

praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. Am J Trop Med Hyg, 60, 932-935.

- 3) Van Lieshout, L. *et al.* (1999) : The contribution of host-related factors to low cure rates of praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* in Senegal. Am J Trop Med Hyg, 61, 760-765.
- 4) Sandra, D.M. *et al.* (2009) : Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. Plos Neg Dis, 3 e504, 1-10.
- 5) バイエル薬品 ビルトリシド添付文書 (2009年9月改訂) 1 - 3.
- 6) Chigusa, Y. (2010) : Praziquantel : Prescribed dosage for schistosomiasis refereed to in the book, TODAY's THERAPY from 1979 to 2010 in Japan, Annual Report of Institute of International Education and Research, 2, 67-74.
- 7) Edmund, Y.W. *et al.* (2011) : Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: Should we be worried ? Am J Trop Med Hyg, 85, 76-82.
- 8) Ting, Lei. *et al.* (2008) : Surgical treatment of epilepsy with chronic cerebral granuloma caused by *Schistosoma japonicum*. Epilepsia, 49, 73-79.
- 9) Watt, G. *et al.* (1986) : Praziquantel treatment of cerebral schistosomiasis. Lancet, 8506, 529-532.
- 10) Matsuda, H. *et al.* (1983) : Mechanism of action of praziquantel on the eggs of *Schistosoma japonicum*. Jpn J Exp Med 53, 271-274.
- 11) Sangster, N.C. and Gill, J. (1999) : Pharmacology of anthelmintic resistance. Parasitol Today, 1999, 15, 141 - 146.



Complete mitochondrial genomes of *Diplogonoporus balaenopterae* and *Diplogonoporus grandis* (Cestoda: Diphylobothriidae) and clarification of their taxonomic relationships[☆]

Hiroshi Yamasaki^{a,*}, Hiroshi Ohmae^a, Toshiaki Kuramochi^b

^a Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

^b Department of Zoology, National Museum of Nature and Science, Tokyo 169-0073, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 February 2011

Received in revised form 29 September 2011

Accepted 28 October 2011

Available online 4 November 2011

Keywords:

Diplogonoporus balaenopterae

Diplogonoporus grandis

Diphylobothrium

Complete mitochondrial genomes

DNA analysis

Phylogeny

ABSTRACT

Although the diplogonadic human tapeworm, *Diplogonoporus grandis*, has long been considered to be a synonym of the whale tapeworm, *Diplogonoporus balaenopterae*, the identity of the both species at the complete mitochondrial genomes and nuclear DNA levels has been not sufficiently undertaken to date. In the present study, to clarify the taxonomic relationships between *D. balaenopterae* and *D. grandis* at the molecular level, the complete mitochondrial genomes of both species were sequenced and compared. In addition, the genetic variation in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (*cox1*) and the nuclear internal transcribed spacer-1 (ITS-1) region of the ribosomal RNA gene were examined. The complete mitochondrial genomes of *D. balaenopterae* and *D. grandis* consisted of 13,724 bp and 13,725 bp, respectively. These mitochondrial genomes contained 12 protein-coding, 22 transfer RNA and 2 ribosomal RNA genes and two longer non-coding regions. Except for *Hymenolepis diminuta*, the genomic organization in both species was essentially identical to that in other cestode genomes examined to date. However, differences were observed between *Diplogonoporus* and *Diphylobothrium* species in abbreviated stop codons, sequences and the number of repeat units in the 2nd non-coding regions. The genetic differences observed in the mitochondrial genomes, *cox1* and ITS-1 regions of both species were considered typical of intraspecific variation. In conclusion, *D. balaenopterae* is a taxonomically valid species and *D. grandis* is a junior synonym of *D. balaenopterae* based on the zoological nomenclature. Further, molecular-phylogenetic analysis confirmed that *D. balaenopterae* is more closely related to *Diphylobothrium stemmacephalum*, the type-species of the genus *Diphylobothrium*, and the taxonomical validity of the genera *Diplogonoporus* and *Diphylobothrium* was also discussed.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Broad tapeworms belonging to the genus *Diplogonoporus* Lönnberg, 1892, are characterized by having a double set of genitalia in a single proglottid, distinguishing them from *Tetragonoporus* Skriabin, 1961, *Hexagonoporus* Gubanov in Delyamure, 1955, and *Polygonoporus* Skriabin, 1967, which all possess multiple gonads in a single proglottid,

and many members of *Diphylobothrium* Cobbold, 1858, which usually have only one set of gonads per proglottid [1]. *Diplogonoporus balaenopterae* Lönnberg, 1892, infects the small intestine of whales, such as the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*, Balaenopteridae, Cetacea), sei whale (*Balaenoptera borealis*, Balaenopteridae, Cetacea) and humpback whale (*Megaptera novaeangliae*, Balaenopteridae, Cetacea) [1]. In contrast, *Diplogonoporus grandis* Lühe, 1899, which causes diplogonoporiasis in humans, has been regarded as a synonym of *D. balaenopterae*, based on adult tapeworm morphology [2–5], characteristics of larval coracidia and proceroids [6,7], and protein profiles [8]. Nevertheless, *D. grandis* has been referred to as the causative agent of human diplogonoporiasis, especially in Japan [9,10].

Diplogonoporiasis cases in humans have been found almost exclusively in Japan where more than 200 cases have been reported over the last 100 years [11]. Outside Japan, a total of 3 cases have been reported in Chile [12], Korea [13] and Spain [14]. In the latter two cases, the etiologic agents were identified as *D. balaenopterae* based on proglottid morphology. While the complete life cycles of these tapeworms have not yet been elucidated, Japanese anchovy or “shir-asu” (*Engraulis japonica*, Engraulidae, Clupeiformes), Japanese sardine

Abbreviations: *atp6*, ATPase subunit 6 gene; *cob*, cytochrome *b* gene; *cox1–cox3*, cytochrome *c* oxidase subunits 1–3 genes; *nad1–nad6*, NADH dehydrogenase subunits 1–6 genes; *nad4L*, NADH dehydrogenase 4 large subunit gene; *rnl*, ribosomal RNA large subunit gene; *rns*, ribosomal RNA small subunit gene; *tm*, transfer RNA genes; PCR, polymerase chain reaction.

[☆] Nucleotide sequences of the *D. balaenopterae* and *D. grandis* mitochondrial genomes reported in the present paper are deposited at the DDBJ/GenBank databases under accession numbers AB425839 and AB425840, respectively. AB355622–AB355626, AB355628, AB355629, AB474567, and AB474568 are the accession numbers for the *cox1* gene and AB449346–AB449356, AB474569, and AB474570 are the accession numbers for the ITS-1 regions.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 4582 2692; fax: +81 3 5285 1173.

E-mail address: hyamasak@nih.go.jp (H. Yamasaki).

Table 1
Diplogonoporus isolates examined in the present study.

Sample no.	Year collected	Locality collected (latitude/longitude)	Host animals	DDBJ/GenBank accession numbers	
				<i>cox1</i>	ITS-1
No. 1	1997	Western North Pacific Ocean (N37/E160)	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (minke whale)	AB355622	AB449346
No. 2 ^a	1997	Western North Pacific Ocean (N37/E163)	<i>B. acutorostrata</i>	AB355623	AB449347
No. 3	1997	Western North Pacific Ocean (N39/E161)	<i>B. acutorostrata</i>	AB355624	AB449342
No. 4	1997	Western North Pacific Ocean (N39/E161)	<i>B. acutorostrata</i>	AB355625	AB449349–AB449352
No. 5	1997	Western North Pacific Ocean (N39/E158)	<i>B. acutorostrata</i>	AB355626	AB449353
No. 6	2002	Western North Pacific Ocean	<i>Balaenoptera borealis</i> (sei whale)	AB474567	AB474569
No. 7	2002	Western North Pacific Ocean	<i>B. borealis</i>	AB474568	AB474570
No. 8 ^a	2004	Tokyo, Japan	<i>Homo sapiens</i> (58-year-old Japanese man)	AB355628	AB449354
No. 9	2006	Hamamatsu, Shizuoka, Japan	<i>H. sapiens</i> (58-year-old Japanese man)	AB355629	AB449355, AB499356

^a *Diplogonoporus* isolates used for the complete mitochondrial genome analysis.

(*Sardinops melanostictus*, Clupeidae, Clupeiformes) [9] and skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*, Scombridae, Perciformes) have been suspected to be the most likely sources of infection in humans [10].

To assess the phylogenetic relationships among eucestodes, genes such as the ribosomal RNA large subunit (28S rRNA) and small subunit (12S rRNA) genes [15–20], *cox1* and *nad3*[21], elongation factor-1 alpha gene [16], the internal transcribed spacer (ITS) regions [22,23] and the 18S rRNA gene [19,24] have been used. With regard to *Diplogonoporus* isolates, preliminary DNA analysis using *cox1* recently supported the assignment of *D. grandis* as a synonym of *D. balaenopterae* [25,26]. Genetic analysis of *Diplogonoporus* isolates from clinical cases has recently revealed a close relationship between *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium stemmacephalum*[24].

Thus, in the present study, the complete mitochondrial genomes of both species were sequenced and compared in order to clarify the molecular–taxonomic relationship between *D. balaenopterae* and *D. grandis*. In addition, the genetic variation within the *cox1* and ITS-1 regions was examined using nine *Diplogonoporus* isolates obtained from whales and humans. The need for a revision of the taxonomic affiliation of the genera *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium* is also discussed.

2. Materials and methods

2.1. *Diplogonoporus* tapeworms examined in the present study

The *Diplogonoporus* tapeworm specimens examined in this study are listed in Table 1. Minke whale and sei whale were taken in the Western North Pacific Ocean with special permission from The Institute of Cetacean Research, Japan. The seven mature *Diplogonoporus* tapeworms collected from the small intestines of the whales were identified as *D. balaenopterae* based on morphological characters (Nos. 1–7 in Table 1). Two diplogonadic tapeworms, one immature tapeworm lacking a scolex (No. 8) and a mature tapeworm with a scolex (No. 9), were obtained from two Japanese patients; these samples were identified morphologically as *D. grandis*. The tapeworms were rinsed thoroughly in phosphate-buffered saline after collection and preserved in 80% ethanol, except for two specimens (Nos. 6 and 9) which were fixed in 10% formalin.

