

鮮魚に見出された寄生虫の形態学的観察とシーケンス解析による同定

阿部仁一郎、前原智史*、樫野雅弥*、大山み乃り

Identification of Parasites Found in Fresh Fish by Morphological and Sequencing Analyses

Niichiro ABE, Tomofumi MAEHARA*, Masaya KASHINO*, and Minori OHYAMA

Abstract

The usefulness of sequencing analysis for the identification of parasites found in fish was examined using 12 parasite samples (1 of microsporidia, 3 of mixozoa, 5 of cestoda, 1 of nematoda, and 2 of copepoda) from fresh marine and freshwater fish. Small and/or large subunit ribosomal RNA genes were successfully amplified in all samples using universal eukaryotic primers or parasite-specific primers. The results obtained from sequence similarity searches against nucleotide databases by using FASTA were identical to those obtained from light microscopy for every sample examined. In addition, a sequence similarity search was also helpful in terms of finding the closest-related parasites for samples for which we were unable to identify or speculate the species morphologically. In this study, we also showed new distributions and possibly identified new species, for some parasites. The following parasites were noted: *Spraguea americana* from an anglerfish, an unidentified and possibly new myxozoan parasite from a grouper, *Kudoa trachuri* from a Japanese jack mackerel, *Kudoa iwatai* from a bartail flathead, *Proteocephalus tetrastomus* from a Japanese smelt, *Parabothriocephalus segmentatus* and *Paraechinophalus japonicus* from a butterfish, *Tentacularia coryphaenae* from a Japanese amberjack, *Molicola thyristes* from a pelagic armorhead (new distribution record), *Philometroides seriolae* from a Japanese amberjack, an unidentified parasite (but speculated to be either *Lernentoma asellina* or *Chondracanthus lophii*) from an anglerfish, and *Lepeophtheirus salmonis* from a salmon.

Key words: fish parasites, morphological identification, sequencing analysis

I 緒言

現在の日本では多様な食材への嗜好が高まる中、食品の安全性を問う事件が相次いで発生し、消費者の「食」に対する衛生意識は高まっている。消費者が一目で分かる食品の異常の一つはそこに発見される異物であり、その同定と健康被害を及ぼす可能性に関する問合せが食品販売店やその検査センターなどに多数寄せられているのではないだろうか。一方、1997年の食品衛生法施行規則の一部改正に伴い、寄生虫を原因

とする飲食物を介した食中毒事件についても厚生労働省への届け出が義務づけられていることから[1]、行政サイドからの原因寄生虫の同定も求められている。

魚介類の生食を嗜好する日本では、そこに見られる寄生虫は最も目に留まりやすい異物の一つと考えられる。しかし魚介類には多種類の寄生虫が存在し、しかも大きさが数ミクロンから数センチ、形も多様性に富むことから、それらの同定には専門知識と観察経験が必要とされる。最近ではPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法を用いた虫種同定が医療機関や研究機関などで試みられており[2-9]、

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

*大阪市中央卸売市場食品衛生検査所

〒553-0005 大阪市福島区野田 1-1-86

Osaka Municipal Central Wholesale Market Food Sanitation Inspection Laboratory

1-1-86 Noda, Fukushima-ku, Osaka 553-0005, Japan

こうした手法は寄生虫の観察経験を必要とせず、また形態学的に類似した種間の鑑別に有効と考えられる。本稿では実際に鮮魚から検出された寄生虫の事例と、遺伝子検査による虫種同定法の有用性を報告する。

II 材料と方法

1) 検査に供した鮮魚由来の寄生虫

2010年3月～2011年5月に、大阪市中央市場の鮮魚取扱業者から同定依頼を受けた寄生虫と、大阪府下の小売店で購入した鮮魚に由来する寄生虫12種類(原虫4種、条虫5種、線虫1種、甲殻類2種)を検体とした。

2) 虫体の分離と形態観察

虫体とその寄生部位を撮影後、虫体を注意深く宿主組織から遊離させ、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を入れた遠沈管で軽く攪拌しながら複数回洗浄し、虫体周囲に付着した宿主組織片を可能な限り除去した。その後、甲殻類(検体番号11、12)については70%エタノールで固定しDNA抽出に供した。原虫類(検体番号1-4)についてはシストの一部をシャーレ内に取り出し、5cm×5cmの45メッシュをのせPBSを加えながらチップの柄部分などでメッシュを検体に押付け検体をほぐした。次にシャーレに適量のPBSを加え、検体をほぐした懸濁液を100メッシュのメンブレンユニットを通して50mL遠沈管に採取し、1500rpm×15分間の遠心操作で沈澱物を回収しDNA抽出と顕微鏡観察に供した。検体番号2(ヤイトハタの筋肉)については組織の一部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後にパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色後に病理組織像を観察した。線虫類(検体番号10)については、以前報告した方法[9]で虫体観察とDNA抽出を行った。すなわち、形態観察は加温した70%エタノールで固定後に虫体頭部をカバーガラスで切り離し、ラクトフェノール液で透過後に行った。またDNA抽出には固定後の虫体の他の部分を用いた。条虫類(検体番号5-9)についても以前報告した方法[9]で虫体観察とDNA抽出を行った。すなわち、虫体をスライドガラスで圧平し70%エタノールで一晩浸漬固定した。固定後にスライドガラスを外して虫体の一部をカバーガラスで切り離し、カーミン染色後に顕微鏡観察を行った。DNA抽出には虫体の他の部分を用いた。

3) DNA抽出、PCR、シーケンス解析

DNA抽出用として1.5mL容のエッペンチューブに採取した各検体は、ホモジナイゼーション用ペッスル(Scientific Specialties Inc., CA, USA)で破碎後に、DNeasy Blood and Tissue Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出、精製した。検体番号5-9、11、12では肉眼的観察から種の予想が困難だったので、その手掛かりをつかむため真核生物の小亜粒

