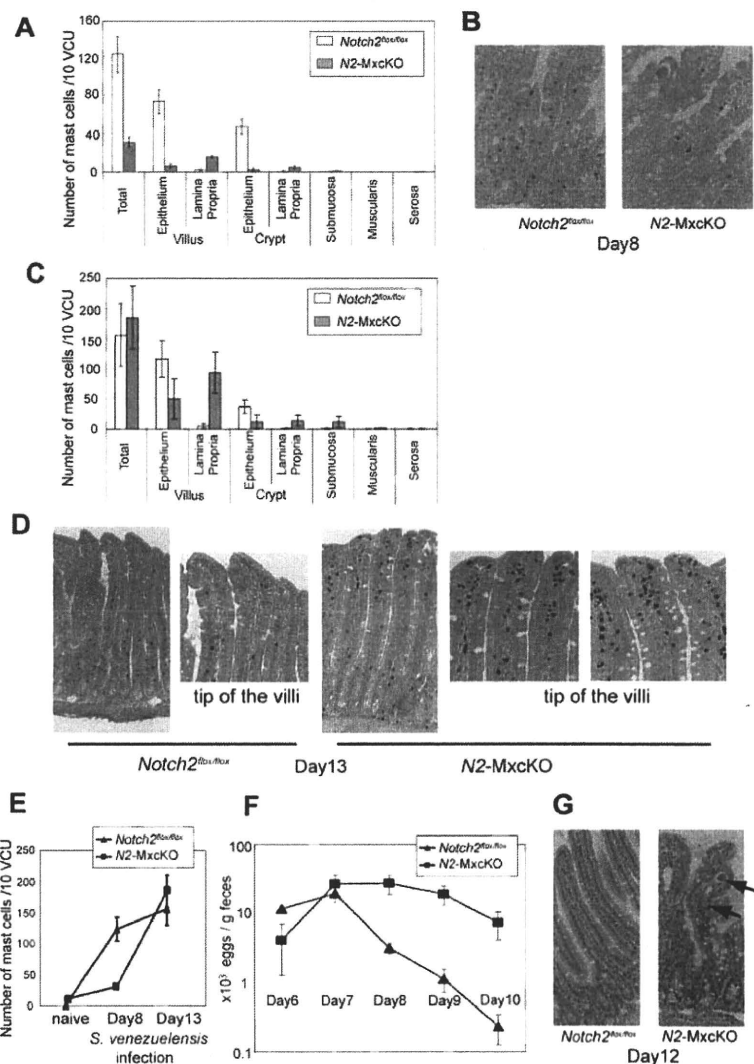


**Figure 6. Notch2 is essential for antiparasite immunity of mast cells in the intestine.** *N2-MxcKO* or control *Notch2<sup>flx/flx</sup>* mice were subcutaneously injected with third-stage infective larvae of *S venezuelensis*. (A) The number of mast cells per 10 vcus in the small intestine on day 8 after *S venezuelensis* infection. Data are presented as means  $\pm$  SEM. The number of mast cells was much less in *N2-MxcKO* mice;  $n = 3$ ,  $P = .008592$  (total),  $P = .005695$  (villus, epithelium),  $P = .000715$  (villus, lamina propria),  $P = .005245$  (crypt, epithelium), and  $P = .045466$  (crypt, lamina propria). Note that mast cells in *N2-MxcKO* mice were abnormally clustered in the lamina propria, whereas most of those in the control *Notch2<sup>flx/flx</sup>* mice were intraepithelially migrated. (B) Toluidine blue staining followed by eosin staining of the small intestine on day 8; original magnification  $\times 200$ . (C) The number of mast cells per 10 vcus in the small intestine on day 13 after *S venezuelensis* infection. Data are presented as means  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ,  $P = .026076$  (villus, epithelium),  $P = .00194$  (villus, lamina propria),  $P = .021177$  (crypt, epithelium), and  $P = .019324$  (crypt, lamina propria),  $P = .047445$  (submucosa). (D) Toluidine blue staining followed by eosin staining of the small intestine on day 13. Original magnification  $\times 200$ . (E) The total number of mast cells per 10 vcus on day 0, day 8, and day 13 of infection. The total number of mast cells was significantly lower in *N2-MxcKO* mice at the early phase (day 8) and almost equal at the later phase (day 13) to that of control mice. Data are presented as means  $\pm$  SEM;  $n = 10$  and 8 (day 0, *Notch2<sup>flx/flx</sup>* and *N2-MxcKO*);  $n = 3$  and 3 (day 8, *Notch2<sup>flx/flx</sup>* and *N2-MxcKO*);  $n = 4$  and 4 (day 13, *Notch2<sup>flx/flx</sup>* and *N2-MxcKO*). (F) Time course of egg number in the stool. The number of excreted eggs was significantly greater in *N2-MxcKO* mice compared with those in *Notch2<sup>flx/flx</sup>* mice. Data are represented as means  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ;  $P = .0291$  (day 8) and  $P = .0219$  (day 9). (G) Hematoxylin-eosin staining of the small intestine on day 12. Original magnification  $\times 200$ . Arrows indicate worms. Worms were still observed in the villi in the jejunum of *N2-MxcKO*, but not of *Notch2<sup>flx/flx</sup>* mice.



an *S venezuelensis*-infection model, mast cells increase in number in the epithelium in control *Notch2<sup>flx/flx</sup>* mice, while they abnormally aggregate in lamina propria in *N2-MxcKO* mice, especially in the later stage of infection. This suggests that mast cell migration from lamina propria toward the epithelium across the basement membrane is impaired in *N2-MxcKO* mice. Consequently, mast cell turnover might be prolonged in *N2-MxcKO* mice. Given that the mechanism of mast cell migration from lamina propria toward the epithelium is common in naive status and infection status, such migration defect may also explain the mast cell increase in *N2-MxcKO* mice in naive status that we observed.

The defect of mast cell migration toward intraepithelium of the small intestine in *N2-MxcKO* mice is very similar to that in integrin  $\beta 6$ -deficient mice,<sup>19</sup> in which activation of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling is impaired.<sup>20</sup> A crosstalk between Notch signaling and TGF- $\beta$  signaling might occur in intestinal mast cells as well as the cases of other cell types.<sup>21</sup> Alternatively, Notch signaling might directly regulate a downstream target of TGF- $\beta$  1 in intestinal mast cell migration (eg, the induction of integrin  $\alpha E$  expression).<sup>19,22</sup> Integrin  $\alpha E$ , forming an integrin  $\alpha E\beta 7$  complex on mast cells, binds to E-cadherin on epithelial cells and is involved in mast cell localization in the epithelium.<sup>22</sup> The expression level of

integrin  $\alpha E\beta 7$ , measured by flow cytometric analysis, however, was not affected by Notch-ligand stimulation in BMDCs (unpublished data).

In the previous paper we showed that Notch signaling facilitates mast cell lineage development at the expense of granulocyte/macrophage development from both common myeloid progenitors (CMPs) and granulocyte-macrophage progenitors (GMPs) in vitro.<sup>11</sup> Mast cells, however, were not depleted in *N2-MxcKO* mice in naive status in vivo, but rather slightly increased in the small intestine of *N2-MxcKO* mice. This clearly indicates that Notch2 signaling is dispensable for steady-state mast cell generation in vivo. However, the dynamic increase of mast cells during the early phase of intestinal parasite infection was markedly impaired in *N2-MxcKO* mice. The mechanisms underlying the Notch2 signaling requirement only in parasite-infected mice remain to be clarified. Nevertheless, rapidly increasing intestinal mast cells have to be supplied by mast cell progenitors. The pathways and mechanisms responsible for mast cell progenitor recruitment and trafficking are likely to be dynamic and susceptible to modification during inflammation.<sup>1</sup> Such a modulation of the mast cell generation pathway during intestinal infection might underlie the requirement of *Notch2* only during parasite infection. This is similar to

IL-3-deficient mice. IL-3 is essential for mast cell differentiation *in vitro*; however, IL-3-deficient mice have the normal number of mast cells at the steady state, whereas mast cell hyperplasia is impaired upon intestinal parasite infection.<sup>23</sup>

Our data showed that parasite expulsion was impaired in *N2-MxcKO* mice. We could not exclude the possibility that the *Notch2* deletion in immune cells other than mast cells modulate the response against the nematode infection. If we could show that Th2-conditioned wild-type BMMCs successfully eradicate *S venezuelensis* in *W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup>* mice and that *Notch2*-null BMMCs do not, it would be clearer that *Notch2* signaling in mast cells per se but not in other immune cells should be critically important for defense against *S venezuelensis* infection. The failure of rescue experiments may be caused by the abnormal mast cell distribution pattern of wild-type BMMCs in *W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup>* mice. Nevertheless, the result of this experiment supported the previous finding that the proper epithelial migration of mast cells is required for efficient expulsion of *S venezuelensis*,<sup>24</sup> and thus provides an insight that the impaired *S venezuelensis* expulsion in *N2-MxcKO* mice is attributed to the mast cell-autonomous deletion of *Notch2*.

In conclusion, our data clearly indicate that *Notch2* receptor signaling is specifically required for proper intestinal mast cell distribution in a cell-autonomous manner. Furthermore, involvement of *Notch2* signaling in mucosal immunity was proven, particularly for eradication of infected parasites, although whether this is due to the *Notch2* signaling in mast cells is yet to be elucidated.

## References

- Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(6):1285-1291.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135-142.
- Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J Immunol*. 2000;164(7):3749-3754.
- Friend DS, Ghildyal N, Gurish MF, et al. Reversible expression of tryptases and chymases in the jejunal mast cells of mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol*. 1998;160(11):5537-5545.
- Miller HR, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology*. 2002;105(4):375-390.
- Tsukumo S, Yasutomo K. Notch governing mature T-cell differentiation. *J Immunol*. 2004;173(12):7109-7113.
- Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004;5(3):247-253.
- Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, et al. *Notch2* integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T-cell cytotoxicity. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1140-1147.
- Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2000;28(5):527-534.
- Jonsson JI, Xiang Z, Pettersson M, Lardelli M, Nilsson G. Distinct and regulated expression of Notch receptors in hematopoietic lineages and during myeloid differentiation. *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3240-3247.
- Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, et al. Coordinated regulation of transcription factors through *Notch2* is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(22):7839-7844.
- Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, et al. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(1):74-81 e71.
- Saito T, Chiba S, Ichikawa M, et al. *Notch2* is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*. 2003;18(5):675-685.
- Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 1995;269(5229):1427-1429.
- Fukao T, Yamada T, Tanabe M, et al. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat Immunol*. 2002;3(3):295-304.
- Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009;137(2):216-233.
- Tanzola MB, Robbie-Ryan M, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *J Immunol*. 2003;171(8):4385-4391.
- Nam DH, Jeon HM, Kim S, et al. Activation of notch signaling in a xenograft model of brain metastasis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4059-4066.
- Brown JK, Knight PA, Pemberton AD, et al. Expression of integrin- $\alpha$ E by mucosal mast cells in the intestinal epithelium and its absence in nematode-infected mice lacking the transforming growth factor- $\beta$ 1-activating integrin  $\alpha$ phv- $\beta$ 6. *Am J Pathol*. 2004;165(1):95-106.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al. The integrin  $\alpha$ v  $\beta$ 6 binds and activates latent TGF  $\beta$ 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999;96(3):319-328.
- Kluppel M, Wrana JL. Turning it up a Notch: cross-talk between TGF  $\beta$  and Notch signaling. *Bioessays*. 2005;27(2):115-118.
- Wright SH, Brown J, Knight PA, Thornton EM, Kilshaw PJ, Miller HR. Transforming growth factor- $\beta$ 1 mediates coexpression of the integrin subunit  $\alpha$ phvE and the chymase mouse mast cell protease-1 during the early differentiation of bone marrow-derived mucosal mast cell homologues. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(2):315-324.
- Lantz CS, Boesiger J, Song CH, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*. 1998;392(6671):90-93.
- Abe T, Nawa Y. Localization of mucosal mast cells in *W/W<sup>v</sup>* mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to *Strongyloides ratti* infection. *Parasite Immunol*. 1987;9(4):477-485.

## Acknowledgments

We thank Dr Shigeo Koyasu for kind advice on the parasite infection experiment and Dr Cliff Takemoto, Dr Eichi Morii, and Dr Keisuke Oboki for kind advice on the histochemistry. We also thank Dr Hiromitsu Nakauchi for the Ly5.1 mice.