2.2. DNA extraction, PCR amplification and DNA sequencing

DNA was extracted from the ethanol-fixed proglottids using a DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The formalin-fixed specimens were embedded in paraffin and DNA was efficiently extracted from the unstained, 10 µm-thick sections using a DEXPAT kit (Takara Bio Inc., Japan) as described previously [26,27]. For analysis of the complete mitochondrial genome, DNA was extracted from two representative tapeworms fixed in ethanol (Nos. 2 and 8 in Table 1). Amplification of the mitochondrial genomes was performed using 13 primer pairs

(Table 2) designed based on the mitochondrial genomes of *Diphyllobothrium nihonkaiense* (AB268585) and *Diphyllobothrium latum* (AB269325). The PCR consisted of an initial denaturation step of 98 °C for 30 s, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 90 s, with a final extension cycle of 72 °C for 5 min. Samples were amplified in a final reaction volume of 50 µL with *Ex Taq* DNA polymerase (Hot Start version, Takara Bio Inc., Japan).

For the polymorphism analysis of the *cox1* and ITS-1 regions of the ethanol-fixed samples (Nos. 1, 3–5 and 7), primer pairs P1/P2 and P28/P31 were designed based on the nucleotide sequences of the *cox1* and ITS-1 regions in *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium*, respectively (Table 3). For the formalin-fixed samples (Nos. 6 and 9), short and overlapping DNA fragments were amplified using primer pairs P3–P27, and P28/P29 and P30/P31 (Table 3) for the *cox1* and the ITS-1 regions, respectively. High fidelity *KOD FX* DNA polymerase (Toyobo, Japan) was occasionally used for DNA samples extracted from formalin-fixed materials. PCR performed using *KOD FX* DNA polymerase employed an initial denaturation step of 94 °C for 15 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, 72 °C for 60 s and a final cycle of 72 °C for 5 min.

Amplicons confirmed by agarose gel or capillary electrophoresis (HAD-GT12, eGene Inc., LA) were purified using a NucleoSpin Extract II kit (Macherey–Nagel, Germany) and used as templates for direct DNA sequencing. Samples for DNA sequencing were prepared using

Table 2
Oligonucleotide primers used for amplification of mitochondrial genomes.

Primer pairs	Nucleotide sequences (5' to 3')
P1 atp6/F1	ATGATCTTCAGTGGTTATTCAAGTT
P2 nad1/R25	CACCTGTAAAAACATAAAAATCAT
P3 trnA/F	ACAGAATACTGGGTTTGGCTCAG
P4 nad3/R60	AAATGATATGACTATAAACCAACJAA
P5 nad3/F1	ATGTAGCTTATTTTTGGTGG
P6 rnl/R250	CTATACACATTTACITGTCCTC
P7 trnT/F38	CAGGGTGGGTTTACTCTTGGGCCT
P8 trnC/R25	TACTAAGACCAAGGCAATAGACTT
P9 rnl/F451	CATATTATAAATTTATATGTAGG
P10 trnC/R25	TACTAAGACCAAGGCAATAGACTT
P11 rnl/F880	TGAGGTGAGTTAAGACCGCGTGAG
P12 rnl/R245	ATTTCACTACTCTTACTCTTACCT
P13 trnC/F40	GTGAATATTGTTTATTCTAGGCCTT
P14 cox2/R25	CGTAGTACAGCAAGAAAATTTTCAT
P15 rnl/F570	GTAACAAGGTAGCCAGATGATTC
P16 trnE/R25	TTATGCTCCAATACAACAACAGG
P17 cox2/F525	GGTGGTCCAGTGTATATGCCATA
P18 nad/R761	CAAGTGGATATGGCAACTATCTTCT
P19 nad5/F565	CTAACCTGTAGTCTTTAGTACA
P20 cox3/R205	TACCAAGGCTAAAACITCAAG
P21 trnG/F40	GTGGGATCTAATGGTTTTAGATAA
P22 trnH/R25	GCCAGTTTAAATAACCTATCAGTAA
P23 cox3/F444	GGTCTAGATTTTATGCTAGTTGT
P24 nad4/R 325	ACAGAGGTAAACATGGATAGCTATA
P25 nad4/F1	ATGAGAGTGTACAAAATTATTAGAT
P26 atp/R25	AATCTTGAATAACCTAAAAGATCAT

Table 3
Oligonucleotide primers used for the amplification of *cox1* genes and ITS-1 regions.

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')
P1 nad3/F120	CGAGTGTGGTTTTAGATCTTCTTCA
P2 rnl/R250	CTATACACATTTACTTGATCTCCTC
P3 nad3/F120	CGAGTGTGGTTTTAGATCTTCTTCA
P4 <i>cox1</i> /R125	ATACGTATCATAACACTAAGGCTCA
P5 <i>cox1</i> /F1	ATGATAATCTTAAAGTTTTAGTIT
P6 <i>cox1</i> /R225	GGGCATCAAAAAAGAATATCATT
P7 <i>cox1</i> /F101	TGAGCCTTAGTGTTATGATACGTAT
P8 <i>cox1</i> /R325	ATAAAATCMGCATTAMGCTTT
P9 <i>cox1</i> /F201	AATGATATTCTTTTTTGTATGCC
P10 <i>cox1</i> /R425	TTTCTATCCCTAAAAAGAGCAGAAG
P11 <i>cox1</i> /F301	AAAGCTTTAAGTGCTTGATTGTAT
P12 <i>cox1</i> /R525	ATCAAAAAAGCTGTGTACAGGGTA
P13 <i>cox1</i> /F501	TACCTGTACACAGCTTTTGTGAT
P14 <i>cox1</i> /R725	TCAGGATGACCAAAAAATC.AAAA
P15 <i>cox1</i> /F601	GTTTTAGCTGCTGCTATTACMTGT
P16 <i>cox1</i> /R825	AAATAATAMCCATAAAATCCAAAA
P17 <i>cox1</i> /F701	TGTTTTGATTTTTTGGTCATCCTGA
P18 <i>cox1</i> /R925	TAATGACTAAAAAAACAGTGT
P19 <i>cox1</i> /F901	ACAGCTGTTTTTTTAGGTGAGTGA
P20 <i>cox1</i> /R1125	AACCACAAATCAAGTATCATGCTTT
P21 <i>cox1</i> /F1080	TGCTTGTCTTCTGATAAATATTTTG
P22 <i>cox1</i> /R1309	AACCGCATATACCAAAGTAATGCAT
P23 <i>cox1</i> /F1230	ATTGCAGTGTATTGTATAGTCTCT
P24 <i>cox1</i> /R1435	TAAGTAGAGACTCCCAAAAATAAAC
P25 <i>cox1</i> /F1401	TTTTTTTGTGTTTATTTTGTGGGAG
P26 <i>cox1</i> /R1566	CTATAAGGCCAACATATAATCTACAAA
P27 <i>trnI</i> /R23	ACAAAACCAAGTATTCTAATTTAAA
P28 ITS-1/F1	ACCTGCGGAAGGATCATTACACGTT
P29 ITS-1/R325	ACACGACGCTCGAGTCTTACGCCT
P30 ITS-1/F301	AGGCGTAAGACTCGAGGCGTCTGT
P31 ITS-1/R625	AATTCACACAGTTGGCTCGCTCTTC

an ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems Inc., CA) and nucleotide sequences were determined by primer walking using an ABI PRISM 3100-Advant Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.).

2.3. Data processing and phylogenetic analysis

A number of models for genetic distance analysis and estimation of phylogenetic trees have been proposed and differ in terms of the parameters used to describe the rates of nucleotide substitution during evolution [28]. In this paper, genetic distance of 36 genes encoded in the mitochondrial genomes between *D. balaenopterae* and *D. grandis*, genetic variation of *cox1* and ITS-1 regions among *Diplogonoporus* isolates was estimated using Kimura's 2-parameter (K2P). The model distinguishes between transitional and transversal substitutions of the nucleotides and assumes that all of the bases are equally frequent [29]. The rate of transitional substitution is often higher than that of transversal substitution, especially in animal mitochondrial DNA, and the model was considered to be suitable for estimating genetic distance of mitochondrial DNA [30]. Genetic distance was calculated by the setting of substitution included transitions and transversions, and the rates among sites (γ parameter = 1).

Phylogenetic analyses of *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium* were performed using nucleotide sequences of *cox1* from 12 *Diphyllobothriidae* taxa (DQ768191, AB369249, AB015753, AB517949, EU241311, EU241317, EU241308, FM209182, AB510496, AM412738, AB268585, AB364645), *Bothriocephalus acheilognathi* (*Bothriocephalidae*, *Bothriocephalidea*, HM439384) and *Taenia solium* (*Taeniidae*, *Cyclophyllidea*, AB516957) were used for comparisons. The nucleotide sequence data were initially aligned with the ClustalW program (ver. 1.83, <http://www.clustalw.ddbj.nig.ac.jp>). The maximum likelihood analysis (ML) and Bayesian inference (BI) were employed for phylogenetic analyses. For the ML, the alignment data were converted to FASTA format using MEGA program (ver. 5.05) and analyzed using Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + G model (γ = 5) which was

selected based on Bayesian Information Criterion scores using MEGA 5.05.

For BI, the alignment data were converted to NEXUS format using the ClustalX2 (ver. 2.0.12) and Bayesian phylogenetic analysis was performed using MrBayes 3.1.2 (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/index.php>). The DNA data were divided into 3 partitions and likelihood setting was set to $nst = 6$, equivalent to the general time reversible (GTR) model of nucleotide substitution [31]. Markov Chain Monte Carlo analysis was then run on each of the datasets for 10^6 generations to estimate the posterior probabilities of trees [32]. Phylogenetic trees were rooted with *T. solium* as the outgroup. For the ML analysis, nodal support was assessed by bootstrap resampling (1000 replicates). In BI, clades were considered to have high nodal support if the BI posterior probability was ≥ 0.95 .

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the complete mitochondrial genomes of *D. balaenopterae* and *D. grandis*

The 5'- and 3'-ends of the protein-coding genes were deduced from the sequences corresponding to the genes in *D. nihonkaiense* and *D. latum*. Using sequence motifs, genes for 2 rRNAs and 22 tRNAs were also annotated in the 5'- and 3'-flanking regions of the open reading frames. In the 2nd non-coding region (NCR2), located between *nad5* and *trnG*, at least three ladder-products were amplified in both species examined (data not shown), with the largest product (320 bp) used to estimate the whole genome size. The complete mitochondrial genome sizes of the isolates No. 2 (*D. balaenopterae*, AB425839) and No. 8 (*D. grandis*, AB425840) were thus estimated to be 13,724 bp and 13,725 bp, respectively.