子リボソームRNA遺伝子(SSUrDNA)と大亜粒子リボソームRNA遺伝子(LSUrDNA)をターゲットとしたユニバーサルプライマーペア[10]を用いてPCRを行い、得られた増幅産物のシーケンス(塩基配列)データを基に種同定を試みた。検体番号1-4、10は肉眼的に微胞子虫、粘液胞子虫、ブリ糸状虫が疑われたので、各々の解析に用いられているSSUrDNAとLSUrDNAをターゲットにしたプライマーペア[11-15]を用いてPCRを行った。PCR反応液の総量は50 μ Lとし、DNA polymeraseにはTaKaRa Ex Taq Hot Start Version (HS) (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Otsu, Japan)を使用した。またPCRバッファーとdNTPはTaKaRa Ex Taq HSに添付されている10×EX BufferとdNTP Mixture(2.5mM each)を使用した。各プライマー溶液は最終濃度が0.5 μ Mとなるように反応液に加えた。PCR反応は熱変性95 $^{\circ}$ C5分、アニーリング55 $^{\circ}$ C30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C1分、サイクル数30回で行った。反応終了後に電気泳動で特異サイズの増幅を確認しその産物を精製した後に、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)で両方向のシーケンスを解読し当該領域のシーケンスを決定した。シーケンスの相同性検索はEMBL-EBIが提供するFASTA-Nucleotide Similarity Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>)を用いて行った。分子系統樹解析はClustal X version 2.0[16]で行い、NJplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>)を用いて系統樹を描いた。今回の解析で得られた各寄生種のシーケンスデータ(accession numbers: AB626142、AB558485、AB558486、AB559560-AB559563、AB629722、AB626140、AB626141、AB626095、AB626096、AB628192、AB628193、AB638616-AB638618)は、日本DNAデータベース(DDBJ)に登録した。

III 結果と考察

1) 検体番号1(アンコウの背骨腹側部に認められた白色嚢状物)

中央市場内の鮮魚業者から問い合わせがあった事例である。アンコウ(山形県産)の解体中その背骨腹側部に白色の嚢状物を認め、その中に黄白色の小塊を多数認めた(図1A、矢印)。メッシュでろ過後の沈澱物の一部を顕微鏡で観察すると長径約3 μ mの構造物が認められ(図1B)、寄生状態、微小構造物の形態から微胞子虫が疑われた。SSUrDNA(794bp)の相同性検索を行ったところ、*Glugea americanus*、*Spraguea lophii*の同領域と98、99%のidentityを認めた。2004年に報告された微胞子虫の分子系統学的研究により、アンコウに寄生する微胞子虫*G. americanus*は*Spraguea*属に移され、その名称は*S. americanus*と変更されている[11]。また*S. lophii*は大小2型の胞子を形成するのに対して*S. americanus*ではそのような性質を持たない[11]。検体

の胞子の大きさには2型を認めなかったことから、今回の微胞子虫は *S. americanus* と同定された。本虫は日本海沿岸で漁獲されるキアンコウに高率に寄生している (D-PAF: 水産食品の寄生虫検索データベース、<http://fishparasite.fs.a.u-tokyo.ac.jp/Spraguea%20americana/Samericana.html>)。ヒトには寄生せず食品衛生上の問題もないが、調理時に苦情の原因となる。

2) 検体番号2(ヤイトハタの筋肉内に認めた褐色筋状病変)

中央市場内の業者から問い合わせがあった事例で、ヤイトハタ(和歌山県産)を加工する際に駆幹筋全体に褐色筋状物を多数認めた(図2A, 2B)。その一部を採取して顕微鏡観察を行ったがクダア様の胞子を認めなかった。病理組織学的検査でも褐色筋状物は筋肉組織に散在し(図2C, 矢頭)、筋線維内に顆粒状物として認められた(図2D, 矢印)。褐色を呈する色素は漂白法により漂白されたことからメラニン色素と同定された。組織の一部か

らDNAを抽出しPCRを行ったところ、SSUrDNA、LSUrDNAの両領域で特異サイズの増幅を認めた。SSUrDNA(935bp)の相同性検索では、オーストラリアのオオニベから検出された *Unicapsula* sp. と identity が最も高く97%であった。またLSUrDNA(596bp)では、スペイン沖地中海のタイ (*Lithognathus mormyrus*) の筋肉より検出された *Unicapsula pflugfelderii* と 84.7%の identity を示した。分子系統学的な検討を試みたところ(図3、4)、ヤイトハタの筋肉内に認めた褐色状物は *Kudoa* 属よりも *Unicapsula* 属に近縁な粘液胞子虫と推測された(図3、4、矢印)。病理組織学的観察と遺伝子解析の結果から、肉眼的に褐色を呈した病変部は筋肉内に寄生した粘液胞子虫が壊死し、そこにメラニン色素が沈着したものと考えられた。grouper(ハタ)と Myxosporea(粘液胞子虫)をキーワードにPubMedにて文献検索を行ったところ、ハタからは *Kudoa hypoepicardialis*(図3で引用)、*Sphaerospora epinepheli* が報告されていた[17, 18]。しかし今回の検体は、*K. hypoepicardialis* とは図3に示したように分子系統学

