

Onchocerca sp. Type A) were included in the comparison. Two other filarial species (*Loxodontofilaria caprini* Uni & Bain, 2006 and *Cercopithifilaria longa* Uni, Bain & Takaoka, 2002) were used as outgroups. The Kimura two-parameter method [29] was used to estimate evolutionary distances from the alignments. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method [30], and the bootstrap probabilities were estimated. The analyses were performed based on 110 sites of the *cox1* using MEGA 5.05 [31].

For Case 2, the excised mass (1 × 1.5 cm) was fixed in 10% buffered formalin for 6 h and embedded in paraffin. To obtain morphological observations, four sections on one glass slide were stained with HE, and four sections on another glass slide underwent periodic acid–Schiff (PAS) staining. In the molecular analysis, 30 sections (5 μm thick) of the worm tissues were obtained from the paraffin block, and the unstained worm tissues (0.11 mm² in 10 sections) were used. The scraped worm tissues were transferred into nine micro-centrifuge tubes. The DNA extraction procedure and PCR amplification using the primer set CO1fF-CO1fR were performed as described above. Template DNA (0.8 μg) was amplified under the following thermal conditions: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 45 cycles at 98°C for 10 s, 42°C for 30 s and 68°C for 30 s. The procedures used to sequence the PCR products and analyse the data were performed as described above. The sequences determined in Cases 1 and 2 were deposited in DDBJ/EMBL/GenBank.

Results

In the longitudinal sections of Case 1, the worm exhibited transverse cuticular ridges, which are typical of female *Onchocerca* species (Table 1 and Figure 1B). Each ridge formed a triangular projection in the longitudinal sections, and the distance between two adjacent ridges was 150–250 μm (arrows in Figure 1B). There were no inner striae in the middle layer of the cuticle (arrowhead in Figure 1B). The cuticle was thick and consisted of four layers. The slightly oblique transverse sections were oval and measured 125–153 × 278–280 μm (Figure 1C). An elevated portion of the cuticle indicated the presence of a ridge (arrow in Figure 1C). The cuticle, hypodermis, lateral chords and polymyarian muscle layer were observed; however, the uterus and intestine were lost during the preparation of the sections. There was no inner cuticular projection on the lateral chord, but irregular waves were observed in the hypodermis. In terms of the host–worm interaction, the worm was surrounded by fibrous tissue, containing macrophages, neutrophils, eosinophils and lymphocytes. In conclusion, the morphological characteristics of the worm were identical or very similar to those of adult females of *O. dewittei japonica* collected from wild boars (Table 1).

The *cox1* sequences (excluding primers) of our specimens were compared with those of 11 species that consisted of *Onchocerca* spp., *Onchocerca* sp. wild boar and *Onchocerca* sp. Type A from GenBank (Table 2). The nucleotide sequence of *cox1* from the causative agent of Case 1 was identical to that of *O. dewittei japonica* from wild boars (Table 2 and Figure 2). Furthermore, in the phylogenetic tree, the causative agent of Case 1 and *O. dewittei japonica* were separated from other congeneric species, with a high bootstrap value (Figure 2). On the basis of the molecular analysis, we confirmed the causative agent of Case 1 to be *O. dewittei japonica*. In Case 2, the transverse sections of the midbody contained the seminal vesicle, intestine and the polymyarian muscle layer (Figure 1D). The seminal vesicle was filled with spermatozooids. We observed small longitudinal ridges (138–152 ridges) on the outer cuticle of the midbody, and the height/width of the ridges was 1/1 μm (arrows in Figure 1E). In the slightly oblique sections, small longitudinal ridges were observed (arrows in Figure 1F). The size and number of the ridges were identical or very similar to those of a male *O. dewittei japonica* (Table 1). Therefore, we identified the causative agent as a male *O. dewittei japonica*.

The nucleotide sequence of *cox1* was compared with that of congeneric species from the GenBank (Table 2). With the exception of one of the 110 sequences, the nucleotide sequences of our specimen from Case 2 were identical to those of *O. dewittei japonica*, confirming that the causative agent was *O. dewittei japonica*. The areas where Cases 1 and 2 were found are indicated on the map of Honshu, Japan (asterisks in Figure 3).

Discussion

We compared the morphological findings of causative agents obtained in the present study with those of congeneric species in Japan. For Case 1, the distance between the adjacent ridges and their triangular shape were very similar to that found in females of *O. dewittei japonica*, while differing from those of other species (Table 1). Furthermore, this specimen did not exhibit the inner striae in the middle layer of the cuticle that are typical for females of *O. gutturosa*, *O. lienalis*, *O. skrjabini*, *O. eberhardi* and *O. cervicalis* (Table 1) [5,21,32–36]. Females of *O. suzukii* lack the transverse ridges and inner striae in the cuticle [19]. We therefore diagnosed the causative agent of Case 1 as a female *O. dewittei japonica*.

To the best of our knowledge, most male *Onchocerca* spp. have no specific characteristics on their cuticle [21,35]. In contrast, males of *O. dewittei japonica* from Japanese wild boars and of *O. dewittei dewittei* Bain, Ramachandran, Petter & Mak, 1977 from Malaysian wild boars (*Sus scrofa jubatus* Miller, 1906) have small longitudinal ridges on the cuticle [20]. In Case 2, the transverse

Table 1 Comparisons of the histological characteristics of a female and male of *Onchocerca dewittei japonica*, obtained from human cases in the current study, with congeneric species from Japan

	<i>Onchocerca dewittei japonica</i> Uni, Bain & Takaoka, 2001	<i>Onchocerca dewittei japonica</i>	<i>Onchocerca dewittei japonica</i>	<i>Onchocerca gutturosa</i> Neumann, 1910	<i>Onchocerca lienalis</i> Stiles, 1892	<i>Onchocerca skrjabini</i> Rukhlyadev, 1964	<i>Onchocerca eberhardi</i> Uni & Bain, 2007	<i>Onchocerca cervicalis</i> Railliet & Henry, 1910	<i>Onchocerca suzukii</i> Yagi, Bain & Shoho, 1994
References	Case 1 in the current study	Case 2 in the current study	[20]	[32]; *[33]; **[34]	[32]; ***[17]	[19]; ****[5]	[21]; ****[5]	[36]; *****[33]	[19]; *****[5]
Host(s)	Human in Hiroshima	Human in Shimane	<i>Sus scrofa leucomystax</i> Temminck, 1842 (Japanese wild boar)	Cattle	Cattle	<i>Cervus nippon</i> Temminck, 1838 (sika deer) and <i>Capricornis crispus</i> (Temminck, 1845) (Japanese serows)	<i>Cervus nippon</i> (sika deer)	Horses	<i>Capricornis crispus</i> (Japanese serows)
Female									
Body width (at midbody)	200-225	NA	180-310	200-300	150-220	340	170-230	320-570	228-430
Distance between two adjacent ridges	150-250	NA	185-290	87-166	60	50-89	25-45	30*****	None
Shape of ridges (H/W) [†] in longitudinal sections	13-18/18-25, Triangular	NA	8-23/23-30, Triangular	10-13/26, Rounded	3/15-23, Small, rounded	6/12****, Small	3/8****, Small, rounded	4/8*****, Small, rounded	None
Number of inner striae between adjacent ridges	None	NA	None	2-4	2	3-4****	2	2*****	None
Thickness of cuticle without ridges	25	NA	10-32	25-35*	10	20-30****	28-32	19*****	15-50*****
Number of muscle cells per quadrant	8-13	NA	8-22	2-7**	5-7***	2-3****	1-2****	-	8-13*****
Male									
Body width (at midbody)	NA	83-85x133-138	130x145	60-100	50-80	105	50-68	140-190	180-212
Thickness of cuticle	NA	5	4	5	2	-	-	-	8-10
Number of small ridges	NA	138-152	130	None	None	None	None	None	None
Small ridges (H/W)	NA	1/1	1/1	None	None	None	None	None	None

Dimensions in micrometres. [†]H/W: height/width. *-*****: cited references.

Table 2 Differences in the nucleotide sequences (110 sites) of the *cox1* gene among *Onchocerca* species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>Onchocerca dewittei japonica</i> (LC008531, Case 1 in the present study)	1	0	0	6	6	7	8	8	8	9	9	10	10	10
2 <i>Onchocerca dewittei japonica</i> (LC008149, Case 2 in the present study)	0.9	1	1	5	5	6	7	7	7	8	8	9	9	9
3 <i>Onchocerca dewittei japonica</i> AB604943, Hiroshima 1	0	0.9	0	6	6	7	8	8	8	9	9	10	10	10
4 <i>Onchocerca dewittei japonica</i> AB518689	0	0.9	0	6	6	7	8	8	8	9	9	10	10	10
5 <i>Onchocerca ochengi</i> AJ271618	5.5	4.5	5.5	5.5	0	3	3	4	8	3	5	8	8	8
6 <i>Onchocerca volvulus</i> AF015193	5.5	4.5	5.5	5.5	0	3	3	4	8	3	5	8	8	8
7 <i>Onchocerca skrjabini</i> AM749269	6.4	5.5	6.4	6.4	2.7	2.7	4	1	7	4	6	7	7	7
8 <i>Onchocerca eberhardi</i> AM749268	7.3	6.4	7.3	7.3	2.7	2.7	3.6	5	10	6	8	11	7	7
9 <i>Onchocerca gibsoni</i> AJ271616	7.3	6.4	7.3	7.3	3.6	3.6	9.1	4.5	7	5	6	8	6	6
10 <i>Onchocerca lupi</i> EF521410	7.3	6.4	7.3	7.3	7.3	7.3	6.4	9.1	6.4	7	7	10	13	13
11 <i>Onchocerca gutturosa</i> AJ271617	8.2	7.3	8.2	8.2	2.7	2.7	3.6	5.5	4.5	6.4	4	7	11	11
12 <i>Onchocerca suzukii</i> AM749275	8.2	7.3	8.2	8.2	4.5	4.5	5.5	7.3	5.5	6.4	3.6	7	10	10
13 <i>Onchocerca</i> sp. Type A AB518876*	9.1	8.2	9.1	9.1	7.3	7.3	6.4	10.0	7.3	9.1	6.4	6.4	11	11
14 <i>Onchocerca</i> sp. wild boar AB518693*	9.1	8.2	9.1	9.1	7.3	7.3	6.4	6.4	5.5	11.8	10.0	9.1	10.0	10.0

Values above the diagonal are the numbers of nucleotide differences, and those below the diagonal are the percentages of nucleotide differences. *See text.

