

赤痢アメーバの属する根足虫類やジアルジアの属する鞭毛虫類では、嚢子が感染型となり、クリプトスポリジウムが属する孢子虫類では、オーシストが感染型になる。トキソプラズマも孢子虫類に属するが、終宿主である猫の糞からヒトに感染する場合は、オーシストが経口感染し、調理不十分の肉から感染する場合は、嚢子が問題となる。一方、蠕虫に経口感染する場合、吸虫ではメタセルカリア、条虫ではプレロセルコイドか嚢虫、虫卵が感染型となる。線虫の場合は、回虫では虫卵、アニサキスでは第2, 3期幼虫が問題となるが、蠕虫は虫卵が感染型となる場合でも、ヒトの糞便中に排泄された直後から感染力を持つことは少ない。

寄生虫の生活環、特に感染型に関する理解は、予防や対策をたてるうえで重要なのはもちろん、排泄物などを用いて検査を行う際も、検体に含まれる寄生虫感染型への認識は不可欠となる。経口摂取され食中毒の原因となる場合も、寄生虫の種類によって、体内移動や増殖のパターンは大きく異なり、潜伏期や病態も様々で、不快感にとどまるものから衰弱して死に至る場合まである。また、宿主となった人の免疫状態が、病態に大きく関与することがあるのも、寄生虫以外の病原体が食中毒の原因となる場合と同様である²⁾。

3. 輸入感染症としての食品媒介寄生虫症、旅行医学における食品媒介寄生虫症の位置づけ

食物や飲料水から経口感染する寄生虫症について、輸入感染症という面から考えると、海外で感染したヒトが、日本に入国してから発症する場合と、病原体を保持している動植物（加工品も含む）が輸入される場合の二つが、国内への流入のパターンとして考えられる。消化管の寄生虫によっておこる臨床症状は、軽い下痢や腹痛にとどまることもあり、潜伏期もはっきりしない場合は、国外で感染して帰国した後、国内で知らないうちに感染原となってしまう危険性も十分考えられる。また、ヒト以外に多くの保虫宿主がいる寄生虫や土壌伝播寄生蠕虫については、輸入動植物が感染原とな

る危険性も否定できない³⁾。

食品に由来する輸入寄生虫症の増加には、海外旅行者数の増加や日本への海外からの入国者数の増加が関係しているのはもちろんだが、食品流通システムの国際化や食習慣の多様化、輸入病原体に感受性のあるヒトの増加といったことも関係している。また、最近の途上国における報告数の増加について言えば、従来は、殆ど顧みられることがなかった疾患が、検査診断技術の開発と普及により診断されるようになったことも、要因としてあげることができよう²⁾。多くの寄生虫症は、早期に診断できれば完治することができるが、現在日本国内では、的確な診断が下せる医師が少なくなっており、診断・治療の遅れが不可逆的・致命的な障害につながることもある。海外での感染予防や水際での防疫はもちろん重要だが、国内における診療体制の改善も課題であろう³⁾。

1) 感染経路と予防

寄生虫は、その生活環の中で様々にその姿を変え、経口感染の場合は、嚢子やオーシスト、虫卵やメタセルカリアなどが、飲料水や食物とともに摂取されることで感染が成立する。食品から感染する寄生虫や消化器症状を示す主な寄生虫について、海外で感染しやすいものを中心に感染経路をまとめた（表1）。

経口的に感染する寄生虫の感染型には、壁構造がみられることも多いが、十分な加熱処理をすれば、感染を予防することができる。

飲料水の加熱処理は、通常であれば5分間煮沸すれば十分であるが、標高があがると沸点が低下するので、1000m あがるごとに1分間余分に煮沸するべきである^{1,3)}。熱帯地方の都市には、高温多湿の環境を避けて高地に建設されたものもあり、場所による配慮も必要となる。また、市販のヨードチンキを1Lの水に4~5滴加えると、寄生虫卵を殺滅することができるが、次亜塩素酸ナトリウムは、通常の濃度では原虫の嚢子やオーシストには効果がない³⁾。長期にわたって途上国に滞在する場合、市販の濾過器は、ウイルスなど、分子量の小さいものの除去には有用ではないが、寄生虫卵や嚢子などの比較的分子量の大きい有機

表 1. 主な消化器系寄生虫と感染経路

		感染経路やヒトへの感染型など		問題となる主な寄生虫種
原虫				
消化管寄生原虫	経口	嚢子 (消化管内で無性生殖後に排出)		赤痢アメーバ, ジアルジア
	経口	オーシスト (消化管内で無性・有性生殖後に排出)		クリプトスポリジウム, イソスポーラ
その他	経口	嚢子	ブタなどの肉中	トキソプラズマ
	経口	オーシスト	糞口 (猫などの肉食獣)	トキソプラズマ
蠕虫 (成虫寄生)				
線虫 消化管寄生	経口	虫卵	- 土壌伝播蠕虫に分類	回虫, 鞭虫
	経皮	幼虫	- 土壌伝播蠕虫に分類	鉤虫 (経口感染も), 糞線虫
吸虫 消化器寄生	経口	メタセルカリア	- 淡水魚	横川吸虫, 異形吸虫, 肝吸虫
その他	経口	メタセルカリア	- 甲殻類 (淡水性)	肺吸虫
	経皮	セルカリア		住血吸虫
条虫 消化管寄生	経口	プレロセルコイド	- サケ, マスなど	広節 (日本海) 裂頭条虫 等
	経口	嚢尾虫	- ウシ, ブタなど	無鉤・有鉤条虫
蠕虫 (幼虫寄生)				
線虫 消化管 全身移行	経口	第 2, 3 期幼虫	- イワシ, サバ, サケ等	アニサキス
	経口	被嚢幼虫	- クマ, ブタ等	旋毛虫
	経口	第 3 期幼虫	- 雷魚, ドジョウ等	顎口虫
条虫 全身移行	経口	虫卵		エキノコックス
	経口	プロセルコイド, プレロセルコイド	- ヘビ, カエル 等	マンソン裂頭条虫

下線の寄生虫は、経皮感染する寄生虫だが、主な寄生臓器が消化管や肝胆道系で、消化器症状が病態の中心となる。

物は、殆どが除去される⁵⁾。

食品については、汚染されている可能性のある魚や動物の肉を食べない、食べる場合は十分加熱するといった対応が中心となる。食材として肉のみじん切りやスライスされた野菜が使われている場合も、注意が必要である。さらに、国外では、国内感染例とは、原因となる飲食物が異なることにも注意を払うべきである。旋毛虫の国内発症例では、クマ肉の生食が原因だったが、米国や報告数の多い途上国では、主に、ブタ肉を生、もしくは調理不十分の状態を食べることによる⁶⁾。また、クリプトスポリジウム症は、日本国内では水道水を介した集団感染例で知られるが、米国や英国では、サラダや牛乳、自家製リンゴ酒による集団感染例も報告されている⁷⁾。

また、現地でのヒトでの報告数が少ないことが、必ずしもその地域で該当する寄生虫の生活環が存在しないことを意味するわけではない。例えば、母国と同じ食習慣でサワガニやモクズガニを食した結果、保虫宿主である野生動物を中心に生活環が維持されていた肺吸虫に感染した在日外国人での集団感染例がある⁸⁾。同様に、アラスカで釣り

たてのマスを生食すれば、海獣を中心に生活環が維持されてきた広節裂頭条虫に感染するかもしれない。エジプト在住の日本人で異形吸虫卵の陽性率が増した感染源としては、ナイル河口の淡水魚の生食が疑われているが、症状の軽い寄生虫症の場合、現地の医療機関では、そもそも検査・治療の対象となっていなかった可能性もある⁹⁾。

寄生虫を持った動植物の日本国内への流入については、1980年代に中国産ドジョウによる顎口虫の流入、2005年には中国産養殖カンパチが問題となったが、後者については迅速な対応でヒトでの発生を防ぐことができた^{10,11)}。また、回虫や鉤虫などの土壌伝播蠕虫については、輸入野菜、特に輸入キムチによる国内持ち込みが心配され、検疫での検査対象となるに至った¹²⁾。

2) 疫学・症状

海外からの帰国者が多く受診する施設からの報告では、日本帰国後、問題となる寄生虫症は、マラリアを除くとやはり消化器系の寄生虫が多い。消化器系症状を示す寄生虫を表 2 にまとめたが、鉤虫や糞線虫、住血吸虫やマラリアなど、経口感

表2. 寄生虫による消化器症状

	主な症状	問題となる主な寄生虫種
	急性腹症, 感染早期の急激な腹痛	アニサキス, 旋尾線虫 など
	血性下痢, 粘血便を伴う下痢症	赤痢アメーバ, マラリア, 住血吸虫 (急性期)
胃腸症状	水様性・脂肪性下痢, 重症化すると頻回の下痢で脱水症を発生	ジアルジア, クリプトスポリジウム, イソスポーラ, サイクロスポーラ
	下痢・腹痛・その他の消化器系不定愁訴, 少数寄生では無症状で経過	回虫, 鉤虫, 鞭毛虫, 横川吸虫, 異形吸虫, 有鉤条虫, 無鉤条虫 など
	胆管炎・胆汁うっ滞	ジアルジア, 肝吸虫, 肝蛭, 回虫 (迷人時)
肝・胆道系症状	肝腫大	赤痢アメーバ (アメーバ性肝膿瘍), マラリア, トキソプラズマ, リーシュマニア, 住血吸虫 (慢性期), エキノコックスや他の内臓幼虫移行症
	貧血	マラリア, 鉤虫, 住血吸虫
	リンパ節腫張	トキソプラズマ, 内臓リーシュマニア
	皮下腫瘤, 皮膚結節	南米トリパノゾーム, 皮膚リーシュマニア, 有鉤囊虫, 顎口虫, 他の皮下幼虫移行症
その他の症状	肺炎様症状	肺吸虫, 幼線虫の肺通過時
	髄膜炎, 脳炎様症状	マラリア, アフリカトリパノゾーム, 住血吸虫, 肺吸虫, 糞線虫 (免疫不全), 有鉤囊虫, 広東住血線虫, 他の内臓幼虫移行症

下線の寄生虫種は、飲食時に経口感染する寄生虫ではないが、消化器症状を示すことがある。

染しないものもある。

海外でよく経験される旅行者下痢症は、70%は細菌が原因とされているが、原虫による場合も5%程度はあると言われている^{13,14)}。比率は地域によって違いがあり、ジアルジア、クリプトスポリジウムなどの小腸に寄生する原虫による旅行者下痢症は、インド亜大陸での感染が疑われる例が多い¹³⁾。典型的な例では水様性、脂肪性下痢を起こすが、ニューキノロン系抗生物質に反応せず、長期間にわたって下痢が続く場合、原虫に関する精査を進めるべきである¹⁴⁾。赤痢アメーバ症では、粘血便など腸炎様の症状となることが多いので、細菌・ウイルス性腸炎との鑑別が必要になる。大腸に潰瘍を形成することがある赤痢アメーバ原虫 *Entamoeba histolytica* と無症状の *E. dispar* は、別種だが形態的には区別できない。前者についても、症状が軽微な例や腸炎症状よりも肝膿瘍が前面にたつ例など、さまざまで、決して全例が赤痢様症状を示すわけではない^{14,15)}。また、赤痢アメーバ症・ジアルジア・クリプトスポリジウム症については、感染者の糞便中に排泄