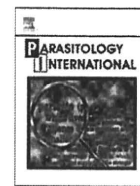
This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (KAKENHI #21790905 to M.S.-Y. and #18659276 to S.C.) and by grants from Mitsubishi Pharma Research Foundation and Takeda Science Foundation.

## Authorship

Contribution: M.S.-Y. designed and performed the research, analyzed the data, and wrote the paper; T.S., Y. Miyake, and Y. Morishita performed the research; T.I.S., H.M., and H.Y. contributed new reagents; E.N.-Y., K.K., M.F., S.O., and M.K. provided vital discussion; K.Y. designed the research; and S.C. designed the research, analyzed the data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Shigeru Chiba, Department of Clinical and Experimental Hematology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan; e-mail: schiba-ky@umin.net.



## Case report

Zoonotic filariasis caused by *Onchocerca dewittei japonica* in a resident of Hiroshima Prefecture, Honshu, JapanShigehiko Uni<sup>a,\*</sup>, Tomoyuki Boda<sup>b</sup>, Koichi Daisaku<sup>b</sup>, Yoshihiro Ikura<sup>c</sup>, Haruhiko Maruyama<sup>d</sup>, Hideo Hasegawa<sup>e</sup>, Masako Fukuda<sup>f,g</sup>, Hiroyuki Takaoka<sup>g</sup>, Odile Bain<sup>h</sup><sup>a</sup> Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan<sup>b</sup> Shobara Red Cross Hospital, Shobara, Hiroshima 727-0013, Japan<sup>c</sup> Department of Pathology, Osaka City University Medical School, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan<sup>d</sup> Department of Infectious Diseases, Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan<sup>e</sup> Department of Biology, Faculty of Medicine, Oita University, Oita 879-5593, Japan<sup>f</sup> Research Promotion Project, Oita University, Oita 879-5593, Japan<sup>g</sup> Department of Infectious Disease Control, Faculty of Medicine, Oita University, Oita 879-5593, Japan<sup>h</sup> Parasitologie comparée, UMR 7205 CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75231 Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 May 2010

Accepted 21 May 2010

Available online 31 May 2010

## Keywords:

Zoonotic onchocerciasis

*Onchocerca dewittei japonica*

Filarioidea

Cuticular characteristics

Wild boar

Japan

## ABSTRACT

A female of *Onchocerca* sp. was found to be the probable causative agent of a subcutaneous nodule in the left knee of a 70-year-old man in a rural area of Hiroshima Prefecture, Honshu, the main island of Japan. We compared the characteristics of the agent with the features of the four previously suspected species found in cattle and horses in various parts of the world, as well as *O. lupi* and *O. jakutensis* that were suspected or proved, respectively, in zoonotic cases in Europe. In addition, the morphologic characteristics of this parasite were compared with those of the four *Onchocerca* species found in wild animals in Japan. Based on such characteristics as the large triangle ridges, the considerable distance between any two adjacent ridges, and the absence of inner cuticular striae in the longitudinal sections, we found the causative agent in the present case to be identical to the female of *Onchocerca dewittei japonica*. All five previous cases of zoonotic onchocerciasis in Japan had been found in Oita, Kyushu, the main southern island. This human case caused by *O. dewittei japonica* suggests that zoonotic onchocerciasis is liable to occur in rural areas in Japan where wild boar, *Simulium* vectors, and humans overlap.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Zoonotic filariasis is an infection found in humans which is caused by filarioids of animals [1]. Numerous human cases caused by members of the genus *Dirofilaria* have been found throughout the world [2]. In contrast, human cases caused by *Onchocerca* species parasitic in animals are rare; the first of 15 cases known to date was reported in Ukraine in 1965. Five human cases in Europe, five in Japan, four in North America, and one on the Arabian Peninsula have been discovered worldwide [3–18].

In zoonotic onchocerciasis, the causative agents suspected are *O. gutturosa* Neumann, 1910 from cattle and *O. cervicalis* Railliet and Henry, 1910 from horses [3–8,13]. Much more recently, in Japan, *Onchocerca dewittei japonica* Uni et al., 2001; [19] from wild boar was identified in four of the most recent five cases in Oita, Kyushu, the main southern island of Japan [9,12,14,15]. In retrospect, *O. lupi* found from dogs was suspected to be responsible for subconjunctival infections

[3,11] in which the causative agent could not be unambiguously determined in Europe [20]. Finally, *Onchocerca* of the red deer, *O. jakutensis* (Guvanov, 1964) was identified in a patient in Austria [17].

Here we present a new case of a zoonotic onchocerciasis found from a patient living in a rural area of Hiroshima Prefecture in Honshu, the main island of Japan.

## 2. Case study

The patient, a 70-year-old man living in Fuchu City, Hiroshima Prefecture, found a nodule on the left knee in the beginning of the year 2009 and reported feeling pain in the nodule in May 2009. The nodule, 2 cm in diameter, was surgically removed from the subcutaneous connective tissue at the knee at the Shobara Red Cross Hospital in Hiroshima Prefecture in July 2009. The mass excised (1 × 2 cm) was fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and embedded in paraffin, a routine process. The sections were stained with hematoxylin and eosin. Histologic sections examined: S3-1, S3-2, S3-4, and S7-9.

A coiled worm was found in the nodule and several longitudinal, oblique, and transverse sections of the main part of the body (midbody) of the worm were examined with a microscope (Fig. 1; 1–5). The worm

\* Corresponding author. Tel.: +81 6 66453760; fax: +81 6 66453762.  
E-mail address: uni@med.osaka-cu.ac.jp (S. Uni).

was a female with its uteri in which microfilariae or embryos were not seen (Fig. 1; 1 and 4). In addition, a section of the thin anterior part, 83  $\mu\text{m}$  wide, with the esophagus and a section of the posterior part of the worm, 125  $\mu\text{m}$  wide, were found. Thus, this nodule was occupied by one female adult.

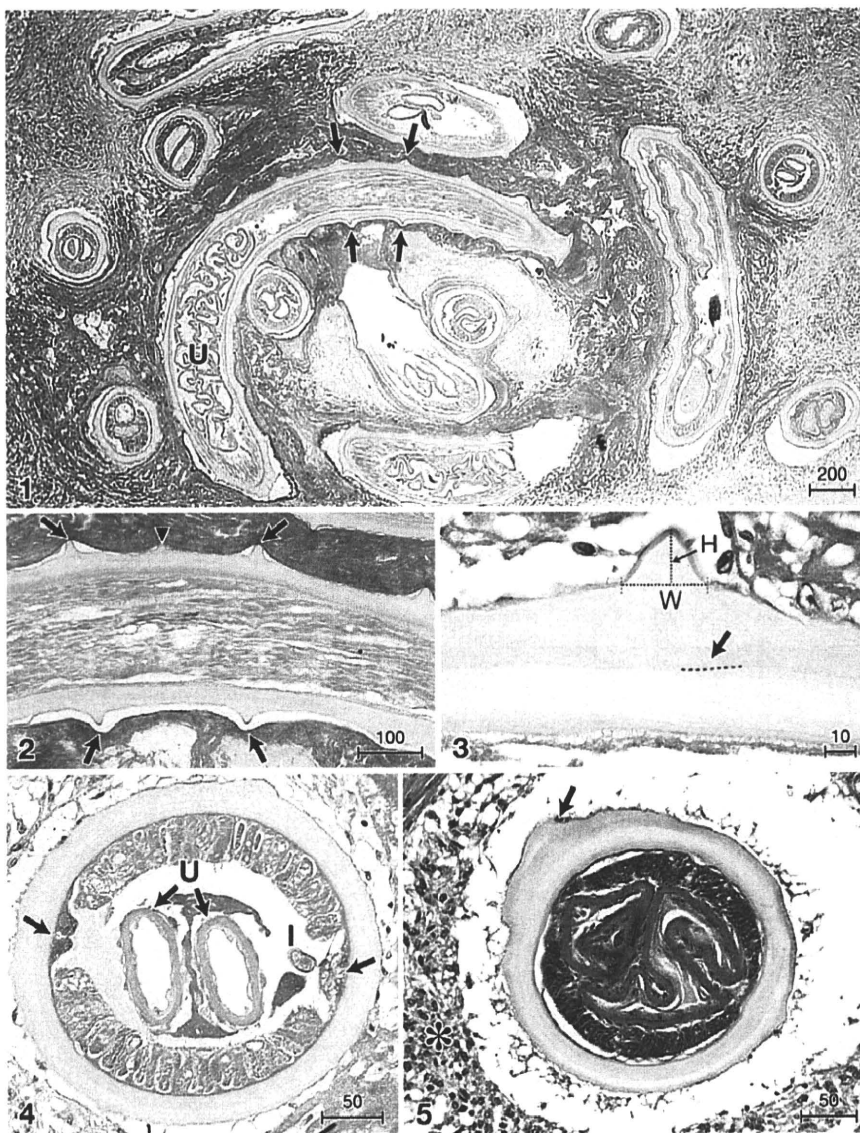
In the longitudinal sections of the worm (Fig. 1; 2), the external transverse ridges were salient on the cuticle and the distance between two adjacent ridges in the main body is shown in Table 1. Our examination revealed two adjoining ridges of one side indicated by two arrows; an arrowhead indicated a small overlapping ridge of the other side (Fig. 1; 2). The distance between the ridges was therefore measured on the ridges of the one side. The ridges formed a sharp triangle (Fig. 1; 3). The cuticle was divided into two main parts of equal thickness and no inner striae were found on the middle line (Fig. 1; 3).

In the transverse sections of the main body, the cuticle was composed of four layers, the muscle cells were 42–52 in number, and the two

lateral chords were large. No inner projections of the cuticle were found at the lateral chords. The transverse sections of the midbody were round and lateral thickening of the cuticle was not seen (Fig. 1; 4). The differences of the thickness of the cuticle can be seen at the ridge in Fig. 1; 5. The difference (30  $\mu\text{m}$ ) between the thick cuticle (55  $\mu\text{m}$ ) and the thin cuticle (25  $\mu\text{m}$ ) corresponded to the height of the ridges of *O. dewittei japonica* (Table 1).

Regarding the histologic reaction of the host, the worm was surrounded with eosinophilic exudate in the center of the granuloma while away from the center, macrophages, neutrophils, eosinophils, and lymphocytes had infiltrated the granulomatous tissue (Fig. 1; 1). Macrophages and eosinophils intensively accumulated around some sections of disintegrating parts of the worm (Fig. 1; 5) but neutrophils were very scarce.

The patient, a farmer, lives in a rural area near mountains inhabited by wild boar. He has never been outside Japan and had not visited Oita, Kyushu, within the past several years. He has not raised pets such as



**Fig. 1.** Histologic sections of a female *Onchocerca dewittei japonica*, found in a nodule excised from the left knee of a 70-year-old man. The sections are stained with hematoxylin and eosin. Bars, micrometers. 1. A coiled female with transverse ridges (arrows) on the cuticle and the uteri (U) in the pseudocoelom. 2. The salient transverse ridges (arrows) of one side and a small ridge (an arrowhead) of the other side (semicircular ridges are overlapping at the lateral field, see text). 3. The triangle ridge in the longitudinal section: height (H) and width (W), and the lack of the inner striae at the dotted line with an arrow in the cuticle. 4. The transverse section at the midbody with thick cuticle, muscle cells, and two large lateral chords (arrows). Two empty uteri (U) and intestine (I) in the pseudocoelom. 5. In the transverse section, a thick portion of the cuticle indicates the ridge (an arrow). The section is intensively surrounded by macrophages (\*).

**Table 1**Comparison of histologic characteristics of *Onchocerca* sp. found from a human nodule with females of *Onchocerca* species known in Japan.