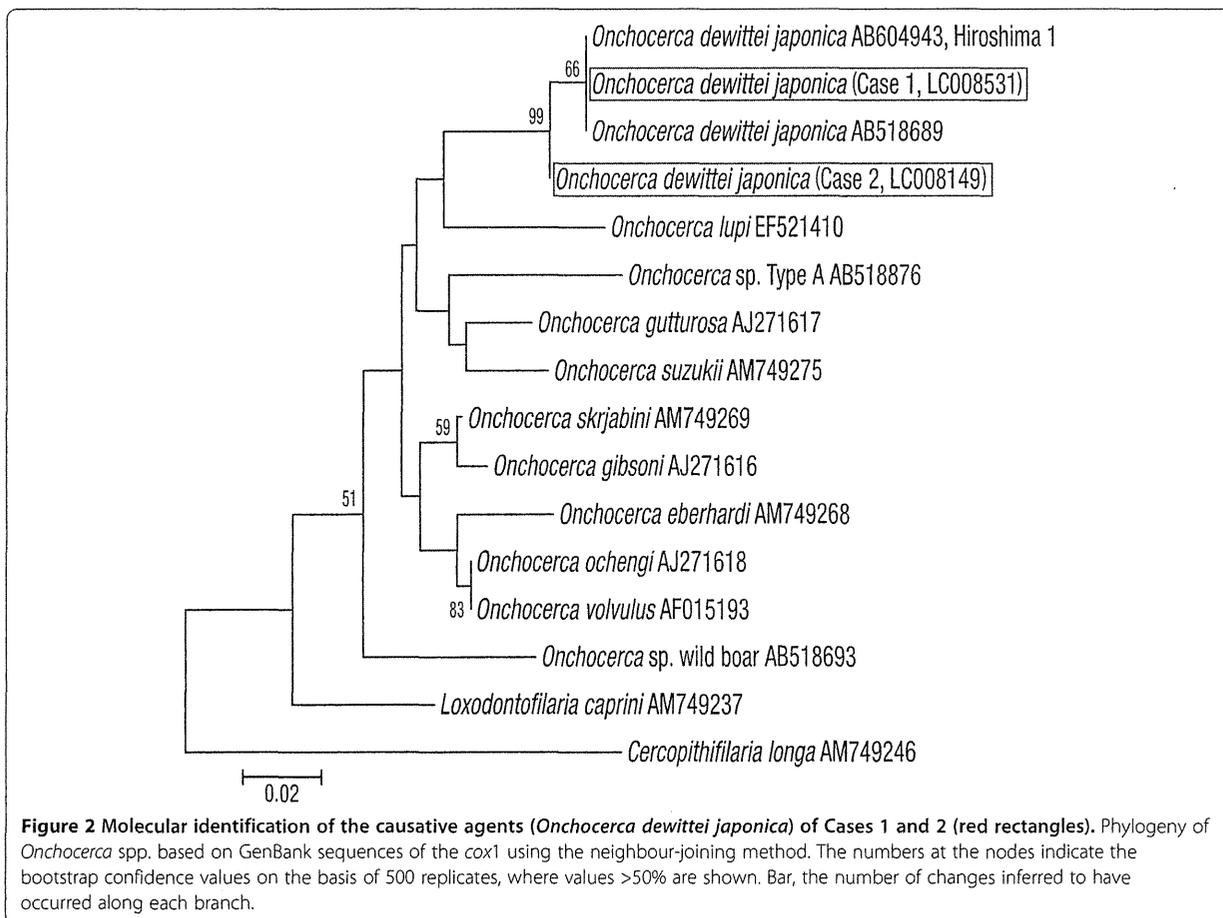
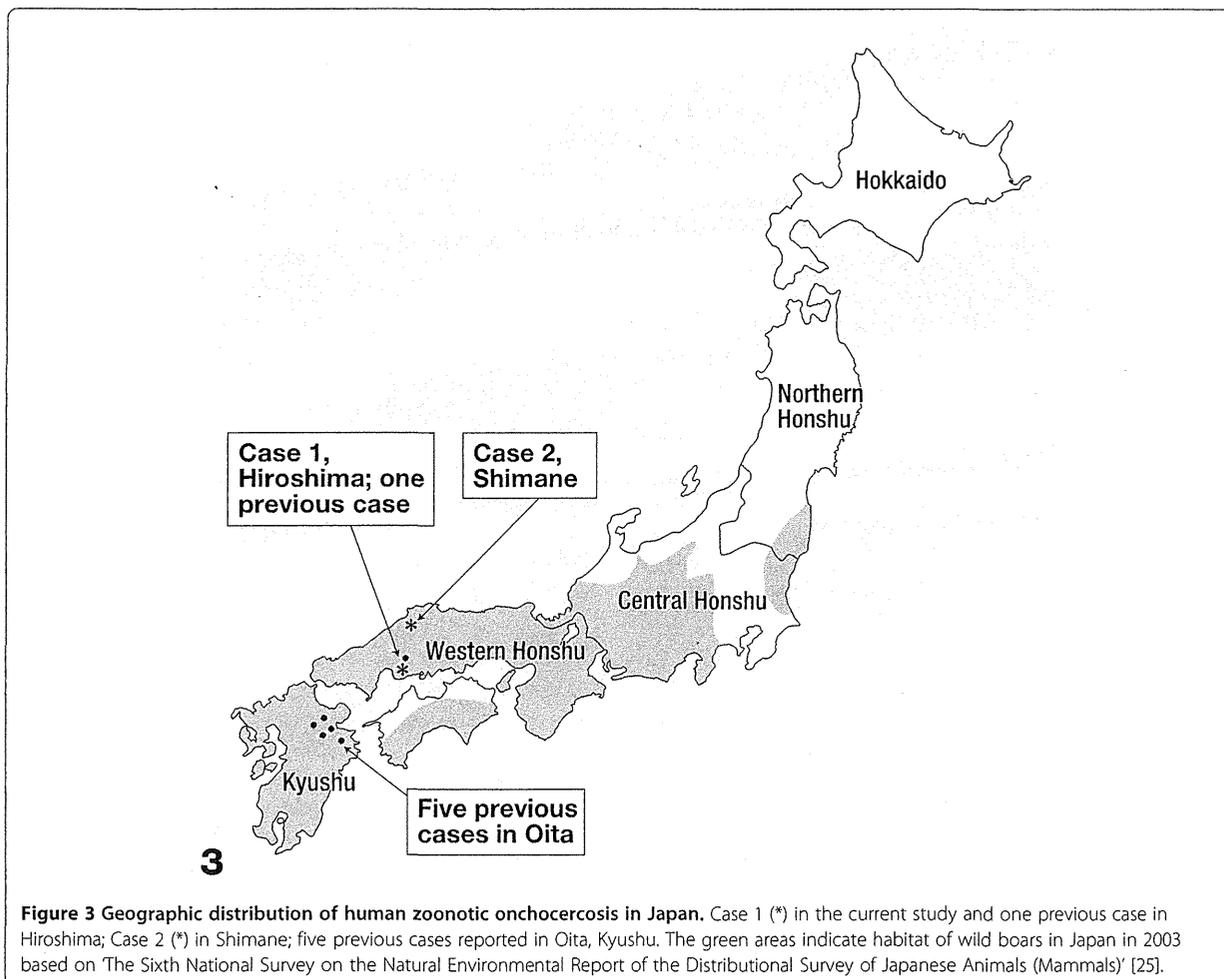


Figure 2 Molecular identification of the causative agents (*Onchocerca dewittei japonica*) of Cases 1 and 2 (red rectangles). Phylogeny of *Onchocerca* spp. based on GenBank sequences of the *cox1* using the neighbour-joining method. The numbers at the nodes indicate the bootstrap confidence values on the basis of 500 replicates, where values >50% are shown. Bar, the number of changes inferred to have occurred along each branch.



sections of the male worm had small ridges on the cuticle, and the number of ridges was similar to that found in a male *O. dewittei japonica* (Table 1). Among the 25 previously reported cases of zoonotic onchocercosis, only one case caused by a male worm has been reported (from Oita in Japan) owing to the worm's morphological characteristics [16].

For Case 1, we verified that the histological sections stained with HE were available for molecular analysis using our primers. Our study indicated the first diagnosis of a male *O. dewittei japonica* confirmed by gene sequencing in Case 2. Moreover, the molecular analysis verified that the causative agents were different from unnamed *Onchocerca* spp. (*Onchocerca* sp. wild boar and *Onchocerca* sp. Type A) found in Kyushu [22-24]. There was only one nucleotide difference between the causative agent of Case 2 and *O. dewittei japonica* obtained from wild boars in the current study (Table 2). According to Ferri et al. [37], the genetic distance between *cox1* from two different species is greater than a threshold value of

4.8%. Therefore, we consider that this difference was intra-specific genetic divergence rather than inter-specific divergence. Furthermore, in the phylogenetic tree, the causative agents of Cases 1 and 2 and *O. dewittei japonica* had a high bootstrap value, which separated them from other congeneric species (Figure 2).

In the current study, Case 1 from Hiroshima and Case 2 from Shimane are the seventh and eighth reported cases of *O. dewittei japonica* infections in Japan, respectively (Figure 3). The causative agent of all six previous cases of zoonotic onchocercosis in Japan was *O. dewittei japonica* [5]. The five previous infections were concentrated in Oita, Kyushu, but another case was reported recently in Hiroshima, the western part of Honshu. Two infections in the current study and one previous case in Hiroshima indicated a new occurrence of the zoonotic onchocercosis in the western part of Honshu.