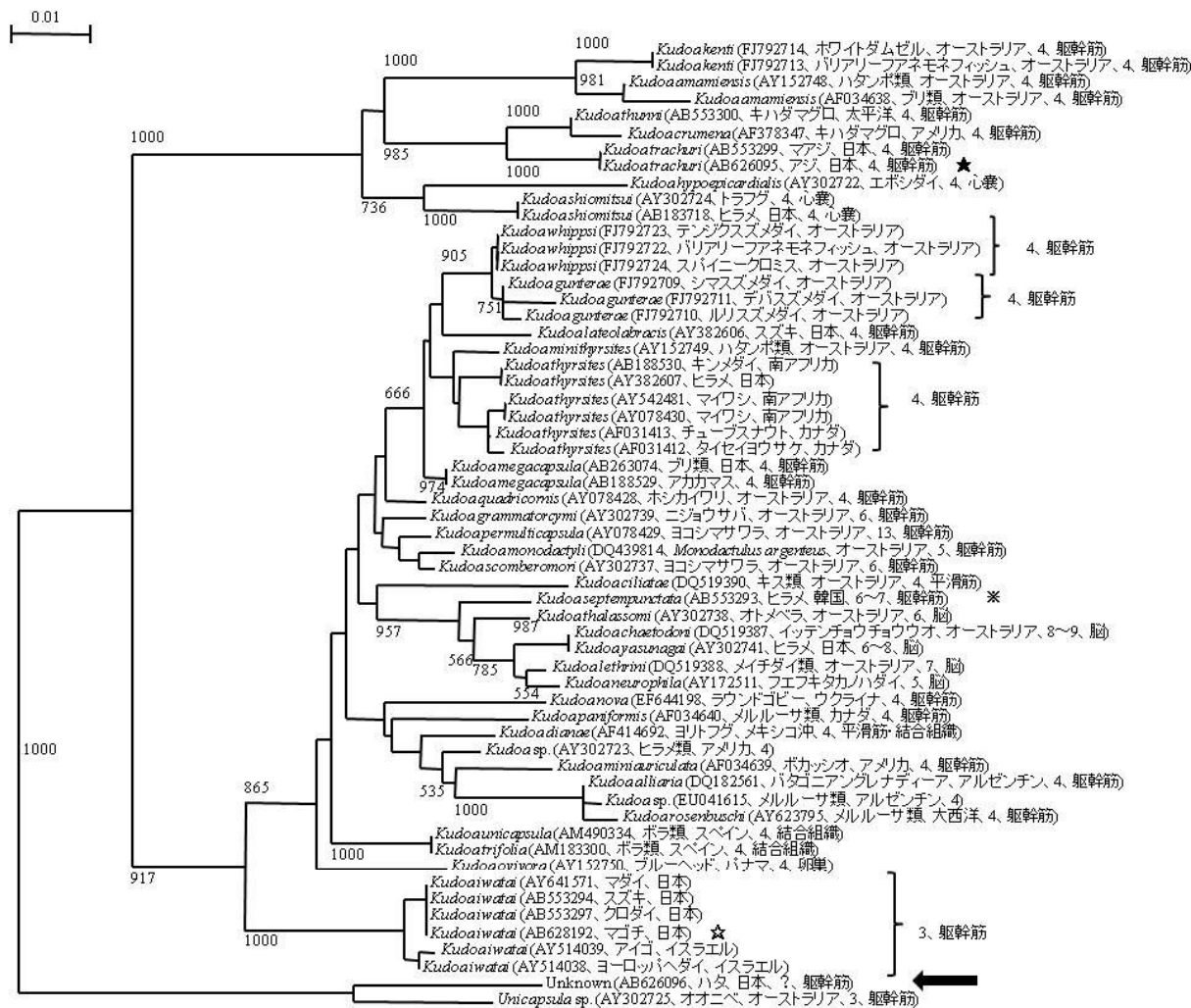


図3 SSUrDNAのシーケンス配列に基づいた分子系統樹。ヤイトハタ由来の検体は、*Kudoa*属より *Unicapsula*属に近縁と考えられる(←)。寄生虫名の後に記載した情報は、accession number、由来宿主、産地、極囊数、寄生部位。