As shown in Table 4, the mitochondrial genomes consisted of 12 protein-coding genes (*atp6*, *cob*, *cox1–cox3*, *nad1–nad6*), 2 rRNA genes (*rnl*, *rns*), 22 tRNA genes (*trns*), and two longer non-coding regions (NCR1, NCR2). The gene encoding ATPase subunit 8, as well as other flatworm mitochondrial genomes, was absent. Most of the genes were interrupted by several bases and no introns were present in the protein-coding genes. Genes were arranged unidirectionally and exhibited a strong bias toward adenine (A) and thymine (T), with the A + T content reaching 68.7–68.8%. Genomic organization was essentially identical to that reported in other diphyllid bothriidean and cyclophyllid cestodes to date, except for *Hymenolepis diminuta* [33–37].

Of the 12 protein-coding genes, 11 were initiated by an ATG codon, while *cox3* was initiated by GTG (Table 4). Eleven protein-coding genes were predicted to end with complete stop codons: five (*atp6*, *cox2*, *nad2*, *nad5* and *nad6*) were predicted to terminate with TAA and six (*cob*, *cox1*, *nad1*, *nad3*, *nad4* and *nad4L*) with a TAG codon. However, *cox3* in the *Diplogonoporus* isolates was predicted to end with an abbreviated stop codon, T (Table 4), and a complete stop codon appeared to be missing downstream of *trnH*, suggesting that the abbreviated T has been modified by post-transcriptional polyadenylation. It is not considered unusual to find incomplete termination codons, such as T or TA, in the protein-coding genes of metazoan mitochondrial genomes [38]. Indeed, in the mitochondrial genome sequences of flatworms that have been reported to date, abbreviated stop codons have been identified in *cox3*, *nad1* and *nad3* of *D. nihonkaiense* and *D. latum* [34], and *nad1* in *T. solium* [35].

The NCR2 region is considered to be involved in the replication of mitochondrial DNA [39]. Kim et al. [37] reported that size variation in the NCR2 region is largely due to differences in the number of identical 36-nucleotide repeat sequence units, and that these differences vary according to geographic location in *D. latum* (4–6 repeats) and *D. nihonkaiense* (4–7 repeats). In the NCR2 region of *Diplogonoporus* isolates from whales and humans, at least 8 identical repeat units consisting of 33 nucleotides (5'-TTAGGGATGTGTAGTATATTCTCTAAATTTG-3')

Table 4
Location of genes and non-coding regions (NCR) in the mitochondrial genomes of *D. balaenopterae* and *D. grandis*.

Genes and NCRs	<i>D. balaenopterae</i> (13,724 bp)			<i>D. grandis</i> (13,725 bp)		
	Locations	Length (bp)	Start–Stop codons	Locations	Length (bp)	Start–Stop codons
<i>trnY</i>	1–66	66		1–66	66	
1st NCR	67–291	225		67–292	226	
<i>trnL1</i> (CUN)	292–358	67		293–359	67	
<i>trnS2</i> (UCN)	380–445	66		379–444	66	
<i>trnL2</i> (UUR)	450–513	64		449–512	64	
<i>trnR</i>	514–568	55		513–567	55	
<i>nad5</i>	572–2140	1569	ATG-TAA	571–2139	1569	ATG-TAA
2nd NCR	2141–2460	320		2140–2459	320	
<i>trnG</i>	2461–2528	68		2460–2527	68	
<i>cox3</i>	2532–3174	643	GTG-T ^a	2531–3173	643	GTG-T ^a
<i>trnH</i>	3175–3238	64		3174–3237	64	
<i>cob</i>	3242–4348	1107	ATG-TAG	3241–4347	1107	ATG-TAG
<i>nad4L</i>	4350–4610	261	ATG-TAG	4349–4609	261	ATG-TAG
<i>nad4</i>	4571–5821	1251	ATG-TAG	4570–5820	1251	ATG-TAG
<i>trnQ</i>	5822–5884	63		5821–5883	63	
<i>trnF</i>	5881–5945	65		5880–5944	65	
<i>trnM</i>	5942–6007	66		5941–6006	66	
<i>atp6</i>	6011–6520	510	ATG-TAA	6010–6519	510	ATG-TAA
<i>nad2</i>	6523–7401	879	ATG-TM	6522–7400	879	ATG-TM
<i>trnV</i>	7404–7468	65		7403–7467	65	
<i>trnA</i>	7471–7533	63		7470–7532	63	
<i>trnD</i>	7537–7598	62		7536–7597	62	
<i>nad1</i>	7599–8489	891	ATG-TAG	7598–8488	891	ATG-TAG
<i>trnN</i>	8489–8553	65		8488–8552	65	
<i>trnP</i>	8567–8629	63		8566–8628	63	
<i>trnI</i>	8640–8702	63		8639–8701	63	
<i>trnK</i>	8709–8773	65		8708–8772	65	
<i>nad3</i>	8775–9131	357	ATG-TAG	8774–9130	357	ATG-TAG
<i>trnS1</i> (AGN)	9121–9179	59		9120–9178	59	
<i>trnW</i>	9181–9243	63		9180–9242	63	
<i>cox1</i>	9252–10,817	1566	ATG-TAG	9251–10,816	1566	ATG-TAG
<i>trnT</i>	10,808–10,869	62		10,807–10,868	62	
<i>trnL</i>	10,870–11,831	962		10,869–11,831	963	
<i>trnC</i>	11,832–11,895	64		11,832–11,895	64	
<i>ms</i>	11,896–12,625	730		11,896–12,626	731	
<i>cox2</i>	12,626–13,195	570	ATG-TAA	12,627–13,196	570	ATG-TAA
<i>trnE</i>	13,198–13,266	69		13,199–13,267	69	
<i>nad6</i>	13,263–13,721	459	ATG-TAA	13,264–13,722	459	ATG-TAA

^a Abbreviated stop codon.

were confirmed, but variation in the number of repeat units among geographical isolates of *Diplogonoporus* has not yet been thoroughly investigated.

3.2. Taxonomic status between *D. balaenopterae* and *D. grandis* based on molecular analyses

Genetic distances of 36 genes encoded by the mitochondrial genomes of both species were calculated using K2P model. The genetic distance values between the 12 protein-coding genes were extremely small ($d=0.0000$ – 0.0054). Similarly, the genetic distances between the *rnl* and *rns* genes were low at 0.0012 and 0.0030, respectively. Of the 22 *trns*, 19 had identical sequences and *trnC*, *trnH* and *trnV* were separated by a distance of $d=0.0158$. By way of comparison, the genetic distance value obtained for the *cox2* in *D. nihonkaiense* and *D. latum*, which are distinct species, was 0.069. Indeed, the value for *cox2* was the lowest genetic distance observed among all of the protein-coding genes of *D. nihonkaiense* and *D. latum* (data not shown), indicating that the differences between *D. balaenopterae* and *D. grandis* were more likely due to intraspecific variation than because the two taxa were separate species.

Fig. 1 is an unrooted neighbor-joining tree showing the genetic relationships among diplogonoporiid isolates estimated using *cox1* (A) and ITS-1 region (B) sequences. The transitional ($A \rightleftharpoons G$, $T \rightleftharpoons C$) and transversal substitutions ($T \rightleftharpoons G$, $T \rightleftharpoons A$) were at 25 and 2 sites (1393 and 1476), respectively, along the 1566-bp *cox1* sequence (data not shown). The genetic distance ranged from 0.0000 to

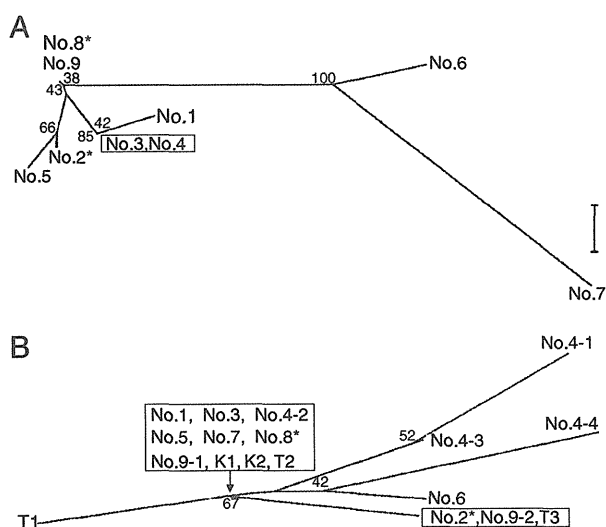


Fig. 1. Unrooted neighbor-joining trees inferred from the sequences of the (A) *cox1* (1566 bp) and (B) ITS-1 region (625 bp) of *Diplogonoporus* isolates. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (1000 replicates). Asterisks denote samples used for the complete mitochondrial genome analysis. Bars indicate genetic distances calculated by K2P model. ITS-1 regions of *D. grandis* isolates K1, K2, T1, T2 and T3 are from accession numbers AB298510, AB298511, AB298512, AB298513 and AB298514, respectively. Bars = 0.001 (A) and 0.0005 (B).

0.0158 (overall mean = 0.0059), which are typical of intraspecific variations. Nucleotide sequences of the ITS-1 region (625 bp) of 2 *Diplogonoporus* isolates (Nos. 4 and 9) were determined using PCR products subcloned into pT7 Blue T-vector (Novagen, USA) because dual peaks at 4 sites were detected by direct DNA sequencing. Polymorphic nucleotides were observed at 4 sites (30, 147, 334 and 548) in *D. balaenopterae* (No. 4) and at position 344 in *D. grandis* (No. 9) (data not shown). Transitions (A \rightleftharpoons G, T \rightleftharpoons C) and transversions (C \rightleftharpoons A) were observed at sites 344 and 548, and 30 and 147, respectively. The genetic distance values ranged from 0.0000 to 0.0048 and overall mean was 0.0017, which are also typical of intraspecific variation. Thus, based on mitochondrial and nuclear DNA data, the present study confirmed that *D. grandis* is a junior synonym of *D. balaenopterae* and thus, causative agent of human diplogonoporiasis should be called *D. balaenopterae*.