Regarding vectors of filarial parasites, Fukuda et al. [22-24] verified that the blackfly *S. bidentatum* both anthropophilic and zoophilic was a natural vector of

O. dewittei japonica in Oita, Kyushu. First, they successfully infected blackflies with microfilariae through intrathoracic inoculations and detected third-stage larvae in blackflies. Second, from results of molecular studies, they identified the third-stage larvae of *O. dewittei japonica* in blackflies during field work in Oita. *Simulium bidentatum*, which is predominant in Kyushu, has been found in Honshu, Japan [4]. Therefore, it is speculated that the blackfly species also appears to be a vector of *O. dewittei japonica* in Honshu.

Fossil records and molecular analyses indicated that the ancestral population of wild boars in Southeast Asia expanded to East Asia and migrated to Kyushu Island and Honshu via southern bridges between the Korean Peninsula and Kyushu Island during the middle to late Pleistocene era (500,000–250,000 years ago) [38]. On the other hand, wild boars did not migrate to Hokkaido across northern bridges between Sakhalin and Hokkaido Island [39]. Therefore, wild boars did not naturally inhabit Hokkaido. In northern Honshu, wild boars were widely present during the Jomon period (12,000–2,400 years ago) but became extinct around 1900 owing to the climate change, actions by local government in response to heavy crop damage (1749 in Aomori Prefecture), expansion of rice fields and human habitat, infectious diseases (e.g. classical swine fever) and grey wolves (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) as a natural enemy [40].

Recently, the habitat of wild boars extended 1.3 times its previous size in the western and central Honshu between 1978 and 2003, based on the national survey on the distribution of Japanese mammals (Figure 3) [25]. The number of wild boars in Japan has increased and is estimated to be several hundred thousand. The present expansion of wild boars was related to a decrease in the annual snowfall in Honshu since 1990 [41]. The annual snowfall in western Honshu is less than 70 days with a snow cover that is 30 cm deep, allowing the migration of wild boars for food. This trend of snowfall will continue in the near future owing to global warming [42]. In addition, unused rice fields have increased because the young workforce has migrated away from rural areas to urban areas. Such fields provide favourable areas for wallowing and feeding grounds for wild boars [43]. Likewise, the number of hunters has decreased because of advanced age [44]. Under these natural and social circumstances, wild boars increased their population and expanded their habitats. Wild boars, blackfly vectors and humans share the same habitat in rural areas in Honshu, as well as Kyushu.

Regarding the interaction between the prevalence of parasites in host animals and human infections, the high prevalence of *Thelazia* eyeworms in dogs should be considered as an indicator of infections in the human population [45,46]. Human infections of dirofilariasis have been

reported in areas of high canine prevalence [47]. In northern Spain, the sero-prevalence rates on dirofilariasis in dogs and humans are almost identical: 12% in dogs and 11.6% in humans [48]. The infection rate of wild boars with *O. dewittei japonica* was found to be 78% in the Shimane Prefecture adjoining the Hiroshima Prefecture [5]. In Oita, Kyushu, five previous infections were found between 1989 and 2005. The prevalence of *O. dewittei japonica* in wild boars was 89% [5]. Therefore, the high prevalence of the causative agents in the host animals appears to be an important factor for zoonosis in humans. Consequently, further infections of zoonotic onchocercosis are likely to occur in the western and central parts of Honshu as well as Kyushu, Japan.

In this study, the presence of spermatozooids in the seminal vesicle indicates the maturation of the male *O. dewittei japonica* in humans. Likewise, a female *O. lupi* worm with microfilariae in the uterus was reported in a human case in Arizona [10]. This evidence suggests that these species of *Onchocerca* be able to adapt to humans. Chabaud and Bain [49] proposed that during the evolution of the genus *Onchocerca*, capture event (host-switching) was more important than their zoological affinity for host animals. According to Morales-Hojas [50], animal parasites may adapt to humans as a result of host-switching of parasites by vectors. We speculate that the causative agents of accidental zoonotic onchocercosis adapt to humans and evolve to cause new parasitic diseases in humans in the future.

Conclusions

We identified causative agents in two cases of zoonotic onchocercosis in the western part of Honshu, the main Island of Japan. For Cases 1 and 2, we diagnosed the causative agents as a female and a male *O. dewittei japonica*, respectively, owing to their histopathological characteristics. The identity of the causative agents was confirmed by sequencing the *cox1* gene. The present findings of zoonotic onchocercosis among the residents in Hiroshima and Shimane appear to reflect the high prevalence of *O. dewittei japonica* in wild boars in the western part of Honshu. Zoonotic onchocercosis is spreading throughout the western part of Honshu owing to the expansion of wild boar habitat in the area.

Consent

Written informed consent was obtained from the patients for the publication of this report and any accompanying images.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SU and HT conceived the research and wrote the first draft. SU, RR and MSA performed the morphological study and contributed to the data analysis and interpretation. MF and YO contributed to the molecular analysis of samples. NH, KY, HT, SM, KK, EM, HM, HH and KS collected samples and were responsible for the medical aspects. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We sincerely thank Professor Dr. Rosli Hashim, Deputy Dean of the Faculty of Science, University of Malaya, Malaysia for his academic support and Mr. Takao Kenko, the Central Laboratory, the Graduate School of Medicine, Osaka City University, Japan, for preparing the histological specimens. This research was partly supported by the Ministry of Higher Education of Malaysia (FRGS FP020-2012).

Author details

¹Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia. ²Department of Parasitology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 545-8585, Japan. ³Research Promotion Institute, Oita University, Oita 879-5593, Japan. ⁴Research Center for the Pacific Islands, Kagoshima University, Kagoshima 890-8580, Japan. ⁵Hiramatsu Orthopedic Clinic, Hiroshima 730-0016, Japan. ⁶Hiroshima University Hospital, Hiroshima 734-8551, Japan. ⁷Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Shimane University, Shimane 693-8501, Japan. ⁸Department of Infectious Diseases, Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan. ⁹Department of Biology, Faculty of Medicine, Oita University, Oita 879-5593, Japan. ¹⁰Department of Environmental and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Shimane University, Shimane 693-8501, Japan.

Received: 10 October 2014 Accepted: 12 January 2015

Published online: 27 January 2015

References

- Orihel TC, Eberhard ML. Zoonotic filariasis. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:366–81.
- Otranto D, Eberhard ML. Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasit Vectors.* 2011;4:41.
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol.* 2011;182:14–21.
- Takaoka H, Fukuda M, Otsuka Y, Aoki C, Uni S, Bain O. Blackfly vectors of zoonotic onchocerciasis in Japan. *Med Vet Entomol.* 2012;26:372–8.
- Uni S, Boda T, Daisaku K, Ikura Y, Maruyama H, Hasegawa H, et al. Zoonotic filariasis caused by *Onchocerca dewittei japonica* in a resident of Hiroshima Prefecture, Honshu, Japan. *Parasitol Int.* 2010;59:477–80.
- Fukuda M, Otsuka Y, Uni S, Boda T, Daisaku H, Hasegawa H, et al. Zoonotic onchocerciasis in Hiroshima, Japan, and molecular analysis of a paraffin section of the agent for a reliable identification. *Parasite.* 2011;18:185–8.
- Otranto D, Sakru N, Testini G, Gürlü VP, Yakar K, Lia RP, et al. Case report: first evidence of human zoonotic infection by *Onchocerca lupi* (Spirurida, Onchocercidae). *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:55–8.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Cebeci Z, Yeniad B, Buyukbabani N, Boral OB, et al. Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*. *Parasit Vectors.* 2012;5:84.
- Eberhard ML, Sims AC, Bishop HS, Mathison BA, Hoffman RS. Ocular zoonotic *Onchocerca* infection in a resident of Oregon. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:1073–5.
- Eberhard ML, Ostovar GA, Chundu K, Bohohm D, Feiz-Erfan I, Mathison BA, et al. Zoonotic *Onchocerca lupi* infection in a 22-month-old child in Arizona: first report in the United States and a review of the literature. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88:601–5.
- Ilhan HD, Yaman A, Morishima Y, Sugiyama H, Muto M, Yamasaki H, et al. *Onchocerca lupi* infection in Turkey: a unique case of a rare human parasite. *Acta Parasitol.* 2013;58:384–8.
- Biswas A, Yassin MH. An unexpected cause of eye irritation: a case of zoonotic ocular onchocerciasis. *Case Rep Infect Dis.* 2013. doi:10.1155/2013/504749.
- Lai JH, Walsh NMG, Pritt BS, Sloan L, Gibson LE, Desormeau L, et al. Cutaneous manifestations of a zoonotic *Onchocerca* species in an adult male acquired in Nova Scotia: report of a case and review of the literature. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1968–70.
- Mowlavi G, Farzod F, Kheirkhah A, Mobeidi I, Bowman DD, Naddaf SR. Human ocular onchocerciasis caused by *Onchocerca lupi* (Spirurida, Onchocercidae) in Iran. *J Helminthol.* 2014;88:250–5.
- Beaver PC, Horner GS, Bilos JZ. Zoonotic onchocercosis in a resident of Illinois and observations on the identification of *Onchocerca* species. *Am J Trop Med Hyg.* 1974;23:595–607.
- Takaoka H, Bain O, Uni S, Korenaga M, Tada K, Ichikawa H, et al. Human infection with *Onchocerca dewittei japonica*, a parasite from wild boar in Oita, Japan. *Parasite.* 2001;8:261–3.
- Takaoka H, Bain O, Uni S, Korenaga M, Kozek WJ, Shirasaka C, et al. Zoonotic onchocerciasis caused by a parasite from wild boar in Oita, Japan. A comprehensive analysis of morphological characteristics of the worms for its diagnosis. *Parasite.* 2004;11:285–92.
- Koehsler M, Soleiman A, Aspöck H, Auer H, Walochnik J. *Onchocerca jakutensis* filariasis in humans. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1749–52.
- Yagi K, Bain O, Shoho C. *Onchocerca suzukii* n. sp. and *O. skrjabini* (= *O. tarsicola*) from a relict bovid, *Capricornis crispus*, in Japan. *Parasite.* 1994;1:349–56.
- Uni S, Bain O, Takaoka H, Miyashita M, Suzuki Y. *Onchocerca dewittei japonica* n. subsp., a common parasite from wild boar in Kyushu Island, Japan. *Parasite.* 2001;8:215–22.
- Uni S, Bain O, Agatsuma T, Harada M, Torii H, Fukuda M, et al. *Onchocerca eberhardi* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from sika deer in Japan: relationships between species parasitic in cervids and bovids in the Holarctic region. *Parasite.* 2007;14:199–211.
- Fukuda M, Takaoka H, Uni S, Bain O. Infective larvae of five *Onchocerca* species from experimentally infected *Simulium* species in an area of zoonotic onchocerciasis in Japan. *Parasite.* 2008;15:111–9.
- Fukuda M, Otsuka Y, Uni S, Bain O, Takaoka H. Genetic evidence for the presence of two species of *Onchocerca* from the wild boar in Japan. *Parasite.* 2010;17:33–7.
- Fukuda M, Otsuka Y, Uni S, Bain O, Takaoka H. Molecular identification of infective larvae of three species of *Onchocerca* found in wild-caught females of *Simulium bidentatum* in Japan. *Parasite.* 2010;17:39–45.
- Japan Wildlife Research Center. The Sixth National Survey on the Natural Environmental Report of the Distributional Survey of Japanese Animals (Mammals), Biodiversity Center of Japan, Nature Conservation Bureau, Ministry of the Environment, Japan. 2004. p. 60–5. in Japanese.
- Kassai T, Cordero del Campillo M, Euzebey J, Gaafar S, Hiepe T, Hirmonas CA. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol.* 1988;29:299–326.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673–80.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–8.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111–20.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406–25.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731–9.
- Eberhard ML. Studies on the *Onchocerca* (Nematoda: Filarioidea) found in cattle in the United States. I. Systematics of *O. gutturosa* and *O. lienalis* with a description of *O. stilesi* sp. n. *J Parasitol.* 1979;65:379–88.
- Bain O. Redescription de cinq espèces d'onchocercques. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1975;50:763–88.
- Bain O, Petit G, Poulain B. Validité des deux espèces *Onchocerca lienalis* et *O. gutturosa*, chez les bovins. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1978;53:421–30.
- Bain O. Le genre *Onchocerca*: hypothèses sur son évolution et clé dichotomique des espèces. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1981;56:503–26.
- Mellor PS. Studies on *Onchocerca cervicalis* Railliet and Henry 1910: 3. Morphological and taxonomic studies on *Onchocerca cervicalis* from British horses. *J Helminthol.* 1974;48:145–53.
- Ferri E, Barbuto M, Bain O, Galimberti A, Uni S, Guerrero RA, et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarial worms and related parasites (Nematoda). *Front Zool.* 2009;6:1.