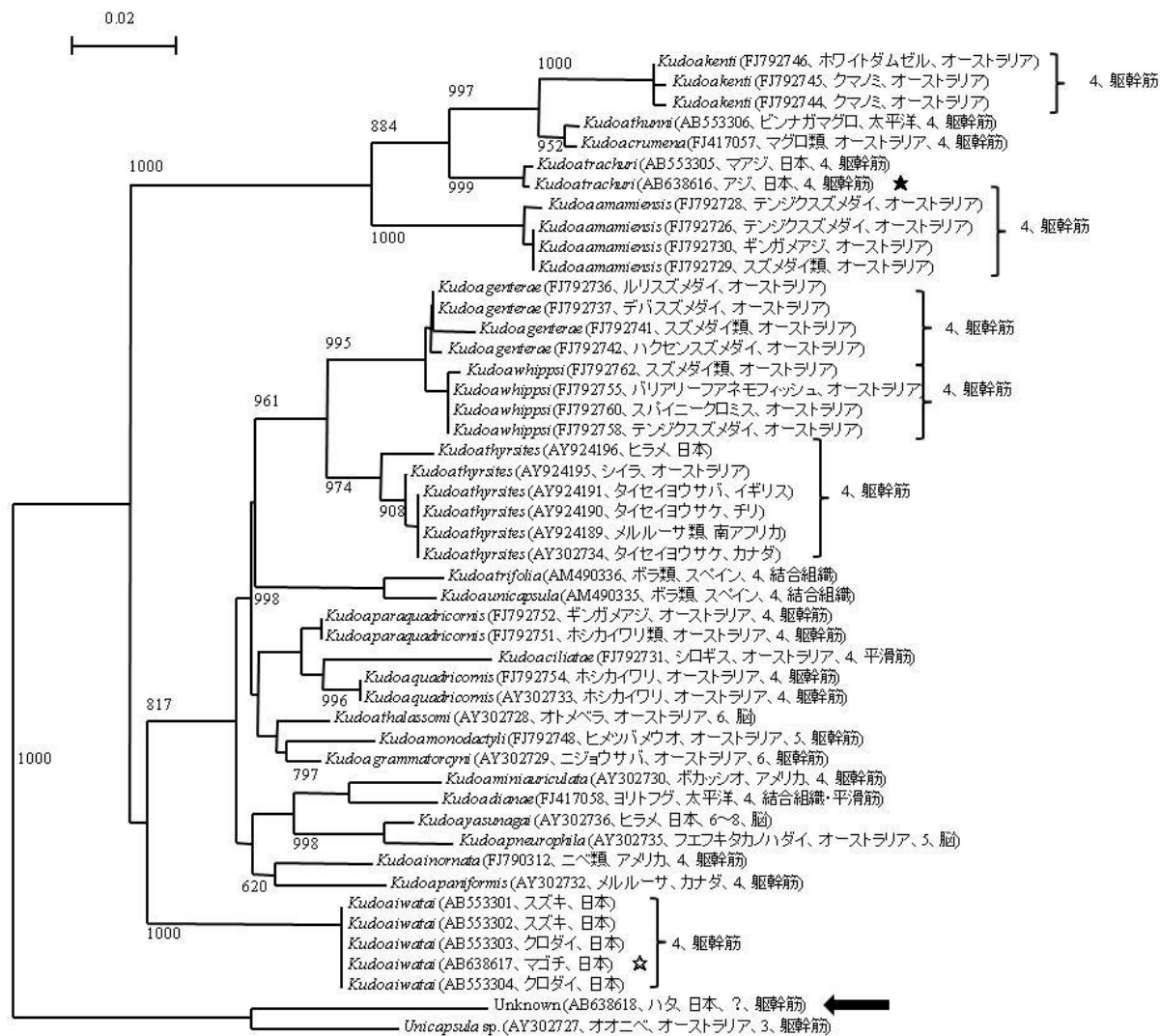


図4 LSUrDNAのシーケンス配列に基づいた分子系統樹。ヤイトハタ由来の検体は、*Kudoa*属より *Unicapsula*属に近縁と考えられる(←)。寄生虫名の後に記載した情報は、accession number、由来宿主、産地、極嚢数、寄生部位。

的に明らかに異なり、また *S. epinepheli* は腎臓に寄生する点で異なることから、新種である可能性が考えられた。なおD-PAFでの検索によると、クエの筋肉にも今回と同様の黒い筋状物を認める事例が紹介されており ([http://fishparasite.fs.a.u-tokyo.ac.jp/Microsporidium%20\(kue\)/Microsporidium-kue.html](http://fishparasite.fs.a.u-tokyo.ac.jp/Microsporidium%20(kue)/Microsporidium-kue.html))、その事例は微孢子虫 (*Microsporidium* sp.) による。今回の検体では微孢子虫の遺伝子検出用プライマー[11]も用いてPCRを行ったが特異サイズの産物は増幅されず、やはり粘液胞子虫が原因と推測された。

3) 検体番号3、4(アジとマゴチの筋肉内に認められた白色小塊)

検体番号3は、アジを調理する際にその筋肉内に直径1~2mm程度の白色小塊(シスト)を認めた事例である。検体番号4は中央市場内の業者から問い合わせが

あった事例で、淡路産マゴチを三枚に下ろす際にその筋肉内に直径1~2mm程度の白色~黄白色の小塊を認めた(図5A、5B)。寄生状況から両検体は粘液胞子虫類の *Kudoa*(クドア)と予想し、メッシュでろ過後の沈澱物を顕微鏡で観察したところ、ともに胞子内に4個の極嚢を有していた(図5C、5D)。胞子の幅はアジ由来種では8µm前後、マゴチのそれは10µm前後でありマゴチ由来種が若干大きいように観察された。

アジ由来種のSSUrDNA(1340bp)の相同性検索では、長崎県沖のアジから検出された *Kudoa trachuri*[19]と99%と一致し、LSUrDNA(758bp)でも同種と99.9%一致した(図3、4、★表示)。一方、マゴチ由来種では、SSUrDNA(714bp)では山口県防府沖のスズキとクロダイから検出された *Kudoa iwatai*[19]と99%一致し、LSUrDNA(732bp)でも同魚種由来 *K. iwatai*と100%一致した(図3、4、☆表示)。アジおよびマゴチ由来種の

胞子の大きさも*K. trachuri*と*K. iwatai*に各々類似していたことから、検体番号3は*K. trachuri*、検体番号4は*K. iwatai*と同定された。図3、4に示したように、*Kudoa*属粘液胞子虫は多様な魚種に寄生が認められ、またその種類も多様である。異種間では寄生部位や極囊数、胞子の大きさなどに違いを認めることもあるがそのみでの種鑑別は困難であり、種同定にはSSUrDNAまたはLSUrDNAの分子系統学的解析が有用である。本年4月には、食後数時間で嘔吐、下痢を引き起こす原因不明食中毒の原因の一つにヒラメ由来粘液胞子虫(*Kudoa septempunctata*)が同定された(<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000001ahy8-att/2r9852000001aib5.pdf>)。本種は韓国産ヒラメの躯幹筋から検出されたが、その特徴として極囊を6~7つ有し*K. iwatai*や*K. trachuri*の感染魚に認められる可視的なシストを形成しないことである[19](図3、※表示)。*K. septempunctata*の生活環、宿主特異性などは不明であり、海産魚での感染実態を効率的に調査する上で遺伝子検査は必要不可欠なツールとなる。

4) 検体番号5(ワカサギの腸管内に認めた条虫)

家庭でワカサギ(琵琶湖産)を調理する際に、その腸管内に白色ひも状の虫体が充満しているのを認めた(図6A、6B)。肉眼的に条虫と考えられたがその種は不明だったので、片節を染色し頭節、成熟片節、虫卵を観察したところ円葉目の条虫と考えられた。

SSUrDNA(732bp)の相同性検索では、*Proteocephalus tetrastomus*の同領域と100%一致した。さらに検体の形態学的特徴はShimazu[20]が報告したワカサギ由来*P. tetrastomus*の形態に一致したことから、この条虫は*P. tetrastomus*と同定された。本条虫はワカサギの腸管内に成虫として寄生し[20]、ヒトへの健康被害はない。

5) 検体番号6、7(ウオゼの腸管内と腹腔内に認めた条虫)

塩焼き用に販売されていた熊本県産のウオゼから、内臓を除去する際に腸管と腹腔内に15cm程度の白色虫体を認め(検体番号6)(図7A)、また腹腔内からは肉厚で6cm程度の白色の虫体も検出された(検体番号7)(図7B)。

腸管と腹腔内に見出された条虫のLSUrDNA(689bp)の相同性検索では、*Parabothriocephaloides segmentatus*の同領域と100%一致した。一方、腹腔内の条虫では(833bp)*Paraechinophalus japonicus*の同領域と100%一致した。100%一致した登録データ(DQ925330、DQ925331)には、両条虫の由来宿主がウオゼ(*Psenopsis anomala*)と報告されており今回の検体魚種と一致した。また両条虫の一部を染色し観察を行ったところ、生殖器構造、陰茎の形態、頭節の形態も*P. segmentatus*、*P. japonicus*のそれら[21、22]と類