される嚢子やオーシストが、そのまま感染型となることもあり、感染症法では5類感染症(全数把握)に分類されている。

回虫は、世界的に感染者が多く、飲料水や野菜などからも容易に感染する。肉や魚からは、様々な寄生蠕虫が感染する可能性があるが、調理方法や加工方法で、当然リスクは大きく異なる。タイやラオスの山間部では、蛋白源として重要な郷土料理から、タイ肝吸虫 *Opisthorchis viverrini* に感染する。香辛料は、料理や保存に使用される通常量では、寄生虫卵やメタセルカリアを殺滅させる効果はない³⁾。

3) 診断と治療

寄生虫症の診断では、現在も形態診断が重視され、原虫症であれば、嚢子・栄養体・オーシストなど、蠕虫症であれば虫卵・幼虫・成虫など、寄生虫感染を直接証明できるものを、検体中に確認できれば確実となる。しかし、適当な検体が得られない場合、或いは寄生部位が深部臓器である場合や幼虫移行症で寄生部位が一定しない場合など、

症例によっては、標準的形態診断が難しいことがある。日本寄生虫学会では、問い合わせがあった症例については会員に照会し、国内外の学会に属する専門家が回答を寄せるという制度を有しているので、寄生虫症の診断・治療の困難例については、日本寄生虫学会のホームページの医療機関向けコンサルテーションにアクセスすることで、解決の糸口とすることができる。

酵素抗体法（ELISA）などの免疫血清検査、PCR法やLAMP法といった分子生物学的検査法も、寄生虫症の検査診断に利用されるが、適切な抗原の選択・精製やプライマーの作成が、検査の質を左右する点は、他の病原体の検査と同様である。幼虫移行症の場合は、ヒト体内で成虫にならず虫卵の産出や排出がないので確定診断は容易ではないが、成虫にならずに体内をさ迷う場合、宿主の生体反応は激しく、免疫血清検査が利用しやすい。また、免疫血清検査は、幼虫移行症以外にも、トキソプラズマや肺吸虫といった組織内寄生の寄生虫や糞便中への虫卵排泄数の少ない蠕虫症にも利用できる。免疫血清診断については、商業ベースで行えるものもあるが、特殊なものについては大学や研究所に依頼しなければならない。そういった情報の入手についても、先に記した日本寄生虫学会のホームページは有益である。

ところで、帰国後健康診断といった特別な場合

を除き、最近是一般健診や人間ドックなどで糞便の虫卵検査が検査項目に入ることは殆どなくなった。何らかの臨床症状を示してから医療機関を受診するとしても、エキノコックス症や住血吸虫症で、実際に臨床症状が出現するには何年もの期間が必要になることが多い。教科書的ないわゆる潜伏期間は、あまりあてにならないと考えた方がよい。

一般検査における好酸球増多で、寄生蠕虫症が疑われることも多いが、好酸球増多は、寄生虫症以外に、アレルギー、膠原病、悪性腫瘍など、様々な病態で起こる¹⁶⁾。寄生虫に特異的な抗原を用いた免疫血清検査で、矛盾した結果が出た場合、悪性腫瘍の潜在も考慮して検査を勧めるべきである。

治療については、表3に、主な消化器系寄生虫症に関し入手しやすい薬剤についてまとめたが、用量や内服法については、厚労科研・ヒューマンサイエンス振興財団政策創薬総合研究事業「熱帯病治療薬研究班（略称）」（<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/parasitology/orphan/index.html>）寄生虫症治療の手引き（2010年）に詳しい。この冊子には、治療以外にも、種々の寄生虫症の疫学や症状、診断についても簡潔にまとめられており有用だが、やはり寄生虫学会のホームページからもダウンロードできる¹⁷⁾。1990年

表3. 国内で入手しやすい寄生虫治療薬の保険適応と国際的な標準使用

	国内で保険適応のある病原体	国際的には標準治療薬だが、国内では保険適応のない寄生虫
メトロニダゾール	膾トリコモナス、赤痢アメーバ、ジアルジア ヘリコバクター・ピロリ、バクテロイデス属等の細菌	
チニダゾール	膾トリコモナス	赤痢アメーバ、ジアルジア
スルファドキシシ/ピリメタミン	マラリア	トキソプラズマ
スルファメトキサゾール/ トリメトプリム	大腸菌、赤痢菌、インフルエンザ菌等のグラム陰性桿菌、ニューモシスチス肺炎病原体	トキソプラズマ
ピランテルパモエイト	回虫、鉤虫、蟯虫	
メベンダゾール	鞭虫	蟯虫、回虫、鉤虫、糞線虫、旋毛虫
アルベンダゾール	エキノコックス（包虫）	蟯虫、回虫、鉤虫、糞線虫、旋毛虫、顎口虫、有鉤囊虫 他の幼虫移行症、ジアルジア
ブラジカンテル	横川吸虫、肝吸虫、肺吸虫	住血吸虫、消化管寄生条虫
イベルメクチン	疥癬、糞線虫	

下線の病原体は、公知申請（医療上の必要性和国内での治験の難しさから、海外での報告例を中心に判断し認可）により保険適応とされた。

代に比べると、かなりの薬が市販されるようになり、本年2月には、公知申請が認められた結果、メベンダゾールの保険適応が、ようやく赤痢アメーバやジアルジアにも拡大された。しかし、世界的には回虫や鉤虫の標準治療薬であるメベンダゾールやアルベンダゾールが、鞭虫やエキノコックスにしか保険適応がないなど、日本国内において保険適応のある疾病と世界的な標準使用の間には、未だ隔たりがある¹⁸⁾。また、国内で市販されていない薬剤を使用する場合は、国内未承認の薬剤を輸入・保管している熱帯病治療薬研究班に依頼する必要がある。寄生虫症診療にあたっては、保険診療の枠を超えねばならないこともあり、特にそのような場合は、十分なインフォームド・コンセントが必要になるのは言うまでもない。

引用文献

- Hotez, P.J., Holyneux, D.H, Fenwick, A., Kumaresan, J., Schs, S.E., Sachs, J.D. and Sovioli, L.: Control of Neglected Tropical Diseases. *New Eng. J. Med.*, **357**, 1018-1027 (2007).
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, S. and Gabriel, S.: Emerging food-borne parasites. *Veterin. Parasitol.*, **163**, 196-206 (2009).
- 大前比呂思：輸入感染症の危険度－消化器系の寄生虫症－. 成人病と生活習慣病 **33**, 1101-1106 (2003).
- 海老沢 功：旅行医学 p.23-24, p.43-44, 日本医事新報社, 東京 (1997).
- Jong, E. C. and Sanford, C. (岩田健太郎, 土井朝子 監訳)：水の消毒. *トラベル・アンド・トロピカル・メデシシ・マニュアル* p.125-153, *メデイシカル・サイエンス・インターナショナル*, 東京 (2012).
- 杉山 広, 小島莊明：旋毛虫. *食中毒予防必携* (渡邊治雄 編) p.319-321, 日本食品衛生協会, 東京 (2007).
- 遠藤卓郎, 黒木俊郎, 泉山信司：クリプトスポリジウム. *食中毒予防必携* (渡邊治雄 編) p.268-273, 日本食品衛生協会, 東京 (2007).
- 杉山 広, 小島莊明：肺吸虫. *食中毒予防必携* (渡邊治雄 編) p.322-324, 日本食品衛生協会, 東京 (2007).
- 濱田篤郎, 奥沢英一, 氏田由可, 本藤紀代美, 大久保紀彦, 西川哲男, 馬杉則彦：発展途上国に長期滞在する日本人の腸管寄生虫感染状況の変化. *感染症誌* **77**, 138-145 (2003).
- 荒木恒治：日本における顎口虫症の現況. *輸入感染症 別冊医学のあゆみ* p.53-57, 医歯薬出版, 東京 (1996).
- 川中正則, 杉山 広, 森嶋康之, 荒川京子：カンパチなど養殖魚に寄生したアニサキス幼虫とその検査法について. *食品衛生研究* **56**, 23-34 (2006).
- 太田伸生, 赤尾信明, 有蘭直樹, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也, 吉田彩子, 川中正憲, 杉山 広：輸入キムチから検出された寄生虫卵 *臨床寄生虫学会誌* **17**, 67-69 (2006).
- DuPont, HL.: Systematic review: the epidemiology and clinical features of travellers' diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **30**, 187-196 (2009).
- Jong, E. C. and Sanford, C. (岩田健太郎, 土井朝子 監訳)：旅行者下痢症へのアプローチ. *アメーバ症, ジアルジア症, その他の腸内原虫感染症. トラベル・アンド・トロピカル・メデシシ・マニュアル* p.497-538, *メデイシカル・サイエンス・インターナショナル*, 東京 (2012).
- 奥沢英一：赤痢アメーバ症とジアルジア症 化学療法領域 **19**, 25-30 (2003).
- Jong, E. C. and Sanford, C. (岩田健太郎, 土井朝子 監訳)：寄生虫感染疑い患者の好酸球増多症. *トラベル・アンド・トロピカル・メデシシ・マニュアル* p.728-742, *メデイシカル・サイエンス・インターナショナル*, 東京 (2012).
- 寄生虫症薬物治療の手引き2010 改訂第7.0版 政策創薬総合研究事業「輸入熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬を用いた最適な治療法による医療対応の確立に関する研究」班 (略称, 熱帯病治療薬研究班) 31-76.
<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/parasitology/orphan/index.html>
- World Health Organization: WHO Model List of Essential Medicines 16th list (updated), March 2010,
<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>

日本人の三日熱マラリア・卵形マラリア症例に対する プリマキンの使用経験

¹ 国立国際医療研究センター病院国際感染症センター, ² 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部
(*現 東京医科大学病院感染制御部)

小林泰一郎¹⁾ 加藤 康幸¹⁾ 山内 悠子¹⁾
氏家 無限¹⁾ 竹下 望¹⁾ 水野 泰孝^{1)*}
金川 修造¹⁾ 狩野 繁之²⁾ 大曲 貴夫¹⁾

(平成 24 年 9 月 27 日受付)

(平成 24 年 11 月 2 日受理)

Key words: primaquine, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*

要 旨

リン酸プリマキンは、三日熱マラリアと卵形マラリアの再発を予防するための根治療法薬であるが、近年、世界各地でプリマキンを標準量（15mg 塩基/日、14 日間）投与後に再発した三日熱マラリアが報告されている。投与量を増やすことで再発率は減少するが、諸外国のガイドラインとは異なり、我が国では、東南アジアとパプアニューギニアで感染した三日熱マラリアにのみ、高用量（30mg 塩基/日、14 日間）のプリマキンの投与が推奨されている。