38. Kawamura Y. Immigration of mammals into the Japanese Islands during the Quaternary. *Quat Res.* 1998;37:251–7.
39. Watanobe T, Ishiguro N, Nakano M. Phylogeography and population structure of the Japanese wild boar *Sus scrofa leucomystax*: mitochondrial DNA variation. *Zool Sci.* 2003;20:1477–89.
40. Tsujino R, Ishimaru E, Yumoto T. Distribution patterns of five mammals in the Jomon period, middle Edo period, and the present, in the Japanese Archipelago. *Mam Stud.* 2010;35:179–89.
41. Tokida K, Maruyama N: Factors affecting the geographical distribution of Japanese wild boars. In *The Second National Survey on the Natural Environmental Report of the Distributional Survey of Japanese Animals (Mammals)*. Japan Wildlife Research Center, 1980, (in Japanese with English summary). www.biodic.go.jp/reports/2-6/ad097.html
42. Japan Meteorological Agency: Climate change and its impact in Japan, 2012. Page 25 (in Japanese), 2013. http://www.env.go.jp/earth/ondanka/rep130412/report_full.pdf
43. Honda T. Environmental factors affecting the distribution of the wild boar, sika deer, Asiatic black bear and Japanese macaque in central Japan, with implications for human-wildlife conflict. *Mam Stud.* 2009;34:107–16.
44. Ministry of the Environment, Japan. Statistics on capture of wildlife, Page 85, (in Japanese), 2014. <https://www.env.go.jp/nature/choju/capture/pdf/d1.pdf>
45. Otranto D, Traversa D. *Thelazia* eyeworm: an original endo- and ecto-parasitic nematode. *Trends Parasitol.* 2005;21:1–4.
46. Otranto D, Dantas-Torres F, Brianti E, Traversa D, Petrić D, Genchi C, et al. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors.* 2013;6:16.
47. Lee AC, Montgomery SP, Theis JH, Blagburn BL, Eberhard ML. Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends Parasitol.* 2010;26:168–73.
48. Morchón R, Moya I, González-Miguel J, Montoya MN, Simón F. Zoonotic *Dirofilaria immitis* infections in a province of Northern Spain. *Epidemiol Infect.* 2010;138:380–3.
49. Chabaud AG, Bain O. The evolutionary expansion of the Spirurida. *Int J Parasitol.* 1994;24:1179–201.
50. Morales-Hojas R. Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2009;9:748–59.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



牛におけるトキソカラ属回虫およびブタ回虫幼虫に対する抗体保有状況調査

釜井 莉佳¹、松尾 加代子^{1,2}、後藤 判友¹、高島 康弘²、
吉田 彩子³、丸山 治彦³、平 健介⁴、赤尾 信明⁵

¹岐阜県食肉衛生検査所、²岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科、

³宮崎大学 医学部 感染症学講座 寄生虫学分野、⁴麻布大学 獣医学部 寄生虫学研究室、

⁵東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 国際環境寄生虫病学分野

要約

トキソカラ属回虫（以下、トキソカラ）およびブタ回虫幼虫による牛肉の汚染状況を明らかにするために、岐阜県内の屠畜場に搬入された牛 309 頭（肥育黒毛和種 108 頭、肥育交雑種 100 頭、乳廃用ホルスタイン種 101 頭）を対象にトキソカラおよびブタ回虫幼虫に対する特異抗体保有率を調査した。トキソカラについてはイヌ回虫 (*Toxocara canis*) 幼虫排泄分泌 (ES) 抗原を用いた ELISA を、ブタ回虫 (*Ascaris suum*) についてはブタ回虫幼虫 ES 抗原を用いた ELISA を行った。検査した牛 309 頭における抗体陽性率はトキソカラに対して 17.8%、ブタ回虫に対して 27.2% を示し、いずれの品種においても陽性抗体価を示す個体が認められた。全体として、ブタ回虫に対する抗体陽性率はトキソカラに対する抗体陽性率と比べ有意に高かった ($P < 0.01$)。特に、黒毛和種ではブタ回虫に対する抗体価がトキソカラに対する抗体価よりも高く ($P < 0.01$)、乳廃用牛ではトキソカラ、ブタ回虫ともに肥育牛よりも低かった ($P < 0.01$)。以上の結果は、動物由来回虫幼虫移行症の原因となることが知られているトキソカラおよびブタ回虫に感染した個体が食肉検査に合格した牛に含まれていることを示唆している。人への感染危険性をもつ幼虫生残数と抗体価との関係については今後の検討課題である。

Keywords: 牛、血清疫学調査、幼虫移行症、トキソカラ、ブタ回虫、幼虫排泄分泌 (ES) 抗原

1. はじめに

トキソカラ属回虫（イヌ回虫 *Toxocara canis*、ネコ回虫 *Toxocara cati*；以下、トキソカラ）やブタ回虫 (*Ascaris suum*) は世界に広く分布する人獣共通寄生虫である。回虫の生活環は基本的に 1 宿主性であるが、固有宿主以外の哺乳類、鳥類、昆虫類も待機宿主あるいは伝播宿主となり得る。待機宿主体内では、幼虫は感染性を保持したまま組織内に留まり、次の宿主への感染源となる。動物由来回虫が人に感染すると、成虫に発育することなく幼虫移行症を引き起こす [2, 11]。人では移行部位によって症状もさまざま不顕性感染も多いと考えられる。また、他の疾病との鑑別診断も困難であり、正確な発生実態は不明であるが、幼虫移行症の症例は国内でも多数報告されている [2, 4, 11, 16, 17, 19, 22]。宮崎大学医学部において、平成 22～24 年の 3 年間に寄生虫感染疑いで検査依頼のあった被検血清 1,215 検体のうち、135 検体

が動物由来回虫症と診断されている（丸山未公表）。これら患者の稟告により、レバーや刺身といった食肉の生食が原因のひとつとして疑われている [2, 4, 11, 16, 17, 19, 22]。近年、内閣府食品安全委員会においても食肉の寄生虫症リスクについて重要視されてきている。そこで今回、我々は牛肉におけるトキソカラおよびブタ回虫の汚染状況を明らかにすることを目的として、屠畜場に搬入された牛について特異抗体保有率を調査した。

2. 材料と方法

平成 24 年 8 月～25 年 5 月に岐阜県内の屠畜場に搬入された牛 309 頭（肥育用黒毛和種 108 頭、肥育用交雑種 100 頭および乳廃用ホルスタイン種 101 頭）の血液を採取し、定法に従い血清を分離した。牛は、岐阜県内で屠畜されているが、出荷地は 11 府県 144 農家（黒毛和種 34、交雑種 32、乳廃用ホルスタイン種 82 農家）にわたっ