	<i>Onchocerca</i> sp. (present study)	<i>O. gutturosa</i>	<i>O. lienalis</i>	<i>O. skrjabini</i>	<i>O. eberhardi</i>	<i>O. suzukii</i>	<i>O. dewittei japonica</i>
Body width at midbody	270–310	170–250**, 140–225***, 200–300*****	180–200**, 180–220****, 150–220*****	170–300	60–170	228–430	180–310
Distance between 2 adjacent ridges	210–280	50–75**, 70–80***, 87–166*****	30–40**, 25–45****, 60*****	48–55	25–40	No ridges	185–290
Shape of ridges (H/W)* in longitudinal sections	Triangle (13–25/23–28)	Rounded ridges (5/12**, 4–5/5–10***, 10–13/26****)	Small, rounded ridges (3/15–23****)	Small ridges (6/12)	Small, rounded ridges (3/8)	No ridges	Triangle (8–23/23–30)
Thickness of cuticle without ridges	30–40	30**, 25–35***	12–17****, 10*****	20–30	28–32	15–50	10–32
Number of inner striae between 2 adjacent ridges	None	3**, 4–8***, 2–4*****	2**, ****, *****	3–4	2	None	None
Size of lateral chords (H/W)* in transverse sections	13–25/42–55	13/54****	16–21/52–63****	15–25/50–88	10/38	5–37/125–132	10–18/45–63
Number of muscle cells per quadrant	8–15	2–4****	5–7*****	2–3	1–2	8–13	8–22
Height of muscle cells	38–43	40****	31****	25–40	15–18	30–38	45–50
Diameter of intestine	15–18	20–34****	26****	38–68	15–20	20–48	15–17
Host(s)	Human	Cattle	Cattle	Deer and serows	Deer	Serows	Wild boar
Histologic sections and references	Sections (S3-1, S3-2, S3-4, S7-9) from a human	**[5]; ***[22]; ****[23]; *****[24]	**[5]; ****[23]; *****[24]; *****[14]	Sections (YG2-31) from a serow	Sections (S57-F3) from a deer	Sections (YG2-35) from a serow	Sections (B57-1) from a wild boar

Dimensions in micrometers.

H/W: height/width.

dogs and cats. Immunologic deficiency was not found in his laboratory examination at the hospital.

### 3. Discussion

In the longitudinal sections, the presence of the transverse ridges on the cuticle of the worm appeared to be typical of a female of the species among the genus *Onchocerca*: 28 species and one subspecies (*O. dewittei japonica*) with the ridges on the cuticle of the female worms and three species without the ridges [21].

The present causative agent can be distinguished from *O. gutturosa* and *O. lienalis*, the two species found in cattle. In these species, the ridges (evident in the posterior part in *O. lienalis*) are rounded, not triangular; the distance between adjacent ridges is smaller; and the females possess inner striae in the cuticle (Table 1), [5,22–24]. In addition, the female of *O. lienalis* has fine, irregular longitudinal striations on the outer surface [23]. The females of *O. cervicalis* and *O. reticulata* from horses have the inner striae in the cuticle and shorter distance between adjoining ridges than that of the causative agent [22]. These four *Onchocerca* species from domestic animals can therefore be excluded from consideration as the causative agent in this case.

The present agent was distinguished from *O. lupi* and *O. jakutensis* in such characteristics as the distance between ridges, the shapes of the ridges, and the inner striae [20,25].

To compare the causative agent with the *Onchocerca* species already found from wild ungulates in Japan, we used portions of the collections of the histologic sections made from females of *Onchocerca* species in the Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School (Table 1) and published descriptions of these species. In Table 1, *O. skrjabini* Rukhlyadev, 1964, taken from a serow, is distinguished from the present human-case causative agent, owing to great differences in such principal characteristics as the distance between adjacent ridges, shape of the ridges, and the inner striae in the cuticle [26,27]. *Onchocerca eberhardi* Uni et al., 2007 taken from a sika deer differs from the causative agent in the diameter of the midbody as well as such characteristics as the distance between the

ridges, the shape of ridges, and the inner striae [21]. In *O. suzukii* Yagi et al., 1994 taken from a serow, the transverse ridges are absent on the cuticle [27].

On the contrary, *O. dewittei japonica* taken from a wild boar was found to be identical to the present human-case causative agent in the distance between adjacent ridges, the shape of the ridges, the lack of inner striae in the cuticle, and other dimensions such as the body width, number of muscle cells, and size of lateral chords (Table 1) [19]. Therefore, comparison of the causative agent of the human case with the *Onchocerca* species, either outside Japan or present in Japan, indicated that the agent was a female adult of *O. dewittei japonica*.

Detailed examinations of the histologic sections of *O. dewittei japonica* found both in a human (the present study) and from wild boar now allow us to identify retrospectively this species as the causative agent of the first human case in Japan [7,8] which had been suspected as *O. gutturosa* or *O. cervicalis*. Uni et al. [19] described the ridges of *O. dewittei japonica* female as semicircular, with double thickness of the cuticle on the transverse sections. Thus, the difference in the cuticular thickness has a specific value to suggest the presence of salient ridges in transverse sections. In the slightly oblique section shown in their Fig. 3 of the first human case [7], it is our consideration that the difference (24 µm) between the thick cuticle (36 µm) (with the transverse ridge) and the thin cuticle (12 µm) (without ridges) corresponds to the height (8–23 µm) of ridges on *O. dewittei japonica* rather than that (4–13 µm) of those on *O. gutturosa* (Table 1). The difference in the cuticular thickness therefore indicates that the causative agent in the first human case found was *O. dewittei japonica* also, but this species had not yet discovered from wild boar at that time.

*Wolbachia* bacterial endosymbionts were found in *O. dewittei japonica* [28, Casiraghi et al., ongoing work]. It is indicated that (1) *Wolbachia* stimulate neutrophil infiltration in onchocercosomata caused by *Wolbachia*-positive filariae and that (2) eosinophils accumulate to kill the parasites after elimination of the *Wolbachia* by antibiotics [29,30]. Histologic examination showed that, rather than neutrophils, macrophages and eosinophils were abundant around the sections of the worm. The endosymbionts appear to have been destroyed in the altered parts of

the worm; the neutrophils appear to have already been replaced with eosinophils in the course of the death of the parasite in the immunological environment.

Until now, all four known cases of zoonotic onchocerciasis caused by *O. dewittei japonica* parasites found in wild boar (plus probably an earlier case, examined in retrospect) were limited only to Oita, Kyushu. However, the present findings indicate that zoonotic onchocerciasis has occurred in at least one other island of Japan as well. The prevalence of *O. dewittei japonica* in wild boar, as measured by the presence of microfilariae in skin snips, was high in and near Hiroshima Prefecture: 78% (31/40) of wild boar were found to harbor this filarioid in Shimane Prefecture adjoining Hiroshima Prefecture, examined between 2005 and 2006, and was close to the prevalence of the parasites (40/45, or 89%) in wild boar in Oita, Kyushu, in 2003. In Wakayama Prefecture, located in the west-central part of Honshu, 77% (23/30) of wild boar harbored this filarioid in 2007. Thus, as in Kyushu, almost all wild boar over one year old in the western part of Honshu examined, were found to harbor *O. dewittei japonica* (Uni et al., unpublished data).

Having obtained experimentally the infective larvae of *O. dewittei japonica* from several kinds of black flies [31], and having identified as *O. dewittei japonica* the larvae from black flies caught in Oita, Fukuda et al. suggested that *Simulium bidentatum* is a vector in the transmission of the zoonotic onchocerciasis caused by *O. dewittei japonica* in Oita [32]. The black fly inhabits Honshu and Shikoku as well as Kyushu and bites both animals and humans. In the present case, DNA sequences of the mitochondrial *CO1* gene obtained from the causative agent, embedded in paraffin for histologic examination, showed high similarities to those of *O. dewittei japonica* [33, Fukuda et al., in preparation].

In Japan, the habitat of the wild boar (estimated population: several hundred thousands) has recently broadened in the western part of Honshu, Shikoku, and Awaji-shima Island as well as Kyushu, because the annual snowfall has decreased, rice fields left unused by migration of segments of the work forces away from rural areas are favorable habitat for wild boar, and the population of hunters has largely decreased [34]. Therefore, the present human-host case caused by *O. dewittei japonica* suggests that zoonotic onchocerciasis is now liable to occur in other rural areas in Japan, or wherever wild boar and humans are in close proximity and the *Simulium* vectors are known, as well as in Oita.

## Acknowledgements

We thank Prof. Kenichi Wakasa, Department of Diagnostic Pathology, Osaka City University Medical School, for comments about the histologic sections of the human case. We thank Mr. J. L. Yohay for reading the manuscript.

## References

- Orihel T, Eberhard ML. Zoonotic filariasis. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:366–81.
- Pampiglione S, Rivasi F. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochotiella) repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia* 2000;42:231–54.
- Azarova NS, Miretsky OY, Sonin MD. The first instance of detection of nematode *Onchocerca* Diesing, 1841 in a person in the USSR. *Med Parazitol (Mosk)* 1965;34:156–8 (In Russian).
- Siegenthaler R, Gubler R. Paraarticuläres Nematodengranulom (einheimische *Onchocerca*). *Schweiz Med Wochenschr* 1965;95:1102–4.
- Beaver PC, Horner GS, Bilos JZ. Zoonotic onchocercosis in a resident of Illinois and observations on the identification of *Onchocerca* species. *Am J Trop Med Hyg* 1974;23:595–607.
- Ali-Khan Z. Tissue pathology and comparative microanatomy of *Onchocerca* from a resident of Ontario and other enzootic *Onchocerca* species from Canada and the U.S.A. *Ann Trop Med Parasitol* 1977;71:469–82.
- Beaver PC, Yoshimura H, Takayasu S, Hashimoto H, Little MD. Zoonotic *Onchocerca* in a Japanese child. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:298–300.
- Hashimoto H, Murakami I, Fujiwara S, Takayasu S, Takaoka H, Uga S, et al. A human case of zoonotic onchocerciasis in Japan. *J Dermatol* 1990;17:52–5.
- Takaoka H, Bain O, Tajimi S, Kashima K, Nakayama I, Korenaga M, et al. Second case of zoonotic *Onchocerca* infection in a resident of Oita in Japan. *Parasite* 1996;3:179–82.
- Burr Jr WE, Brown MF, Eberhard ML. Zoonotic *Onchocerca* (Nematoda: Filarioidea) in the cornea of a Colorado resident. *Ophthalmology* 1998;105:1494–7.
- Pampiglione S, Vakalis N, Lyssimachou A, Kouppari G, Orihel TC. Subconjunctival zoonotic *Onchocerca* in an Albanian man. *Ann Trop Med Parasitol* 2001;95:827–32.
- Takaoka H, Bain O, Uni S, Korenaga M, Tada K, Ichikawa H, et al. Human infection with *Onchocerca dewittei japonica*, a parasite from wild boar in Oita, Japan. *Parasite* 2001;8:261–3.
- Wright RW, Neafie RC, McLean M, Markman AW. Zoonotic onchocerciasis of the shoulder: a case report. *J Bone Joint Surg* 2002;84:627–9.
- Takaoka H, Bain O, Uni S, Korenaga M, Kozek WJ, Shirasaka C, et al. Zoonotic onchocerciasis caused by a parasite from wild boar in Oita, Japan. A comprehensive analysis of morphological characteristics of the worms for its diagnosis. *Parasite* 2004;11:285–92.
- Takaoka H, Yanagi T, Daa T, Anzai S, Aoki C, Fukuda M, et al. An *Onchocerca* species of wild boar found in the subcutaneous nodule of a resident of Oita, Japan. *Parasitol Int* 2005;54:91–3.
- Sallo F, Eberhard ML, Fok E, Baska F, Hatvani I. Zoonotic intravitreal *Onchocerca* in Hungary. *Ophthalmology* 2005;112:502–4.
- Koehsler M, Soleiman A, Aspöck H, Auer H, Walochnik J. *Onchocerca jakutensis* filariasis in humans. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1749–52.
- Hira PR, Al-Buloushi A, Khalid N, Iqbal J, Bain O, Eberhard ML. Case report: zoonotic filariasis in the Arabian Peninsula: autochthonous onchocerciasis and dirofilariasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:739–41.
- Uni S, Bain O, Takaoka H, Miyashita M, Suzuki Y. *Onchocerca dewittei japonica* n. subsp., a common parasite from wild boar in Kyushu Island, Japan. *Parasite* 2001;8:215–22.
- Sréter T, Széll Z, Egyed Z, Varga I. Subconjunctival zoonotic onchocerciasis in man: aberrant infection with *Onchocerca lupi*? *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96:497–502.
- Uni S, Bain O, Agatsuma T, Harada M, Torii H, Fukuda M, et al. *Onchocerca eberhardi* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from sika deer in Japan; relationships between species parasitic in cervids and bovines in the Holarctic region. *Parasite* 2007;14:199–211.
- Bain O. Redescription de cinq espèces d'onchocercques. *Ann Parasitol Hum Comp* 1975;50:763–88.
- Bain O, Petit G, Poulain B. Validité des deux espèces *Onchocerca lienalis* et *O. gutturosa*, chez les bovins. *Ann Parasitol Hum Comp* 1978;53:421–30.
- Eberhard ML. Studies on the *Onchocerca* (Nematoda: Filarioidea) found in cattle in the United States. I. Systematics of *O. gutturosa* and *O. lienalis* with a description of *O. stilesi* sp. n. *J Parasitol* 1979;65:379–88.
- Demiaszkiewicz AW. Redescription of *Onchocerca jakutensis* (Gubanov, 1964) (Nematoda, Filarioidea). *Acta Parasitol* 1993;38:124–7.
- Uni S, Suzuki Y, Katsumi A, Kimata I, Iseki M, Bain O. Taxonomy and pathology of filarial parasites from Japanese serows (*Capricornis crispus*). *Proc 9th Int Cong Parasitol*; 1998. p. 681–4.
- Yagi K, Bain O, Shoho C. *Onchocerca suzukii* n. sp. and *O. skrjabini* (= *O. tarsicola*) from a relict bovid, *Capricornis crispus*, in Japan. *Parasite* 1994;1:349–56.
- Bain O, Casiraghi M, Martin C, Uni S. The Nematoda Filarioidea: critical analysis linking molecular and traditional approaches. *Parasite* 2008;15:342–8.
- Brattig NW, Büttner DW, Hoerauf A. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect* 2001;3:439–46.
- Nfon CK, Makepeace BL, Njongmeta LM, Tanya VN, Bain O, Trees AJ. Eosinophils contribute to killing of adult *Onchocerca ochengi* within onchocercomata following elimination of *Wolbachia*. *Microbes Infect* 2006;8:2698–705.
- Fukuda M, Takaoka H, Uni S, Bain O. Infective larvae of five *Onchocerca* species from experimentally infected *Simulium* species in an area of zoonotic onchocerciasis in Japan. *Parasite* 2008;15:111–9.
- Fukuda M, Otsuka Y, Uni S, Bain O, Takaoka H. Molecular identification of infective larvae of three species of *Onchocerca* found in wild-caught females of *Simulium bidentatum* in Japan. *Parasite* 2010;17:39–45.
- Fukuda M, Uni S, Boda T, Daisaku K, Hasegawa H, Otsuka Y, et al. A case of zoonotic onchocerciasis in Hiroshima: identification of the causative agent by mitochondrial DNA analysis of paraffin-embedded specimens. *Med Entomol Zool* 2010;61:62 (Suppl.).
- Kodera Y. *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. In: Ohdachi SD, Ishibashi Y, Iwasa MA, Saitoh T, editors. The wild mammals of Japan. Kyoto: Shoukadoh; 2009. p. 304–5.