3.3. Taxonomic and phylogenetic relationships between the genera *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium*

The Pseudophyllidea van Beneden in Carus, 1863, a well-recognized order of tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda), has been considered to be a monophyletic group of difossate cestodes [40]. However, phylogenetic analysis based on nuclear ribosomal RNA genes and ITS-2 sequences revealed the presence of two phylogenetically unrelated groups, indicating paraphyly or polyphyly of the order Pseudophyllidea [15,17,19,20]; consequently, two new orders, Diphyllobothriidea and Bothriocephalidea, have been proposed to accommodate these unrelated lineages [41]. In addition another study [24], the mitochondrial DNA results of this study also support the proposal. However, the taxonomic and phylogenetic relationships between the genera *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium* (Diphyllobothriidae, Diphyllobothriidea) have been not yet been clarified in sufficient detail, primarily because DNA sequence data are only available for a limited number of species [42], and also because the taxonomic positions of several species within these genera are still uncertain.

Fig. 2 shows phylogenetic trees inferred by ML and BI algorithms using nucleotide sequences of the *cox1* (356 bp). Although two tree topologies were somewhat different, *Diplogonoporus* isolates formed monophyletic clade belonging to Diphyllobothriidae (Diphyllobothriidea) with strong nodal support (≥ 75 in ML, ≥ 0.97 in BI) and were more closely related to *D. stemmacephalum*, the type-species of the genus *Diphyllobothrium*, corroborating the findings of a previous study [24]. Phylogenetic studies on pseudophyllidean (= diphyllobothriidean and bothriocephalidean) cestodes support paraphyly and/or polyphyly of several cestode genera, including *Ligula* Bloch, 1782 and *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808 [17,19,22], and *Diphyllobothrium* [43]. The close relationship between *Diplogonoporus* spp. and *D. stemmacephalum* implies that these taxa constitute a paraphyletic group.

Interestingly, *D. balaenopterae* and *D. stemmacephalum* are phylogenetically closely related and infect cetaceans, such as *Balaenoptera* spp. and *M. novaeangliae* (Balaenopteridae) [1,2], and the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*, Phocoenidae, Cetacea), bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*, Delphinidae, Cetacea) and long-finned pilot whale (*Globicephala melas*, Delphinidae, Cetacea) [1], respectively. Based on these similarities in host preference, it seems likely that *D. balaenopterae* and *D. stemmacephalum* are derived from a common ancestral species [24].

The genus *Diplogonoporus* has been characterized as having two sets of genitalia in a single proglottid [1]. However, additional genitalia (3 to 5 pairs) have been observed in some segments of *D. balaenopterae* collected from an Antarctic sei whale (*B. borealis*, Balaenopteridae, Cetacea) [44]. Similarly, in dwarf forms of *D. balaenopterae* (body length: 61–809 mm, max. width 2.0–5.6 mm) obtained from a minke whale, although two sets of genitalia per segment were usually encountered, sometimes 4 paired genitalia were observed in a single proglottid in the same individuals [45]. Conversely, two sets of reproductive organs

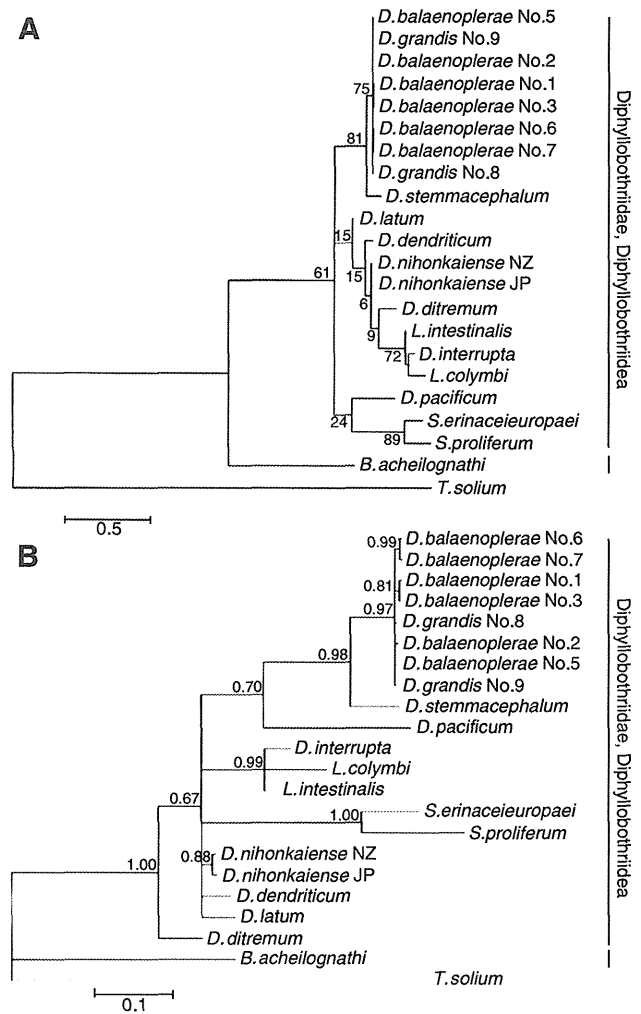


Fig. 2. Phylogenetic trees constructed by the (A) maximum likelihood and (B) Bayesian inference analyses using *cox1* sequence data (356 bp). Nucleotide sequence data were obtained from the following accession numbers: *Diplogonoporus balaenopterae* (AB355622–AB355624, AB355626, AB474567, AB474568), *Diplogonoporus grandis* (AB355628, AB355629), *Diphyllobothrium stemmacephalum* (DQ768191), *Diphyllobothrium pacificum* (AB517949), *Spirometra erinaceieuropaei* (AB369249), *Sparaganum proliferum* (AB015753), *Digramma interrupta* (EU241311), *Ligula intestinalis* (EU241317), *Ligula colymbi* (EU241308), *Diphyllobothrium ditremum* (FM209182), *Diphyllobothrium latum* (AB510496), *Diphyllobothrium dendriticum* (AM412738), *Diphyllobothrium nihonkaiense* (AB268585, AB364645) and *Bothriocephalus acheilognathi* (Bothriocephalidae, Bothriocephalidea, HM439384). *Taenia solium* (Taeniidae, Cyclophyllidea, AB516957) was used as the outgroup. Bootstrap values (1000 replicates) in ML and posterior probabilities in the BI are shown at the branch. Bars indicate the number of base substitutions/site.

per segment have been reported in *Diphyllobothrium yonagense*, which infects Risso's dolphin (*Grampus griseus*, Delphinidae, Cetacea) [46] and rarely, duplicated genitalia have been reported in *Bothriocephalus*, *Triaenophorus*, *Echinophallus* and *Paraechinophallus* (Bothriocephalidea) [41]. Moreover, in some genera of Diphyllobothriidae (e.g., *Baylisia*, *Tetragonoporus* and *Hexagonoporus*), multiple genital organs have been observed in each segment. Thus, because the number of genitalia can vary, even within species, two sets of genitalia as a taxonomic character may not be sufficiently robust for resolving affiliations among the members of the genus *Diplogonoporus*. In addition, these observations suggest that multiplication of the reproductive organs may be an adaptive phenomenon in cestode evolution.

In so far as the taxonomic placement of *Diphyllobothrium pacificum*, a parasite of the South American sea lion (*Otaria flavescens*,

Otariidae, Carnivora), is concerned, it has been proposed that *Adenocephalus pacificus* Nybelin, 1931, the original name assigned to the species, should be restored as the valid name based on molecular and morphological data which *D. pacificum* is phylogenetically distant from *Diphyllobothrium* species (i.e., *D. nihonkaiense*, *D. latum*, and *D. dendriticum* etc) [23]. Our results also support the validity of the original genus *Adenocephalus* although the position of *D. pacificum* was different in two phylogenetic trees. Because *Diphyllobothrium* including *D. nihonkaiense*, *D. latum*, *D. dendriticum* and *D. ditremum*, which are all non-cetacean *Diphyllobothrium* parasites, is placed at markedly distant position from *D. stemmacephalum* (Fig. 2). The genera *Digramma* Choldkovsky, 1914 and *Ligula*, formed a monophyletic cluster, but *Digramma* is considered a synonym of *Ligula* [22,47]. Indeed, *Digramma* may merely be a rare diplogonadic type of *Ligula*.

Regarding the validity of the genera *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium* based on molecular evidence, the following scenarios are possible;

- i) *Diplogonoporus* should be synonymized with *Diphyllobothrium*, and the name *Diphyllobothrium* should be used for *D. stemmacephalum*, which may also include several other cetacean *Diphyllobothrium* species
- ii) *Diplogonoporus* should be retained as a valid genus
- iii) Non-cetacean *Diphyllobothrium* species, including *D. nihonkaiense*, *D. latum* and *D. dendriticum*, should be placed in a newly designated genus.

To conclude whether *Diplogonoporus* can be regarded as a synonym of *Diphyllobothrium* or not, comprehensive molecular-phylogenetic analyses should be undertaken using other *Diplogonoporus* species, such as *Diplogonoporus tetraapterus*, which infects the harbor seal (*Phoca vitulina*, Phocidae, Carnivora) and fur seal (*Callorhinus ursinus*, Otariidae, Carnivora), and *Diplogonoporus violettiae* which infects the sea lion (*Eumetopias jubatus*, Otariidae, Carnivora). In addition, the gigantic and dwarf forms of *D. balaenopterae* [45,46], as well as species that infect other cetacean species, including *D. yonagoense* and *Diphyllobothrium macroovatum* which infect minke whales (*B. acutorostrata*) and gray whale (*Eschrichtius gibbosus*, Eschrichtiidae, Cetacea) [48] should be also examined. Moreover, other genera related to *Diplogonoporus*, including *Tetragonoporus*, *Hexagonoporus* and *Polygonoporus*, are required in order to clarify the phylogenetic relationships among these cestodes, and molecular analyses using *D. yonagoense* and *Hexagonoporus* isolates are currently underway. For scenario iii), the genus *Diphyllobothrium* should contain the type-species of *D. stemmacephalum*. It may therefore be reasonable to place the non-cetacean *Diphyllobothrium* species into a new genus that is distinct from *Diphyllobothrium*. To revise the validity of the genus *Diphyllobothrium*, further molecular analysis using more non-cetacean *Diphyllobothrium* taxa would be necessary.

In conclusion, the findings of the mitochondrial and nuclear DNA analyses reported here will be very useful, not only for analyzing the phylogenetic relationships among eucestodes, but also for differentiating *Diplogonoporus* species from *Diphyllobothrium* species. In addition, larval stages of *D. balaenopterae* have not yet been discovered. It will now be possible to determine whether plerocercoids found in marine fish hosts are *D. balaenopterae* or not, which will further clarify the life cycle of this parasite and facilitate the prevention of diplogonoporiasis in humans.