2007 年から 2011 年に、国立国際医療研究センター病院において、プリマキンによる根治療法を行った日本人 18 例（三日熱マラリア 13 例、卵形マラリア 5 例）を、診療録を用いて後方視的に検討した。ブラジルで感染した三日熱マラリア 1 例で、標準量のプリマキン投与後に再発していたが、卵形マラリアでは再発は見られなかった。また、高用量を使用した 10 例を含む全例で副作用を認めなかった。

三日熱マラリアの根治療法としてプリマキンを標準量投与した後の再発は、東南アジアとパプアニューギニア以外の地域でも報告されている。高用量で増加するとされる消化器系の副作用が、食後内服により忍容可能で、日本人の G6PD 異常症が非常に稀であることも併せて考えると、高用量を用いることで生じ得る副作用よりも、再発率減少の有益性の方が優ると考えられる。日本人の三日熱マラリアにおいても、渡航先に関わらず高用量のプリマキンが適切と考えられる。

[感染症誌 87: 22~26, 2013]

序 文

2010 年における世界のマラリア患者数は 2 億 1,600 万人で、死亡者数は 65 万 5 千人に上る¹⁾。死亡例のほとんどは熱帯熱マラリアによるが、三日熱マラリアは全マラリア症例の半数以上を占める²⁾。三日熱マラリアと卵形マラリアでは、急性期治療の 16 日から 4 年の後に肝細胞内の休眠体から再発し、度重なる発熱発作による経済的損失や小児における発育障害も無視できない^{3)~5)}。

また、三日熱マラリアは一般に致死率は低いとされ

ているが、近年、重症三日熱マラリア症例がしばしば報告され、その重要性が認識されてきている⁶⁾。

リン酸プリマキンは 8-アミノキノリン化合物で、ミトコンドリアの働きや DNA の結合を阻害することで、三日熱マラリアと卵形マラリアの休眠体を殺滅する。すなわち、クロロキンなどによる急性期治療の後に、再発予防のための根治療法として用いられる。一方、副作用としては、G6PD 異常症患者における溶血発作や腹痛、悪心、嘔吐、メトヘモグロビン血症などがある⁷⁾。

15mg 塩基/日を 14 日間投与する用法用量が標準療法とされるが、東南アジアやオセアニアの三日熱マラリアに対して標準量のプリマキンをを用いても、再発を

別刷請求先：(〒162-8655) 東京都新宿区戸山 1-21-1
国立国際医療研究センター病院国際感染症センター
小林泰一郎

繰り返すことが多く、同地域で感染した三日熱マラリアに対して、再発率を減らすために高用量（30mg 塩基/日、14日間）のプリマキン投与が推奨されてきた³⁾。しかし、近年、同地域以外からも標準療法後の再発例が報告され、諸外国では、同地域以外で感染した三日熱マラリアに対しても高用量のプリマキンの使用が推奨されてきている⁸⁾⁹⁾。

日本における適切なプリマキンの使用法についての知見は少ないが、近年では木村ら¹⁰⁾や Miura, et al¹¹⁾の報告などがあり、東南アジアやオセアニアで感染した三日熱マラリアに対する、プリマキン標準療法後の再発率の高さについても言及されている。

今回、国立国際医療研究センター病院においてプリマキンを使用したマラリア症例について、副作用も含めて調査し、特にプリマキンの投与量について検討した。

対象と方法

2007年4月から2011年9月に、当院において、三日熱マラリアまたは卵形マラリアの根治療法としてプリマキンを用いた日本人患者について、診療録を用いて後方視的検討を行った。当院は、東京都新宿区にある病床数885床の主に急性期医療を担う教育病院で、トラベルクリニックを有し、特定感染症指定医療機関でもある。

対象は20歳以上の日本人成人で、三日熱マラリアまたは卵形マラリアの急性期治療終了後の根治療法としてプリマキンを使用した症例である。診断において、末梢血の薄層塗抹標本をギムザ染色し、光学顕微鏡を用いて観察した形態学的検討と、PCR法を相補的に用いた。G6PD活性はWST-8法により、定性的に評価した。

調査項目として、年齢や性別の他、体重、渡航先、感染原虫種、原虫寄生数、原虫寄生率、急性期治療薬、急性期治療終了からプリマキンの投与開始までの期間、プリマキンの用法用量、G6PD活性や副作用、再発の有無について検討した。

なお、日本国内では未承認であるリン酸プリマキン錠；Primaquine（Durbin PLC社）は、厚生労働科学研究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」に関する研究班（熱帯病治療薬研究班）より入手し、患者本人に対する説明と文書による同意の取得後に使用した。

成績

対象症例は18例で、男性が14例、女性が4例であった。年齢は20歳から62歳（中央値：25歳）、体重は46kgから86kg（中央値：62.25kg）に分布した。三日熱マラリアが13例で、原虫寄生率は0.005%から

0.74%（中央値：0.15%）に分布した。卵形マラリアは5例で、原虫寄生率は0.0009%から0.08%（中央値：0.01%）に分布した。渡航先は、インドとパプアニューギニア、ウガンダ、インドネシア、ブラジル、ガーナ、マレーシア、仏領ギアナであった。急性期治療薬は、クロロキンが9例、メフロキンが7例であり、治療開始時に熱帯熱マラリアとの鑑別が困難であった2例において、各々アーテメター・ルメファントリンとアトバコン・プログアニルが使用された。全例が治癒した。

急性期治療終了からプリマキン投与開始までの期間の中央値は2.7日で、急性期治療と同時に開始した症例から、薬剤の供給の問題から47日後に開始した症例まで見られたが、プリマキン投与前に再発を来した症例はなかった。当初から高用量を選択した9例は、パプアニューギニアとインド、インドネシア、マレーシアで感染した症例であった。G6PD活性を確認した16例は全員が正常で、副作用を呈した症例は確認されなかった。6カ月以上の経過観察中、17例では再発を認めなかったが、標準量を用いたブラジル帰国後の三日熱マラリアの1例（Case 15）に再発を認めた（Table 1）。同症例について詳細を以下に記す。

再発症例

症例：25歳、日本人男性。

既往歴・生活歴・アレルギー歴：特記事項なし。

渡航歴：ブラジルのアマゾン川流域のマナウス市周辺の森林地帯などに8日間、仕事で滞在した。マラリア予防薬は内服せず、トラベラーズワクチンの接種は受けなかった。

現病歴：ブラジルから帰国11日目に発熱し、頭痛を伴った。第9病日に当院を受診した。

身体所見：体温：40.1℃、意識清明、体重：63.5kg、結膜：貧血・黄染なし、胸部：正常肺呼吸音、腹部：肝脾腫なし。

検査所見：血液塗抹標本の鏡検/PCR：三日熱マラリア原虫（原虫寄生率：0.1%）、他Table 2。参照。

経過：メフロキン（総量1,250mg塩基）で治療開始し、発熱消失時間（FCT；Fever clearance time）：22時間、原虫消失時間（PCT；Parasite clearance time）：33時間で軽快した。メフロキン投与終了6日後から、ブラジルが感染地であったことからプリマキン15mg塩基/日（14日間）の標準量で根治療法を施行し、副作用なく完遂した。

プリマキン投与終了54日後に、再び発熱し、第5病日に当院を再診した。血液塗抹標本の鏡検とPCRにて、三日熱マラリアの再発（原虫寄生率：0.06%）と診断し、メフロキン（総量1,250mg塩基）で再治療し、FCT：12時間、PCT：96時間で軽快した。メ

Table 1 Demographic features and clinical course of those treated with primaquine (n = 18).

Case	Age	Gender	Body weight (kg)	Contracted countries	Malaria species	Parasitemia (/μL)	(%)	Schizonto-cides	Time between completion of acute phase therapy and start of primaquine therapy (days)	Dose of primaquine (mg/day)	Duration of primaquine therapy (days)	G6PD activity	Adverse effect of primaquine	Relapse
1.	24	M	60	Uganda	<i>P. ovale</i>	690	0.02	cloroquine	4	15	14	N.D.	(-)	(-)
2.	35	M	55	Papua New Guinea	<i>P. vivax</i>	8,700	0.2	cloroquine	-2	30	14	N.D.	(-)	(-)
3.	35	M	59	Indonesia	<i>P. vivax</i>	9,080	0.2	mefloquine	7	30	14	Normal	(-)	(-)
4.	21	F	51	Malaysia	<i>P. vivax</i>	240	0.005	cloroquine	-2	30	14	Normal	(-)	(-)
5.	28	M	86	Brazil	<i>P. vivax</i>	32,000	0.74	cloroquine	1	15	14	Normal	(-)	(-)
6.	21	M	58	Uganda	<i>P. ovale</i>	50	0.0009	atovaquone/ proguanil	0.5	15	14	Normal	(-)	(-)
7.	20	M	N.D.	India	<i>P. vivax</i>	3,190	0.06	cloroquine	1	15	14	Normal	(-)	(-)
8.	29	M	84	India	<i>P. vivax</i>	19,920	0.4	cloroquine	2	30	14	Normal	(-)	(-)
9.	25	M	55	Papua New Guinea	<i>P. vivax</i>	4,980	0.1	artemether/ lumefantrine	2	30	14	Normal	(-)	(-)
10.	22	F	46	India	<i>P. vivax</i>	2,260	0.06	cloroquine	47	30	14	Normal	(-)	(-)
11.	22	F	61	Ghana	<i>P. ovale</i>	3,150	0.08	cloroquine	3.5	15	14	Normal	(-)	(-)
12.	62	M	70	French Guiana	<i>P. vivax</i>	15,700	0.34	cloroquine	3.5	15	14	Normal	(-)	(-)
13.	36	M	75	Uganda	<i>P. ovale</i>	170	0.0035	mefloquine	2.5	15	14	Normal	(-)	(-)
14.	23	F	N.D.	Ghana	<i>P. ovale</i>	470	0.01	mefloquine	3	15	14	Normal	(-)	(-)
15.	25	M	63.5	Brazil	<i>P. vivax</i>	5,260	0.1	mefloquine	6	15	14	Normal	(-)	(+)
15*	26	M	60	Brazil	<i>P. vivax</i>	2,920	0.06	mefloquine	2	30	14	Normal	(-)	(-)
16.	30	M	67.7	Indonesia	<i>P. vivax</i>	4,260	0.09	mefloquine	2.5	30	14	Normal	(-)	(-)
17.	20	M	65	India	<i>P. vivax</i>	14,780	0.33	mefloquine	6.5	30	14	Normal	(-)	(-)
18.	36	M	80	Papua New Guinea	<i>P. vivax</i>	930	0.02	mefloquine	22.5	30	14	Normal	(-)	(-)