## 熱帯病・寄生虫症に対する研究班保管国内未承認薬

木村幹男・丸山治彦\*・三浦聡之\*\*

(財)結核予防会新山手病院内科・\*宮崎大学医学部感染症講座寄生虫学分野・

\*\*東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野/きむら・みきお まるやま・はるひこ みうら・としゆき

### 研究班の目的・沿革●

観光、企業活動、学術調査、途上国援助など種々の形で国際交流が活発化し、大量航空機輸送の発達と相まって、日本からの海外渡航者や海外長期滞在者が増加しつつある。そして、渡航目的国としては熱帯・亜熱帯地域や途上国も増えており、熱帯病・寄生虫症に罹患する日本人も増加しつつある。したがって、国内においてもそれらの治療薬剤の医療上の有用性は高くなっているが、患者数が収益性に見合うほど多くはないので、国内製薬企業は新規薬剤の開発に積極的でない。その問題が1980年当時の厚生省薬務局審査課を中心に検討され、研究班を発足させて国内未承認薬を導入し、熱帯病・寄生虫症患者に対して適切な治療を提供することを目指した。

その結果、1980年に厚生省研究事業「輸入熱帯病の薬物治療法に関する研究班」(代表者：東京大学医科学研究所・田中 寛)が発足し、クロロキン、スルファドキシシン/ピリメタミン合剤(当時、国内未承認薬)、キニーネ注、プリマキンなどの抗マラリア薬を含む15種類の国内未承認薬の保管を開始した。また、国立衛生試験所(現：国立医薬品食品衛生研究所)でそれらの薬剤の品質検査を行い、わが国の製剤基準に合致することを確認してから使用することとした。その後の研究班の母体は、厚生省新薬開発研究事業、厚生省オーファンドラッグ研究事業、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業(代表者：東京慈恵会医科大学・大友弘士、その後、宮崎大学・名和行文)、厚労科研費補助金政策創薬総合研究事業(代表者：名和行文、その後、木村幹男)と変遷を重ね、現在の研究班は、平成22年4月に発足した厚労科研費補助金創薬基盤推進研究事業「国内未承認薬の使用も含めた熱帯病・寄生虫症の最適な診療体制の確立」(代表者：木村幹男)である。な

お、本研究班は略称で「熱帯病治療薬研究班」とも呼称される。

### 研究班の活動●

現在では、抗マラリア薬のアトバコン/プログアニル合剤、アーテメター/ルメファントリン合剤、抗赤痢アメーバ薬のメトロニダゾール注、パロモイシンその他、種々の疾患に対する治療薬も導入し(表1, 2)、わが国で発生する患者に対して、欧米先進国並みのレベルで治療が行える体制の構築を目指している。さらに近年、全国の医療従事者からの診断や治療に関する問い合わせにも対応し、症例の相談においては、血液塗抹顕微鏡像、CT/MRIなどの画像、皮膚症状の写真などを添付した電子メールを通じて症例検討を行ってきた。また、ほぼ3年に一度、「寄生虫薬物治療の手引き」(現在は改訂7.0版)を出版して、各種学術集会などで広く配付した。さらに、医療従事者に対する有用な情報提供の場として、研究班ホームページ<sup>1)</sup>を更新しているが、そこには「寄生虫薬物治療の手引き」の電子版を掲載し、随時その電子版の改訂を行うなど、わが国における熱帯病・寄生虫症の総合的ネットワークとしての役割を果たしてきた。

薬剤使用後は、主治医からの治療報告書の提出を求めるが、それらの記載内容を検討し、必要に応じて主治医に詳細を問い合わせ、有効性と安全性に重点をおいた解析を行っている。最近、筆者・木村が中心となり、合併症のない熱帯熱マラリアにおけるアトバコン/プログアニル合剤<sup>2)</sup>、中等症～重症の赤痢アメーバ症におけるメトロニダゾール注<sup>3)</sup>の使用経験をまとめ、雑誌に発表した。また研究報告書レベルでは、マラリアにおけるアーテメター/ルメファントリン合剤、肝蛭症におけるトリクラベンダゾールの有効性と安全性を報告し、リーシュマニア症におけるスチボグル

- 熱帯病治療薬研究班(略称)は熱帯病・寄生虫症の総合的ネットワークである。
- 研究班保管薬剤の使用にあたっては、倫理指針を遵守する必要がある。
- 研究班保管薬剤は、あらかじめ登録された医療機関で使用する。

表1 研究班が保管する抗マラリア薬

一般名	商品名(含量)	疾患	用法・用量(成人を基本)	備考
クロロキン	Avloclor (250 mg 塩=155 mg 塩基)	三日熱、卵形マラリア(いずれも急性期治療)、四日熱マラリア	クロロキン塩基にして初回 10 mg/kg, 6, 24, 48 時間後にそれぞれ 5 mg/kg	熱帯熱マラリアでは薬剤耐性のため、ほとんど使われない。三日熱マラリアでも耐性が出現している
プリマキン	Primaquine (7.5 mg 塩基)	三日熱、卵形マラリア(休眠原虫に対する根治療法)	プリマキン塩基にして 15 mg/日、14 日間。低感受性が予想される三日熱マラリアでは 30 mg/日、14 日間	G6PD 欠損では禁忌
アトハコン/ブ ロクアール合剤	Malarone (250 mg/100 mg)	熱帯熱マラリア (非重症例)	4 錠を 1 日 1 回、3 日間	欧米では治療のみならず、予防にも評価が高い
アーテメター/ ルメフランドリ ン合剤	Riamet (20 mg/120 mg)	熱帯熱マラリア (非重症例)	4 錠を 0, 6, 24, 36, 48, 60 時間後に投与	欧米では治療薬としての評価が高い
キニーネ注	Quinimax (250 mg 塩基/2 ml)	熱帯熱マラリア (重症例)	キニーネ塩基として 1 回量 8.3 mg/kg を 200~500 ml の 5% ブドウ糖液あるいは生理食塩液に希釈し、4 時間かけての点滴静注を 8~12 時間ごとに繰り返す	重症度が高い場合、初回のみ倍量の負荷投与量 (loading dose) も考慮
アーテメター/ プラモトリン 坐薬	Plasmotrim Recto- caps (200 mg)	熱帯熱マラリア (重症例)	1 日目 200 mg を 2 回、2~5 日目それぞれ 200 mg/日 を直腸内投与	上記のキニーネ注が使用不可能なときに緊急避難的に使用

クロロキン、プリマキン、キニーネでは、塩あるいは塩基としての表示がありうることに注意。治療量については、塩基として示すのが原則。

コン酸ナトリウム、クリプトスポリジウム症におけるニタゾキサニド使用例の解析も行っている。

#### 国内未承認薬とその使用基準●

研究班が保管する国内未承認薬は、わずかな例外を除いて先進国で承認されており、標準的薬剤と位置づけられる。これらの薬剤を使用する基準は患者に対する最大限の利益であり、国際的標準からすると研究的な使用とは考えられない。しかし国内未承認薬であるために、健康被害に対して副作用被害救済制度が適用されない問題がある。そして、臨床研究に際しては厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針(平成 20 年 7 月 31 日)」<sup>4)</sup>の遵守が求められている。本倫理指針では、「通常の診療を超えた医療行為」は「介入」として扱われ、臨床研究保険に加入することが義務づけられた。研究班保管薬剤を用いることは国際的標準では通

常の診療の範囲内と判断されるが、わが国では国内未承認薬であることから、「介入」として扱うべきである。本稿が出版されるころには、本研究班において臨床研究保険の契約がなされているはずである。

研究班保管薬剤の使用が可能となるのは、以下のいずれかの場合である。

1) 当該疾患/病態に対して国内承認薬がなく、研究班保管の国内未承認薬による治療が必要と判断される場合。

2) 当該疾患/病態に対する国内承認薬があるが、効果や副作用を勘案し、国際的標準に照らしても国内未承認薬のほうを選択すべきであると判断される場合。

3) 当該疾患/病態に対して国内承認薬を用いたが、効果あるいは副作用の面から、国内未承認薬



- いくつかの抗マラリア薬では、塩としての表記と塩基としての表記がある。
- メトロニダゾール注は重症赤痢アメーバ症での使用価値が高い。
- ニタゾキサニドは免疫不全者でのクリプトスポリジウム症を対象とする。

表2 研究班が保管する抗マラリア薬以外の主要薬剤

一般名	商品名(含量)	疾患	用法・用量(成人を基本)	備考
メトロニダゾール注	Flagyl Inj. (500 mg/バッグ)	赤痢アメーバ症 (経口投与不能例)	500 mgを8時間ごと, 7日間	筆者らにより, 重症例での優れた効果が示されている
ハロモマイシン	Humatin (250 mg)	赤痢アメーバ症 (根治療法)	1,500 mg/日・分3, 10日間	効果の判定が難しい
スルファジアジン	Sulfadiazine (500 mg)	トキソプラズマ症	エイズ患者の脳炎では, スルファジアジン4~6 g/日・分4, ピリメタミン初日200 mg/日・分2, その後50~75 mg/日の併用で, 症状が軽快してからも4~6週間	ロイコボリンを併用
ピリメタミン	Daraprim (25 mg)	トキソプラズマ症		
ニタゾキサニド	Alinia (500 mg)	クリプトスポリジウム症(免疫不全者)	1~2 g/日・分2, 14日間	難治性のジアルジア症にも使われる
ステホグルコシ酸ナトリウム	Pentostam (100 mg/ml)	リーシュマニア症	内臓型, 粘膜皮膚型では20 mg/kgを1日1回静注あるいは筋注, 28日間. 皮膚型では10~20 mg/kgを1日1回局注, 静注, あるいは筋注, 10日間(あるいはそれ以上)	内臓型では薬剤耐性が問題になりつつある
ミルテフォニン	Impavido (50 mg)	リーシュマニア症 (内臓型)	100 mg/日・分2, 28日間	エイズ患者では長期の服用が必要
トリクラヘンダゾール	Egaten (250 mg)	肝蛭症	10 mg/kgを食直後に単回服用, 重症例では20 mg/kg・分2(食直後)	本研究班における使用で, 優れた効果がみられている
スファミン	Germanin (1 g/バイアル)	アフリカトリパノソーマ症(別名, 睡眠病) (ローデシア型の早期)	初めに100 mgの試験的静注, その後20 mg/kg(最大1 g)を0, 3, 7, 14, 21日に計5回	発熱, 発疹, 消化器症状などの副作用. ガンビア型の早期ではベンタミジン
メラルソプロール	Arsobal (180 mg/5 ml バイアル)	アフリカトリパノソーマ症 (ローデシア型の後期)	1日目1.2 mg/kg, 2日目2.4 mg/kg, 3および4日目3.6 mg/kgの静注, 7日間の休薬を置いて3回繰り返す(計26日間)	毒性は高度で, 2~10%に脳症を生じ, うち50%近くが死亡
エフロールニチン	Omidyl (200 mg/ml) (100 ml ボトル)	アフリカトリパノソーマ症 (ガンビア型の後期)	100 mg/kgの静注を6時間ごと, 14日間	貧血, 消化器症状, けいれんなどの副作用
ニフルチモグリス	Lampit (120 mg)	アメリカトリパノソーマ症 (別名, シャーガス病)	8~10 mg/kg/日・分4, 3~4ヵ月間	小児では15 mg/kg/日まで増量可能