ていた。

トキソカラについては、ネコ回虫と共通の抗原性を持つイヌ回虫幼虫排泄分泌 (ES) 抗原を用い、ブタ回虫については、ブタ回虫幼虫 ES 抗原を用いた ELISA 法 (以下、ES-ELISA) で特異抗体価の測定を行った [13]。これらの方法は、人での動物由来回虫症診断にも用いられている [16, 17, 22]。96-well ELISA プレート (Nunc A/s, Postboks, Roskilde, Denmark) への抗原コーティングは、東京医科歯科大学で調製したイヌ回虫 ES 抗原 (1 µg/ml) あるいは宮崎大学で調製したブタ回虫 ES 抗原 (1 µg/ml) を 50 µl/well、4℃で一晩静置した後、37℃で 60 分間インキュベートすることにより行った。抗原の希釈には、Tris-buffered saline (TBS; pH7.6) を用いた。その後、0.05% Tween20 添加 PBS で 3 回洗浄し、3% スキムミルク添加 TBS (pH7.6) を 100 µl/well 加え、37℃で 60 分間静置することによりブロッキングを行った。ブロッキング後、同様に 3 回洗浄し、1 次抗体 (1 : 3,000 希釈被検血清) を 50 µl/well 加え、37℃で 60 分間反応させた。3 回洗浄後、2 次抗体 (1 : 30,000 希釈 HRP 標識抗ウシ IgG 抗体) (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) を 50 µl/well 加え、37℃で 60 分間反応させた。1 次抗体および 2 次抗体の希釈には、3% スキムミルク添加 TBS (pH7.6) を用いた。3 回洗浄後、基質液 (TMB + Substrate-Chromogen; Dako Japan, 東京) を 50 µl/well 加え、遮光下、室温で 30 分間反応させた。その後、停止液 (1N H₂SO₄) を 50 µl/well 加え、直ちに OD₄₅₀ における吸光度を測定した。陰性コントロールには、その他の蠕虫感染の可能性を排除するため、市販の FCS (牛胎仔血清 : DS ファーマバイオメディカル, 吹田市, 大阪) 6 検体を使用し、カットオフ値はこれら陰性コントロールの平均吸光度の 3 倍とした。トキソカラの陽性コントロールには静岡県東部食肉衛生検査所で採取された牛血清のうち、東京医科歯科大学にて行われたイヌ回虫 ES ELISA により、1.0 以上の吸光度を示した 2 検体

を使用した。また、陽性率の比較にはカイ二乗検定を行った。

3. 結果

トキソカラ ES-ELISA でのカットオフ値は 0.086 であったことから、この値よりも高い吸光度を示したサンプルを陽性と判定した (図 1)。特異抗体陽性率は 17.8%であった (表 1)。黒毛和種では 10 / 34 軒、交雑種では 12 / 32 軒、乳廃用ホルスタイン種では 12 / 82 軒の農家から陽性牛が検出された。

ブタ回虫については、カットオフ値は 0.100 と算定され、陽性率は 27.2%であった (表 1)。吸光度分布は図 2 に示した。農家別では、黒毛和種 17 / 34 軒、交雑種 18 / 32 軒、乳廃用ホルスタイン種 10 / 82 軒から陽性牛が検出された。

表 1 に示したように、いずれの品種においても、動物由来回虫幼虫 ES 抗原に対する特異抗体をもつ個体が検出された。全体として、ブタ回虫に対する抗体陽性率をトキソカラに対する抗体陽性率と比べると、前者が有意

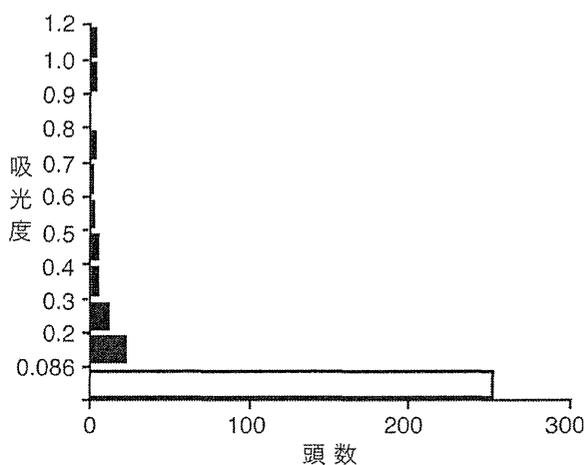


図 1. ES ELISA 法による抗トキソカラ特異抗体の吸光度分布 (白抜きは陰性)。

表 1. トキソカラおよびブタ回虫に対する抗体保有率

品 種	検査数	トキソカラ陽性数 (%)	ブタ回虫陽性数 (%)
肥育黒毛和種	108	18 (16.7%)	40 (37.0%)
肥育交雑種	100	25 (25.0%)	33 (33.0%)
乳廃ホルスタイン種	101	12 (11.9%)	11 (10.9%)
計	309	55 (17.8%)	84 (27.2%)

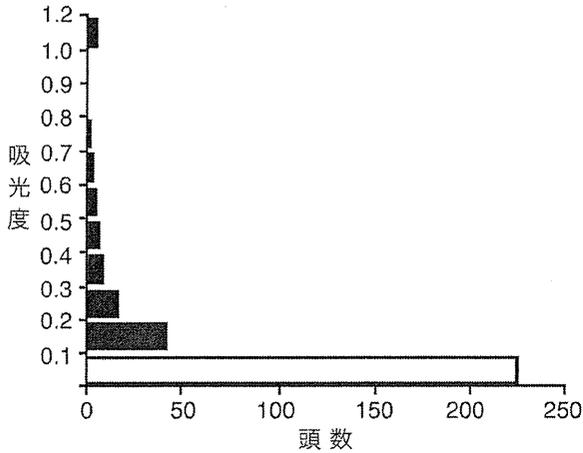


図2. ES ELISA 法による抗ブタ回虫特異抗体の吸光度分布 (白抜きは陰性).

に高かった ($P<0.01$).特に、黒毛和種ではブタ回虫がトキソカラよりも高く ($P<0.01$)、乳廃用ホルスタイン種ではトキソカラ、ブタ回虫ともに肥育牛 (黒毛和種、交雑種) よりも低かった ($P<0.01$).トキソカラおよびブタ回虫のいずれに対しても特異抗体陽性の牛が検出された農家は、黒毛和種で7/34軒 (20.6%)、交雑種で7/32軒 (21.9%)、乳廃用ホルスタイン種で3/82軒 (3.7%)であった。また、トキソカラ、ブタ回虫、両者に対しての特異抗体陽性を示した牛は、黒毛和種7頭、交雑種8頭および乳廃用ホルスタイン種3頭の計18頭であった。抗体価の相関は図3に示した。

4. 考 察

動物由来回虫幼虫移行症について、牛での感染実験や感染牛の諸臓器からの虫体回収は現実的に難しく、感染時期や幼虫の感染数と特異抗体価の推移の関係を論じた報告は、著者らの知る限りでは見当たらない。そこで、本研究では、イヌ回虫やネコ回虫といったトキソカラやブタ回虫での特異抗体検出において人での感染診断において高い有用性が証明されているES-ELISA法を用いた血清疫学調査を屠畜場に搬入された牛に適用した。前述したように、動物由来回虫による幼虫移行症患者の稟告において、レバーや刺身といった食肉の生食が原因のひとつとして疑われていることから [2, 4, 11, 16, 17, 19, 22]、国内で生産・食肉処理された牛での動物由来回虫への感染機会を推定することを本研究の目的とした。牛血清を検査対象とした場合の交叉反応性、すなわち非特異反応が今回用いた回虫幼虫ES抗原に対して起こって

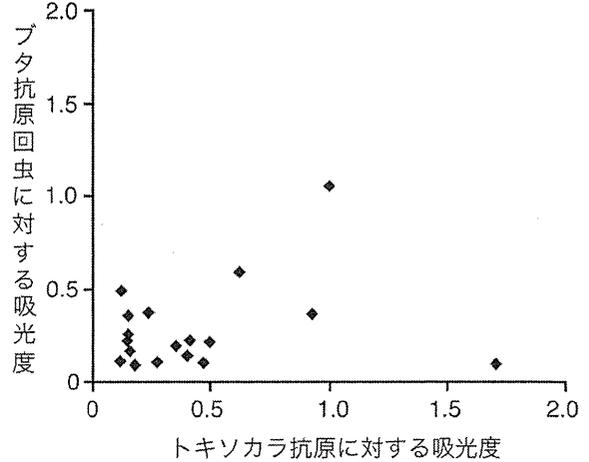


図3. ES ELISA 法により抗トキソカラ特異抗体と抗ブタ回虫特異抗体が共に陽性となった牛血清サンプルの吸光度の相関性.

いる可能性も完全には排除できないが、今回の調査対象となった牛はトキソカラやブタ回虫に対する特異抗体を高率に保有していることが確認された。また、図3に示すようにトキソカラおよびブタ回虫いずれに対しても特異抗体も保有している個体がみられた。この結果が、複数の回虫の重感染であるのか、あるいは類縁異種間の交叉反応であるのかも現時点では不明である。これらの点を含め、今後、牛血清を検査対象としたES-ELISA法の感度と特異性について更に検討する余地がある。また、特異抗体価と幼虫生残数の間の関係を明らかにすることも重要であろう。

本研究で行った血清疫学調査は、食肉処理される家畜が動物由来回虫に感染する機会が多分にあることを示唆している。このことは、過去に状況証拠として指摘された、以下の記録とも合致しているように思える。

獣医学教育に使用されている成書によると、牛からブタ回虫が検出される事例は我が国でも稀ではないと記述されている [8, 9, 12, 21]。また、詳細は不明ながら、和牛でしばしば認められる好酸球性増殖性小葉間静脈炎について調べた1996年度の野村らによる科研費報告書の研究概要 (<http://kaken.nii.ac.jp/d/p/08660391.ja.html>) には、「わが国の牛におけるブタ回虫寄生例の存在も明らかとなり・・・」と記されていることも注目される。牛の品種については言及されていないが、好酸球性増殖性小葉間静脈炎が和牛に多発することと今回の抗体調査において、ブタ回虫の陽性率が、肥育牛、特に黒毛和種では有意に高かったことと関連しているかもしれない。1970年の子牛におけるイヌ回虫実験感染 [3] では、幼虫の検出と好酸球の消長についても述べられている。肥