N.D.: No data; *Relapse

Table 2 Laboratory data on relapsed case admission

WBC	9,920 /μL	LDH	537 IU/L
RBC	526 × 10 ⁴ /μL	ALP	352 IU/L
Hb	15.9 g/dL	BUN	6.0 mg/dL
Hct	42.8 %	Cr	0.84 mg/dL
Plt	7.9 × 10 ⁴ /μL	Na	137 mEq/L
T-Bil	1.7 mg/dL	K	3.6 mEq/L
AST	124 IU/L	BS	101 mg/dL
ALT	193 IU/L	CRP	3.76 mg/dL

フロキシン投与終了2日後から、プリマキン 30mg 塩基/日 (14日間)の高用量で根治療法を施行した。その後12カ月間、再発は認めていない。

考 察

ブラジルにおけるマラリアの患者数は30万6千人(2009年)とされる。99.8%の症例はアマゾン川流域で発生し、1960年代以降のアマゾン川流域への移民増加によりマラリアの患者数は増加傾向にある。マラリア症例の83.7%を三日熱マラリアが占め、16.3%を熱帯熱マラリアが占め、四日熱マラリアも時に報告される¹²⁾。

三日熱マラリア、および卵形マラリアの根治療法として、現在標準量とされているプリマキン15mg 塩基/日を14日間投与する方法は、朝鮮戦争中の1952年

に米国医薬食品局(FDA: Food and Drug Administration)が³⁾、朝鮮半島由来の三日熱マラリア原虫に対する有効性と、アフリカ系米国人に多い軽症から中等症のG6PD異常症患者における安全性を基に認可したものである⁷⁾。その後、東南アジアやパプアニューギニアなどのオセアニアの三日熱マラリアで、標準量のプリマキン投与後の再発症例が多く報告され、投与量を増やすことで再発率が下がることから、同地域で感染した三日熱マラリアに対しては、高用量の30mg 塩基/日を14日間投与する方法が推奨されてきた⁵⁾。その後現在までに、インドやアフガニスタン、ブラジル、コロンビア、ソマリア、エチオピアなど世界中で、標準量のプリマキンを投与した後に再発する症例が報告されている⁷⁾¹³⁾。

元来、プリマキンによる根治療法を行わない状況での三日熱マラリアの再発率は地域によって異なる。インドでは9~19%、タイでは63%、パプアニューギニアのChesson株では99%と、その地域差は大きい¹⁴⁾。そして、プリマキン標準療法を施行した後の再発率にも地域差があり、インドでは0~5.3%、タイでは18%、パプアニューギニアのChesson株は27~79%と報告されている¹³⁾¹⁴⁾。そして、本症例の感染したブラジルでは6.5~14%と報告されている¹³⁾。

再発率に影響する因子として、このような各地域で

異なる原虫株の再発性向やプリマキン感受性の他に、プリマキン投与量や原虫寄生率、患者体重などが知られている。本再発例は、体重過多や高原虫血症を認めず、原虫側の因子、すなわち、感染した三日熱マラリア原虫のプリマキン低感受性から生じたと推察している。

一般に、プリマキンを高用量投与することで三日熱マラリアの再発率は減少するため、諸外国ではより広範囲の地域における三日熱マラリアに対して、高用量のプリマキンが推奨されるようになった¹³⁾。現在、世界保健機関（WHO；World Health Organization）は、東南アジアとオセアニアの三日熱マラリアに高用量を推奨し、その他の地域の三日熱マラリアと卵形マラリアに標準量を推奨している³⁾。我が国の熱帯病治療薬研究班が作成した「寄生虫薬物治療の手引き 改訂（2010年）第7.0.1版」においても、高用量のプリマキンが推奨されるのは、東南アジアとパプアニューギニアで感染した三日熱マラリアのみであり、その他の地域で感染した三日熱マラリアと卵形マラリアの根治療法には、標準量が推奨されている¹⁵⁾。それに対し、英国保健庁（HPA；Health Protection Agency）は、全ての地域の三日熱マラリアに対して高用量を推奨し、卵形マラリアに対しては標準量を推奨している⁸⁾。米国疾病管理センター（CDC；Centers for Disease Control and Prevention）は、全ての地域の三日熱マラリアと卵形マラリアに対して高用量を推奨している⁹⁾。また、プリマキンはクリンダマイシンの併用で、ニューモシスチス肺炎の治療にも使用されるが、15~30mg/日を21日間と、高用量をより長期に渡って使用することが推奨されている¹⁶⁾。

プリマキンによる嘔気や腹痛といった消化器系の副作用は用量依存性である。プリマキンによる腹痛の発症率は、15mg/日で0%、30mg/日で4%、60mg/日で33%、120mg/日で100%と報告されている¹⁷⁾。これらの消化器症状は食後内服により軽減し、30mg/日まででは忍容可能とされている。高用量でより重篤な溶血発作を発症するG6PD異常症患者は、日本人では0.1~0.5%と非常に稀であり、確認されたとしても軽症または中等症であることが知られている¹⁸⁾。今回の当院のマラリア診療における検討でも、高用量のプリマキン使用例も含め、副作用を呈した患者は見られなかった。

本検討でも示唆されたように、高用量プリマキンの副作用は、日本人においては稀であると考えられた¹⁰⁾¹¹⁾。高用量は明らかに三日熱マラリアの再発率を減少させるため、プリマキン低感受性株の分布が南米など様々な地域で報告されている状況を考慮すると、日本においても、英米の推奨に準じて、渡航先に関わ

らず高用量のプリマキンが推奨されるべきと考える。一方、プリマキン標準量使用後に再発した卵形マラリア症例の報告は稀であり¹⁹⁾、今回の検討でも再発例は見られなかった。卵形マラリアの根治療法には、一般に推奨されている標準量で十分と考えられる⁵⁾⁸⁾¹⁵⁾。

本検討における症例数は限られており、日本人における高用量のプリマキン使用例の報告も少ないことから、本邦における症例の集積による有効性と安全性の確認を今後も継続する必要がある。

謝辞：マラリアの検査・診断を担当していただいた国立国際医療研究センター研究所マラリア・熱帯医学研究部の石上盛敏、駒木加奈子、矢野和彦先生に感謝します。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「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（H22-政策創薬一般-003）」の助成を受けた。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) World Health Organization : The World Malaria Report. World Health Organization, Geneva, 2011.
- 2) Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R : The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 64 : 97—106.
- 3) Duarte EC, Pang LW, Ribeiro LC, Fontes CJ : Association of subtherapeutic dosages of a standard drug regimen with failures in preventing relapses of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 65 : 471—6.
- 4) Duarante Mangoni E, Severini C, Menegon M, Romi R, Ruggiero G, Majori G : Case report : An unusual late relapse of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003 ; 68 : 159—60.
- 5) World Health Organization : Guidelines for the Treatment of Malaria—2nd edition. World Health Organization, Geneva, 2010.
- 6) Alexandre MA, Ferreira CO, Sigueira AM, Magalhaes BL, Mourao MP, Lacerda MV, *et al.* : Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2010 ; 16 : 1611—4.
- 7) Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ : Primaquine : report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 75 : 402—15.
- 8) Laloo DG, Shingadia D, Pasvol G, Chiodini PL, Whitty CJ, Beeching NJ, *et al.* : UK malaria treatment guidelines. *J Infect* 2007 ; 54 : 111—21.
- 9) Centers for Disease Control and Prevention : Treatment of Malaria (Guidelines For Clinicians). Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta 2011.
- 10) 木村幹男, 富沢 功, 滝沢慶彦, 大友弘士 : 三日熱マラリアにおけるプリマキン標準療法後の

- 再発例の検討. 感染症誌 1996 ; 70 : 1086—91.
- 11) Miura T, Kimura M, Koibuchi T, Endo T, Nakamura H, Odawara T, *et al.* : Clinical characteristics of imported malaria in Japan: analysis at a referral hospital. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 73 : 599—603.
 - 12) Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT : Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 2010 ; 30 : 115.
 - 13) Goller JL, Jolley D, Ringwald P, Biggs BA : Regional differences in the response of *Plasmodium vivax* malaria to primaquine as anti-relapse therapy. *Am J Trop Med Hyg* 2007 ; 76 : 203—7.
 - 14) Baird JK, Hoffman SL : Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis* 2004 ; 39 : 1336—45.
 - 15) 厚生労働科学研究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」に関する研究班 (熱帯病治療薬研究班) : 寄生虫薬物治療の手引き—2010—. 2010. http://miyazaki-med.ac.jp/parasitology/orphan/docDL/tebiki_ver7.0.1.pdf.
 - 16) John GB, Joel EG, Paul AP : Medical management of HIV infection. 2009-2010 ed. Knowledge Source Solutions. 2009 ; p. 448—51.
 - 17) Clayman CB, Arnold J, Hockwold RS, Yount EH, Edgecomb JH, Alving AS : Toxicity of primaquine in caucasians. *JAMA* 1952 ; 149 : 1563—8.
 - 18) Nakatsuji T, Miwa S : Incidence and characteristics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Japan. *Hum Genet* 1979 ; 51 : 297—305.
 - 19) Bottieau E, Clerinx J, Van Den, Enden E, Van Esbroeck M, Colebunders R, *et al.* : Imported non-*Plasmodium falciparum* malaria: a five-year prospective study in a European referral center. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 75 : 133—8.

Clinical Experience of Primaquine Use for Treatment of Vivax and Ovale Malaria in Japanese Travelers

Taiichiro KOBAYASHI¹⁾, Yasuyuki KATO¹⁾, Yuko YAMAUCHI¹⁾, Mugen UJIE¹⁾, Nozomi TAKESHITA¹⁾, Yasutaka MIZUNO^{1)*}, Shuzo KANAGAWA¹⁾, Shigeyuki KANO²⁾ & Norio OHMAGARI¹⁾

¹⁾Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine,

²⁾Department of Tropical Medicine and Malaria, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine,

*Present Affiliation : Department of Infection Control and Prevention, Tokyo Medical University Hospital

Primaquine phosphate has been used to prevent relapse as a radical cure after the acute-phase treatment of vivax and ovale malaria however. Many vivax malaria relapses have been reported following a standard dose of primaquine (15mg/day for 14 days). A higher dose of primaquine (30mg/day for 14 days) decreases the relapse rate, and the concomitant risk of gastrointestinal side effects tends to disappear when the drug is administered with food. G6PD deficiency is rare in the Japanese population. Although the relapsed phenomenon is reported globally, the higher dose of primaquine is currently recommended in Japan only for those returning from Southeast Asia or Papua New Guinea.

Cases of 18 Japanese, including 13 vivax malaria and 5 ovale malaria, prescribed primaquine at a referral center in Japan, were analyzed retrospectively from 2007-2011. Data on diagnosis, treatment, and outcome were extracted from medical records. Of the 18, 10 with vivax malaria were administered the higher dose of primaquine. We found that only one suffered relapse—a vivax malarial case returning from Brazil and treated with the standard dose of primaquine. No ovale malarial case suffered relapse. None, including the 10 prescribed the higher primaquine dose, experienced any adverse side effects.