による再治療が必要と判断される場合。

#### ●薬剤使用の実際

研究班保管薬剤の使用にあたっては, 以下の手順に従う。薬剤の使用は登録された機関(薬剤使用機関)(研究班ホームページに掲載)で行う。患者の容態などから薬剤使用機関への搬送が不可能

な場合などで, 人道的観点から緊急避難的使用として一般の医療機関で薬剤を使用せざるを得ない場合, 研究班員(木村幹男, 三浦聡之, 丸山治彦のいずれか)から許可を得なければならない。

1) 薬剤使用機関の責任者は, 研究班作成の「薬剤使用説明書」を患者に渡し, それを元に, 患者

- 三日熱マラリアのプリマキン療法では、投与量が多くなりつつある。
- 欧米では、合併症のない熱帯熱マラリアの治療に合剤が多く使われる。
- キニーネ注の投与では、心毒性に注意が必要である。

が自由に質問できる状況下で十分な説明を行う。

2) 「薬剤使用承諾書」に患者の署名を得る。

3) 「薬剤使用登録書」を東京大学医科学研究所の関係者に郵送、ファクス、あるいは電子メール添付で送付する。

4) いわゆる重篤有害事象がみられたら、直ちに「重篤有害事象報告書」を東京大学医科学研究所の関係者にファクス送付する。

5) 治療終了後は一定期間内に、「治療報告書」(マラリア用、非マラリア用)を東京大学医科学研究所の関係者に送付する。

#### 抗マラリア薬治療の概説●

紙面の都合上、マラリアに限って治療の概説を行う。三日熱、卵形マラリアの急性期治療、四日熱マラリアの治療においては、クロロキンをを用いるのが世界的標準である。ただし、三日熱マラリアでは軽度であるがクロロキン耐性が出現していることに注意する。また、三日熱、卵形マラリアで急性期治療の後に、再発予防の目的でプリマキンを用いるが、三日熱マラリアではプリマキン低感受性が増えている。そのため、従来のプリマキン塩基 15 mg/日・14 日間に代わり、倍量にあたる 30 mg/日・14 日間が多く使われつつある。

合併症のない熱帯熱マラリアで原虫数が多くなければ、国内承認薬のメフロキン、キニーネ末(+ドキシサイクリン)も選択肢の一つであるが、前者の薬剤では精神神経系副作用が出やすく、耐性も増えており、後者の薬剤では忍容性の問題がある。欧米ではアトバコン/プログアニル合剤、アーテメター/ルメファントリン合剤が多く使われている。

合併症を有する熱帯熱マラリア(重症マラリア)、あるいは原虫数が多い熱帯熱マラリアでは非経口投与を選択し、キニーネ注が第一選択薬である。ただし、心伝導障害などでは禁忌となり、

投与中も心電図のモニターが必要である。重症度が高い場合、倍量の負荷投与量(loading dose)も考慮するが、心毒性にはより十分な注意が必要である。キニーネ注が禁忌の場合、入手不可能な場合などでは、緊急避難的なアーテスネート坐薬の使用も考慮するが、注射薬よりも効果の発現は遅いこと、吸収にばらつきが出る可能性にも注意する。これら非経口投与により、赤血球感染率<1%で経口摂取が可能となれば、それぞれキニーネ経口薬、アーテスネート経口薬(国内での入手は困難)にスイッチし、非経口投与と経口投与とを合わせて7日間用いる<sup>5)</sup>。最近では、同一薬剤による経口投与の代わりにメフロキン、アトバコン/プログアニル合剤、アーテメター/ルメファントリン合剤のいずれかを投与することも多くなっている。ただし、キニーネ注の後にメフロキンをを用いる場合には、前者の投与終了後12時間以上経ってからとする。

本稿の内容には、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業(H22-政策創薬一般-003)による研究成果を含む。

#### 文 献

- 1) <http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/parasitology/orphan/index.html>
- 2) Hitani, A. et al.: Efficacy and safety of atovaquone-proguanil compared with mefloquine in the treatment of nonimmune patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria in Japan. *J Infect Chemother* 12 : 277-282, 2006
- 3) Kimura, M. et al.: Experience with intravenous metronidazole to treat moderate-to-severe amebiasis in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 77 : 381-385, 2007
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shishin.pdf>
- 5) 木村幹男ほか: 脳マラリア. *Neuroinfection* (印刷中)

寄生虫の標的臓器別症状からすすめる実地診療  
—疑い、問診・診断から治療まで—  
腹部症状(腹痛, 下痢, 下血など)

丸山治彦

宮崎大学医学部感染症学講座寄生虫学分野/まるやま・はるひこ

はじめに●

いわゆる「感染性胃腸炎」の中に占める寄生虫感染症の割合は低いが、寄生虫の側から考えると、消化管はもっとも広く採用されている寄生部位である。回虫、蟯虫、鞭虫、赤痢アメーバやクリプトスポリジウムなどすべて消化管寄生虫である。消化管に一定数以上の虫がいれば何らかの腹部症状が現れる。

症状あるいは訴えが直接的かつ特徴的なときは、それだけで寄生虫を言い当てることも可能なことがある。例えば「排便時にお尻から虫が出てきた。引っ張ったら千切れた」とか「お尻からミミズのような虫が出てきた」などというものである。前者は広節(日本海)裂頭条虫、後者は回虫の可能性が高い。しかしながら、通常の診療では「これはひょっとして寄生虫か」と途中で疑い出すことのほうが多いであろう。本項では、どういうときに寄生虫のことを思い出すべきかに焦点を当てる。

なお、マラリアでも悪心、嘔吐、下痢、腹痛などの腹部症状を訴えることがあるが、これは「発熱」の項目で詳述されるので本項では述べない。

寄生虫の種類●

寄生虫の種類自体は膨大な数に上るが、外来で遭遇するであろう消化管関連の寄生虫に絞ればそれほど多いものではない。消化管および肝臓に病変をもたらす寄生虫の種類を表1にまとめた。以下に述べるとおり症状は寄生部位に依存するので、主な寄生部位を知っておくと整理しやすい。

注意すべきは、ヒト体内では成熟できずに幼虫が腸管外を移動する、いわゆる幼虫移行症のカテゴリーに含まれる寄生虫も消化管に障害を引き起こす可能性があることである(後述)。

寄生虫による腹部症状●

腹痛、下痢、下血などの症状は、寄生虫が消化管やその近傍に寄生して、機械的刺激や炎症反応などの刺激を起こすことが原因である。寄生数が少なれば症状はほとんどないが、虫体が大きい場合などでは少数寄生でも発症しうる。寄生虫は種によって決まった部位に寄生するので、臨床症状から寄生虫の種類を大まかに推定することは可能で、診断の出発点になる。

1. 急激に発症する腹痛

上部消化管に寄生虫が存在して急な痛みで発症する場合がある。もっとも代表的なのは胃アニサキス症である。典型的には、夕食に新鮮なサバやイカを食べたところ、夜中に突然心窩部が差し込むように激しく痛み出して寝ていられなくなったという経過をとる。届出数は少ないが、毎年2,000~3,000例くらい発生していると推定されており、夜間の当直で遭遇する可能性が高い。内視鏡による虫体の摘出が診断と治療を兼ねる。

他に上部消化管で急性の痛みを引き起こすものに回虫がある。現代日本で回虫の生活環が維持されているとは思えないが、患者は存在する。回虫は狭いところにもぐり込む性質があるので、胆管に入り込んで胆管を閉塞させ急性胆嚢炎を起こす。この場合、腹部超音波検査で回虫が胆管内の異物として認められる。

その他の例として、幼虫移行症による炎症性腸閉塞がある。ドロレス顎口虫や旋尾線虫タイプXが消化管の腹膜側から組織に侵入し、激しい好酸球性炎症を起こして機能的イレウスに陥る。一般に、寄生虫感染による顕著な好酸球増多は、寄生虫(原虫を除く)の幼虫が腸管外の組織を移行しているときか、成虫が腸管外に寄生しているときにみられる。したがって、著明な好酸球増多があった腹部症状を訴えるときは、腸管外の寄生虫が腹

- マラリアでも悪心、嘔吐、下痢、腹痛などの腹部症状を訴えることがある。
- 著明な好酸球増多があつて腹部症状を訴えるときは、腸管外の寄生虫が腹部症状の原因になっていることを考える。

表1 病変部位別寄生虫リスト

寄生部位	寄生虫	主な症状	主な診断方法	国内感染
胃	アニサキス	急な胃痛	虫体確認	+
肝・胆道	ランブル鞭毛虫	下痢・腹痛	便検査(シスト, 栄養体)	+
	赤痢アメーバ(肝膿瘍)	季肋部痛・発熱	抗体検査	+
	肝蛭	季肋部痛・発熱	抗体検査	+
	腸管住血吸虫(虫卵)	肝機能障害	抗体検査・便検査(虫卵)	-
	単包虫	季肋部痛・発熱	抗体検査	-
	多包虫	腹痛・黄疸	抗体検査	+
	回虫	急な腹痛	虫体確認	+
小腸	ランブル鞭毛虫	下痢・腹痛	便検査(シスト, 栄養体)	+
	クリプトスポリジウム	下痢・腹痛	便検査(オーシスト)	+
	サイクロスポーラ	下痢・腹痛	便検査(オーシスト)	-
	横川吸虫	下痢・腹痛	便検査(虫卵)	+
	腸管住血吸虫(成虫)	下痢・腹痛	抗体検査・便検査(虫卵)	-
	広節(日本海)裂頭条虫	下痢・腹痛	虫体確認・便検査(虫卵)	+
	無鉤条虫		虫体確認・肛門周囲虫卵検査*	-
	有鉤条虫		虫体確認・肛門周囲虫卵検査*	-
	小型条虫	下痢・腹痛	便検査(虫卵)	+
	回虫	下痢・腹痛	虫体確認	+
	糞線虫	下痢・腹痛	便検査(幼虫)	+
			体重減少	
大腸	赤痢アメーバ	粘血便・下痢・腹痛	便検査(シスト, 栄養体)	+
	腸管住血吸虫(成虫)*	下痢・腹痛	抗体検査・便検査(虫卵)	-
	鞭虫	下痢・腹痛(多数寄生時)	虫体確認・便検査(虫卵)	+
	蟯虫	下痢・腹痛(多数寄生時)	虫体確認・肛門周囲虫卵検査*	+

顎口虫と旋尾線虫タイプXはこの表に入っていない。

\*いわゆるセロファンテープ法。

部症状の原因になっていることを考える。

## 2. 肝異常陰影

肝臓に寄生したり病変を引き起こす寄生虫は多い(表1)。肝臓は腫大し、慢性の季肋部痛、悪心、嘔吐、発熱などを伴う。肝臓の画像検査により何らかの異常陰影が得られるので、問題は原因の鑑別リストに寄生虫が入っているかいないかにかかっている。一般的に、寄生虫疾患の場合は、画像が派手な割に全身状態は良好である。

詳しくは「肝障害、肝脾腫、肝エコー異常」の項目で述べられるが、画像自体から寄生虫を疑う場

合として「境界明瞭な肝膿瘍」がある。孤発性であればアメーバ性肝膿瘍を疑うべきだし、多発性であれば単包虫症の可能性もある。内臓幼虫移行症、肝蛭症、住血吸虫症、多包虫症などでは、肝異常陰影に加えて末梢血好酸球増多がみられる。