Acknowledgments

The authors thank Y. Fujise (The Institute of Cetacean Research, Tokyo, Japan) for permission regarding the use of cetacean tapeworm materials, T. Nara (Juntendo University, Tokyo, Japan), H. Kino (Hamamatsu Medical University, Hamamatsu, Japan) and Y. Nishimura (Seibu Medical Center, Hamamatsu, Japan) for providing clinical samples, and S. Izumiyama (National Institute of Infectious Diseases,

Tokyo, Japan) for helping BI analysis. The authors would also like to thank the three anonymous reviewers who provided insightful and critical suggestions regarding the phylogeny of *Diplogonoporus/Diphyllobothrium*. The technical assistance of Y. Misawa and Y. Mori is also appreciated. This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (H20-H22 Shinko-ippan-015) to HO and (H20-H22 Shinko-ippan-016) to HY.

References

- [1] Kamo H. In: Hirai K, editor. Guide to identification of diphyllobothriid cestodes. Tokyo: Gendaikikaku; 1999. p. 1–146. (in Japanese).
- [2] Rausch RL. Studies on the helminth fauna of Alaska. XLI. Observations on cestodes of the genus *Diplogonoporus* Lönnberg, 1892 (Diphyllobothriidae). Canadian Journal of Zoology 1964;42:1049–69.
- [3] Iwata S. *Diplogonoporus grandis* (Blanchard, 1894) Lühe, 1889 in the synonym of *D. balaenopterae* Lönnberg, 1892. Proceedings of the Japan Society Systematic Zoology 1967;3:20–4 (in Japanese).
- [4] Kamo H. Studies on *Diplogonoporus grandis* (Blanchard, 1894). Japanese Journal of Parasitology 1969;18:333–7 (in Japanese with English summary).
- [5] Delyamure SL, Skriabin AS. Identification of species of *Diplogonoporus balaenopterae* and *D. grandis* (Cestoda, Diphyllobothriidae). Parazitologiiia 1986;20:69–72 (in Russian with English summary).
- [6] Kamo H, Iwata S, Hatsushika R, Maejima J. Experimental studies on the life-cycle of *Diplogonoporus grandis*. I. Embryonation and hatching of the egg. Japanese Journal of Parasitology 1972;21:59–69 (in Japanese with English summary).
- [7] Kamo H, Iwata S, Hatsushika R, Maejima J. Experimental studies on the life-cycle of *Diplogonoporus grandis*. II. Infection experiments against marine copepoda. Japanese Journal of Parasitology 1973;22:79–89 (in Japanese with English summary).
- [8] Fukumoto S, Yazaki S, Nagai D, Maejima J, Hirai K. Soluble protein profile and isozyme patterns in the genus *Diplogonoporus* and *Diphyllobothrium macroovatum* by isoelectric focusing. Yonago Acta Medica 1988;31:129–38.
- [9] Kino H, Hori W, Kobayashi H, Nakamura N, Nagasawa K. A mass occurrence of human infection with *Diplogonoporus grandis* (Cestoda: Diphyllobothriidae) in Shizuoka Prefecture, central Japan. Parasitology International 2002;51:73–9.
- [10] Tanaka T, Tachibana H, Nagakura K, Kaneda Y, Watanabe K. The fifth case of *diplogonoporiasis grandis* in Kanagawa Prefecture, Japan. Kansenshōgaku Zasshi 1988;62:1197–201 (in Japanese).
- [11] Kamo H. Cestodes. In: Otsuru M, Kamegai S, Hayashi S, editors. Progress of Medical Parasitology in Japan, Vol. 8. Tokyo: Meguro Parasitological Museum Press; 2003. p. 235–43.
- [12] Wilhelm O. Pseudophyllidea (*Diphyllobothrium* y *Diplogonoporus*) en Chile. Boletín de la Sociedad de Biología 1958;33:125–30 (in Spanish).
- [13] Chung DI, Kong HH, Moon CH, Choi DW, Kim TH, Lee DW, Park JJ. The first human case of *Diplogonoporus balaenopterae* (Cestoda: Diphyllobothriidae) infection in Korea. The Korean Journal of Parasitology 1995;33:225–30.
- [14] Clavel A, Bargues MD, Castillo FJ, Rubio MD, Mas-Coma S. Diplogonoporiasis presumably introduced into Spain: first confirmed case of human infection acquired outside the Far East. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1997;57:317–20.
- [15] Mariaux J. A molecular phylogeny of the Eucestoda. The Journal of Parasitology 1998;84:114–24.
- [16] Olson PD, Cairn JN. Evolution of the major lineages of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) inferred from 18S ribosomal DNA and elongation factor-1 alpha. The Journal of Parasitology 1999;85:1134–59.
- [17] Kodedová I, Doležel D, Broučková M, Jirků M, Hypšá V, Lukeš J, Scholz T. On the phylogenetic positions of the Caryophyllidea, Pseudophyllidea and Proteocephalidea (Eucestoda) inferred from 18S rRNA. International Journal for Parasitology 2000;30:1109–13.
- [18] Olson PD, Littlewood DT, Bray RA, Mariaux J. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). Molecular Phylogenetics and Evolution 2001;19:443–67.
- [19] Brabec J, Kuchta R, Scholz T. Paraphyly of the Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Cestoda): circumscription of monophyletic clades based on phylogenetic analysis of ribosomal RNA. International Journal for Parasitology 2006;36:1535–41.
- [20] Waeschenbach A, Webster BL, Bray RA, Littlewood DT. Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 2007;45:311–25.
- [21] Yéra H, Estran C, Delaunay P, Gari-Toussaint M, Dupouy-Camet J, Marty P. Putative *Diphyllobothrium nihonkaiense* acquired from a Pacific salmon (*Oncorhynchus keta*) eaten in France; genomic identification and case report. Parasitology International 2006;55:45–9.
- [22] Logan FJ, Horák A, Štefka J, Aydogdu A, Scholz T. The phylogeny of diphyllobothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. Parasitology Research 2004;94:10–5.
- [23] Štefňáková A, Brabec J, Kuchta R, Jiménez JA, García HH, Scholz T. Is the human-infecting *Diphyllobothrium pacificum* a valid species or just a South American population of the holarctic fish broad tapeworm, *D. latum*? The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2006;75:307–10.
- [24] Arizono N, Fukumoto S, Tademoto S, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Kuramochi T. Diplogonoporiasis in Japan: genetic analyses of five clinical isolates. Parasitology International 2008;57:212–6.

- [25] Nishimura Y, Yamaguchi S, Sahara T, Nakazaki Y, Tsuruta S, Fujimori I, Kino H, Yamasaki H, Nakao M, Ito A, Kuramochi T. Two cases of intestinal cestode infections diagnosed by genetic analysis. *Clinical Parasitology* 2007;18:69–71 (in Japanese).
- [26] Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Sako Y, Ito A. Significance of molecular diagnosis using histopathological specimens in cestode zoonoses. *Tropical Medicine & Health* 2007;35:307–21.
- [27] Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Sako Y, Ito A. Mitochondrial DNA diagnosis for cestode zoonoses: application to formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2007;38(Suppl 1):166–74.
- [28] Bos DH, Posada D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Developmental and Comparative Immunology* 2005;29:211–27.
- [29] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980;16:111–20.
- [30] Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 1982;18:225–39.
- [31] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003;19:1572–4.
- [32] Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 2007;134:713–22.
- [33] Le TH, Pearson MS, Blair D, Dai N, Zhang LH, McManus DP. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends in Parasitology* 2002;18:206–13.
- [34] Nakao M, Abmed D, Yamasaki H, Ito A. Mitochondrial genomes of the human broad tapeworms *Diphyllobothrium latum* and *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Parasitology Research* 2007;101:233–6.
- [35] Nakao M, Sako Y, Ito A. The mitochondrial genome of the tapeworm *Taenia solium*: a finding of the abbreviated stop codon U. *The Journal of Parasitology* 2003;89:633–5.
- [36] Park JK, Kim KH, Kang S, Jeon HK, Kim JH, Littlewood DT, Eom KS. Characterization of the mitochondrial genome of *Diphyllobothrium latum* (Cestoda: Pseudophyllidea)—implications for the phylogeny of eucestodes. *Parasitology* 2007;134:749–59.
- [37] Kim KH, Jeon HK, Kang S, Sultana T, Kim GJ, Eom KS, Park JK. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Diphyllbothriidae: Cestoda), and development of molecular markers for differentiating fish tapeworms. *Molecules and Cells* 2007;23:379–90.
- [38] Boore JL, Brown WM. Mitochondrial genomes of *Galathealinum*, *Helobdella*, and *Platyneris*: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Molecular Biology and Evolution* 2000;17:87–106.
- [39] von Nickisch-Rosenegk M, Brown WM, Boore JL. Complete sequence of the mitochondrial genome of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*: gene arrangements indicate that Platyhelminths are Eutrochozoans. *Molecular Biology and Evolution* 2001;18:721–30.
- [40] Hoberg EP, Mariaux J, Justine JL, Brooks DR, Weekes PJ. Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercaromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. *The Journal of Parasitology* 1997;83:1128–47.
- [41] Kuchta R, Scholz T, Brabec J, Bray RA. Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *International Journal for Parasitology* 2008;38:49–55.
- [42] Scholz T, Garcia HH, Kuchta R, Wicht B. Update on the human broad tapeworm (Genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* 2009;22:146–60.
- [43] Arizono N, Shedko M, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Takeda K, Hashimoto K. Mitochondrial DNA divergence in populations of the tapeworm *Diphyllobothrium nihonkaiense* and its phylogenetic relationship with *Diphyllobothrium klebanovskii*. *Parasitology International* 2009;58:22–8.
- [44] Hirai K. Variations in the morphology of *Diplogonoporus balaenopterae* Lönnberg, 1982 with special reference to the specimens from Antarctic sei whale. *The Journal of the Yonago Medical Association* 1971;22:46–59 (in Japanese with English summary).
- [45] Hiraga M. Morphological and taxonomical study on dwarf form of diplogonadic cestode found from Minke whale. *The Journal of the Yonago Medical Association* 1982;33:240–60 (in Japanese with English summary).
- [46] Yamane Y, Kamo H, Yazaki S, Fukumoto S, Maejima J. On a new marine species of the genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Pseudophyllidea) found from a man in Japan. *Japanese Journal of Parasitology* 1981;30:101–11.
- [47] Luo HY, Nie P, Yao WJ, Wang GT, Gao Q. Is the genus *Digramma* synonymous to the genus *Ligula* (Cestoda: Pseudophyllidea)? *Parasitology Research* 2003;89:419–21.
- [48] Kamo H, Maejima J, Hatsushika R. First record of *Diphyllobothrium macroovatum* Jurachno, 1973 from Minke whale, *Balaenoptera acutorostrata* Lacépède, 1804 (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Japanese Journal of Parasitology* 1980;29:499–505 (in Japanese with English summary).