Based on our findings, we recommend a higher dose of primaquine be used to prevent relapse when treating Japanese suffering from vivax malaria.

Ⅲ. 新興・再興感染症

4. 最近の注意すべき寄生虫症

加藤 康幸¹⁾ 狩野 繁之²⁾ 大西 健児³⁾

要 旨

最近、注目される新興・再興寄生虫症として、東南アジアの森林地帯で報告が増加しているヒト*Plasmodium knowlesi*感染症、移民により分布が拡大するシャーガス病（アメリカトリパノソーマ症）、豚レバー生食に関連したアジア条虫症、ヒラメを介したクドア食中毒、馬肉に関連した消化管ザルコシスティス症をとりあげた。いずれも、疫学、病態に不明の点が多く、今後の研究が待たれる。

〔日内会誌 101：3162～3167, 2012〕

Key words サルマラリア, アジア条虫, クドア, ザルコシスティス

はじめに

新興・再興感染症は1970年以降に新たに認識された感染症である。一般にHIV感染症、エボラ出血熱、重症急性呼吸器症候群（SARS）などウイルス性疾患が多いが、寄生虫症でも分子診断学の進歩や世界的な人的交流の増加などにより新たに認識されるようになった疾患がある。本項では、近年、注目を集めるようになった寄生虫症を紹介する。

1. ヒト*Plasmodium knowlesi*感染症

ヒトにマラリアを起こす原虫はこれまで*Plasmodium*属の4種（熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫）が知られている。一方、サルを宿主とするマラリア原虫はおよそ30種が知られおり、一部の原虫ではヒトでも感染の成立することが実験室内感染などの事例を通じて報告されてきた。1965年にマレー半島の森林地帯に滞在した米国人でサルマラリア原虫の自然感染が初めて報告された。この原虫*P. knowlesi*は、東南アジアの森林地帯に生息するブタオザル等を宿主とし、

1) 国立国際医療研究センター国際感染症センター, 2) 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部, 3) 東京都立墨東病院感染症科

Infectious Diseases: Progress in Diagnosis and Treatment. Topics: III. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases; 4. Emerging parasitic diseases.

Yasuyuki Kato¹⁾, Shigeyuki Kano²⁾ and Kenji Ohnishi³⁾: ¹⁾Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, Japan, ²⁾Department of Tropical Medicine and Malaria, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Japan and ³⁾Department of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Bokutoh General Hospital, Japan.

トピックス

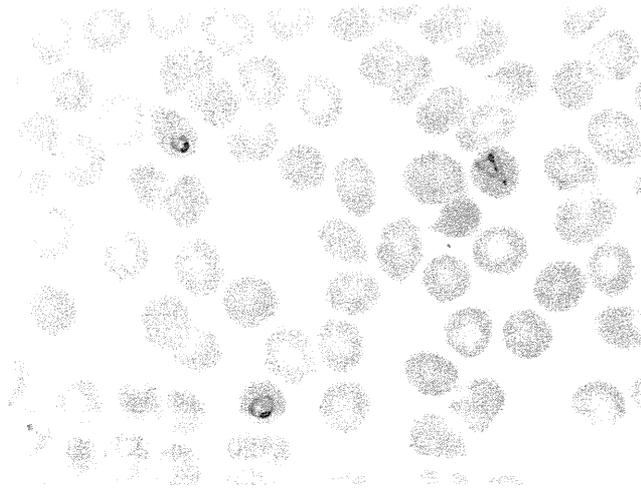


図 1. サルマラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* 末梢血塗抹標本像 (国立国際医療研究センター研究所)

森林地帯に生息するハマダラカ (*Anopheles leucosphyrus* group) により媒介される。ヒト症例の報告は以後限られていたが、マレーシア・ボルネオで2000～2002年に診断されたマラリア208例中120例でPCR法により*P. knowlesi*が陽性であったことが2004年に報告され、注目を集めるようになった。その後、マレーシアを中心に、ミャンマー、タイ、シンガポール、フィリピン、ベトナム、インドネシアなどから報告がみられる。最近では、東南アジアの森林地帯に滞在歴のある旅行者の症例も少数ながら報告され続けており、我が国でも1例報告がある。

2006～2008年にかけて、マレーシア・サラワク州の病院に入院した成人マラリア152症例の検討では、全体の70%にあたる107例が*P. knowlesi*によるものであった。発熱、頭痛、悪寒戦慄、倦怠感などの症状や血小板減少はあるが貧血を認めないといった血液検査所見は、ほかのヒトマラリア原虫による急性マラリアのそれと一致した。10例が世界保健機関による重症マラリアの基準を満たしたが、合併症は呼吸不全が最も多く、熱帯熱マラリアに多い脳マラリアの所見は認められなかった。重症度と末梢血塗抹標本から算出する原虫寄生率が相関するのは熱帯熱

マラリアと同様で、死亡した2例の寄生原虫数は20万/ μ lを越えていた。

本症の潜伏期は2週間程度と考えられている。本原虫の赤血球内増殖周期は24時間であることが特徴であり、発熱は連日認められる。三日熱・卵形マラリア原虫のような肝細胞内での休眠体は存在しない。末梢血塗抹標本における本原虫の早期栄養体は熱帯熱マラリア原虫の輪状体に似ており、後期栄養体は四日熱マラリア原虫のそれに似る(図1)。このため、鏡検法では原虫種の鑑別が難しいため、遺伝子診断が必要となる。国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部などでは、PCR法による診断が可能である。

本症の治療や予防に有効な抗マラリア薬は不明な点もあるが、他の原虫種によるマラリアと同様に考えてよい。我が国で承認されているメフロキン、キニーネは有効である。重症例では熱帯熱マラリアのそれに準じた治療が必要になる。我が国では、厚生労働科学研究費補助金「熱帯病治療薬研究班」薬剤使用機関に紹介することができる。渡航者が東南アジアでマラリアに罹患することは一般に少なくなっているのが現状だが、森林地帯に滞在した後に発熱をきたした患者では本症を疑い、速やかな診断と治療が望まれる。

2. 移民によって分布が拡大するシャーガス病

シャーガス病(アメリカトリパノソーマ症)は中南米に常在する原虫クルーズトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)の慢性感染症である。中南米の貧困地域を中心に世界で1,000万人の患者がいる「顧みられない熱帯病(Neglected Tropical Diseases)」の一つである。吸血昆虫であるサシガメの糞便中に含まれる本原虫が刺し口や粘膜から擦り込まれ感染する。急性期は発熱、リンパ

トピックス

節腫脹などがみられることもあるが、原虫は完全に排除されず、筋肉・消化管神経節に潜伏感染する。この間に症状はないが、微量の原虫血症をきたすため、輸血を介した感染や母子感染が生じうる。その後、数年から十数年を経て、約30%の感染者に心臓障害(伝導障害、拡張型心筋症)がみられるようになる。心電図上、右脚ブロックと左脚前枝ブロックを同時に認めるのが特徴的とされる。巨大食道、巨大結腸などの消化管障害は、約15%の感染者にみられ、アマゾン川流域南部での罹患例に多い。

中南米の常在地では、媒介虫対策の改善などにより、罹患率は近年大幅に減少したが、2000年以降、欧米などの非常在地でこれらの常在地からの移民にシャーガス病が診断される機会が増えてきた。2006年の時点で、常在地から移住した本原虫の感染者は米国に30万人、スペインに6万人、我が国に数千人いると推定されている。これにあわせて、非常在地でも母子感染や輸血・臓器移植による感染事例も報告されるようになった。

中南米からの移住者、あるいは旅行者で、心臓障害、巨大食道・結腸の疑われる患者がいれば、本症を疑う。血清診断は、日赤中央血液研究所感染症解析部(担当:三浦左千夫、佐山勇輔)などに依頼することができる。慢性期における抗トリパノソーマ薬の効果は明らかでないが、50歳以下の症例で心臓障害が高度でない場合には使用が推奨されている。我が国では、厚生労働科学研究費補助金「熱帯病治療薬研究班」により、ニフルチモックスが保管されている。

3. 新たな食品媒介寄生虫症

1) 豚レバー生食に関連したアジア条虫症

台湾、韓国、中国、インドネシア、ベトナムでは、ウシを中間宿主とする無鉤条虫(*Taenia saginata*)によく似た条虫(サナダムシ)が、豚

を食す人から排泄されることが知られていた。この条虫は、近年の分子生物学的研究により、無鉤条虫と近縁だが、別種と考えられるアジア条虫(*T. asiatica*)と分類されるようになった。ブタを中間宿主とする有鉤条虫(*T. solium*)とは遺伝学的に大きく異なり、アジア条虫はヒトがその虫卵を摂取しても囊虫症はきたさない。

2010年以降、我が国にこれまで常在しないと考えられていたアジア条虫症が関東地方を中心に確認されるようになった。2011年2月までに15例が報告されているが、患者の多くは渡航歴がなく、豚レバーの生食歴があることから、国産豚の汚染が示唆されている。ブタを中間宿主とする点で同じだが、有鉤条虫の幼虫(囊虫)が筋肉内に寄生するのに対し、アジア条虫のそれは主に肝臓内に寄生する。

患者は肛門からの体節排泄を主訴に来院し、腹痛や下痢などの消化器症状は特に見られないことが多い。体節や虫卵の形態から無鉤条虫や有鉤条虫と鑑別することは難しいため、遺伝子検査による同定が必要である。国立感染症研究所寄生動物部第二室が窓口となる。駆虫にはブラジカンテル(10~20 mg/kg)を単回使用する(図2)。

2) ヒラメを介したクドア食中毒

食後数時間程度で発症し、一過性の下痢や嘔吐を呈するが、比較的軽症で終わり、既知の食中毒病因物質が検出できない事例が、2000年頃から中四国を中心に全国で報告されてきた。当初から原因食品の一つにヒラメが疑われていたが、2011年6月、厚生労働省は、原因をヒラメに寄生する*Kudoa septempunctata*とする調査結果を公表した。*K. septempunctata*はミクソゾア門に属する粘液胞子虫である(図3)。ヒラメの筋肉に寄生し、顕微鏡で容易に観察できるが、肉眼的には異常を認めない。ゴカイなどの環形動物とヒラメの間で生活環が形成されている。