## 3. 慢性の下痢・腹痛

下痢が慢性的に続き、培養で起病菌が検出されず、または抗菌薬による治療が無効のときには、まず寄生虫感染を疑うべきである。通常の感染性胃腸炎は、免疫不全でなければ早く2~3日、遅くとも1週間くらいから治癒に向かう。抗菌薬

- 理由のわからない慢性の下痢では、寄生虫感染を疑い便検査を行うことが必須である。
- 潰瘍性大腸炎と診断する前に、便検査、潰瘍部の生検などによりアメーバの有無を確認しなければならない。
- 赤痢アメーバ感染が確定したら他の性感染症(梅毒、HIV感染など)も検索すべきである。

の効かない慢性の下痢はウイルス性でも細菌性でもないことを示唆しているが、非感染性の胃腸炎の検討に入る前に、ぜひとも寄生虫の検索を行う必要がある。

これまでに、アメーバ性大腸炎なのに潰瘍性大腸炎としてステロイド投与を受けていた例(多数)、横川吸虫症であるのに悪性疾患疑いで長期の入院を余儀なくされた例、重症の糞線虫症による吸収不良によって体重減少と低蛋白血症が起きていたにもかかわらず神経性食思不振症が疑われていた例などがある。理由のわからない慢性の下痢では、寄生虫感染を疑い便検査を行うことが必須である。

下痢や腹痛の原因になる寄生虫としては、原虫類が赤痢アメーバ、クリプトスポリジウム(通常慢性化はしない)、ランブル鞭毛虫、サイクロスポーラなどがあり、吸虫類では横川吸虫、有害異形吸虫、腸管住血吸虫(マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、メコン住血吸虫、インターカラーツム住血吸虫)がある。条虫類では広節裂頭条虫、無鉤条虫、有鉤条虫、小型条虫が下痢を起こしうる。線虫類では回虫、鞭虫、蟯虫などの重症例で慢性の下痢を起こすが、現在の日本でこれら腸管線虫の多数寄生例は皆無といってよい。線虫類で問題にすべきは糞線虫である(後述)。

寄生虫と症状の関係は、小腸寄生では原虫、吸虫、条虫ともに下痢は軟便から水様性までさまざまだが、ほとんどの場合便潜血はみられない。一方、大腸寄生では粘膜破壊を伴うものが多く、粘血便やテネズムスを認める。以下に、特に赤痢アメーバ感染症と糞線虫症について述べる。

#### a. 赤痢アメーバ感染症

赤痢アメーバは熱帯から亜熱帯を中心に全世界に分布している。病型にはアメーバ性腸炎とアメーバ性肝膿瘍がある。ほとんどの場合粘膜病変

が認められるが、肝膿瘍だけの症例もある。

アメーバ性肝膿瘍の画像所見は特徴的で、境界明瞭な孤発性の膿瘍(右葉に多い)を形成する。肝膿瘍には抗体検査が診断法として有効である。アメーバ性大腸炎では粘膜に潰瘍が形成され、増悪と寛解を繰り返す。ステロイド投与により炎症が抑制されるために症状が軽快し、一見治療がうまくいったように錯覚することがあるが、あくまで錯覚である。潰瘍性大腸炎と診断する前に、便検査、潰瘍部の生検などによりアメーバの有無を確認しなければならない。

赤痢アメーバ症の治療はメトロニダゾール(商品名:フラジール、250 mg錠)が第一選択薬である。欧米での標準的用量は2,250 mg/日(1日9錠、分3)を10日間であるが(用法・用量保険適応外)、食欲不振、悪心、嘔吐などの消化器症状が出現しやすい。なお、わが国では赤痢アメーバ症の多くは性行為感染症である<sup>1)</sup>。赤痢アメーバ感染が確定したら他の性感染症(梅毒、HIV感染など)も検索すべきである。

#### b. 糞線虫症

少数寄生では無症状で気付かれないことも多いが、多数が寄生すると下痢や腹痛、腹部膨満感、吸収不良を起こす。もっとも重篤な病態は播種性糞線虫症と呼ばれ、大腸粘膜から侵入した幼虫が体内のいたる所に血行性にばらまかれる。粘膜侵入時に腸内細菌を引き連れて入り、敗血症、細菌性髄膜炎、細菌性肺炎などの重篤な合併症を併発する。発症のきっかけは、加齢や免疫抑制薬投与などによる宿主の免疫力低下である<sup>2)</sup>。成人T細胞白血病(ATL)のキャリアが白血病発症前に糞線虫症を発症することはよく知られている。ただし、臨床的に免疫不全がなくても重症化する事例がある。

糞線虫の特徴は自家感染を起こすことである。

- 原因不明の慢性の下痢を起こしている患者が南西諸島出身であったら、何十年も島を離れていても糞線虫症を疑わなくてはならない。
- どんな患者でも感染症の可能性があるときには「最近海外旅行には行かれましたか」と聞く習慣をつけておいたほうがよい。

自家感染とは、小腸に寄生しているメスが産んだ虫卵が孵化し、幼虫の一部がF型と呼ばれる感染型の幼虫に发育して大腸粘膜や肛門周囲の皮膚から経粘膜または経皮的に侵入し、消化管に到達して成熟することをいう。自家感染の結果、成虫の寿命は1~2年であるにもかかわらず何十年も感染が持続する。

宿主免疫能が低下するとF型感染幼虫に发育する幼虫の割合が増え、結果として体内の成虫の数が増え、寄生虫体数が膨大になる。かくして重症糞線虫症、播種性糞線虫症に陥る。わが国では糞線虫は南西諸島に分布しているので、子供時代にこの地方に住んでいて中年を過ぎて発症することがある。原因不明の慢性の下痢を起こしている患者が南西諸島出身であったら、何十年も島を離れていても糞線虫症を疑わなくてはならない。

糞線虫症の治療はイベルメクチン(商品名:ストロメクトール, 3mg錠)が第一選択薬である。200mg/kg/日, 1日1回, 朝食1時間前に服用, 2週間後に再度同量服用を原則とするが, 免疫不全や播種性糞線虫症があるときには1~2週間隔で, 糞線虫が陰性化するまで4回以上投与する<sup>3)</sup>。経口摂取不能の場合は錠剤を粉砕してイレウス管などから投与するが, 緊急倫理審査を経て動物用イベルメクチン注射薬を静注したという報告もある<sup>4)</sup>。

#### ●問診のすすめかた

寄生虫感染をいくらかでも疑った場合に確認すべきポイントとしては, 海外渡航歴, 国内の居住歴, 食事歴がある。

途上国への渡航歴があれば寄生虫感染のリスクは増す。いわゆる旅行者下痢症のうち, 寄生虫ではランブル鞭毛虫, 赤痢アメーバ, クリプトスポリジウムが多い。国内感染がまれであるものには

表2 腹部症状を起こしうる寄生虫に感染する食品のリスト

	寄生虫	食品
線虫	アニサキス 旋尾線虫タイプX 顎口虫	イカ, サバなど ホタルイカ ドジョウ, ヘビ(マムシ), 淡水魚
吸虫	横川吸虫 肝吸虫 肝蛭	アユ, ウグイ モロコ, タナゴなど 水草, ウシ(肝)
条虫	広節(日本海)裂頭条虫 無鉤条虫* 有鉤条虫* 旋毛虫*	サケ, マスなど ウシ ブタ ブタ, クマ, アザラシなど

\*国内では感染しない。

サイクロスポーラがあげられる<sup>5)</sup>。途上国からの帰国者では検査すべき病原体の種類と緊急度が大幅に変わってくることを考えると, どんな患者でも感染症の可能性があるときには「最近海外旅行には行かれましたか」と聞く習慣をつけておいたほうがよい。

居住歴が寄生虫感染と関係することがある。具体的には, 北海道ではエキノコックス症を, 南西諸島(薩南諸島と琉球諸島)では糞線虫症を考えなければならない。どちらも致命的になりうる寄生虫疾患である。

日本国内では寄生虫には食品から感染することが多い。したがって, 感染性胃腸炎を診察するときの問診リストに寄生虫関連の食品も加えておくのがよい(表2)。通常の食中毒と違う点は, 新鮮な食材ほど寄生虫感染のリスクは増すことである。また, 野生動物(鳥類, 獣, 爬虫類, 両生類, 淡水産の魚類, 甲殻類)を十分に加熱せずに食べれば寄生虫感染のリスクが高い。精をつけるためなどの理由でいろいろな人がいろいろなものを口にする。本人は決して「変なもの」を口にしたとは

- 野生動物(鳥類, 獣, 爬虫類, 両生類, 淡水産の魚類, 淡水産の甲殻類)を十分に加熱せずに食べれば寄生虫感染のリスクが高い。
- 寄生虫を疑ったときの便検査では, 日を変えて複数回施行する必要があることと, 直接塗抹では検出できない寄生虫があることに留意する。

思っていないので, 丁寧な聞きかたを心掛けるべきである。

#### 検査のすすめかた●

腸管寄生原虫やヒト腸管内で成熟する吸虫, 条虫, 線虫では, 嚢子や栄養体, 虫卵, 幼虫, 成虫などが糞便とともに排出される。したがって, これらの寄生虫を疑ったときには便検査を行う必要がある。便検査に際しての留意点としては, 1回かぎりではなく日を変えて複数回施行すること, 通常の直接塗抹では検出できない寄生虫があることを認識しておくということである(「糞便検査」の項参照)。

寄生虫によっては産卵数が少ないので, 集卵法(横川吸虫や住血吸虫など)や特殊な検出法(糞線虫症における普通寒天平板培地法)が用いられることがある。しかしながら, 下痢の原因が寄生虫であれば寄生数は多いと考えるべきで, 直接塗抹法で調べる価値は十分にある。

内視鏡検査は, 内視鏡が届く範囲に肉眼レベルの寄生虫がいる場合きわめて有効である。上部消化管では回虫, アニサキス, 大腸内視鏡では鞭虫や広節(日本海)裂頭条虫が発見される。広節裂頭条虫では, 内視鏡で追いかけたが回盲部から奥の方に逃げられたという例が多い。カプセル内視鏡は, 自然状態の寄生虫を観察できるという点で寄生虫学者としては興味深い。

抗体検査が有効な寄生虫は組織侵入性があるものに限られるので, 幼虫移行症や腸管以外の臓器に寄生する虫など, 便検査が無効な寄生虫疾患に

対して有用である。寄生虫の抗体検査は, (株)エスアールエル, 宮崎大学医学部寄生虫学, 国立感染症研究所寄生動物部などで実施している。

#### おわりに●

寄生虫感染症に関する相談があるときは, 最寄りの大学の寄生虫学・医動物学関係の研究室, あるいは国立感染症研究所寄生動物部に連絡するのがよい。筆者が所属する宮崎大学医学部寄生虫学分野でも検査依頼や相談に応じている。詳しくは研究室ホームページを参照いただきたい(<http://www.miyazaki-med.ac.jp/parasitology/detail.htm>, 相談専用メールアドレスは [kessai@med.miyazaki-u.ac.jp](mailto:kessai@med.miyazaki-u.ac.jp))。

本稿の内容には, 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業(H22-政策創薬一般-003)による研究成果を含む。

#### 文 献

- 1) 日本性感染症学会編: 赤痢アメーバ症. 性感染症 診断・治療 ガイドライン 2008
- 2) Keiser, P.B. et al.: *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev* 17: 208-217, 2004
- 3) 平田哲夫: 糞線虫症. 寄生虫薬物治療の手引き 2010, 熱帯病治療薬研究班編
- 4) Amornvipasa, P. et al.: Overwhelming strongyloidiasis. *Asian Biomedicine*, vol. 3, No. 5, p.531-536, 2009
- 5) 増田剛太ほか: サイクロスポーラ症一症例報告4例と文献的考察一. *感染症誌* 76: 416-424, 2002

# 寄生虫検査

丸山 治彦

## 異常値の出るメカニズムと臨床的意義

寄生虫検査における便検査の異常とは、便中に寄生虫の虫体、虫卵、幼虫、シスト(嚢子)、オーシストなどが検出されることである。シストあるいはオーシストとは原虫の感染型で、宿主外に排出されて次の宿主への感染源となる。検出されないのが正常であり、検出されればそれだけで寄生虫感染の証明になる。

便検査で感染が証明される寄生虫は、基本的に消化管およびその付属器(肺や胆管など)に寄生するもので、赤痢アメーバ、ランブル鞭毛虫(ジアルジア)、クリプトスポリジウム、イソスポラ、横川吸虫、広節(日本海)裂頭条虫、糞線虫、鞭虫、回虫などである。肺吸虫や住血吸虫も便中に虫卵を検出できることがある。