—面白い寄生虫の臨床 (Ⅱ)—

日本獣医臨床寄生虫学研究会編

輸入寄生虫病 —マラリアと人獣共通寄生虫症を中心に考える—

大前比呂思[†] (国立感染症研究所寄生動物部第3室長)

1 はじめに

一寄生虫症をめぐる法的変遷
と輸入感染症の位置づけ—

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、「感染症法」という。)は、従来の「伝染病予防法」「性病予防法」「エイズ予防法」の3つを統合して1998年に制定され、2007年には「結核予防法」も統合された。その間、SARS(重症急性呼吸器症候群)や新型インフルエンザといった地球規模の新興・再興感染症が問題となり、人権尊重を原則としつつ、緊急時における対策の強化としては、感染者に対する隔離といった措置も可能となる改正がなされた。また、SARSや鳥インフルエンザ以外でも、ウエストナイル熱、狂犬病といった人と動物の共通感染症(人獣共通感染症、動物由来感染症)の侵入と拡大を防止するため、医師のみならず動物の診療等に従事する獣医師にも、届出義務が新たに追加された。獣医師の届出対象となる罹患動物としては、SARSや出血熱といった重篤なウイルス性疾患を想定したサルやプレーリードック、ハクビシン、タヌキなどのほか、鳥インフルエンザやウエストナイル熱で「鳥類に属する動物」、エキノコックス症で「犬」が追加されるに至っている。

寄生虫症対策の指針だった寄生虫病予防法(1931年制定)は、国内感染状況の変化を背景に、感染症法の制定前の1994年に廃止された。寄生虫予防法で主に対象とされたのは、回虫、鉤虫、住血吸虫、肝吸虫であったが、感染症法で、人症例の届出が義務づけられている寄生虫症は、マラリアとエキノコックス症(以上、第4類)、赤痢アメーバ、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症(以上、第5類)である。対策の重点とされる寄生虫症がこの間大きく変わったことがよくわかるが、回虫や鉤虫が宿主特異性の強い寄生蠕虫で、専ら人の感染

症としてのみ問題となっていたのに対し、感染症法での届出対象寄生虫症は、全て人獣共通感染症と言ってよい。

このうち、マラリアは、2003年の検疫法改正で、検疫感染症としても位置づけられた。従来、代表的な検疫感染症としては、国際衛生規則(1951年)で定められたペスト・コレラ・黄熱病をあげるのが常であったが、前述の感染症法の制定(1998年)にあわせ、まずペスト以外の第1類感染症(エボラ出血熱、マールブルク熱、ラッサ熱など)が追加された。さらに、SARSの発生と拡大(2003年)の後には、鳥インフルエンザや新たに指定された第1類感染症(SARS、痘そう)、と並んで、第4類感染症からマラリア・デング熱が追加されるに至った。日本国内でも *Vibrio* 属細菌の常在が確認されるコレラや、日本国内にベクターが生息していない黄熱病が検疫対象からぬけ、日本国内にベクターが生息しているデング熱やマラリアが検疫対象となったのは、一貫した考えに基づく理にかなった改正と言える。チクングニア熱ウイルスのベクターは、デング熱ウイルスと共通の種の蚊が多いが、ウイルスの伝播効率が非常に高いこともあって、年間の患者報告数が10例にみえない段階で、2011年に速やかに4類感染症に分類されるとともに、検疫対象感染症にもなった。一方、人獣共通寄生虫症の中には、感染症法での指定を受けていなくとも、第1類感染症に匹敵するような致死率を有するものや、感染動物の移入が、ベクターを介した国内での新興・再興感染症のリスクに直結するものもある。

2 問題となる輸入寄生虫病

一人獣共通寄生虫症(動物由来寄生虫症)を中心に—

ある感染症が、実際に日本国内で新興・再興感染症となる可能性については、生態・環境変化以外にも多くのファクターが関わり、病原体の種ごとに別々に考えねばならない。以下に代表的なものを列挙し、最近の動向を示したい。

[†] 連絡責任者：大前比呂思 (国立感染症研究所寄生動物部第3室)

〒162-8640 新宿区戸山1-23-1 ☎00-000-0000 FAX 00-000-0000 E-mail: h-ohmae@nih.go.jp

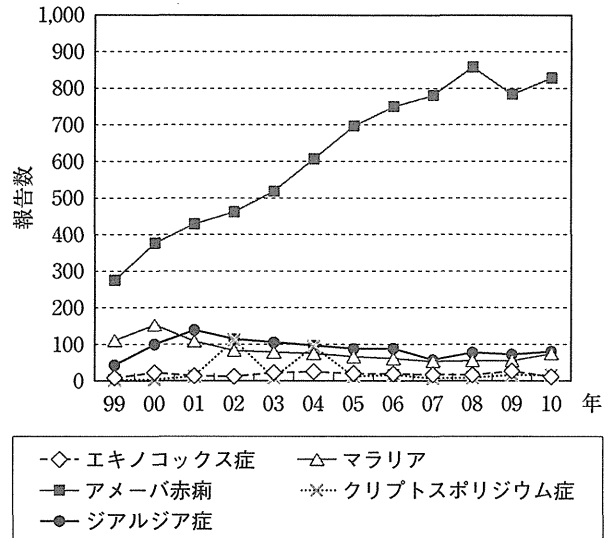
(1) マラリア

人に寄生するマラリア原虫としては、従来熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum*、四日熱マラリア原虫 *P. malariae*、三日熱マラリア原虫 *P. vivax*、卵型マラリア原虫 *P. ovale* の4種が知られ、サルに寄生するマラリア原虫のうち何種類かは特殊な環境下で人にも寄生するものの、公衆衛生的な問題は起こさないとされてきた [1]。日本での輸入感染症としてのマラリアを考えると、報告数は2000年までは増加傾向を示したが、2000年の年間154例をピークとした後は減少傾向を示し、最近では50～60例と横ばいである (図1)。その理由としては、マラリア対策の強化により世界的にマラリア患者数が減少していることもあげられる。特に、日本からの渡航者が多いアジア、オセアニア (南太平洋地域) では、近年マラリア対策が進展し、罹病率や死亡率が減少するとともに、流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアへとシフトした [2]。しかし、アジア地域では朝鮮半島や中国の一部で、温帯地方における再興感染症として三日熱マラリアが流行するとともに、東南アジアでは新興感染症として、*P. knowlesi* 感染が問題となっている。

P. knowlesi は、従来、マカク属のサルに感染するマラリア原虫として知られていたが、人での感染例も集団でみられるなど、従来のサル由来のマラリア原虫での人感染例とは異なった様相を示し、東南アジア諸国では第5の人マラリアとして脅威となっている [3]。*P. knowlesi* は、マカク属サルに寄生するマラリア原虫だが、24～28時間という早い赤血球内増殖期間もあって、原虫密度が高くなって重症化し、致死的となることもある。複数の抗マラリア薬を投与したのにも関わらず死亡した例では、薬剤耐性よりも、急速な経過が主因の可能性が高い。また、日本国内でも旅行者で発症例が報告されており、今後も輸入感染症として問題となる可能性がある。ただし、ベクターとなるハマダラカを介しての人から人への感染は、まだ確認されておらず、サル→蚊→ヒトでの濃厚接触がみられる地域でないと、クラスターでの人感染例はないと思われる。また、媒介蚊は、東南アジアの森林に生息する *Leucosphyrus* グループのハマダラカに限られ、日本国内に生息するハマダラカには伝播能力はない。

(2) 肉胞子虫

馬肉の生食に起因すると思われる食中毒の病原体として、近年、肉胞子虫類の *Sarcocystis fayeri* が注目されている。平成14年頃から、生食後5時間程度で、一過性の下痢と嘔吐を示すが (24時間以内にはほぼ消失)、原因食品がわからない例が、報告されるようになり、食中毒にならない有症苦情例が増加する傾向を示した。原因の究明が進められた結果、平成23年4月25日、厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会、食中毒・乳



届出対象寄生虫症は、全て人獣共通感染症と言ってよい。アメーバ赤痢が最も多い。マラリアは年間100例前後で推移していきだが、やや減少傾向にある。クリプトスポリジウム症は、水系集団感染があった年には多くなる。

図1 感染症法対象の寄生虫疾患年次報告数の推移

働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会、食中毒・乳肉水産食品合同部会において、*Kudoa septempunctata* と *S. fayeri* が食中毒病因物質と認定された。さらに、厚生労働省通知 (6月17日付け) として、ヒラメ (*K. septempunctata*) 及び馬肉 (*S. fayeri*) の摂取に関連する食中毒リスク低減を図るため、生食用には-20℃での冷凍処理 (4時間以上一クドア, 48時間以上一ザルコシスチス) を義務づけるに至った [4]。

馬肉生食によるザルコシスチス食中毒が、なぜこの時期に問題になったかについては、色々な理由が考えられるが、原料となる馬肉の生産地の変化も可能性の一つとして考えることができる。寄生例は、国産馬肉検体に比べて、輸入馬肉検体で多く確認されているが、ザルコシスチス食中毒が問題となり始めた頃に、日本に食肉を目的として輸入される馬の原産国は、大きく変化している (図2)。

(3) 住血吸虫症とエキノコックス症

日本住血吸虫症は、1977年以降、国内感染例は報告されていないが、ベクターであるミヤイリガイ *Oncomelania hupensis nosophora* は、未だ甲府盆地や千葉県の小櫃川流域に生息している (図3)。フィリピンや中国で得られる日本住血吸虫の株は、日本のベクター *O. h. nosophora* にも感染性を有している [5]。また、日本住血吸虫は、人に感染する住血吸虫の中では、一番保有宿主となる動物の数が多く、馬や牛、豚や犬・猫にとどまらず、ウサギやネズミなど多くの哺乳類が終宿主になる。食肉用の家畜動物や実験動物だけではなく、ペットとして輸入される動物による日本国内への持ち込み