ヒラメに寄生するクドアはこれまで人体に害

トピックス

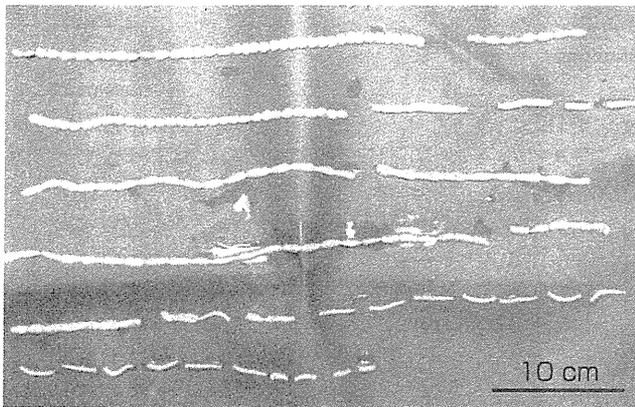


図2. プラジカンテルの内服後に排泄されたアジアカンテル (東京都立墨東病院感染症科)

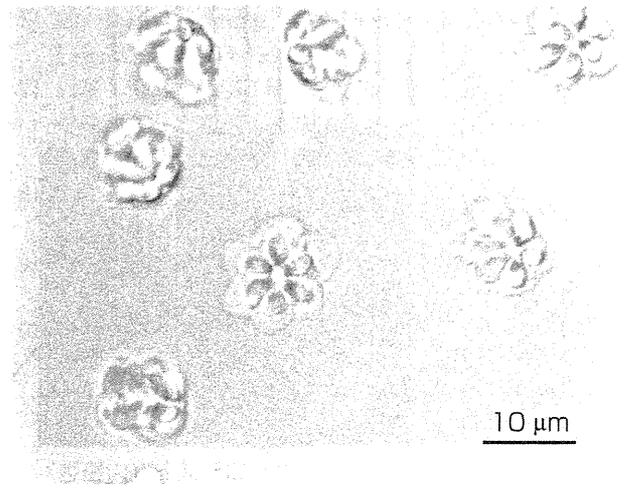


図3. *Kudoa septempunctata* (国立医薬品食品衛生研究所)

はないと考えられてきたが, *K. septempunctata* は乳のみマウスに下痢を引き起こし, スンクスに嘔吐を起こす. 病態には不明の部分が多いが, *K. septempunctata*が腸管細胞に感染することが発症に関係することと示唆されている.

比較的明瞭な季節性があり, 8~10月に多発する. ヒラメの消費が冬期に多いことと乖離が見られる. 天然よりも養殖ヒラメに本寄生虫の感染が多く見られ, 国産, 輸入品の双方に認められる. 2010年10月に発生した事例では, ヒラメを喫食した約500人のうち, 約100人が発症し, 平均潜伏期は約5時間であった. 症状は下痢が最も多く(79.7%), 次いで嘔吐(57.6%), 発熱(19.6%)であった. 下痢の回数は3回が最も多かったが, 22回の症例もあった. 予後は良好で, 多くの場合, 24時間以内に消失した. 食中毒の診断は通常病歴により行われるが, 喫食されたヒラメ残品や患者の便, 吐物のPCR検査, 顕微鏡検査が地方衛生研究所で行われる.

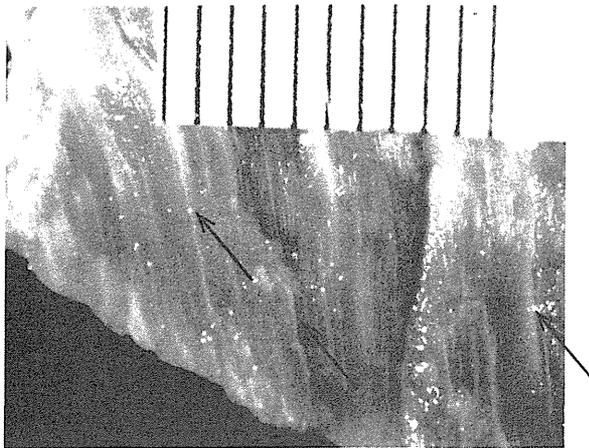
*K. septempunctata*の病原性は, 冷凍, および加熱処理で失われる. 養殖環境でのヒラメ間の水平感染はおこりえないことから, 感染稚魚の排除や出荷時における感染ヒラメのスクリーニングが行われている.

3) 馬肉に関連した消化管ザルコシスティス症
馬肉を喫食後数時間で発症する一過性の嘔吐・

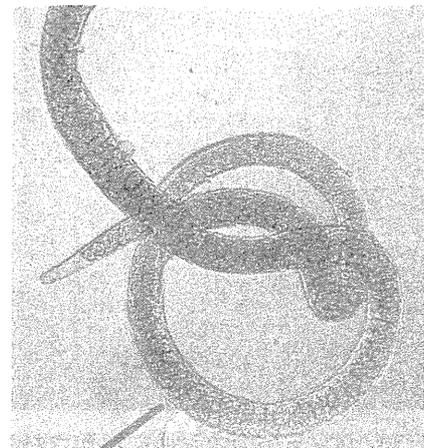
下痢症について, 厚生労働省は2011年6月, *Sarcocystis fayeri*が関与している可能性が高いと公表した. ザルコシスティス(住肉胞子虫)はコクシジウム目に属するトキソプラズマに近縁の原虫である. 草食動物が中間宿主となり, 筋肉内に多数のブラディゾイトを含んだ肉胞囊(ザルコシスト)を形成する(図4). ザルコシストを摂食した終宿主(イヌ, ネコなど肉食動物)の消化管内で有性生殖が行われ, オーシストが排泄される. ヒトは中間宿主にも終宿主にもなりうるが, ヒトを終宿主とするザルコシスティスとして, ウシを中間宿主とする*S. hominis*, ブタを中間宿主とする*S. suis*が知られている. 今回, 食中毒の原因とされた*S. fayeri*はウマを中間宿主とする. 国内で生まれて肥育されたウマより外国産馬の方に感染率が高い.

ヒトのザルコシスティス症は, 筋肉ザルコシスティス症と消化管ザルコシスティス症に分類される. 前者は, オーシストで汚染された水や食物を経口摂取することで感染し, 発熱, 好酸球増多, 筋炎を伴うことが多い. 後者はザルコシストを含有した生肉を摂食することで感染し, 嘔吐, 腹痛, 下痢をきたし, 馬刺しに関連したザルコシスティス症もこちらに分類される. ク

トピックス

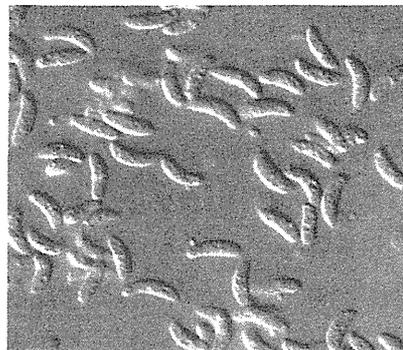


実体顕微鏡（×10）でみたザルコシスト（肉嚢胞）
（筋肉間の脂肪「さし」と区別が難しい）



×100

ザルコシスト（肉嚢胞）の中に多数の
ブラディゾイトを認める



×200

ブラディゾイト（この構成蛋白質が下痢原性を有する）

図4. *Sarcocystis fayeri*（国立医薬品食品衛生研究所）

ドア食中毒に比べて、嘔吐より下痢が目立つとされるが、潜伏期は約6時間と同様である。なお、*S. fayeri*の病原性は、分子量15 kDaの細胞骨格系タンパク質にあるとされ、原虫の組織侵入というより毒素型の食中毒と考えられ、研究が進められている。

病因微生物診断は、クドア食中毒と同様にPCR法と顕微鏡法により行われる。馬肉は冷凍、または加熱処理すると感染性は失われる。

おわりに

最近注目される寄生虫症として、ヒト*P. knowlesi*感染症、シャーガス病、アジア条虫症、クドア食中毒、馬肉に関連したザルコシスティス症を取り上げて概説した。いずれも人獣共通感染症

としての側面を備えており、これらの感染症を制御するには、動物の疾病や環境・生態系を考慮した広い視野で対策を立てる必要がある。いずれも、疫学、病態などに未解明の部分が多く、今後の症例集積に基づいたさらなる研究が望まれる。

謝辞 原稿の査読、貴重な写真を提供していただいた山崎浩博士（国立感染症研究所）、小西良子博士（国立医薬品食品衛生研究所）に深謝いたします。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

参考文献

- 1) Singh B, et al: A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024, 2004.

- 2) Kantele A, Jokiranta TS: Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis 52: 1356-1362, 2011.
- 3) 前田貴子, 他: 著名な血小板減少をきたした三日熱マラリアとサルマラリア重複感染の1例(第82回日本感染症学会学術講演会後抄録). 感染症学雑誌 82: 758, 2009.
- 4) Daneshvar C, et al: Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. Clin Infect Dis 49: 852-860, 2009.
- 5) Rassi A Jr, et al: Chagas disease. Lancet 375: 1388-1402, 2010.
- 6) Ito A, et al: Human taeniasis and cysticercosis in Asia. Lancet 362: 1918-1920, 2003.
- 7) 山崎 浩, 他: 2010年6月以降に続けて関東地方で発生が確認された新興寄生虫感染症としてのアジア条虫症. 病原微生物検出情報 (IASR) 32: 106-107, 2011.
- 8) 小西良子: 病因物質不明有症事例—提言までの道のり—. 食品衛生研究 61: 7-12, 2011.
- 9) 大西貴弘: *Kudoa septempunctata*を原因微生物とする食中毒. 食品衛生研究 61: 13-20, 2011.
- 10) 鎌田洋一: *Sarcocystis fayeri*を含んだ馬肉による食中毒. 食品衛生研究 61: 21-27, 2011.

Identification of a Bacteria-Like Ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an Animal Parasitic Nematode

Eiji Nagayasu¹, Sohta A. Ishikawa², Shigeru Taketani³, Gunimala Chakraborty¹, Ayako Yoshida¹, Yuji Inagaki², Haruhiko Maruyama^{1*}

1 Department of Infectious Diseases, Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan, **2** Graduate School for Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, **3** Department of Biotechnology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan

Abstract

Heme is an essential molecule for vast majority of organisms serving as a prosthetic group for various hemoproteins. Although most organisms synthesize heme from 5-aminolevulinic acid through a conserved heme biosynthetic pathway composed of seven consecutive enzymatic reactions, nematodes are known to be natural heme auxotrophs. The completely sequenced *Caenorhabditis elegans* genome, for example, lacks all seven genes for heme biosynthesis. However, genome/transcriptome sequencing of *Strongyloides venezuelensis*, an important model nematode species for studying human strongyloidiasis, indicated the presence of a gene for ferrochelatase (FeCH), which catalyzes the terminal step of heme biosynthesis, whereas the other six heme biosynthesis genes are apparently missing. Phylogenetic analyses indicated that nematode FeCH genes, including that of *S. venezuelensis* (SvFeCH) have a fundamentally different evolutionary origin from the FeCH genes of non-nematode metazoa. Although all non-nematode metazoan FeCH genes appear to be inherited vertically from an ancestral opisthokont, nematode FeCH may have been acquired from an alpha-proteobacterium, horizontally. The identified SvFeCH sequence was found to function as FeCH as expected based on both *in vitro* chelatase assays using recombinant SvFeCH and *in vivo* complementation experiments using an FeCH-deficient strain of *Escherichia coli*. Messenger RNA expression levels during the *S. venezuelensis* lifecycle were examined by real-time RT-PCR. SvFeCH mRNA was expressed at all the stages examined with a marked reduction at the infective third-stage larvae. Our study demonstrates the presence of a bacteria-like FeCH gene in the *S. venezuelensis* genome. It appeared that *S. venezuelensis* and some other animal parasitic nematodes reacquired the once-lost FeCH gene. Although the underlying evolutionary pressures that necessitated this reacquisition remain to be investigated, it is interesting that the presence of FeCH genes in the absence of other heme biosynthesis genes has been reported only for animal pathogens, and this finding may be related to nutritional availability in animal hosts.