一方、寄生虫が消化管やその付属器でないと寄生している場合には、便中に虫体、虫卵、幼虫、シスト、オーシストなどが排出されることはなく、便検査は陰性となる。具体的には、組織寄生性の原虫(マラリア原虫、トキソプラズマなど)や組織寄生性の寄生蠕虫(フィラリア類、旋毛虫など)、さらに人体内で成虫になれない寄生蠕虫(イヌ回虫、ブタ回虫、顎口虫、エキノコックス、マンソン孤虫など)も、便検査は陰性である。有鉤条虫、無鉤条虫、蟯虫は、成虫になっても消化管内では産卵しないので、通常の便検査は陰性である。これらの寄生虫には、セロファンテ

ープ法による肛門周囲の虫卵検出が行われる。

便検査は、通常はホルマリン・エーテル法などの集シスト/集卵法を用いるが赤痢アメーバやランブル鞭毛虫の栄養体を観察する場合には「直接塗抹法」で検出できる。これは、少量の便をスライドグラスに採って生理食塩水で混和・希釈して鏡検するもので、採便後1~2時間以内に30~35℃に保って観察する。一度でも凍結・融解した便では栄養体は確認できない。

## 臨床上の重要性と選択

### ■診断価値が高い病態

寄生虫感染を疑って便検査を施行するべきなのは以下の場合である。

- 慢性の下痢が続き、培養で起因菌が検出されないか、抗菌薬による治療が無効のとき
  - 途上国から帰国後の下痢で、有意な細菌・ウイルスを検出できないとき
  - 患者が免疫不全状態にあると考えられるとき
  - そのほか、原因不明の慢性の下痢があるとき
- 一方、便寄生虫検査の意味がないのは以下の場合である。
- フィラリア症やトキソプラズマ症など、便中に寄生虫が出現しない疾患を疑うとき
  - トキソカラ症やマンソン孤虫症などの幼虫移行症を疑うとき

### ■重要な疾患

[赤痢アメーバ感染症] 大腸炎がある場合や肝



に孤発性の膿瘍を認める場合は、赤痢アメーバ感染症を疑う。途上国からの帰国者、施設入居者、男性同性愛者がハイリスクとされる。赤痢アメーバ感染はほかの性感染症との重複があり得るので、アメーバ陽性との結果が得られれば梅毒やHIVなどについても検査すべきである<sup>1)</sup>。

[ランブル鞭毛虫症(ジアルジア症)] 無症状でシストの排出のみ認めるものから水様性の激しい下痢、吸収不良症候群、胆管胆嚢炎まで、さまざまな病状を呈する。途上国からの帰国者と男性同性愛者に感染が多いとされるが、感染源が推測できないものもある。

[クリプトスポリジウム症] 水様性の下痢を特徴とするが、健常人では自然治癒する。したがって、慢性の下痢の原因がクリプトスポリジウムの場合には、何らかの免疫不全が背景にあると考えるべきである。

[糞線虫症] 全く症状のない場合から重症糞線虫症と呼ばれる重篤な状態まで幅広い。下痢を起こしているような重症例では直接塗抹でも幼虫が観察される。日本では鹿児島県から沖縄県にかけての南西諸島出身者に患者が認められる。糞線虫症の重症化には成人T細胞白血病が背景にあることがあるので、HTLV-I抗体(ATLA-抗体)を検査すべきである。

## 正常と異常の判断

便中に寄生虫の虫体、虫卵、幼虫、シスト、オーシストなどが検出されれば、それだけで寄生虫疾患の確定診断がつく。無症状でも治療の対象になるので、便検査における寄生虫陽性は異常と判断できる。

## 異常を示す疾患・病態

[赤痢アメーバ感染症] 便検査で診断される寄生虫疾患のうち最も報告症例数が多い。途上国帰りで感染リスクが高く、国内感染は性感染症と考えたほうがよい。赤痢アメーバ感染では大腸粘膜が破壊されるので、腸穿孔や遠隔臓器で

の膿瘍形成が起こりうる。アメーバ性肝膿瘍では大腸粘膜に病変のないことがあり、便検査も陰性である。

[ランブル鞭毛虫症(ジアルジア症)] 小腸上部が寄生部位だが、胆嚢や胆管粘膜まで寄生が波及していることもある。

[クリプトスポリジウム症] 水様性の下痢がみられる場合、きわめて多数のオーシストが便中に排出される。数個のオーシストの摂取で発症しうるので、便の取り扱いには注意が必要である。AIDS患者の感染では抗ウイルス療法が効果を現すと治癒する。

[糞線虫症] 重症例では直接塗抹で幼虫(R型)を検出できる。形態学的な確定診断は濾紙培養法で感染幼虫(F型幼虫)を得ることで可能である。寄生虫体数が少ないときはホルマリン・エーテル法などでは十分な感度が得られないので、普通寒天平板培地法を行う<sup>2)</sup>。

## 関連検査

[抗体検査] 赤痢アメーバの慢性感染、特にアメーバ性肝膿瘍では抗体検査はきわめて有効。肺吸虫症、住血吸虫症では虫卵陽性率が低いので、便検査よりも抗体検査のほうが信頼性が高い。

[抗原検査] 便中に含まれる原虫抗原を検出するキットが各種販売されているが、いずれも国内では診断薬として承認されていない。

## 検査費用と保険請求

寄生虫便検査が行われるのは、診断目的、除外目的、治癒判定目的のいずれかである。1回限りではなく、日にちを変えて数日のうちに3回程度施行するべきである。広節(日本海)裂頭条虫の駆虫判定は、治療後2~4週後に行う。

## 文献

- 1) 大西健児：東京都立墨東病院感染症科を受診した最近の赤痢アメーバ症について。病原微生物検出情報(IASR)28:105-106,2007
- 2) Sato Y, et al: Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. Am J Trop Med Hyg 53:248-250,1995



## Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*

Yasutoshi Kido <sup>a</sup>, Kimitoshi Sakamoto <sup>a</sup>, Kosuke Nakamura <sup>a</sup>, Michiyo Harada <sup>a</sup>, Takashi Suzuki <sup>b</sup>, Yoshisada Yabu <sup>b</sup>, Hiroyuki Saimoto <sup>c</sup>, Fumiyuki Yamakura <sup>d</sup>, Daijiro Ohmori <sup>d</sup>, Anthony Moore <sup>e</sup>, Shigeharu Harada <sup>f</sup>, Kiyoshi Kita <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>b</sup> Department of Molecular Parasitology, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University, Nagoya 467-8601, Japan

<sup>c</sup> Department of Materials Science, Faculty of Engineering, Tottori University, Tottori, Japan

<sup>d</sup> Department of Chemistry, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan

<sup>e</sup> Biochemistry and Biomedical Sciences, School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer, Brighton, UK

<sup>f</sup> Department of Applied Biology, Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 September 2009

Received in revised form 23 December 2009

Accepted 25 December 2009

Available online 4 January 2010

#### Keywords:

Alternative oxidase

Membrane-bound diiron protein

*Trypanosoma brucei*

Ascofuranone

Chemotherapy

### ABSTRACT

The trypanosome alternative oxidase (TAO) functions in the African trypanosomes as a cytochrome-independent terminal oxidase, which is essential for their survival in the mammalian host and as it does not exist in the mammalian host is considered to be a promising drug target for the treatment of trypanosomiasis. In the present study, recombinant TAO (rTAO) overexpressed in a haem-deficient *Escherichia coli* strain has been solubilized from *E. coli* membranes and purified to homogeneity in a stable and highly active form. Analysis of bound iron detected by inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS) reveals a stoichiometry of two bound iron atoms per monomer of rTAO. Confirmation that the rTAO was indeed a diiron protein was obtained by EPR analysis which revealed a signal, in the reduced forms of rTAO, with a *g*-value of 15. The kinetics of ubiquinol-1 oxidation by purified rTAO showed typical Michaelis–Menten kinetics ( $K_m$  of 338  $\mu$ M and  $V_{max}$  of 601  $\mu$ mol/min/mg), whereas ubiquinol-2 oxidation showed unusual substrate inhibition. The specific inhibitor, ascofuranone, inhibited the enzyme in a mixed-type inhibition manner with respect to ubiquinol-1.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Trypanosoma brucei* is a parasite that causes African sleeping sickness in humans and Nagana in livestock and is transmitted by the tsetse fly. There is an urgent need for further development of chemotherapy against African trypanosomiasis since current chemotherapeutic drugs are not entirely satisfactory [1].

Trypanosomal parasites are equipped with a unique energy metabolism, they live as the bloodstream form in the mammalian host and as the procyclic form in the vector. The procyclic form of *T. brucei* fulfills its ATP requirement from a cyanide-sensitive and

cytochrome-dependent respiratory chain comparable to that observed in the host mitochondria, whereas in the bloodstream form, trypanosomes use the glycolytic pathway, which is localized in a unique organelle the glycosome, as their major source of ATP [2–5]. Once the parasites invade the mammalian host in the bloodstream form, both its cytochrome-dependent respiratory chain and ATP synthesis by oxidative phosphorylation disappear [2,5]. Instead a cyanide-resistant and cytochrome-independent trypanosomal alternative oxidase (TAO) functions as the sole terminal oxidase to re-oxidize NADH accumulated during glycolysis [5].

TAO is generally considered to be a good target for the anti-trypanosomal drugs because this oxidase is essential for their survival, since it reoxidizes cytosolic NADH, and mammalian hosts do not possess this protein [5,6]. Indeed, we found that ascofuranone, isolated from the pathogenic fungus *Ascochyta visiae*, specifically inhibits the quinol oxidase activity of TAO and rapidly kills the parasites [7]. In addition, we have confirmed the chemotherapeutic efficacy of ascofuranone *in vivo* [8,9].

The alternative oxidase (AOX) is a non-protonmotive ubiquinol oxido-reductase catalyzing the 4-electron reduction of dioxygen to water [5,10–12]. Genes encoding AOX have been found in higher

**Abbreviations:** AOX, alternative oxidase; DM, *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside; EPR, electron paramagnetic resonance; ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectrometer; IPTG, isopropyl,  $\beta$ -D-1-thiogalactoside;  $k_{cat}$ , molecular activity; C10E8, octaethylene glycol-monododecylether; OG, *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; rTAO, recombinant trypanosome alternative oxidase; SHAM, salicylhydroxamic acid; TAO, trypanosome alternative oxidase; Ubiquinol, reduced form ubiquinone

\* Corresponding author. Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. Tel.: +81 3 5841 3526; fax: +81 3 5841 3444.

E-mail address: [kita@r.m.u-tokyo.ac.jp](mailto:kita@r.m.u-tokyo.ac.jp) (K. Kita).

plants, algae, yeast, slime molds, free-living amoebae, eubacteria and nematodes [13–16]. Moreover, recent bioinformatic searches have broadened the taxonomic distribution of AOX to some members of the animal kingdom [17]. The primary role of AOX in non-thermogenic plants is to regulate cellular redox balance and to protect against reactive oxygen species particularly when the cytochrome pathway is inhibited [18–20]. In addition to this role, many other physiological roles have been described for AOXs in other organisms and these have been discussed in detail elsewhere [13,21]. The ubiquitous occurrence of AOX may suggest that the metabolic flexibility that the alternative pathway confers upon an organism allows it to respond to a wide range of developmental and environmental conditions [22].

Despite universal conservation of the gene and diversified physiology, the molecular features of AOX have not yet been well characterized. Although no high-resolution AOX structure has been determined to date, current structural models predict that it is an integral interfacial membrane protein that interacts with a single leaflet of the lipid bilayer, and contains a non-haem diiron carboxylate active site [23,24]. This model is supported by extensive site-directed mutagenesis studies [18,25–29] and furthermore both EPR and FTIR spectroscopies have confirmed the presence of a binuclear iron center in both the plant and trypanosomal enzymes [30–32].