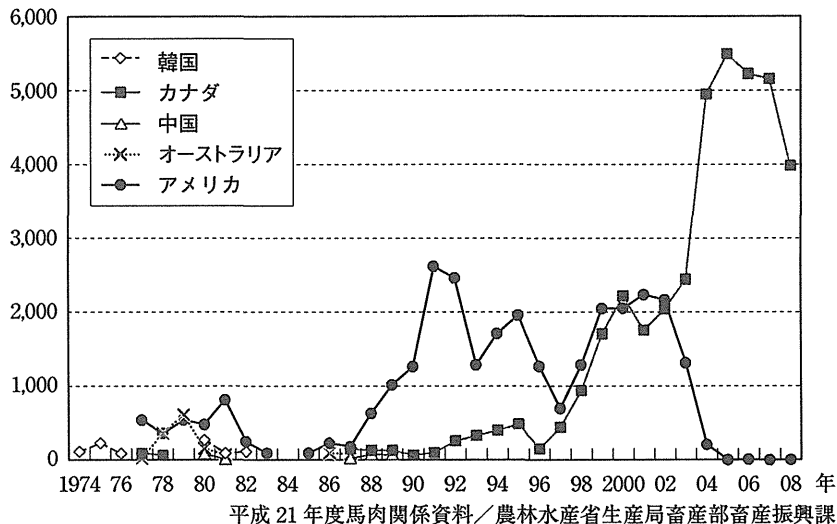


図2 食肉を目的とした馬の輸入頭数と原産国の推移

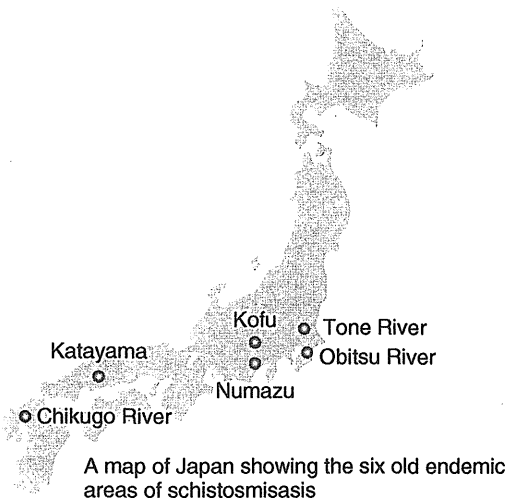


図3 日本国内における日本住血吸虫症の旧流行地と現在の媒介貝生息状況

	最後の虫卵陽性者の確認	媒介貝の生息確認
筑後川流域 (福岡・佐賀県)	1975	1983
片山地方 (広島県)	1967	1973
甲府盆地 (山梨県)	1977	現存 (1,300ha)
沼津地方 (静岡県)	1962	1961
小櫃川流域 (千葉県)	不詳	現存 (10ha)
利根川流域 (千葉・茨城県)	1973	1973

可能性も否定することはできない。

エキノコックス症では、単包条虫または多包条虫の幼虫感染が問題となる。キタキツネと同様、犬が感染したエゾヤチネズミを捕食すると、約1カ月後小腸内で成虫になり、感染源となり得るので、前述のように獣医師による届出も必要とされるようになった。最近、好適宿主ではない馬でも幼虫寄生が問題となることが報告された[6]。馬での多包条虫の幼虫寄生で生じる病変は、病理組織学的には肝砂粒症で、「表面に境界明瞭な粟粒大で、球形の硬い白色結節が散発している。結節は断面にも散在性に認められた。馬円虫や無歯円虫の幼虫による病変、過去においては日本住血吸虫の寄生でこのような病変が生じた。」(食肉・食鳥衛生検査マクロ病理学カラーアトラス 165頁 一全国食肉衛生検査所協議会編— 1997)とされる。日本住血吸虫症の軽症例(人)や非好適終宿主での病変でみられる病理組織所見で、超音波検査やX線検査などの画像検査での所見も類似すると思われる。エ

キノコックス症では、従来から犬の国内移動に伴う感染拡大のリスクが指摘されてきた。輸入寄生虫症ではないが、今後は、国内での動物の移動に伴うエキノコックス症の感染拡大について、従来とは異なった視点からの注意が必要とされるかもしれない。

(4) アライグマ回虫

米国においては1981年の初発例以来、アライグマ回虫 *Baylisascaris procyonis* の感染を原因とする重症脳障害患者が少なくとも10例以上確認され、そのために少なくとも5人が死亡している(表1)。日本国内での、人感染事例は、幸い現在まで報告されていない。しかしながら、動物園及び観光施設で飼育されているアライグマには本虫の寄生が見つかっており、東日本の観光施設では、2000年にウサギの群れで、アライグマ回虫による脳幼虫移行症が、クラスターとして確認された。アライグマが検疫対象となった2000年以降、日本国内への輸入は事実上困難になったが、1977年のアライグマを

表1 アライグマ回虫による人体幼虫移行症（米国での主な報告例）

年齢	性別	患者居住地	診断	転帰	診断根拠	年次
10カ月	男	ペンシルバニア	脳炎	死亡	虫体(剖検)	1980
18カ月	男	イリノイ	脳炎	死亡	虫体(剖検)	1984
13カ月	男	ニューヨーク	脳炎	失明・発育不全・麻痺	血清	1990
13カ月	男	カリフォルニア	脳炎(網膜炎)	後遺症・発育不全	虫体(生検)	1993
29歳	男	カリフォルニア	網膜炎	治癒	虫体(検眼)	1993
13カ月	男	ミネソタ	脳炎	死亡	血清	1996
19カ月	男	ミネソタ	脳炎	死亡	血清	1997
11カ月	男	カリフォルニア	脳炎	後遺症・発育不全	血清	1998
2.5歳	男	イリノイ	脳炎	後遺症	血清	2000
17歳	男	カリフォルニア	脳炎	死亡	虫体(生検)	2000
11カ月	男	カリフォルニア	脳炎	後遺症・失明・癩癩	血清	2002

(Baylisascariasis. Gavin PJ, Kazacos KR, Shulman ST, Clin Microbiol Rev, 18 (4) : 703-18 (2005) ほか)

主人公としたテレビアニメ放映によるブーム以来、多くのアライグマが輸入され、それに伴いアライグマ回虫も日本国内に流入したと推測される [7-9].

日本国内の諸施設や一般家庭で飼育されたアライグマは現在までに総計2万頭を越えると思計されるが、その一部が飼育しきれずに逃亡や遺棄されたため、野外で定着・繁殖している現状が問題視されている。今までの調査では、これらの「野生アライグマ」からはアライグマ回虫の寄生例は確認されていないが、調査自体が散発的なものにとどまり、組織的調査やモニタリングは、必要性が叫ばれながらも実現されない。また、2011年には、伴侶動物のキンカジュー（アライグマ科）で、アライグマ回虫感染が疑われたが、*Baylisascaris* 属線虫の帰属については議論があり、キンカジューで検出される回虫とアライグマから検出される回虫についても、異同ははっきりしない。ところで、アライグマ回虫の人での幼虫移行症の致死率は、一類感染症に分類されるウイルス性出血熱とほぼ同じ水準で（表2）、非常に重篤な感染症と言ってよいが、人-人感染が問題となることはないためか、感染症法や検疫法では、全くとりあげられていない。

3 検疫による動物由来感染症防御の考え方

現在、動物検疫については、感染症法や検疫法以外に、家畜伝染病予防法や狂犬病予防法、水産資源保護法

表2 主な一類感染症とアライグマ回虫幼虫移行症の比較

	報告数 流行地 (年次)	輸入感染者・ 報告数 先進国 (年次)	報告数・ 日本 (年次)	致死率 (%)
エボラ出血熱	1,617 アフリカ中央部 (1976~2002)	なし	なし	50~80
マールブルク熱	500以上 アフリカ中東南部 (1975~2005)	38 ドイツなど (1967~2008)	なし	30~70
ラッサ熱	20~30万人? アフリカ西部 (1969~)	23+ ドイツ, 米国等 (1969~)	1 (1987)	1~2
クリミア・コンゴ出血熱	数十名 アフリカ, 中央アジア等	不明	なし	15~40
アライグマ回虫脳炎	不明 米国, ヨーロッパ諸国以外	20+ 米国, カナダ, ドイツ (1980~2012)	なし	50程度

アライグマ回虫 *Baylisascaris procyonis* による脳炎では、致死率は50%近く、重篤な後遺症なく治癒することはほとんどない。

(感染症の話 エボラ出血熱 佐多徹太郎 2002年第32週号, ラッサ熱 倉田 毅 2002年第35週号, マールブルク熱 倉田 毅 2002年第36週号, クリミアコンゴ出血熱 倉田 毅 2002年第31週号, IDWR 国立感染症研究所 ほか)

表3 主な検疫対象動物の係留期間

動物種類	係留期間	輸入	輸出
偶蹄類の動物		15日	7日
馬		10日	5日
鶏, ウズラ, ダチョウ, 七面鳥, かも目の鳥類		10日	2日
初生ひな		14日	2日
上記以外		1日	1日

による検疫が行われているが、準拠する法律で、主たる検疫目的は異なっている。現在の検疫検査システムでは、狂犬病やウイルス性出血熱など特定の病原体検査を除くと、係留期間内に発症しないことの確認が、生体の動物検疫の中で、大きな役割を占めていると思われる。しかし、人でも他の動物でも、発症までの期間が月単位のことが多い寄生虫症の場合、定められた係留期間内に明らかな病状を示す可能性は高くない（表3）。

検疫の基本は、国外・地域外からの危険な感染症の侵入・蔓延の防止という社会防衛の考え方に立っている。マラリア以外にも、国内発生がなく（あるいはほとんどなく）、国内にベクターや保有動物が生息している寄生虫症は複数ある。現在、獣医師に届出義務のある主な感