Citation: Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, et al. (2013) Identification of a Bacteria-Like Ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an Animal Parasitic Nematode. PLoS ONE 8(3): e58458. doi:10.1371/journal.pone.0058458

Editor: Stuart Alexander Ralph, University of Melbourne, Australia

Received: August 1, 2012; **Accepted:** February 5, 2013; **Published:** March 13, 2013

Copyright: © 2013 Nagayasu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (23790461) from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Grant-in-Aid for Scientific Research C (21590466), Grant-in-aid for Scientific Research on Priority Areas 'Matrix of Infection Phenomena' (21022041), Health Labor Sciences Research Grant (H23-Shinko-Ippan-014, H21-kokui-shitei-004), and Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Genome Science" from MEXT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: hikomaru@med.miyazaki-u.ac.jp

Introduction

Heme is essential for the vast majority of life serving as a prosthetic group for many hemoproteins such as catalase, cytochrome, hemoglobin, myoglobin, and peroxidase [1]. Although most aerobic organisms possess a complete biosynthetic pathway for this compound [2], certain organisms are deficient in heme biosynthesis, lacking some or all genes for the heme biosynthetic pathway. Some anaerobic protists, such as *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis*, and *Encephalitozoon cuniculi* do not possess any heme biosynthetic genes [3]. Members of the family Trypanosomatidae lost some or the entire set of heme biosynthesis genes. They acquire heme or heme precursors from their diet [3,4]. In Trypanosomatidae, members of the genus *Trypanosoma* lack all the heme biosynthesis genes [3,5,6,7], whereas other members such as

Leishmania spp. possess the genes for the last three steps which were horizontally acquired from a gamma-proteobacterium [3]. Insect trypanosomatid species (*Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*) cannot synthesize heme by themselves but harbor bacterial endosymbionts that generate and donate heme or heme precursors to the host (trypanosomatid) cells [4,8]. More peculiar is the case of *Phytomonas serpens*, a plant kinetoplastid [9]. This organism lacks most of the known hemoproteins including respiratory cytochromes and does not require heme for viability despite its dependence on oxidative metabolism [9]. The draft genome of *P. serpens* does not appear to contain heme biosynthesis genes other than ferrochelatase (FeCH, EC 4.99.1.1) [9].

Another important and interesting group of organisms that lack the ability to synthesize heme is the nematodes. Nematodes, or roundworms, are typically small, diverse, and highly abundant metazoan organisms [10]. Although free-living species are found

CTGCTATTAAAGTAATCTA
*

ATGTCGCTAACAAATGTTAAAAATCAATCTTATTAGTTTATCTAAAATCACTTGTT
1 M S S N N N V K I Q S Y L V Y L K S L V
TCCAATCATGTAAACTACCCGTGAATATTAAGTATCAAGAGAACATCAAAGACTGGT
21 S N H V K L P V N I N S I K R T S K T G
ATTATTATTATAACAGCTACACCTAAGTCTTATGGATACTGGGACTTAAGAAGATAT
41 I I I I N T G T P K S Y G Y W D L R R Y
CTTGAAGAATTTTAAACCGATCAAAGGATTAAGAAATCAGTAAATTTATATGGTATCCT
61 L E E F L T D Q R V I E I S K F I W Y P
ATACTTTATCTTTTATCTTCCAATTCGCTCTTTAAAAAGAGAAATGTTATAAAAGT
81 I L Y L F I L P I R P F K K R N C Y K S
ATCTGGAATATGGAGAAGGATGAATCACCATTATTAACGTTATCTAGAAATCAATGTGAT
101 I W N M E K D E S P L L T L S R N Q C D
AAAATTATTGAAAATTTATCTAGTAAAATTAATCTCCTTTTCATTGTCGATGGGCATTT
121 K I I E N L S S K I K S P F I V D W A F
ACATATGGACCACACAATATGAGGAGAGAATTAATGTTCTTGTATTAATCAAGTGTGAC
141 R Y G P H N I E E R I N V L V N E G C D
AAGTTGTAATCTTACCACATTTTCCACATTTATAGTCAAGTACTGTTGGTGGACATGT
161 K L V I L P L F P H Y S Q A T V G G A C
GATGAG (gtaagattgatttaaaatattataataataaaacaatatttttag) GTA
181 D E <--- intron >---> V
TACAGAACAATGCTGAATTAAGATATCAACCTGCATTACGATAGTTCCTCCCATACTAT
184 Y R T M L K L R Y Q P A L R I V P P Y Y
AAAATGAAAAATATAGAAGTATTGGTAATTCAGTATTGAAAAACTGACAAATGAT
204 K I E K Y I E V I G N S V L K K L T N D
AACATTCCACTTGAAGTACTTATTTTTCATATCATGGAATACCATTAAAATATAGTCAA
224 N I P L E V L I F S Y H G I P L K Y S Q
AAAGCGCATCCATATGGATATCAATGTCATGAAACAACCTGAATATATTCAAAATTTATATC
244 K G D P Y G Y Q C H E T T E Y I T N Y I
AAAAACATATTGAAAAGAACCGTCAAAGTATAACCCACTCCCATATACCGTGACATCT
264 K N I I E K E P S K Y N P L P Y T V T S
TATTCAAGTAGATTGGTCCATTAGAATGGCTAAAACCATACACAGATGATGTTGTTAGC
284 Y S S R F G P L E W L K P Y T D D V V T
AATCTTGGAAAGAAAGGATGTAATCATTGGGAATATATCACCTTCCCTCCACTGAT
304 N L G K K G C K S L G I I S P S F H T D
TGCTTGAACATGGGAAGAACTTAGGGATGAATAGGGGAACCTTTTATTAACCTCAGT
324 C L E T W E E L R D E L G E L F I K L S
AATGGTGGAAATTCGTTTTATAGATTCATTAATGATACAAAGATTCAATGTATCTT
344 N G G N F V F I D S L N D T K D S I D L
CTATGTCAATTAATGATAGTAACTTTAGATATTATTTTACTTGAAGAAGTAAAT
364 L C Q L I D S N N F *
AAATAAATACAAAATAA

Figure 1. Genomic DNA and cDNA sequences of the *Strongyloides venezuelensis* FeCH gene. Both sequences were identical excluding the intronic region, which existed only in the genomic DNA, and a nucleotide at the 54th codon (single-underlined), which was cytosine in the cDNA sequence but was thymidine in the genomic DNA sequences (silent mutation). The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. In-frame stop codons are indicated by asterisks. 5'- and 3'-splice junction sites that obey the GT-AG rule of eukaryotic introns are indicated by double lines. doi:10.1371/journal.pone.0058458.g001

in nearly all habitats (marine, freshwater, and soil), nematodes are also parasites of vertebrate and invertebrate animals as well as plants. Molecular phylogenetics have defined five major nematode clades (I through V), within which parasitism has arisen multiple times [11]. The genome of *Caenorhabditis elegans*, which was the first metazoan genome to be completely sequenced [12], appears to lack all seven genes necessary to synthesize heme from 5-aminolevulinic acid [13].

Some hemoproteins of animal parasitic nematodes are particularly well studied because of the interests in their roles in low-oxygen environment (host intestine). One such protein is peritremic hemoglobin of *Ascaris lumbricoides* (parasitic nematode of humans), which has an extraordinary high oxygen affinity, approximately 10,000-fold higher than that of the host's globin [14]. The proposed functions of this oxygen-avid hemoglobin include oxygen detoxification by a reaction driven by nitric oxide [15] and maintenance of body wall O₂ tension by creating an inward-decreasing O₂ gradient that is considered important for oxygen unloading from body wall myoglobin, another heme-

containing protein [16]. Another example of well-studied nematode hemoproteins is cytochrome *b* in the mitochondrial respiratory complex II of *Ascaris suum* (swine parasitic nematode). *A. suum* larvae utilize classic mammalian-type respiration, expressing a small subunit of larval cytochrome *b* (CybS^L) [17]. In contrast, adult worms live in the host small intestine, where oxygen tension is low and utilize an anaerobic NADH-fumarate reductase system expressing a different small subunit of cytochrome *b* (CybS^A) instead of CybS^L [17]. Given the important roles played by the hemoproteins in animal parasitic nematodes, it is interesting to know how heme molecules are synthesized or acquired from the animal hosts.

Strongyloides is a genus of obligate gastrointestinal parasites of vertebrates that belong to nematode clade IV [18]. Among more than 50 documented species, two are known to cause human infections, namely *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* [18]. It is estimated that 30–100 million individuals are infected with *Strongyloides* worldwide primarily in tropic and subtropical regions [19]. Symptoms are usually absent or mild in immunocompetent hosts. However, in impaired host immunity, severe manifestations can develop, and fatalities may ensue [20].

To study strongyloidiasis, *Strongyloides venezuelensis*, which is native to rats but can also infect mice, has been widely used as a model [21]. In a transcriptome sequencing project of this *Strongyloides* species, we identified a partial cDNA sequence that most likely encodes a gene for FeCH [22]. FeCH catalyzes the terminal step of heme biosynthesis [23]. The existence of FeCH sequences was noticed in the genomes of *Brugia malayi* (another animal parasitic nematode belonging to nematode clade III) and its bacterial endosymbiont, (*Wolbachia*). However, further analysis was conducted only on the FeCH gene in the endosymbiont genome [24,25].

In the present study, we cloned the entire cDNA sequence of the FeCH gene from *S. venezuelensis* (*Sv*FeCH). Our BLAST search on publicly available databases revealed that only a fraction of nematode species possesses the FeCH gene. Interestingly, all these species were parasites of mammals. Surprisingly, in our phylogenetic analysis, nematode FeCH formed a distinctive clade, and it was placed distantly from the clade that contains non-nematode metazoan FeCH, suggesting that the origin of nematode FeCH genes are different from those of non-nematode metazoan FeCH. The chelatase activity of the *Sv*FeCH was confirmed by an *in vitro* assay using recombinant protein and a gene complementation assay using an FeCH-deficient *Escherichia coli*.

Nematode genes for heme biosynthesis have not been cloned or characterized to date, essentially because of the nonexistence of these genes in species commonly used in laboratories such as *C. elegans*. Thus, the present study represents the first report of a cloned active FeCH from organisms in the phylum *Nematoda*.