Further detailed structural and biochemical analyses of AOXs, however, requires further development of purification protocols to produce sufficiently purified and highly active protein to enable crystallization trials and kinetic analyses to proceed. In this paper, we report on the further refinement of our previous protocol through over-expressing rTAO in an *E. coli*  $\Delta hemA$  mutant (FN102) strain, which lacks quinol oxidase activity of cytochrome *bo* and *bd* complexes [33–35]. Purified rTAO protein is highly active and exhibits an exceptional stability upon storage. The analysis of the prosthetic groups by inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS) and electron paramagnetic resonance (EPR) reveals the presence of two ferric ions stoichiometrically bound per rTAO monomer. To our knowledge this is the first direct confirmation of two ferric irons per AOX. Furthermore we show that purified rTAO is potently inhibited by ascofuranone with mixed function kinetics.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of membrane sample

The strain FN102/pTbAO carrying cDNA for *T. b. brucei* TAO [36] was pre-cultured at 37 °C in 100 ml of LB medium containing 10 mg ampicillin, 5 mg kanamycin, and 5 mg 5-aminolevulinic acid for 4–6 h. The pre-cultured cells were aerobically grown at 30 °C in 10 l of S-medium containing 100 g tryptone peptone, 50 g yeast extract, 50 g casamino acid, 104 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.5 g trisodium-citrate·2H<sub>2</sub>O, 25 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 g FeCl<sub>3</sub>, 0.2%(w/v) glucose, and 1 g carbenicillin. The culture was initiated at O.D.<sub>600</sub> = 0.01 and expression of rTAO was induced by the addition of isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactoside (IPTG) (25  $\mu$ M) at O.D.<sub>600</sub> = 0.1. Cells were harvested 8–10 h following induction and were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 20%(w/w) sucrose, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Sigma) and broken by a French Pressure Cell (Ohtake, Tokyo). Unbroken cells were removed by centrifugation at 8000 g for 10 min (Hitachi 21G). Inner membranes of FN102/pTbAO were fractionated in high density sucrose after ultracentrifugation at 200,000 g for 1 h at 4 °C (Hitachi 85H) (35 ml of supernatant was overlaid over 35 ml of 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 40%(w/w) sucrose per ultracentrifuge tube). Buoyant inner rich membranes upon 40%(w/w) sucrose layer were fractionated and the inner membrane pellet was separated by further ultracentrifugation at 200,000 g for 1 h (HITACHI 85H). The membrane pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 20%(w/w) sucrose.

### 2.2. Solubilization

Membranes were treated with solubilization buffer (6 mg/ml protein in 50 mM Tris-HCl, 1.4%(w/v) *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG), 200 mM MgSO<sub>4</sub>, 20%(v/v) glycerol, pH 7.3) at 4 °C and immediately ultracentrifuged at 200,000 g for 1 h at 4 °C. The quinol oxidase activities of the samples before centrifugation, as well as that of supernatant and pellet were determined.

### 2.3. Purification of rTAO

Hybrid batch/column procedure described in the manufacturer's instruction was used as stated below. Ten milliliter of the resin (BD Bioscience, TALON Metal Affinity Resin) was equilibrated in a batch format by 100 ml of equilibration buffer (20 mM Tris-HCl, 1.4%(w/v) OG, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 20%(v/v) glycerol, pH 7.3). Twenty milliliter of OG extract was mixed with the resin for 20 min at 4 °C. The resin was washed twice with 100 ml of wash buffer (20 mM Tris-HCl, 20 mM imidazole, 0.042%(w/v) *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM), 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 20%(v/v) glycerol pH 7.3) and the resin bound rTAO was transferred to a column for additional washing with 20 ml of second wash buffer (20 mM Tris-HCl, 165 mM imidazole, 0.042%(w/v) DM, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 20%(v/v) glycerol pH 7.3; flow rate 1 ml/min) and protein elution. Finally, rTAO was eluted with elution buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM imidazole, 0.042%(w/v) DM, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 60 mM NaCl, 20%(v/v) glycerol pH 7.3; flow rate 1 ml/min). Fractions (4 ml each) were collected.

### 2.4. Quantitative analysis of metals and EPR spectroscopy

Three independent preparations of rTAO were analyzed (details in Section 3). Each sample solution containing 0.1 g of rTAO was added to 1 ml of nitric acid and 7 ml of water. Organic compounds were hydrolyzed by microwave-assisted protein digestion system (Ethos Pro, Milestone General). Fe, Mn, Cu, Zn and Co in each sample were quantified by inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS, ELAN DRC PerkinElmer Japan). Analysis was performed by the Sumika Chemical Analysis Center (Osaka, Japan). Protein concentration was determined by the Lowry method.

EPR spectra were recorded on a JEOL X-band JES-FA300 spectrometer equipped with an ES-CT470 Heli-Tran cryostat system and a Scientific Instruments digital temperature indicator/controller model 9700a. For EPR analysis of rTAO, 13 mg/ml purified rTAO was frozen in EPR tubes in liquid nitrogen. The purified rTAO was reduced by 2 mM dithionite and 1 mM phenazine methosulfate prior to freezing.

### 2.5. Ubiquinol oxidase assay

Ubiquinol oxidase activity was measured by recording the absorbance change of ubiquinol-1 at 278 nm (Shimadzu spectrophotometer UV-3000). Reactions were started by the addition of ubiquinol-1 (final concentration 150  $\mu$ M,  $\epsilon_{278} = 15,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) after 2 min preincubation at 25 °C in the presence of rTAO and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). For the enzyme kinetics of purified rTAO, the reaction was initiated by the addition of ubiquinol-1 after 2 min preincubation at 25 °C in the presence of rTAO and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.05%(w/v) octaethylene glycol-monododecylether detergent (C10E8).

### 2.6. Chemicals

All chemicals were biochemistry grade. Ubiquinone-1 and protease inhibitor cocktail were purchased from Sigma-Aldrich. The other detergents were purchased from Dojin Chemicals (Tokyo, Japan).

### 3. Results

#### 3.1. Purification of fully active TAO

Although we previously established a protocol for the overproduction of rTAO in *E. coli* FN102 ( $\Delta hemA$ ) lacking cytochrome *bo* and *bd* complexes of the bacteria, the yield of the active enzyme was too low to analyze its prosthetic group [36]. Such a preparation also hampered the determination of kinetic parameters of rTAO such as its molecular activity. Therefore, conditions for the expression of rTAO and purification protocols were optimized to obtain large quantities of active and stable rTAO to enable such determinations. Three factors were critical to obtain large amounts of active rTAO, namely, growth time of the culture prior to addition of IPTG, absolute concentration of IPTG, and the use of purified inner membranes as the starting material.

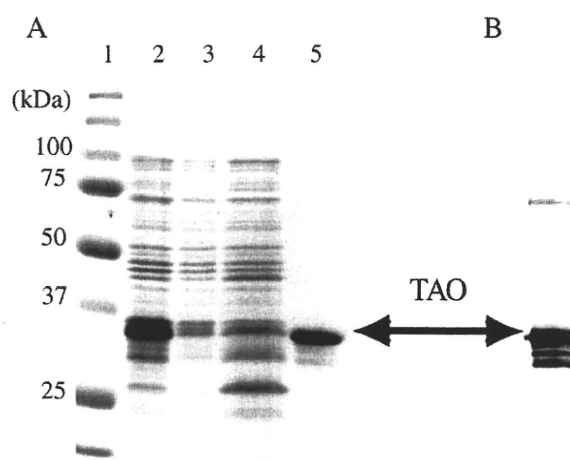
After extensive screening of detergents and additives to establish the procedure for efficient extraction of active rTAO from the inner membranes, we found that *n*-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG) specifically solubilized rTAO as shown in Table 1 (specific activity increased from 23.3 to 63.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  after solubilization). Approximately 60% of the membrane quinol oxidase activity was recovered with 1.4%(w/v) OG in the extract (Sup. Fig. 1). Thus, recovery of the activity was significantly higher than that of previously reported digitonin extraction (17%) [36]. Following solubilization, it was possible to maintain enzymatic activity for at least 1 month at 20 °C.

Since rTAO was fused with N-terminal histidine tag, solubilized rTAO was purified by cobalt affinity chromatography. Although the enzyme solubilized by OG was bound to the cobalt affinity resin in the presence of OG, it was not possible to elute bound rTAO from the resin with buffer containing OG. Interestingly, however, we found that 100% of the rTAO activity could be recovered from the column when OG in the washing and elution buffers was exchanged with *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM). In the final step, purified rTAO was obtained by a two-step elution with 165 mM and 200 mM imidazole, which resulted in a very efficient purification of active rTAO in the presence of DM. A typical elution profile of quinol oxidase activity with increasing imidazole concentration is shown in Sup. Fig. 1B. Purified rTAO, with a molecular mass of 34 kDa, was estimated to be 95% pure by SDS-PAGE (Fig. 1A, lane 5). In addition to the 34 kDa band, it is apparent that other bands are also present including two with a smaller size than rTAO and one band with an approximate molecular mass of 74 kDa. Since all of these bands were recognized in Western blot using a monoclonal antibody against TAO (Fig. 1B), the smaller protein bands possibly represent proteolytic breakdown products whilst the 74 kDa band most likely represents the dimeric form of rTAO. The specific activity of purified rTAO was more than 200  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein when 150  $\mu\text{M}$  of ubiquinol-1 was used as a substrate, which had a five-fold higher activity than that of the previously purified rTAO (approximately 40  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) [36]. Quinol oxidase activity of purified rTAO was insensitive to 5 mM KCN but was completely inhibited by 10 nM ascofuranone. A greater than 35-fold increase in purification was achieved using the techniques described above, and 13.2% of the total activity was recovered from the lysate of

**Table 1**  
Purification of rTAO.

Fractions	Total activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Protein (mg)	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Recovery (%)
<i>E. coli</i> lysate	14100	2410	5.85	100
Inner membrane	3500	150	23.3	24.8
OG extract	2400	37.9	63.2	17.0
Co-column	1860	8.95	207	13.2

The activities listed here were measured using 150  $\mu\text{M}$  of ubiquinol-1. Fractions (eluate numbers 6–13 in Supplemental Fig. 1B) were collected as purified rTAO after co-column.



**Fig. 1.** SDS-PAGE and Western blotting of rTAO in purification steps. A: CBB-staining 12.5% SDS-PAGE of each fraction from the cobalt column chromatography. Lane 1, marker; lanes 2 and 3, each 5 ml of OG extract and flow through fraction; lane 4, 500 ml of wash fraction; and lane 5, 60 ml of eluted fraction collected from fractions 6–12. Loading samples on lanes 2 to 5 were precipitated with acetone. B: Western blot of purified rTAO. The same sample to lane 5 in panel A was electrophoresed on 12.5% polyacrylamide gel. Monoclonal antibodies were used against highly purified rTAO obtained by a nickel column in the presence of guanidine. Epitope recognized by this antibody is the C-terminal domain of the enzyme. The arrow indicates rTAO with an apparent molecular mass of 34 kDa.

FN102/pTAO cells as summarized in Table 1. Such procedures resulted in approximately 10 mg of highly purified rTAO from a 10 l culture.

#### 3.2. Iron content in purified TAO

Since a highly active and stable purified rTAO could be obtained by the protocol described above, the metal content of purified rTAO was measured by ICP-MS. On the basis that TAO has a diiron center as previously proposed [23,24], then two equivalents of iron should be detected per monomer of rTAO. To this end we analyzed the iron content of purified native rTAO, inactive rTAO, denatured rTAO, and iron within the buffer eluted from the cobalt-column. Purified native rTAOs derived from three independent *E. coli* cultures were precipitated by PEG 3350 and resuspended in the elution buffer at three different concentrations as shown in Sup. Table 1. To prepare inactive rTAO, precipitated rTAO was resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, which resulted in complete loss of enzyme activity. Denatured rTAO was prepared by resuspending the precipitant in elution buffer containing 6 M guanidine-HCl and 0.3 M EDTA. Metal contents in these preparations were 9000 ng/ml, 2900 ng/ml and 1800 ng/ml of Fe respectively for the native rTAO (3.71, 1.19 and 0.80 mg/ml), 230 ng/ml, 100 ng/ml and 28 ng/ml of Fe for inactive rTAO, denatured rTAO and the elution buffer, respectively (Sup. Table 1). From these results, the stoichiometry of bound iron per rTAO monomer can be deduced as indicated below, based on the following parameters namely, a molecular mass of rTAO of 39,391 Da (including the 6 $\times$  histidine tag), purity of 95% based on SDS-PAGE gels, and the atomic weight of Fe being 55.85. Thus the ratio of iron atoms per rTAO is 1.76 for native rTAO and 0.2 and 0.08 in inactive rTAO and denatured rTAO, respectively (Table 2). This data indicates that one monomer of TAO possesses two atoms of iron which are released during inactivation or denaturation of the enzyme. To our knowledge, this is the first direct measurement of iron in purified AOX and the stoichiometry is consistent with the active site of AOX being a diiron carboxylate-center.

Other metals including Mn, Cu and Zn were also analyzed (Sup. Table 1). In all cases, these metals were below their detection limit (10 ng/ml sample solution) or background level. Although cobalt was