肺吸虫の生活環が維持されていると考えられた。本種肺吸虫症の流行制御のためには、猟犬については積極的に検査、駆虫を行い、また訓練などで人為的にイノシシ肉を給餌する際には、一度凍結し幼若虫を殺滅させるなど、イノシシ猟犬を介した伝播経路によるウエステルマン肺吸虫の生活環を断ち切る終宿主対策が必要と考えられた。

本研究を通じて、西日本の広い範囲に依然としてウエステルマン肺吸虫が分布していること、およびその生活環の維持にイノシシ猟犬が重要であることが示唆された。このこと

は、猟犬の管理だけでなく、公衆衛生学的にも重要な知見であり、ヒトの感染予防のためにも、流行地域においてはイノシシ肉を摂食する際には十分な加熱をするなどの対策を啓蒙することが重要であると考えられた。

謝辞

本研究および論文の作成をすすめるにあたり、懇切なご指導およびご助言を頂いた鳥取大学農学部共同獣医学科病態獣医学講座獣医寄生虫病学研究室 奥祐三郎教授、宮崎大学農学部獣医学科獣医寄生虫病学研究室 野中成晃教授、宮崎大学 堀井洋一郎名誉教授、宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野 丸山治彦教授、山口大学農学部獣医学科臨床寄生虫学講座獣医寄生虫病学研究室 佐藤宏教授、福岡大学医学部医学科微生物学・免疫学講座 波部重久講師、Khon Kaen University, Tropical Diseases Research Center 名和行文教授に厚く感謝の意を表します。

虫卵検査法の改良にあたり、肝吸虫および横川吸虫の虫卵を分与くださいました北里大学医学部寄生虫学/国際寄生虫制御学研究室の中村健講師ならびに坪川大悟助教に御礼申し上げます。

宮崎県内の調査にあたり猟犬血液の入手にご協力いただきましたパソベッツこじま 小島聖獣医師、および やの動物病院 矢野安正獣医師、岩田義男氏に深謝いたします。

西日本における肺吸虫疫学調査にあたり、検体を提供くださったイノシシ猟師の皆様、猟友会の皆様、調査のコーディネーターに多大なご尽力をいただきました奥野正幸氏に感謝します。

調査および測定にあたりご協力を頂いた宮崎大学農学部獣医寄生虫病学研究室の皆様、および諸々の事務を担当頂いた本田奈穂子女史に感謝します。

参考文献

- Abebe R, Abunna F, Berhane M, Mekuria S, Megersa B, Regassa A (2010) Fasciolosis: Prevalence, financial losses due to liver condemnation and evaluation of a simple sedimentation diagnostic technique in cattle slaughtered at Hawassa Municipal abattoir, southern Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal* 14: 39-51
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402
- Ahmadi NA, Damraj F (2009) A field evaluation of formalin-gasoline technique in the concentration of stool for detection of intestinal parasites. *Parasitology Research* 104: 553-557
- 芦沢広三・野坂 大・村上隆之・波部重久・林 俊春 (1974) タヌキの肺吸虫症の1例：肺および付属リンパ節の病理学的所見. 宮崎大学農学部研究報告 21: 123-133
- 芦沢広三・村上隆之・桐木康充・野坂 大・立山 晋・波部重久 (1976) 宮崎県下に生息するテンの肺吸虫自然感染状況について：昭和50年度猟期における成績. 宮崎大学農学部研究報告 23: 395-401
- 芦沢広三・村上隆之・波部重久・野坂 大・立山 晋 (1977) 宮崎肺吸虫が寄生するアナグマ肺の病理学的所見. 宮崎大学農学部研究報告24: 255-264

芦沢広三・波部重久・村上隆之・野坂 大・立山 晋 (1980) アナグマの肺吸虫感染例について. 宮崎大学農学部研究報告 27: 55-62

Blair D, Xu ZB, Agatsuma T (1999) Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Advances in Parasitology* 42: 113-222

Blair D, Agatsuma T, Wang W (2007) Paragonimiasis. In: Murrell KD, Fried B (eds) *World Class Parasites: volume 11. Food-borne parasitic zoonoses. Fish and plant-borne parasites*. Springer, New York, pp 117-150

Bowles J, Blair D, McManus DP (1995) A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 103-109

Bowman DD, Frongillo MK, Johnson RC, Beck KA, Hornbuckle WE, Blue JT (1991) Evaluation of praziquantel for treatment of experimentally induced paragonimiasis in dogs and cats. *American Journal of Veterinary Research* 52: 68-71

Cho SY, Kim SI, Kang SY, Kong Y, Han SK, Shim YS, Han YC (1989) Antibody changes in paragonimiasis patients after praziquantel treatment as observed by ELISA and immunoblot. *Korean Journal of Parasitology* 27: 15-21

Cho SY, Kong Y, Yun DH, Kang SY, Kim LS, Chung YB, Yang HY (2000) Persisting antibody reaction in paragonimiasis after praziquantel treatment in elicited

mainly by egg antigens. Korean Journal of Parasitology 38: 75-84

Conceição MAP, Durão RM, Costa IH, Costa JMC (2002) Evaluation of a simple sedimentation method (modified MacMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis.