似していたことから、腸管と腹腔内に認めた条虫は*P. segmentatus*、腹腔内のそれは*P. japonicus*と同定された。なお*P. japonicus*の寄生部位を記した論文を検索することはできなかったが、ウオゼには成虫として寄生することから腸管内が本来の寄生部位と考えられる。今回の事例では腹腔内に*P. japonicus*を認めたが、おそらくウオゼの腹部を包丁で切る際に腸管が破れ腹腔へ移動したものと推測された。両条虫のヒトでの感染例は知られていないが、虫体が大きく目に留まりやすいことから苦情の原因となる。なお両条虫の染色標本は目黒寄生虫館に登録している(登録番号MPM Coll. No. 18913、*Parabothriocephaloides segmentatus*; MPM Coll. No. 18914、*Paraechinophallus japonicus*)。

6) 検体番号8(ハマチの筋肉内に認めた幼条虫)

中央市場内の業者から問い合わせがあった事例である。ハマチ(石川県産)の刺身用切り身に、1cm前後の黄白色の寄生虫を認めた(図8A)。虫体は生理食塩水中で体を伸縮し、頭部には4つの小さな物を認め(図8B)その周囲に多数の小鉤が密生していた(図8C)。

SSUrDNA(601bp)とLSUrDNA(572bp)の相同性検索では、*Tentacularia coryphaenae*(テナクラリア)のそれらと各々99.7%、100%のidentityを示した。また幼条虫の形態や寄生部位などが類似する*Nybelinia*(ニペリニア)属幼条虫(*N. surmenicola*)とはSSUrDNAで99%、LSUrDNAで97.9%のidentityであった。検体吻部の鉤の形態は図6Cに示したように鉤基部付近の幅が*Nybelinia*属のそれより広く、また基部から先端までのブレードの長さ、先端の曲がり具合なども*Nybelinia*属と異なり*Tentacularia*属に類似していた[23]。これらの結果から、この幼条虫は*T. coryphaenae*と同定された。*Tentacularia*属条虫は*Nybelinia*属条虫と同様にサメが終宿主となりその腸管内で成虫となり、幼虫はカツオ、サバなどの筋肉内に寄生している。ヒトへは寄生しないが、形態的に類似した*Nybelinia*ではスルメイカの生食後に幼虫が吻部の鉤で咽頭に固着した報告がある[24]。

7) 検体番号9(クサカリツボダイの筋肉内に認めた幼条虫)

中央市場内の業者から問い合わせがあった事例である。ニュージーランド沖で水揚げされたツボダイの冷凍切り身に、2cmほどの細長いものから5mm程度のシスト状をした白色の寄生虫を数個認めた(図9A、9B)。

SSUrDNA(602bp)とLSUrDNA(591bp)の相同性検索では、*Molicola thyristes*のそれらと100%のidentityを示した。*Molicola*属条虫はサメの腸管内で成虫となり、幼条虫は大西洋、太平洋の真骨魚類に寄生する[23]。*M. thyristes*は南半球を中心に食用とされるクロタチカマス科の深海魚*Thyrstites atum*から報告されている[25]。クサカリツボダイも深海魚であり、ニュージーラン

ド沖で水揚げされたものであった。*Molicola*属は頭部に特徴的な多数の鉤を有する物を備え *Nybelinia* や *Tentacularia* と同様に虫体内部への物の出し入れは可能であるが、今回の検体は冷凍状態で虫体は既に死滅していたのでその構造を確認することはできなかった。しかし遺伝子解析の結果とクサカリツボダイが *T. atum* と生息域を共有する可能性があることから、今回の幼条虫は *M. thyristes* と考えられ国内では最初の報告である。

8) 検体番号10(ハマチの筋肉内に認めた線虫)

刺身用に販売されていたハマチの半身を切り分けたところ、切り身に虫体の断端と思われる部位を認めた(図10A)。その部位を切開したところ薄赤色の線虫が幾重にも折れ曲がった状態で寄生しており(図10B)、切断された虫体長は6cm前後であった。また体表のクチクラには疣様の隆起を多数認めた(図10C)。

Internal transcribed spacer 1 (ITS1) ~ 5.8SリボソームRNA遺伝子(5.8SrDNA)シーケンス(404bp)の相同性検索では、ブリ糸状虫(*Philometroides seriolae*)のシーケンスと100%一致した。遺伝子解析の結果と宿主、寄生部位、形態学的特徴に基づき、この線虫はブリ糸状虫と同定された。本線虫はヒトへは寄生しないが虫体が大きい目目に留まりやすく、また寄生部位は腔所化し粘液が溜まっていることもあり商品価値の低下と不快感を与えるため苦情の原因となる。

9) 検体番号11(アンコウの口腔内に認めた甲殻類)

中央市場内の業者から問い合わせがあった事例で、アンコウの口腔内に虫体を認めた(図11A)。虫体は3cm前後の大きさで、その一端には卵嚢と思われる構造物を認めた(図11B)。魚介類の寄生虫ハンドブック第2巻[26]を参照してみると、そこに記載されたアンコウの鰓に寄生するツブムシ目の *Acanthochondria* と大きさや肉眼的特徴は類似していた。

SSUrDNAの相同性検索(671bp)ではホウボウ由来の *Lernentoma asellina*、アンコウ由来の *Chondracanthus lophii*[27]と99%のidentityを示した。*Acanthochondria*のデータはINSDCに登録されておらずそれとの比較はできなかった。SSUrDNAの相同性検索の結果から判断すると今回の検体は *L. asellina* または *C. lophii* のどちらかであると推測されるが、正確な同定のためには両種の形態学的差異、宿主特異性など生物学的性状の検索と他の遺伝子領域をターゲットにした遺伝子解析が必要と考えられる。

10) 検体番号12(サケの体表に認めた節足動物)