Although the biological significance of carrying only the FeCH gene among other heme biosynthesis genes is unclear, the presence of this gene only in animal parasites suggests a possible role for this gene in nutritional adaptation to the animal host environment.

Materials and Methods

Ethics Statement

S. venezuelensis has been maintained over serial passages in male Wistar rats purchased from Kyudo Co. Ltd. (Kumamoto, Japan). The animals were housed and handled in the Division of Parasitology, Department of Infectious Diseases, University of Miyazaki [26]. All animal studies were conducted under the applicable laws and guidelines for the care and use of laboratory animals in the University of Miyazaki and approved by the Animal

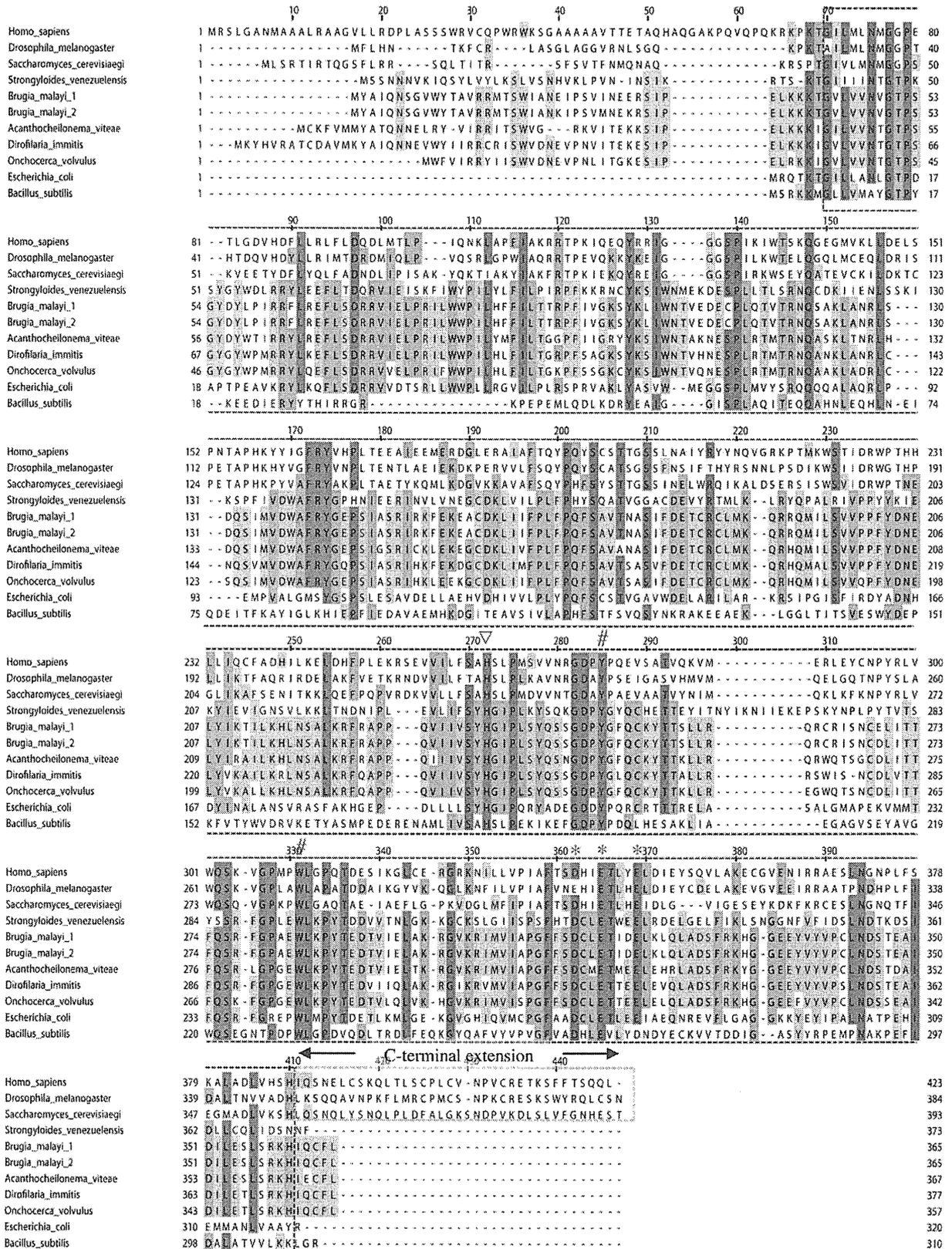


Figure 2. Multiple sequence alignment of FeCH sequences. The FeCH sequences were taken from the NCBI protein database together with the *S. venezuelensis* sequence (this study); *Homo sapiens* (CAB65962), *Drosophila melanogaster* (AAC26225), *Saccharomyces cerevisiae* (EDV10759), *Brugia malayi* 1 (ADI33748), *Brugia malayi* 2 (ADI33749), *Acanthocheilonea viteae* (ADI33750), *Dirofilaria immitis* (ADI33752), *Onchocerca volvulus* (ADI33751), *Escherichia coli* (AP_001124), and *Bacillus subtilis* (NP_388894). The sequences were computationally aligned by the ClustalX program [55]. The catalytic core and the C-terminal extension are boxed by red and green dotted lines, respectively. A histidine residue reported to be critical for metal substrate binding (H263, human sequence numbering) is indicated by an inverted triangle. A cluster of three acidic residues are marked with asterisks. Two residues at the active site that were reported to be identical in all known FeCH sequences (Y276 and W310) [56] are indicated by number (#) marks.

doi:10.1371/journal.pone.0058458.g002

Experiment Committee of the University, as specified in the Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiment and Related Activities in Academic Research Institutions under the jurisdiction of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, 2006.

5'- and 3'-rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

To determine the sequences of the 3'- and 5'-ends of FeCH cDNA, RACE experiments were performed [27,28]. The priming sites used for these experiments were based on a contig sequence obtained from our *S. venezuelensis* transcriptome sequencing project [22]. For 3'-RACE, a PrimeScript RT-PCR kit (Takara, Japan) was used with oligo(dT) adaptor primers to synthesize cDNA from total RNA prepared from parasitic adult worms. Using this 3'-RACE-ready cDNA as a template, hemi-nested PCR was performed first with primer pairs ENM059/ENM008, followed by ENM060/ENM008. The primer sequences used in this study are summarized in Table S1. The resultant PCR products were cloned into pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for DNA sequencing.

For 5'-RACE, a gene specific-primer (reverse) ENM070 was used to synthesize cDNA from total RNA prepared from adult worms. The addition of a homopolymeric A-tail to the 3'-end of the synthesized first-strand cDNA was performed using dATP and terminal transferase. The dA-tailed cDNA was used as a template for hemi-nested PCR first with primers ENM5_6_7, and ENM008/ENM071, then with primers ENM008/ENM072. The resultant PCR products were cloned into pCR2.1 TOPO for DNA sequencing.

Based on the sequence information obtained from the 5'- and 3'-RACE experiments, a PCR primer pair (ENM073/ENM074) was designed to amplify the entire ORF of the *Sv*FeCH gene. The PCR products obtained using an adult-stage cDNA sample as a template were cloned into pCR2.1 TOPO vectors to determine the sequence. The resultant full-length ORF sequence was deposited into DNA Data Bank of Japan under the accession number AB710465, which can be accessed through GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), and used to deduce the amino acid sequence of the *Sv*FeCH.

BLAST Homology Search

To search for heme biosynthesis genes, BLAST homology searches [29] were performed against predicted protein sequence data from published nematode genome projects (*Caenorhabditis briggsae* (nematode clade V) [30], *C. elegans* (V) [12], *Pristionchus pacificus* (V) [31], *Meloidogyne incognita* (IV) [31], *Meloidogyne hapla* (IV) [32], *Bursaphelenchus xylophilus* (IV) [33], *B. malayi* (III) [25], *Ascaris suum* (III) [34], and *Trichinella spiralis* (I) [35]) and nematode expressed sequence tags (ESTs) from NEMBASE4 [36], and *S. venezuelensis* genome (obtained by the Roche-454 pyrosequencing platform [37] with an estimated coverage of more than 20, unpublished), and transcriptome [22] datasets, using human sequences as queries with cutoff value of 1×10^{-4} . For the FeCH gene, the *S. venezuelensis* protein sequence, deduced from the cDNA

sequence, was also used as a query to search for potential orthologs against the aforementioned set of nematode genome and EST datasets, as well as the NCBI nonredundant protein database. Similarly, nematode heme biosynthesis gene sequences identified during these database searches were used as queries, instead of the human sequences, to search for potential orthologs in our *S. venezuelensis* genome and transcriptome datasets.

Phylogenetic Analyses

We retrieved the gene sequences encoding FeCH of 71 bacterial and 65 eukaryotic species from the GENBANK nonredundant protein database (note that some eukaryotes possess more than two FeCH homologs). These amino acid sequences and those of the *S. venezuelensis* homolog were firstly aligned using MAFFT [38], and the resultant alignment was edited manually. After the exclusion of ambiguously aligned positions, the final FeCH alignment containing 71 eukaryotic and 71 bacterial homologs with 177 amino acid positions was subjected to phylogenetic analyses, as described below. Taxonomic affiliation and accession numbers for the sequences considered in our FeCH alignment are listed in Table S2.

Maximum likelihood (ML) phylogenetic analyses were performed using RAxML 7.2.8 [39]. The substitution model used was the LG model incorporating the among-site rate variation approximated with a discrete gamma distribution with four categories (LG+ Γ). This particular substitution model was selected as the most appropriate model for the FeCH alignment using Aminosan [40]. The ML tree was selected from heuristic tree search initiated from 20 distinctive parsimonious trees. In ML bootstrap analysis (with 100 replicates), a single tree search was performed per replicate.

Bayesian analysis based on the LG+ Γ model was also conducted using MrBayes 3.2.1 [41]. Four parallel Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo runs, each consisting of one cold and seven heated chains with a chain temperature of 0.1, were run for 5,000,000 generations. Log-likelihood scores and trees with branch lengths were sampled every 1000 generations. The first 1,250,000 generations were excluded as burn-in, and the remaining trees were summarized to obtain Bayesian posterior probabilities.

Bacterial Expression of Recombinant *Sv*FeCH and Measurement of Porphyrin-metal Chelatase Activity

A cDNA sequence corresponding to the entire catalytic core region of *Sv*FeCH (amino acid positions 29–373) was obtained by PCR using the primer pair TKT001/TKT002. The PCR product was cloned into pET-21a (+), an *E. coli* expression vector (Merck, Darmstadt, Germany), and the plasmid obtained was transferred to *E. coli* BL21. The bacteria were grown in LB medium for 16 h, and then the culture medium was diluted by 10-fold in fresh LB medium. The enzyme was expressed with 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 30°C for 2 h.

The cells were harvested by centrifugation and suspended in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1%