Veterinary Parasitology 105: 337-343

Dekumyoy P, Waikagul J, Eom KS (1998) Human lung fluke *Paragonimus heterotremus*: differential diagnosis between *Paragonimus heterotremus* and *Paragonimus westermani* infections by EITB. Tropical Medicine and International Health 3: 52-56

Doanh PN, Shinohara A, Horii Y, Habe S, Nawa Y, The DT, Le NT (2007) Morphological and molecular identification of two *Paragonimus* spp., of which metacercariae concurrently found in a land crab, *Potamiscus tannanti*, collected in Yenbai Province, Vietnam. Parasitology Research 100: 1075-1082

Doanh PN, Dung DT, Thach DTC, Horii Y, Shinohara A, Nawa Y (2011) Human paragonimiasis in Viet Nam: epidemiological survey and identification of the responsible species by DNA sequencing of eggs in patients' sputum. Parasitology International 60: 534-537

Duthaler U, Rinaldi L, Maurelli MP, Vargas M, Utzinger J, Cringoli G, Keiser J (2010) *Fasciola hepatica*: Comparison of the sedimentation and FLOTAC techniques for

the detection and quantification of faecal egg counts in rats. *Experimental Parasitology* 126: 161-166

Fan PC, Lu H, Lin LH (1998) Egg production capacity of *Paragonimus pulmonalis* in cats. *Journal of Parasitology* 84: 1282-1285

Fried B, Abruzzi A (2010) Food-borne trematode infections of humans in the United States of America. *Parasitology Research* 106: 1263-1280

Glinz D, Silue KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, Rinaldi L, Cringoli G, N'Goran EK, Utzinger J (2010) Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4: e754

Goodman D, Haji HJ, Bickle QD, Stoltzfus RJ, Tielsch JM, Ramsan M, Savioli L, Albonico M (2007) A comparison of methods for detecting the eggs of *Ascaris*, *Trichuris*, and hookworm in infant stool, and the epidemiology of infection in Zanzibari infants. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 725-731

波部重久・芦沢広三・斉藤哲郎 (1977) アナグマ、イヌおよびブタから得た肺吸虫の種類. *寄生虫学雑誌* 26: 63-66

- Habtamu A, Mariam SW (2011) Repeated simple sedimentation technique and prevalence of bovine schistosomiasis in selected sites of Bahir Dar woreda. Ethiopian Veterinary Journal 15: 49-57
- Hunter 3rd GW, Hodges EP, Jahnes WG, Diamond LS, Ingalls Jr JW (1948) Studies on schistosomiasis. II. Summary of further studies on methods of recovering eggs of *S. japonicum* from stool. Bulletin of the U. S. Army Medical Department 8: 128-131
- 今井淳一 (1979) ウエステルマン肺吸虫の抗原分析に関する研究 : 2. 成虫分画抗原の免疫反応について. 熱帯医学 21: 45-55
- 一色於菟四郎 (1954) *Paragonimus iloktsuenensis* Chen (小型大平肺吸虫) の犬における一自然感染例. 浪速大学紀要 農学・自然科学 (動物・植物) 3: 61-74
- Itoh M, Sato S (1990) Multi-dot enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of trematodiasis. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 21: 471-474
- Itoh N, Ito Y, Kato A, Kanai K, Chikazawa S, Hori Y, Hoshi F, Higuchi S (2013) Prevalence of intestinal parasites in pet shop kittens in Japan. Journal of Feline Medicine and Surgery 15: 908-910
- Janeau G, Cargnelutti B, Cousse S, Hewison M, Spitz F (1995) Daily movement

pattern variations in wild boar (*Sus scrofa* L.). *Journal of Mountain Ecology* 3:
98-101

Joo CY, Ahn SH, Park YC (1985) Epidemiological survey of *Paragonimus westermani*
in Ulchin county, Kyungpook Province, Korea. *Korean Journal of Parasitology*
23: 102-110