中央市場内の業者から問い合わせがあった事例である。虫体は1cm前後の大きさで、主に臀鰭基部周辺の体表に付着していた(図12A)。

SSUrDNAの相同性検索(728bp)では、ウオジラミ

目サケジラミ(*Lepeophtheirus salmonis*)の当該領域と100%一致した。さらにD-PAF(<http://fishparasite.fs.a.u-tokyo.ac.jp/Lepeophtheirus/Lepeophtheirus-salmonis.html>)に記載された情報を参照すると、サケジラミとは虫体長(1cm前後)と寄生部位が一致し、雌と考えられる虫体の後端には一對の細長い器官(卵嚢)が存在したことから(図12B、矢頭)、この甲殻類はサケジラミと同定された。本種はサケ、マスなどのサケ科魚類に寄生し、宿主の体表組織や粘液を摂取する。ヒトには寄生せず健康被害はない。

本調査では鮮魚由来寄生虫12種の同定を、形態のみならずシーケンス解析で試みた。形態学的に種を予想できた寄生虫はシーケンス解析においても同様の結果を示し(*Philometroides seriolae*)、形態学的に種レベルの同定が難しい寄生虫ではシーケンス解析による種の同定(*Kudoa trachuri*, *K. iwatai*, *Molicola thyristes*)または近縁種の検索(*Unicapsula* sp., *Lernentoma asellina/Chondracanthus lophii*)が可能であった。またこれまで観察した経験がない寄生虫においてもシーケンス解析により種レベルの同定が可能であり、その形態学的特徴も文献記載の情報と一致した(*Spraguea americana*, *Proteocephalus tetrastomus*, *Parabothriocephaloides segmentatus*, *Paraechinophalus japonicus*, *Tentacularia coryphaenae*, *Lepeophtheirus salmonis*)。このことから形態学的に種同定が困難な場合は、シーケンス解析により種または近縁種を検索することが可能と考えられる。寄生虫を含む多様な生物種の遺伝子シーケンスの中で、SSUrDNA、LSUrDNAを含むリボソームRNA遺伝子のデータはINSDCに極めて多数登録されていることから、形態学的同定が困難な寄生虫でもこの領域を検索すれば同定またはその手掛かりを得ることが可能である。真核生物のSSUrDNA、LSUrDNAをターゲットとするPCRプライマーは、今回調査した寄生虫でも各々の領域を増幅し解析可能だったことから有効なプライマーと考えられる。しかしこのプライマーは真核生物についてユニバーサルであるが故に寄生虫だけでなく宿主のDNAも増幅するため、虫体からDNA抽出を行う際には今回行ったように攪拌洗浄を複数回繰り返して宿主組織をできるだけ除去する必要がある。

食品中の寄生虫の同定で困難を伴うのは加工食品に紛れた寄生虫(虫体の断端を含む)であり、このような寄生虫の多くは同定のポイントとなる虫体部位が失われていたり、透過液に浸漬しても虫体の内部構造が見えないなど形態学的観察には適さない。こうした場合に遺伝子検査による同定が期待されるが、著者の経験ではラップに包まれ長期の冷蔵保存で乾燥してしまったアニサキス、塩サバやしめサバに紛れた死滅アニサキス、キムチに紛れた *Nybelinia* やアニサキスなどでは、その一部から抽出したDNAを用いてPCRさらにシーケンス解析で同定することは可能であったが、魚の塩漬けに紛れ

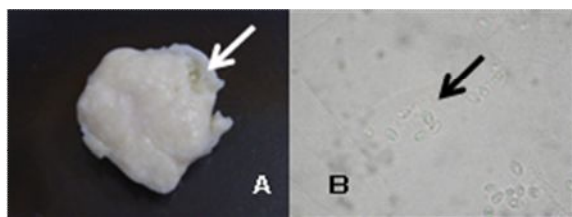


図1 アンコウの背骨腹側部から抽出された2cm程度の白色嚢状物(抽出後70%エタノールで固定したもの)。嚢の中には1~2mm程度の黄白色の小塊(A、矢印)を多数認め、その小塊には大きさ3 μ m程度の孢子(B)を多数認めた。

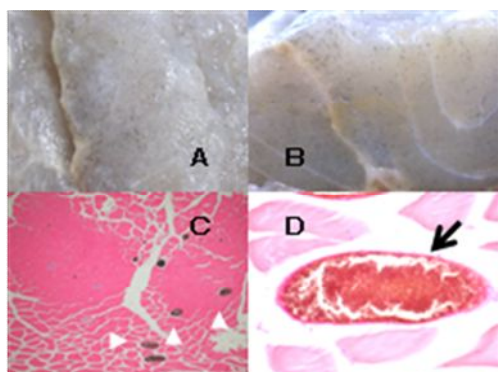


図2 ヤイトハタの切り身全体に認められた褐色筋状物(A)。切り身断面にも認めた(B)。筋肉組織に散在する筋状物(C、矢頭)とその拡大像(D、矢印は顆粒状物)。

た *Philometra* 属線虫を疑う検体ではPCRで増幅産物を得ることはできなかった(阿部、未発表)。加工処理で添加された調味料の種類、濃度、商品の保存期間、調理方法などにより虫体DNAが変性もしくは破壊される可能性もあるが、塩漬けの検体ではキットを用いてDNA抽出を行った際に虫体様物を十分に可溶化ができなかったことから、そのことがPCR失敗の一因とも考えられる。今後検体からのDNA抽出法の再検討が必要である。

ウェブ上での魚類寄生虫の検索は前述したD-PAFで利用可能であり、このデータベースは平易な説明と虫体のカラー写真が多数掲載されており、消費者でも容易に検索できるものと思われる。また一部の自治体でも事例紹介などのサイト(<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/musi/>、<http://www.city.sendai.jp/kenkou/kanshi/jirei/kisei.html>)を構築している。しかしD-PAFを含め同様のサイトで紹介されている寄生虫のデータ数は十分とはいえず、また検体と類似した寄生虫を検索できない場合は他のサイトを検索する必要があることから、今後自治体または研究者間で水産食品由来寄生虫のデータや情報を提供・集積し、内容が充実し一つにまとまったデータベースの構築が必要である。