染症罹患動物は、サル（エボラ出血熱、マールブルク熱、細菌性赤痢、結核）、イヌ（エキノコックス症）、プレーリードック（ペスト）、鳥類（鳥インフルエンザ-H5N1、ウエストナイル熱）、ハクビシンやタヌキなど（SARS）である。また、「動物展示施設における共通感染症対策ガイドライン（2003）」では、オウム病クラミジア、アライグマ回虫、ウエストナイル熱ウイルス等に、注意が払われている。個々の感染症で、各々実際にあった防疫を考える場合は、症状の強さや致死率、感染力の違いや想定されるリスクなど、総合的に考えていかねばならない。人獣共通感染症については、人・動物の両面から検疫対象疾患が議論されてきたが、寄生虫感染症については、ウイルスや細菌に比して、十分な検討がなされてこなかった印象を受ける。今後、代表的な家畜・伴侶動物によって輸入される可能性がある寄生虫症について、情報を収集・共有しながら、防疫を具体化していく必要があると思われる。

参 考 文 献

- [1] 大友弘士：人獣共通感染症としての猿マラリア、本邦における人獣共通感染症，104-115，文光堂，東京（1989）
- [2] 大前比呂思，他：検疫感染症としてのマラリアをどう捉えるか，臨床寄生虫学会誌，17，127-130（2006）
- [3] 川合 覚：人獣共通感染症・サルマラリアに関する最近の知見，モダン・メディア，56，136-145（2010）
- [4] 山崎 浩，他：食肉・野生動物の生食と寄生虫症，公衆衛生，76，64-73（2012）
- [5] 大前比呂思，他：輸入感染症としての日本住血吸虫症をどう捉えるか，臨床寄生虫学会誌，13，148-150（2002）
- [6] 国立感染症研究所：山形県でと畜された軽種馬の肝臓から高率に検出されたエキノコックス（多包虫），IASR，31，210-212（2010）
- [7] 川中正憲，他：アライグマ回虫による幼虫移行症，感染症の話，IDWR，第42週号，国立感染症研究所（2002）
- [8] 杉山 広，他：幼虫移行症としてのアライグマ回虫，獣医寄生虫学会誌，2，13-19（2002）
- [9] 佐藤 宏：人獣共通感染症としての回虫症，モダン・メディア，51，177-186（2005）

講座

食品による寄生動物感染症①

食品媒介寄生虫感染症
—総論・旅行医学における本症—

大前 比呂思

〈掲載予定内容、所属・著者、掲載巻号〉

1. 食品媒介寄生虫感染症
(寄生虫学的総論・旅行医学の中での本症)
国立感染症研究所 大前比呂思 (40-10)
2. 食品媒介寄生虫食中毒の実態と対策—行政の立場から—
厚生労働省 温泉川肇彦 (40-10)
3. 原虫感染症(1)ザルコシスティス・クドア
国立感染症研究所 八木田健司
4. 原虫感染症(2)クリプトスポリジウム・ジアルジア
国立感染症研究所 泉山信司
5. 原虫感染症(3)トキソプラズマ
国立感染症研究所 永宗喜三郎
6. 蠕虫感染症(1)横川吸虫・肝吸虫
国立感染症研究所 森嶋康之
7. 蠕虫感染症(2)肺吸虫 国立感染症研究所 杉山 広
8. 蠕虫感染症(3)条虫 国立感染症研究所 山崎 浩
9. 蠕虫感染症(4)アニサキス
麻布大学 川上 泰・国立感染症研究所 梅原梓里
10. 蠕虫感染症(5)トキソカラ (犬回虫・猫回虫)
麻布大学 平 健介
11. 蠕虫感染症(6)顎口虫 宮崎大学 野中成晃
12. 蠕虫感染症(7)旋毛虫 国立感染症研究所 川中正憲

はじめに

日本国内でも、かつて回虫や鉤虫といった消化管の寄生蠕虫症が全国的に蔓延していた。また、地域によっては、住血吸虫や肝吸虫、肺吸虫やフィラリアなどの寄生虫症も多く見られた。現在、日本国内での日常診療の場で、これらの寄生虫症にふれることは少なくなったが、熱帯・亜熱帯の途上国では、未だに大きな公衆衛生上の問題である。近年、これらの寄生虫症は、感染者数が多いものの種々の理由から対策が遅れがちだった一連の感染症、Neglected Tropical Disease (NTDs) として、世界保健機構 (WHO) を中心に国際機関の注目を集めており、昆虫媒介性のリンパ系フィラリア症は、2020年までの世界的な制圧を目指している。しかし、回虫や鞭虫、赤痢アメーバやジアルジアといった、飲料水や食物から容易に感染する消化管の寄生虫は、世界的にみると現在も、全体で何十億という感染者がいると推定されている¹⁾。

1. 寄生虫とは

寄生虫とは、宿主と言われる他の生物に寄生し栄養を受ける生物のうち、動物に分類されるものを総称する言葉で、寄生動物と言われることもある。寄生部位によって、体表面に寄生するものを外部寄生虫、体内に寄生するものを内部寄生虫と

分類するが、一般に寄生虫と言った場合は、主に内部寄生虫のことを指す。寄生虫は、多くの動物種にまたがっているが、厳密な生物学的分類による各寄生虫種の帰属については、曖昧な点や異論も多く、医学的な観点からみるとあまり実用的な意味はない。慣用的には、そのライフサイクル（生活環、生活史）の中で、他の動物への寄生生活の時期を持つ原生動物を原虫 protozoa と総称し、多細胞の後正動物を蠕虫 helminths と総称する。原虫は、無性生殖しか行わない根足虫類や鞭毛虫類、有性生殖も行う孢子虫類などに大別される。また、蠕虫は、袋形動物に属して雌雄異体の線虫 nematodes と、扁平動物に属し原則として雌雄同体の吸虫 trematodes、条虫 cestodes などに大別される。このように、寄生虫と総称される動物は、赤血球に寄生し体長1~2 μm のマラリア原虫から、消化管に寄生し体調10m 近くにも及ぶ広節裂頭条虫まで、実に多彩な動物種の集合体である。

寄生生活に適応すると、多くの種では、自由生活に必要な器官を失っていく。消化管の蠕動運動に発達した筋層で対抗する回虫のような例を除き、運動器官は退化していくのが一般的である。消化器官は、退化もしくは独自の発達を示し、吸虫では盲管に終わり、条虫では固有の消化器官を欠くものの上皮全体から栄養分を吸収できるようになっている。生殖器官についてはよく発達していることが多い。

寄生虫の宿主となる動物も多岐にわたるが、次世代につながるように原虫が無性・有性生殖を行い、蠕虫の成虫が寄生する宿主を終宿主 Final host と呼ぶ。また、有性生殖のステージを持つ原虫も無性生殖のみを行い、蠕虫の幼虫が寄生して体内で増殖する宿主は、中間宿主 Intermediate host である。一般的には、終宿主内では寄生生活としての適応がうまく進み、寄生虫は宿主に病害性を示しながらも、長期間にわたって共生を続ける場合が多い。一方、中間宿主は、変異・増殖の場として、寄生虫が利用している動物と位置づけることもでき、宿主の生命を脅かすような病害性を示すことも稀ではない。また、生活環の中で不可欠な中間宿主ではないが、寄生虫が侵入

後も変異せずに、生存可能な宿主を待機宿主と呼ぶ。ヒトの位置づけについては、寄生虫の種によって異なっており、終宿主として位置づけられるものもあれば、中間宿主や待機宿主として位置づけられる場合もある。終宿主となり得る動物種の数は、寄生虫の種によって異なり、総じて吸虫や条虫では多い。

大半の寄生虫では、その生活環の中に他の動物も関係しており、人獣共通感染症（動物由来感染症）zoonosis の病原体となるものも多い。ヒトが終宿主となる場合、ヒト以外の終宿主動物を保虫宿主 Reservoir host と呼ぶ。病害性は、寄生部位によっても様々だが、ヒトを本来の固有宿主としない蠕虫の幼虫が感染すると、成虫になることができず体内を移動するうえ、有鉤囊虫症やエキノコックス症のように、種によっては無性生殖を繰り返し、たいへん重篤な症状を引き起こすことがある（幼虫移行症 Larva migrans）。また、通常は無害で不顕性感染している寄生虫が、後天性免疫不全や抗がん剤・免疫抑制剤投与などを契機として、虫体の増殖と病態の顕在化・重症化を起こす場合、日和見感染症 Opportunistic infection と呼ばれる。

2. 食中毒との関連

寄生虫は、寄生生活から寄生生活、自由生活から寄生生活へと、その生活環の中で、生活環境を変えるが、その過程の中で、環境中からヒトへ、ヒトからヒト、他の動物からヒトへと移動することになる。その移動過程は、マラリア原虫のように蚊によって媒介されることもあるが、媒介動物（ベクター vector）の介在なしに直接経口的、経皮的になされることも多い。経口的に感染する寄生虫の感染型が、食物中、或いは、飲料水中に存在する場合、Foodborne disease, Waterborne disease を起こし、食中毒の原因として特定されることになる。寄生虫は、その生活環の中で様々なその姿を変え、同種の寄生虫であっても、ヒトへの感染性を持つ時期は、その生活環の中で限られている。この点、同じように食中毒を起こす他の病原体、ウイルスや細菌とは大きく異なる。

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壤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^{4,5)}。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 クリプトスポリジウム, イソスポーラ
	経口	オーシスト (消化管内で無性・有性生殖後に排出)		
その他	経口	嚢子	ブタなどの肉中	トキソプラズマ トキソプラズマ
	経口	オーシスト	糞口 (猫などの肉食獣)	
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 鉤虫 (経口感染も), 糞線虫
	経皮	幼虫	- 土壌伝播蠕虫に分類	
吸虫 消化器寄生 その他	経口	メタセルカリア	- 淡水魚	横川吸虫, 異形吸虫, 肝吸虫 肺吸虫 住血吸虫
	経口	メタセルカリア	- 甲殻類 (淡水性)	
	経皮	セルカリア		
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 無鉤・有鉤条虫
	経口	嚢尾虫	- ウシ, ブタなど	
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 旋毛虫 顎口虫
	経口	被嚢幼虫	- クマ, ブタ等	
	経口	第 3 期幼虫	- 雷魚, ドジョウ等	
条虫 全身移行	経口	虫卵		エキノコックス マンソン裂頭条虫
	経口	プロセルコイド, プレロセルコイド	- ヘビ, カエル 等	

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ですることによる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 (迷入時)
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	南米トリパノゾーマ, 皮膚リーシュマニア, 有鉤条虫, 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マ, 住血吸虫, 肺吸虫, 糞線虫 (免疫不全), 有鉤条虫, 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、けっ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の量では、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、厚生科研・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症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
スルファドキシシン/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（医療上の必要性と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, 小島荘明：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, 小島荘明：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增多症。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>