Joo KH, Ahn H, Chung MS, Rim HJ (1989) Demonstration of species-specific and cross
reactive components of *Paragonimus westermani* crude worm antigen by EITB.
Korean Journal of Parasitology 27: 9-14

環境省(2004) 第 6 回自然環境保全基礎調査. 種の多様性調査 哺乳類分布調査報告書.
http://www.biodic.go.jp/reports2/6th/6_mammal/index.html. (アクセス日: 2018
年 1 月 26 日)

環境省(2013) 平成 25 年度 鳥獣統計. 狩猟者登録を受けた者による捕獲鳥獣数. および
都道府県知事の捕獲許可による捕獲鳥獣数 (4) 有害鳥獣捕獲.
<https://www.env.go.jp/nature/choju/docs/docs2/h25/06h25tou.html>. (アクセス日:
2016 年 4 月 20 日)

片峰大助・本村主生(1962) 長崎県のイタチから得た肺吸虫に就いて. *長崎大学風土病紀要*
4: 120-124

片峰大助・坂口祐二・井上俊一郎・本村主生(1960) 天草島に於ける肺吸虫症の研究(1) 天

- 草町に於ける人肺吸虫症の調査. 長崎大学風土病紀要 2: 212-221
- 片峰大助・今井淳一・青木克己・野島尚武・村上文也(1972) 高知県幡多郡における肺吸虫感染の実態. 熱帯医学 14: 186-197
- Kawanaka M, Sugiyama H, Kato K (1999) Paragonimiasis acquired by eating boar meat: current status in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases 52: 49
- 木原滋陽 (1976) 寄生虫卵浮遊法の検討. 日本獣医師会雑誌 29: 203-208
- 木原滋陽・木原輝久・木原法子・樋口雅仁 (1980) ウエステルマン肺吸虫人工感染犬の糞便内 EPG および EPD の変動とその診断的意義. 日本獣医師会雑誌 33: 65-69
- Kirino Y, Nakano N, Hagio M, Hidaka Y, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Horii Y (2008) Infection of a group of boar-hunting dogs with *Paragonimus westermani* in Miyazaki Prefecture, Japan. Veterinary Parasitology 158: 376-379
- Kirino Y, Nakano N, Doanh PN, Nawa Y, Horii Y (2009) A seroepidemiological survey for paragonimosis among boar-hunting dogs in central and southern Kyushu, Japan. Veterinary Parasitology 161: 335-338
- Knobloch J (1984) Application of different *Paragonimus* antigens to immunodiagnosis of human lung fluke infection. Arzneimittel Forschung 34: 1208-1210
- Komiya Y, Yokogawa M (1953) The recovery of *Paragonimus* eggs from stools of paragonimiasis patients by the AMS III centrifugation technique. Japanese

Journal of Medical Science and Biology 6: 207-211

Kong Y, Ito A, Yang HJ, Chung YB, Kasuya S, Kobayashi M, Liu YH, Cho SY (1998)

Immunoglobulin G (IgG) subclass and IgE responses in human paragonimiasis caused by three different species. Clinical and Diagnostic Laboratory

Immunology 5: 474-478

Lee SK, Shin BM, Chung NS, Chai JY, Lee SH (1994) Second report on intestinal parasites among the patients of Seoul paik hospital (1984-1992). Korean Journal of Parasitology 32: 27-33 (in Korean with English Abstract)

Madarame H, Suzuki H, Saitoh Y, Tachibana M, Habe S, Uchida A, Sugiyama H (2009)

Ectopic (subcutaneous) *Paragonimus miyazakii* infection in a dog. Veterinary Pathology 46: 945-948

Maleewong W, Wongkham C, Pariyanonda S, Intapan P (1992) Analysis of antibody

levels before and after praziquantel treatment in human paragonimiasis heterotremus. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 10: 69-72

万納寺徳貞 (1952) 大平肺吸虫に関する研究補遺 その3, 大平肺吸虫の免疫学的研究. 医学研究 22: 1197-1224

丸山治彦 (2008) わが国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際. 日本薬理学雑誌 132: 292-296

丸山治彦・名和行文 (2007) 肺吸虫. 日本胸部臨床 66: 269-275

Min HK (1981) An epidemiological study on zoonoses in Korea. Korean Journal of Parasitology 19: 60-75 (in Korean with English Abstract)

三浦義徳 (1952) 肺吸虫の研究(1). 高知県下野犬に於ける肺吸虫症に就いて. 大阪医科大学雑誌 12: 144-151

Miyazaki I (1991) Paragonimiasis. In: Miyazaki I (ed) An illustrated book of helminthic zoonosis. International Medical Foundation of Japan, Tokyo, pp 76-146