育牛と乳用牛では飼料や飼育方法などが異なることも、今回明らかになった特異抗体保有率の品種間の違い、すなわち異なる感染機会の説明の1つとして考えられるので、個々の農家で飼養管理について調査を行うことで、今回の結果の意義を明確にできる可能性がある。

トキソカラによる汚染については、農家に猫が出入りしていたり、番犬を飼育していることが原因として考えられる。論文として公表はされていないが、平成22年度全国食肉衛生検査所技術研修会で発表された静岡県東部食肉衛生検査所と東京医科歯科大による調査研究では、トキソカラに対する抗体調査で陽性牛が多数みられた農場では、牛の飼料が猫の糞便で容易に汚染される環境にあったと指摘されている。終宿主である犬や猫のトキソカラ感染率は高く [5, 10]、牛を飼育する農家の犬や猫では、特に駆虫が必要である。また、今回の調査対象牛は岐阜県内の屠畜場で処理されているが、半数以上は近隣10府県からも搬入されており、出荷地を所管する家畜保健衛生所や家畜共済などと連携した農家の実態調査が望まれる。

ブタ回虫では、岐阜県食肉衛生検査所における屠畜検査において、養豚農家によっては出荷されるロット全ての肝臓がブタ回虫の感染を主因とするミルクスポットで廃棄される場合もあり、実際に、検査時に腸管に寄生する成虫を目にする機会も多い。文献的にも、大阪市食肉衛生検査所での成績として、屠畜場で採取された豚糞便の約15%からブタ回虫卵が検出されている [15]。1隻のブタ回虫の1日の産卵数は20万個とも言われている [8, 9]。近縁種であるヒト回虫卵では環境によっては15年以上もの間、感染能を有するとの報告があり [14]、ブタ回虫についても同等の環境抵抗性が推定される。また、豚の糞尿は堆肥化されるが、その過程において、ブタ回虫卵が死滅する温度 (60℃、15～20分) が十分に達成されていないことがある [7, 20]。未熟堆肥を餌とする糞食性昆虫などが虫卵を機械的に媒介、拡散させる可能性も否定できない。以上のように土壌や飼料の汚染を介して牛が感染し、待機宿主になる可能性は十分に考えられる。鶏に感染したトキソカラの幼虫の体内分布は、イヌ回虫では肝臓に多く [1, 6]、ネコ回虫では筋肉に多いことが知られている [18]。牛でのイヌ回虫感染実験において、横隔膜や心筋よりも肝臓に多く幼虫が分布したと言う報告もあるが [3]、牛においても回虫種によって寄生部位が異なる可能性がある。

屠畜検査員は消費者の安全のために食肉の検査にあっているが、マクロ所見を主体とする現場での検査に

は限界があり、特に今回の調査対象であるトキソカラやブタ回虫の牛での幼虫移行症は肉眼的な確認は極めて難しい。細菌性食中毒の発生を受けた平成24年7月の食品衛生法の一部改正により、牛の生レバーは販売・提供が禁止されたが、生食用牛肉の処理については、表面1cmの加熱が義務付けられたものの、中心部に存在するかも知れない寄生虫のリスクについては触れられていない。また、地鶏などは刺身やたたきが食文化とされている。さらに一部飲食店では豚の生レバーや生肉を提供するところもある。このように、生食への抵抗が失われている昨今、公衆衛生獣医師は生食に潜在するリスクについて調査を行い、消費者に情報を提供し、十分な加熱調理などリスクを回避するための方法を提案していく必要がある。

今後は肝臓を含む食肉から幼虫の証明を試みるとともに、他の食肉衛生検査所、大学、研究機関および家畜保健衛生所などと協力・連携し、全国的な調査を実施することで、我が国における動物由来回虫の食肉汚染状況について引き続き明らかにしていきたい。

謝 辞

英文校閲にご協力いただいた金子志乃生氏、検体採体に協力していただいた岐阜県食肉衛生検査所、管内食肉事業センターおよび食肉処理施設諸氏に深謝します。

引用文献

1. Agnihotori, R. K., Bhatia, B. and Kumar, D. 1987. Visceral larva migrants. I. Migratory behaviour of *Toxocara canis* larvae in golden hamster and chicken. *Indian J. Anim. Sci.* 8 : 835-855.
2. Akao, N. and Ohta, N. 2007. Toxocariasis in Japan. *Parasitol. Int.* 56 : 87-93.
3. Fitzgerald, P. R. and Mansfield, M. E. 1970. Visceral larva migrans (*Toxocara canis*) in calves. *Am. J. Vet. Res.* 31 : 561-565.
4. 藤井康浩, 俣木浩子, 是枝快房, 川島寿史, 浜田美奈子, 中塩屋二郎, 富山由美子, 川畑政治. 2011. イベルメクチンが有効であった肺トキソカラ症の1例. *呼吸器誌* 49 : 399-403.
5. 深瀬 徹. 2007. 東京都およびその近郊の地域の路上にて採取した犬の糞便からの寄生虫の検出 - 1985年～2005年の検査成績 -. *動臨医* 16 : 1-6.

6. Galvin, T. J. 1964. Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons. *J. Parasitol.* 50 : 124-127.
7. 原田靖生. 1997. 日本における豚ふん堆肥の製造・利用の実態. *養豚誌* 34 : 145-150.
8. 今井壯一編. 2007. 改訂獣医寄生虫学・寄生虫病学 2 蠕虫他. 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 433.
9. 板垣 博, 大石勇監修. 2007. 最新家畜寄生虫病学. 朝倉書店, 東京, pp. 324.
10. 伊藤直之, 青木美樹子, 板垣 匡. 2005. 青森県八戸地域の飼育猫における消化管内寄生虫の検出状況. *日獣会誌* 58 : 683-686.
11. Izumikawa, K., Kohno, Y., Izumikawa, K., Hara, K., Hayashi, H., Maruyama, H. and Kohno, S. 2011. Eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans possibly caused by *Ascaris suum*: a case report and review of recent literatures. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64 : 428-432.
12. 獣医臨床寄生虫学編集委員会編. 1995. 新版獣医臨床寄生虫学 (産業動物編). 文栄堂, 東京, pp. 514.
13. Kondo, K., Akao, N., Konishi, Y. and Yoshimura, H. 1984. Experimental studies on visceral larva migrans 4. Examination of immunoglobulins in sera of infected rabbits with *Toxocara canis* by means of indirect fluorescent antibody (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn. J. Parasitol.* 33 : 99-104.
14. rasnonos, L. N. 1978. Prolonged survival of *Ascaris lumbricoides* L., 1758 ova in the soil in Samarkand. *Med. Parazitol. Parazit. Bolezni* 47 : 103-105.
15. Matsubayashi, M., Kita, T., Narushima, T., Kimata, I., Tani, H., Sasai, K. and Baba, E. 2009. Coprological survey of parasitic infections in pigs and cattle in slaughterhouse in Osaka, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71 : 1079-1083.
16. 三田村未央, 福岡麻美, 春田善男, 小荒田秀一, 多田芳史, 長沢浩平. 2007. 多様な症状を呈シイヌ回虫幼虫移行症が疑われた1例. *感染症誌* 81 : 305-308.
17. Morimatsu, Y., Akao, N., Akiyoshi, H., Kawazu, T., Okabe, Y. and Aizawa, H. 2006. A familial case of visceral larva migrants after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 : 303-306.
18. Taira, K., Saitoh, Y. and Christian, M. O. K. 2011. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Vet. Parasitol.* 180 : 287-291.
19. 高崎 淳, 片桐 聡, 小寺由人, 有泉俊一, 山本雅一. 2011. 術前診断が困難であった寄生虫が原因と考えられる肝好酸球性肉芽腫症の1例. *日臨外会誌* 72 : 2882-2888.
20. 畜産環境整備機構. 2006. たい肥づくりの手引き. [http://www.chikusan-kankyo.jp/tdd/tdd_index.html].
21. 内田明彦, 野上貞雄, 黄鴻堅. 2006. 図説 獣医寄生虫学. メディカグローブ, 弘前, pp. 207.
22. Yoshikawa, M., O uji, Y., Nishiofuku, M., Moriya, K., Kasahara, K., Mikasa, K., Mizuno, Y., Nakamura, T., Ogawa, S., Ishizaka, S. and Akao, N. 2008. Visceral toxocariasis from regular consumption of raw cow liver. *Intern. med.* 47 : 1289-1290.

連絡責任者：松尾加代子、岐阜県食肉衛生検査所、
〒503-0015 岐阜県大垣市林町 3-167-1、
TEL : 0584-82-2700、Fax : 0584-82-2702、
E-mail : matsuo-kayoko@pref.gifu.lg.jp

Correspondence : Kayoko MATSUO, Gifu Prefectural Meat Inspection Office, 3-167-1 Hayashimachi, Oogaki, Gifu 503-0015, Japan.

Serosurvey of *Toxocara* spp. and *Ascaris suum* larval infections in cattle

Rika KAMAI¹, Kayoko MATSUO^{1,2}, Hanyu GOTO¹, Yasuhiro TAKASHIMA²,
Ayako YOSHIDA³, Haruhiko MARUYAMA³, Kensuke TAIRA⁴, Nobuaki AKAO⁵

¹Gifu Prefectural Meat Inspection Office, ²Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University,

³Faculty of Medicine, University of Miyazaki, ⁴Department of Veterinary Medicine, Azabu University

⁵Division of Public Health, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University

ABSTRACT

The prevalence of antibodies to *Toxocara* spp. and *Ascaris suum* larvae in cattle was investigated. A total of 309 sera were collected from beef cattle (108 heads Japanese black and 100 heads crossbred) and discarded dairy cattle (101 heads Holstein) in abattoirs, Gifu Prefecture. Antibodies to *Toxocara* spp. were evaluated by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Toxocara canis* larva excretory-secretory (ES) antigen, and antibodies to *A. suum* were measured by an ELISA using *A. suum* larva ES antigen. The overall positive rates were 17.8% (55/309) for *Toxocara* spp. and 27.2% (84/309) for *A. suum*, and seropositive individuals were found in all breeds. The positive rate to *A. suum* was significantly higher than that of *Toxocara* spp. ($P < 0.01$ in total result), especially in Japanese black ($P < 0.01$). The positive rates to both ascarid nematodes in discarded dairy cattle were lower than those of beef cattle ($P < 0.01$). These results suggest that zoonotic infection with ascarid larvae migrans may occur from consuming the infected raw beef.