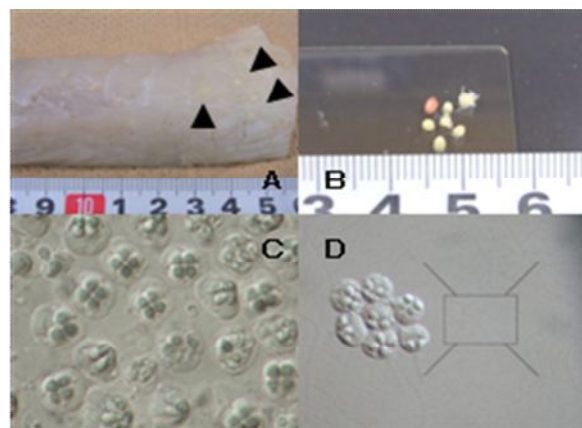


図5 *Kudoa iwatai*の寄生を受けたマゴチの躯幹筋(A、矢頭)と筋肉から抽出したシスト(B)。シスト内には4つの極嚢を有した孢子を多数認めた(C:マゴチ由来*K. iwatai*の孢子、D:アジ由来*K. trachuri*の孢子)。

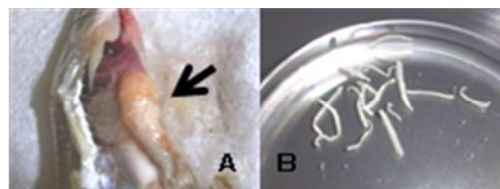


図6 ワカサギの腸管内に多数寄生する条虫(A、矢印)と抽出後の虫体(B、2~3cm程度の長さ)。

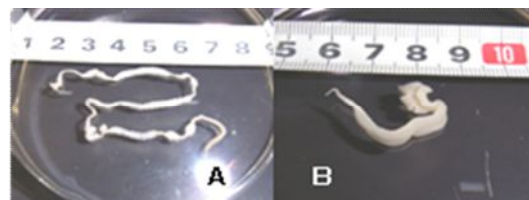


図7 ウオゼの腸管、腹腔内に認めた条虫 *P. segmentatus* (A)と腹腔内に認めた条虫 *P. japonicus* (B)。

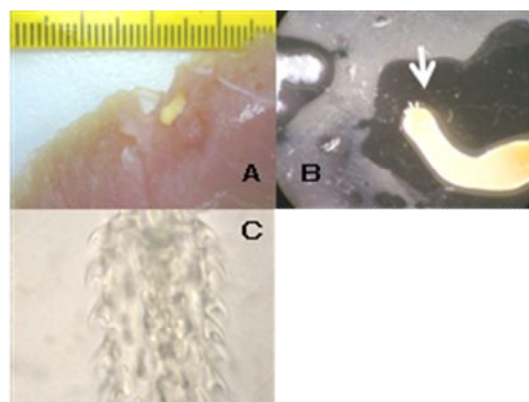


図8 ハマチの切り身内に認めた *Tentacularia coryphaenae*の幼条虫(A)。頭物には4つの物を有し(B、矢印)、その周囲には微小な棘が密生している(C)。

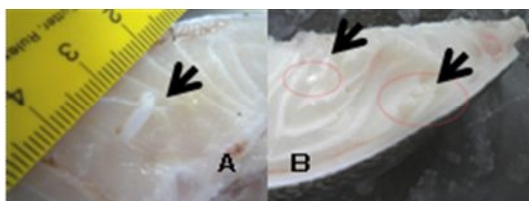


図9 クサカリツボダイの切り身に認められた *Molicola thyristes* の幼条虫 (A、B、矢印)。冷凍状態のため虫体は既に死滅していた。

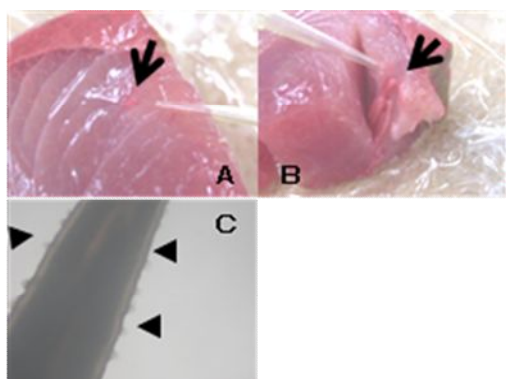


図10 ハマチの切り身に認められた *Philometroides seriola* の虫体断端 (A、矢印)。Aの部分を作り開いていくと折りたたまった細長い虫体を認め (B、矢印)、その体表クチクラには疣状構造を多数認めた (C、矢頭)。

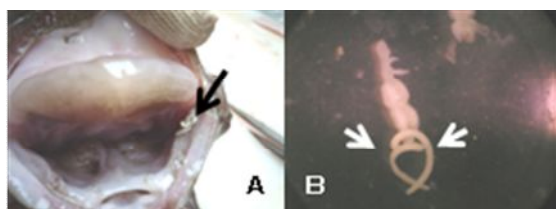


図11 アンコウの口腔内に寄生するツブムシ目の寄生虫 (A、矢印)。虫体の後端には卵囊と思われる構造物を認める (B、矢印)。

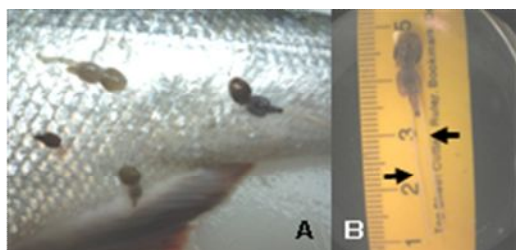


図12 サケの臀鰭基部周辺の体表に付着する *Lepeophtheirus salmonis* (A)。雌虫体の体後方には1対の細長い卵囊を認める (B、矢印)。

謝辞 寄生虫標本の登録にご協力いただいた(財)目黒寄生虫館 巖城隆博士、寄生虫の同定に際し有意義なコメントを寄せていただいた広島大学大学院生物圏科学研究科水産増殖学研究室 長澤和也教授、東京大学大学院農学生命科学研究科魚病研究室 横山博 助教、大英自然史博物館Dr Rodney A Bray、チェコ共和国サイエンスアカデミーDrs Tomáš Scholz、František Moravec、Roman Kuchtaに深謝いたします。