Miyazaki I, Habe S (1976) A newly recognized mode of human infection with lung fluke, *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878). Journal of Parasitology 62: 646-648

Miyazaki I, Hirose H (1976) Immature lung flukes first found in the muscle of the wild boar in Japan. Journal of Parasitology 62: 836-837

Miyazaki I, Terasaki K, Iwata K (1978) Natural infection of muscle of wild boars in Japan by immature *Paragonimus westermani* (Kerbert 1878). Journal of Parasitology 64: 559-560

Nagayasu E, Yoshida A, Hombu A, Horii Y, Maruyama H (2015) Paragonimiasis in Japan: A twelve-year retrospective case review (2001-2012). Internal Medicine 54: 179-186

Nakamura-Uchiyama F, Onah DN, Nawa Y (2001) Clinical features of paragonimiasis

cases recently found in Japan: Parasite-specific immunoglobulin M and G antibody classes. *Clinical Infectious Diseases* 32: e171-e175

Nakamura-Uchiyama F, Mukae H, Nawa Y (2002) Paragonimiasis: a Japanese perspective. *Clinics in Chest Medicine* 23: 409-420

Nakamura-Uchiyama F, Hiromatsu K, Ishiwata K, Sakamoto Y, Nawa Y (2003) The current status of parasitic disease in Japan. *Internal Medicine* 42: 222-236

Nakano N, Kirino Y, Uchida K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Horii Y (2009) Large-group infection of boar-hunting dogs with *Paragonimus westermani* in Miyazaki Prefecture, Japan, with special reference to a case of sudden death due to bilateral pneumothorax. *Journal of Veterinary Medical Science* 71: 657-660

Nawa Y (1998) Histopathological and immunological diagnosis for parasitic zoonoses. In: Ishikura H, Aikawa M, Itakura H, Kikuchi K (eds) Host response to international parasitic zoonoses. Springer-Japan, Tokyo, pp 39-52

Nawa Y (2000) Re-emergence of paragonimiasis. *Internal Medicine* 39: 353-354

Nawa Y, Nakamura-Uchiyama F (2005) *Paragonimus* and paragonimiasis in Japan. In: Arizono N, Chai JY, Nawa Y, Takahashi Y (eds) Food-borne Helminthiasis in Asia, *Asian Parasitology* vol. 1. AAA committee/Federation of Asian Parasitologists, Chiba, pp 125-131

西田 弘 (1989) 肺吸虫の国内における分布と生態. 上本騏一・和田義人 (編) 病気の生物地理学. 病原・媒介動物の分布と種分化をめぐって. 東海大学出版会, 東京, pp 26-37

西田 弘・柴原壽行 (1999) 肺吸虫の疫学. 大鶴正満・亀谷 了・林 滋生 (編) 日本における寄生虫学の研究 7. 目黒寄生虫館, 東京, pp 189-203

Nkouawa A, Okamoto M, Mabou AK, Edinga E, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Blair D, Agatsuma T, Enyong P, Shibahara T, Moyou-Somo T, Ito A (2009) Paragonimiasis in Cameroon: molecular identification, serodiagnosis and clinical manifestations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 255-261

岡田 淳 (1959) 肺吸虫症の疫学的研究. 虫卵検出方法について. *日本衛生学雑誌* 13: 783-788

Ono S, Nagamachi S, Kusumoto S, Watanabe K, Imai J, Nawa Y (1992) A case of paragonimiasis *miyazakii* with cavitating lesions in lung: the first case found in Miyazaki Prefecture. *Japanese Journal of Parasitology* 41: 279-282

Park GM, Im KI, Yong TS (2003) Phylogenetic relationship of ribosomal ITS2 and mitochondrial COI among diploid and triploid *Paragonimus westermani* isolates. *Korean Journal of Parasitology* 41: 47-55

- Patel P, Chaudhary U, Chudasama RK (2013) Intestinal parasites prevalence and related factors in hospitalized children age upto 12 years with diarrhea in Surat, India. *Journal of Pediatric Sciences* 5: e183
- R Development Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>. (accessed 16.03.15)
- Ritchie LS (1948) An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the U. S. Army Medical Department* 8: 326
- Shaheen MA, Mahmoud MA, Abdel-Aziz MM, El-Morsy HI, Abdel-Khalik KA (2009) Sputum dipalmitoylphosphatidylcholine level as a novel airway inflammatory marker in asthmatic children. *Clinical Respiratory Journal* 3: 95-101
- Shibahara T, Nishida H (1985) An epidemiological survey of the lung fluke, *Paragonimus* spp. in wild mammals of the northern part of Hyogo Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Veterinary Science* 47: 911-919
- Shin M, Min D (1999) Infection status of *Paragonimus westermani* metacercariae in crayfish (*Cambaroides similis*) collected from Bogildo (Islet), Wando-gun, Chollanam-do, Korea. *Korean Journal of Parasitology* 37: 55-57
- Singh TS, Sugiyama H, Rangsiruji A (2012) *Paragonimus* and paragonimiasis in India.