Keywords : cattle, serosurvey, larvae migrans, *Toxocara* spp., *Ascaris suum*, larva excretory-secretory (ES) antigen.

人獣共通感染症としての動物由来回虫症

吉田 彩子、丸山 治彦

宮崎大学 医学部 感染症学講座 寄生虫学分野

要約

動物由来回虫症は、本来は動物に寄生する回虫がヒトに感染して起こる幼虫移行症で、宮崎大学医学部だけでも2004年から2013年までの10年間に680名の臨床症例が確認されている。特にヒトへの感染が問題となっているのはトキソカラ属回虫（イヌ回虫、ネコ回虫）とブタ回虫で、感染者の多くは症状を自覚することなく経過するが、感染数や幼虫の迷入部位によっては呼吸器症状、眼症状、神経症状といった様々な症状がみられる。診断は免疫学的検査による抗体検出が主流で、ベンズイミダゾール系駆虫薬のアルベンダゾールによる投薬治療が有効である。ヒトへの感染ルートとしては、感染能を持った虫卵の経口摂取が一般的なルートとされてきたが、近年はこれらの回虫類に感染した家畜の肉や内臓の生食によるルートが注目されている。このように動物由来回虫症は人獣共通感染症であることから、疾病コントロールのためには獣医学・医学両領域が連携をとって対策を行う必要がある。

Keywords: 動物由来回虫症、幼虫移行症、トキソカラ属回虫、ブタ回虫

1. わが国におけるヒトの蠕虫感染状況

衛生環境の整った今日の日本では、ヒトの蠕虫疾患はすでに過去の疾病であるイメージが強いが、実際には今なお毎年新規に患者が発生している身近な感染症である。宮崎大学医学部では、臨床現場からの寄生虫症診断に対するニーズに答え、全国の医療機関から抗寄生虫抗体のスクリーニング検査を受託している。図1に、過去10年間（2004～2013年）に宮崎大学医学

部で抗蠕虫抗体陽性と診断された新規患者数の推移を示した。蠕虫症患者数は2004年から2009年にかけて減少傾向がみられたものの、それ以降は年間100名程度とほぼ一定で推移している。内訳としては動物由来回虫症患者が最も多い。この10年間で累計1,328名が蠕虫症と診断されたが、うち680名（51.2%）が動物由来回虫症であり、我が国における人獣共通寄生虫症としての動物由来回虫症の重要性がうかがわれる。

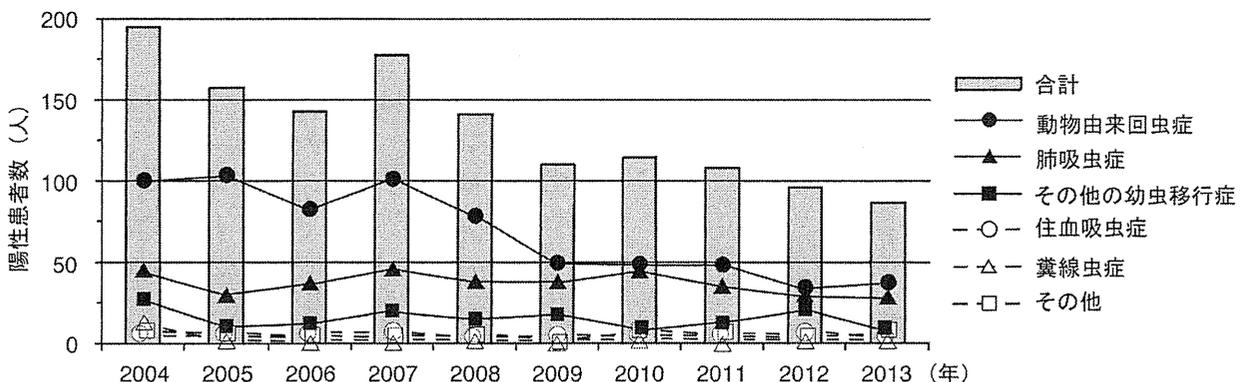


図1. 抗寄生虫抗体検査により診断された蠕虫症患者数の推移（宮崎大学医学部実施）

2. 動物由来回虫類による幼虫移行症

ヒト以外の動物を本来の宿主とする回虫には、イヌ回虫、ネコ回虫、ブタ回虫、ウシ回虫、アライグマ回虫などの多くの種類が存在する[7]。中でも、特にヒトへの感染が問題となっている回虫類として、トキソカラ属回虫（イヌ回虫・ネコ回虫）やブタ回虫が挙げられる[7, 15]。これらの回虫が本来の宿主（固有宿主）であるイヌ、ネコまたはブタに感染した場合、虫卵から小腸内で孵化した幼虫は、一旦消化管を脱出し、肝臓、肺と体内移行を行った後、再び小腸に戻って成熟する[2, 13]。一方で、本来の宿主以外の動物（非固有宿主）に感染した場合、幼虫は成虫になることなく感染動物の体内を移行し続ける。トキソカラ属回虫やブタ回虫にとって、ヒトは後者の非固有宿主にあたる[2, 3, 13]。

これらの回虫類にヒトが感染しておこる動物由来回虫症では、体内移行幼虫による組織傷害が原因となる様々な臨床症状を呈することが知られており、その症状によって内臓型、眼型、神経型、潜伏型の4型に分類される（表1）[2, 9]。感染者の多くは無症状または非常に軽微な臨床症状しか示さない潜伏型であり、動物由来回虫症として診断されることもほとんどない。しかしながら、頻度は低いものの、肺炎や視力障害、髄膜脳炎といった重篤な症状を示すケースもあり、ヒトに健康被害を及ぼす寄生虫症として認識すべきである。

表1. 動物由来回虫症の一般症状

内臓型	眼型	神経型	潜伏型
発熱	失明	痙攣	咳嗽
腹痛	視力・視野障害	発熱	頭痛
肝脾腫	網膜剥離	頭痛	不眠
喘鳴	網膜内肉芽腫	髄膜脳炎	行動障害
乾性咳	脈絡網膜炎	神経症状	倦怠感
喘息	眼内炎		不穏状態
呼吸器症状	ぶどう膜炎		
肝機能障害	硝子体混濁		

3. 動物由来回虫症の診断と治療

前述したように、トキソカラ属回虫やブタ回虫は非固有宿主であるヒトの体内では基本的に成虫にはならないため、糞便中からの虫卵検出によって診断することはできない。そこで、動物由来回虫症の診断は、血清や体液中の抗回虫抗体をELISA法やウエスタンブロット法で検出する免疫学的な診断が主流となっている[9, 17]。抗体検出に用いる回虫抗原についてはこれまでに様々な抗原が評価されてきたが、現在、幼虫由来の排出・分泌抗原(LES)が感度・特異性の点から診断用抗原として最も優れているとされている。トキソカラ属回虫感染によるトキソカラ症については、すでにイヌ回虫のLESを使ったヒト用の診断キットが開発されており、日本で入手可能なものもある。一方で、ブタ回虫感染によるブタ回虫症を対象とした診断キット等は開発されておらず、一部の限られた機関でしか診断できないのが現状である。そういった中、臨床検査会社の株式会社SRLは宮崎大学からの技術提供を受け、12種類の寄生虫症について抗寄生虫抗体のスクリーニング検査を受託しており、トキソカラ属回虫やブタ回虫も検査対象に含まれている（図2）。動物由来回虫症は、感染規模と幼虫の移行器官によってさまざまな症状を呈するため、臨床症状からの診断は非常に難しい。したがって、患者の症状や問診情報、さらに臨床検査結果から総合的に判断して動物由来回虫症が疑われる場合には、こういった機関を利用して積極的に抗体検査を実施すべきである。

動物由来回虫症の治療は、基本的にベンズイミダゾール系駆虫薬とステロイド等の抗炎症剤の投与による。わが国では、厚生労働科学研究費補助金・医療技術実用化総合研究事業の「わが国における熱帯病・寄生虫症の最適な診断治療体制の構築」に関する研究班によって、アルベンダゾール（15mg/kg、分2〜3、4〜8週間）が推奨されており[20]、同研究班によるフォロー・アップ症例263例を対象とした調査において、その治療効果は78.8%と良好な値が得られている[6]。また、副作用については、12.9%で肝機能障害等の副作用が報告されたものの、重篤な副作用を示した症例はなく、

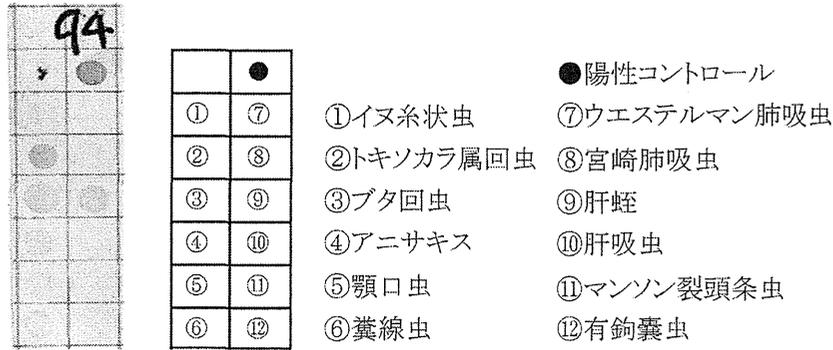


図2. Multipul-dot ELISAによる抗寄生虫抗体のスクリーニング検査。
寄生虫抗原を吸着させたニトロセルロース膜を用い、抗寄生虫抗体を発色反応を利用して検出する。陽性の場合には黒いスポットが目視できる。