(本調査は、平成21～22年度大阪市立環境科学研究所一般研究課題「食品から異物として見出される寄生虫などの分子生物学的手法による同定法の開発」の内容として行われたものである。)

参考文献

- 1) 杉山 広. 食品媒介寄生虫による食中毒. 日本食品微生物学雑誌 2010; 27: 1-7.
- 2) Abe N, Ohya N, Yanagiguchi R. Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. J Helminthol 2005; 79: 303-306.
- 3) Abe N, Tominaga K, Kimata I. Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the internal transcribed spacer region of rDNA for identification of *Anisakis simplex* complex. Jpn J Infect Dis 2006; 59: 60-61.
- 4) Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. Parasitol Int 2007; 56: 211-215.
- 5) 八木欣平, 寺島寛樹, 高野敬志, 浦口宏二. 食品に混入した動物性異物の遺伝子を用いた同定法の検討-コショウダイ筋肉中の動物性異物の遺伝子解析-. 北海道立衛生研究所報告 2007; 57: 97-99.
- 6) 阿部仁一郎, 木俣 勲, 宇仁茂彦. 遺伝子検査による日本海裂頭条虫、マンソン孤虫、無鉤条虫の同定. 生活衛生 2009; 53: 169-176.
- 7) 阿部仁一郎. ワカサギの体腔内より検出された幼条虫プレロセルコイドの同定と文献的考察. 生活衛生 2009; 53: 110-116.
- 8) Suzuki J, Murata R, Sadamasu K, Araki J. Detection and identification of *Dipyllobothrium nihonkaiense* plerocercoids from wild Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) in Japan. J Helminthol 2010; 84: 434-440.
- 9) Abe N. Molecular and morphological identification of helminthes found in Japanese smelt, *Hypomesus transpacificus nipponensis*, with notes on new host

- records of *Eustrongylides ignotus* and *Raphidascaris gigi*. Acta Parasitol 2011; 56: 227-231.
- 10) Brabec J, Kuchta R, Scholz T. Paraphyly of the Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Cestoda): circumscription of monophyletic clades based on phylogenetic analysis of ribosomal RNA. Int J Parasitol 2006; 36: 1535-1541.
 - 11) Freeman MA, Yokoyama H, Ogawa K. A microsporidian parasite of the genus *Spraguea* in the nervous tissues of the Japanese anglerfish *Lophius litulon*. Folia Parasitol 2004; 51: 167-176.
 - 12) Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, Sakanari JA. Molecular Phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. J Parasitol 2005; 91: 1413-1429.
 - 13) Burger MAA, Adlard RD. Phenotypic variation in a significant spore character in *Kudoa* (Myxosporea: Multivalvulida) species infecting brain tissue. Parasitology 2010; 137: 1759-1772.
 - 14) Whipps CM, Adlard RD, Bryant MS, Kent ML. Two unusual myxozoan, *Kudoa quadricornis* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of goldspotted trevally (*Carangoides fulvoguttatus*) and *Kudoa permulticapsula* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) from the Great Barrier Reef, Australia. J Parasitol 2003; 89: 168-173.
 - 15) Freeman MA, Yokoyama H, Ogawa K. Description and phylogeny of *Ceratomyxa anko* n. sp. and *Zschokkella lophii* n. sp. from the Japanese anglerfish, *Lophius litulon* (Jordan). J Fish Dis 2008; 31: 921-930.
 - 16) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007; 23: 2947-2948.
 - 17) Supamattaya K, Fischer-Scheri T, Hoffmann RW, Boonyaratpalin S. *Sphaerospora epinepheli* n. sp. (Myxosporea: Sphaerosporidae) observed in grouper (*Epinephelus malabaricus*). J Protozool 1991; 38: 448-454.
 - 18) Blaylock RB, Bullard SA, Whipps CM. *Kudoa hypoepicardialis* n. sp. (Myxozoa: Kudoidae) and associated lesions from the heart of seven perciform fishes in the northern Gulf of Mexico. J Parasitol 2004; 90: 584-593.
 - 19) Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. Parasitol Res 2011; 108: 913-926.
 - 20) Shimazu T. Some species of the genus *Proteocephalus* (Cestoidea: Proteocephalidae) from Japanese freshwater fishes, with a description of a new species. Jpn J Parasitol 1990; 39: 612-624.
 - 21) Kuchta R, Scholz T, Bray RA. Revision of the order Bothriocephalidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008 (Eucestoda) with amended generic diagnoses and keys to families and genera. Syst Parasitol 2008; 71: 81-136.
 - 22) Bray RA, Jones A, Andersen KI. Order Pseudophyllidea Carus, 1863. In: Keys to the cestode parasites of vertebrates (Khalil LF, Jones A, Bray RA, eds). Oxon, UK; CAB International; 1994. p205-247.
 - 23) Campbell RA, Beveridge I. Order Trypanorhyncha Diesing, 1863. In: Keys to the cestode parasites of vertebrates (Khalil LF, Jones A, Bray RA, eds). Oxon, UK; CAB International; 1994. p51-148.
 - 24) 東京都市場衛生検査所. 魚介類の寄生虫ハンドブック第一巻. 東京:東京都情報連絡室情報公開部都民情報課;1989. 24頁.
 - 25) Olson PD, Caira JN, Jensen K, Overstreet RM, Palm HW, Beveridge I. Evolution of the trypanorhynch tapeworms: Parasite phylogeny supports independent lineages of sharks and rays. Int J Parasitol 2010; 40: 223-242.
 - 26) 東京都市場衛生検査所. 魚介類の寄生虫ハンドブック第二巻. 東京:東京都情報連絡室情報公開部都民情報課;1990. 10頁.
 - 27) Huys R, Llewellyn-Hughes J, Conroy-Dalton S, Olson PD, Spinks JN, Johnston DA. Extraordinary host switching in siphonostomatoid copepods and the demise of the Monstrilloidea: Intergrating molecular data, ontogeny and antennulary morphology. Mol Phylogenetic Evol 2007; 43: 368-378.