Indian Journal of Medical Research 136: 192-204

Soh CT, Lee KT, Shin EW, Kang TC (1961) Incidence of parasites in Seoul area based on an examination of the severance hospital out-patients. Yonsei Medical Journal 2: 31-41

Songserm N, Promthet S, Wiangnon S, Sithithaworn P (2012) Prevalence and co-infection of intestinal parasites among Thai rural residents at high-risk of developing cholangiocarcinoma: A cross-sectional study in a prospective cohort study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 13: 6175-6179

菅野紘行・余戸庄作・深瀬 徹・茅根士郎・板垣 博 (1989) 愛媛県において認められた犬の肺吸虫症. 日本獣医師会雑誌 42: 495-498

杉山 広 (2010) 食品媒介寄生虫による食中毒. 日本食品微生物学会雑誌 27: 1-7

杉山 広・柴田勝優・川上 泰・御供田睦代・森嶋康之・山崎 浩 (2016) 野生鳥獣肉 (ジビエ)を介した肺吸虫症のリスク. Clinical Parasitology 27: 40-42

Sugiyama H, Sonoda J, Tomimura T, Nishida H (1983) Studies on the geographical distribution of the lung fluke, *Paragonimus westermani* (Kerbert. 1878) in the southern prefectures of the Kinki district, Japan: Observations on the incidence of encysted larvae of *P. westermani* in *Geothelphusa dehaani* in Higashi-Yoshino area, Nara prefecture. Japanese Journal of Veterinary Science 45: 227-236

Sugiyama H, Umehara A, Morishima Y, Yamasaki H (2009) Detection of *Paragonimus* metacercariae in the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani*, bought at retail fish markets in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases 62: 324-325

平 詔亨 (1997) 吸虫卵の検査法. 今井壯一, 神谷正男, 平 詔亨, 茅根士郎 (編) 獣医寄生虫検査マニュアル. 文永堂出版, 東京, pp 97-105

竹山晃市 (1962) 新淀川右岸地区の鼠類、犬、猫及びカニにおける小型大平肺吸虫保有状況. 衛生動物 13: 156

田中徳郎・瀬井義澄・釘田芳文 (1955) 長崎市内野犬の肺吸虫症自然感染例について. 長崎大学風土病研究所業績 4: 1491-1494

Thaenkham U, Waikagul J (2008) Molecular phylogenetic relationship of *Paragonimus pseudoheterotremus*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 39: 217-221

富村 保・小野忠相・荒川 皓 (1958) 大平肺吸虫感染犬糞便の E.P.G.および E.P.D.検査に関する研究. 寄生虫学雑誌 7: 503-513

Toscano C, Yu SH, Nunn P, Motto KE (1995) Paragonimiasis and tuberculosis, diagnostic confusion: a review of literature. Tropical Diseases Bulletin 92: 1-26

Truant AL, Elliott SH, Kelly MT, Smith JH (1981) Comparison of formalin-ethyl ether

sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 882-884

Uchiyama F, Morimoto Y, Nawa Y (1999) Re-emergence of paragonimiasis in Kyushu, Japan. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 30: 686-691

山口富雄・桜田淑子・南 幸論 (1988) 血清学的に大平肺吸虫症が疑われた症例. *寄生虫学雑誌* 37: 82

横川宗雄 (1955) 北米産肺吸虫 *Paragonimus kellicotti* に関する研究、特に糞便内虫卵排出状況. *寄生虫学雑誌* 4: 57-63

横川宗雄 (1958) 肺吸虫病. *内科の領域* 4: 239-246

Yokogawa M (1965) *Paragonimus* and paragonimiasis. *Advances in Parasitology* 3: 99-158

Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL (1979) Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in formalin-ether sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology* 10: 852-853

Waikagul J (1989) Serodiagnosis of paragonimiasis by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoelectrophoresis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine*

and Public Health 20: 243-251

Waree P, Polseela P, Pannarunothai S, Pipitgool V (2001) The present situation of paragonimiasis in endemic area in Phitsanulok Province. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 32: 51-54