比較的安全性の高い治療薬であると言える。

4. 感染ルート：食品由来寄生虫症としての動物由来回虫症

トキソカラ属回虫やブタ回虫のヒトへの感染ルートは、大きく2つのルートに分けられる。1つは感染性を持った幼虫形成卵を誤って経口摂取するルートで、もう1つは回虫類に感染した動物の肉や臓器を生食し、それらに含まれた回虫類の幼虫を摂取することによるルートである[2, 7, 9]。

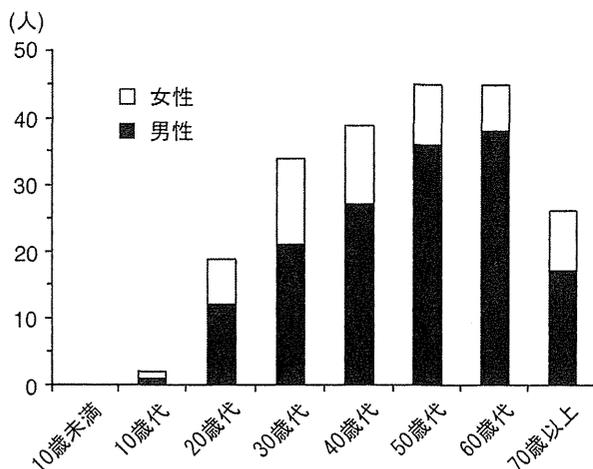


図3. 宮崎大学医学部で動物由来回虫症と診断された患者の年齢と性別 (2009~2013年)。

欧米では、前者の虫卵摂取による感染が主体であり、患者は虫卵に汚染された土壌を誤って口にする可能性の高い幼児や小児に多い傾向がある[5, 14]。一方で、わが国の動物由来回虫症患者の年齢分布とその推定される感染ルートは欧米とは異なるパターンをとることが以前から指摘されている[1, 18]。図3は、宮崎大学において2009年からの5年間に動物由来寄生虫症と診断された患者の年齢と性別を示したものである。欧米での中心である幼児は全体の1%以下(210名中2名)と非常に少なく、30歳以上の年齢層、特に50歳代と60歳代で最も多く患者が見られた。また、患者の男女比を見ると、男性が女性の2.6倍と多数を占めていることが分かる。したがって、日本における動物由来回虫症は「中高年の男性に多い病気」ということができるであろう。

この原因として考えられるのは、欧米との感染ルートの違いである。わが国ではウシやニワトリのサシミや生レバーを喫食する習慣があり、幼虫に汚染されたこれらの食品から感染したと思われる症例も複数報告されている[10, 19]。患者の問診情報をもとに動物由来回虫症患者の食歴を調べてみると、48.4%に生肉や生レバーを食べた経験があった(図4)。細菌性食中毒とは異なり、動物由来回虫症は感染から発症、診断までに長い時間がかかる。そのため、感染源となった食品の特定は困難であり、肉やレバーの生食の危険性も推測の域を出ない。しかしながら、小規模な調査ではある

ものの、食肉用として処理されたウシやニワトリの中に抗トキソカラ属回虫抗体の高い個体がみられたとの報告もなされており[16]、食品衛生の観点からも肉やレバーの生食と動物由来回虫症との関連については評価を行っていく必要があると考えられる。

5. 動物由来回虫症のコントロール

動物由来回虫感染者の多くは感染を自覚することがないため、病院を受診して診断に至るケースは実際の感染者のごく一部である。1990年代に報告された疫学調査の結果では、全国14都府県で実施した調査での健康人の抗トキソカラ抗体陽性率は1.6%で、この数字を日本の人口に当てはめると約200万人がトキソカラ属回虫に暴露された経験を持つ可能性があることになる[8]。また、ブタ回虫症については、南九州8町村における疫学調査での抗ブタ回虫抗体陽性率は17.9%と非常に高い値が報告されている[11]。

回虫類の虫卵は物理的・化学的刺激に強い抵抗性を持っており、土壌中の劣悪な環境下でも長期間生存を続け、市販の消毒薬では不活化されない[4, 12]。したがって、環境中の虫卵を殺滅することは非常に難しく、虫卵による環境汚染を防ぐ対策を取ることの方が現実的である。イヌ、ネコについては、これらの動物での感染率の低下を目的とした駆虫の実施と、糞便管理の徹底を飼い主に指導していくことが重要である。ブタにおいても、駆虫によりブタでの感染率を低下させることが望ましいが、コストや手間がかかるといった理由もあり、産業動物であるブタでは駆虫薬の使用が必ずしも受け入れられるとは限らない。そこで、周辺環境の汚染防止策として、糞便を利用した堆肥は十分に発酵させ、発酵熱によって虫卵を不活化することが必要である。また、ヒトへの感染源としての評価は十分とはいえないまでも、生食機会の多いウシやニワトリへのトキソカラ属回虫やブタ回虫の感染を防ぐために、畜舎へのイヌやネコの立ち入りをなくし、草地に使用する堆肥は十分に発酵させたものを使用する等の対策は取っていくべきであろう。一方で、動物由来回虫症に対するワクチンは存在しないため、ヒト

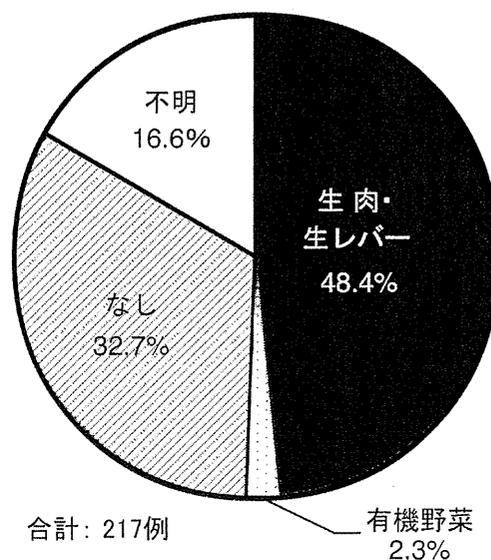


図4. 動物由来回虫症患者の生食歴（宮崎大学医学部、2009～2013年）.

は感染性のある虫卵や幼虫を体内に摂取しないようにすることでしか、動物由来回虫症を防ぐことは出来ない。具体的には、ペットのイヌ、ネコとの過剰な接触を避ける、土を触った後の手洗いを徹底する、肉や内臓の生食を避けるといった対策が有効である。

2012年7月から、食品衛生法に基づいて、日本ではウシのレバーを生食用として販売・提供することが禁止された。これは、本来は出血性大腸菌による食中毒を防ぐ目的で施行されたものであるが、図1を見ると時期を同じくして動物由来回虫症患者もまた減少傾向にあるような印象を受ける。このことから、両者の関連性の評価は今後の課題であるが、さらなる患者数の減少が期待できるかもしれない。その一方で、日本で禁止されたという理由から海外旅行先でウシの生肉や生レバーを食べ、帰国後に発症した輸入症例とみられるケースも2013年だけで5例経験しており、今後は輸入感染症としても対応していく必要があると考えられる。

動物由来回虫症は人獣共通感染症である。したがって、そのコントロールは、獣医学・医学両領域が協力して対策をとる必要がある。獣医学関係者はヒトへの感染の危険性を理解し、その情報を家畜所有者に与え、

イヌ、ネコ、ブタでの感染率を減少させるべく努力するとともに、前述したように回虫類に感染した家畜の肉や内臓もヒトへの感染源となりうることから、これら回虫類の食肉用家畜への感染を防ぐための対策をしていくことが望まれる。残念ながら、動物由来回虫症の認知度はあまり高くなく、医療現場の医師ですら正しい知識を持っているとは言えないのが現状である。医学関係者は、動物由来回虫症の正しい知識を持ったうえで、一般人に対して感染防御に関する的確な情報を提供していくべきである。動物由来回虫症の発生をゼロにすることは難しいかもしれない。しかし、獣医学・医学両領域が協調して対策を行い、患者数をゼロに近づける努力を続けることが、この寄生虫症をコントロールするためには重要であろう。

引用文献

1. Akao, N. and Ohta, N. 2007. Toxocariasis in Japan. *Parasitol Int.* 56: 87-93.
2. Despommier, D. 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 265-272.
3. Dold, C. and Holland, C. V. 2011. Ascaris and ascariasis. *Microbes Infect.* 13: 632-637.
4. Fan, C. K., Lin, Y. H., Du, W. Y. and Su, K. E. 2003. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol.* 113: 145-155.
5. Holland, C. V., O'Lorcaina, P., Taylor, M. R. and Kelly, A. 1995. Sero-epidemiology of toxocariasis in school children. *Parasitology* 110: 535-545.
6. 本部エミ, 吉田彩子, 長安英治, 黒木美香, 丸山治彦. 2013. 動物由来回虫症に対するアルベンダゾールの有効性の検討. *Clin. Parasitol.* 24: 91-93.
7. 石渡賢次, 名和行文. 2001. 人獣共通感染症の生態: 3. 寄生性人獣共通感染症, 4) 動物由来の回虫による幼虫移行症. *化療の領域* 17: 752-758.
8. Kondo, K., Akao, N., Ohya, T. and Okazawa, T. 1998. Sero-epidemiological investigation of toxocariasis in Asian area. *The 5th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses.* 65-70.
9. Magnaval, J. F., Glickman, L. T., Dorchie, P. and Morassin B. 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39: 1-11.
10. Nagakura, K., Tachibana, H., Kaneda, Y. and Kato, Y. 1989. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J. Infect. Dis.* 160: 735-736.
11. 名和行文. 2000. 新しい内臓幼虫移行症としてのブタ回虫人体感染の実態解明とその対策. 科学研究費補助金研究成果報告書, pp. 14-28.
12. O'Lorcaina, P. 1995. The effects of freezing on the viability of *Toxocara canis* and *T. cati* embryonated eggs. *J. Helminthol.* 69: 169-171.
13. Overgaauw, P. A. 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 233-251.
14. Pawlowski, Z. 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J. Helminthol.* 75: 299-305.
15. Pinelli, E., Herremans, T., Harms, M. G., Hoek, D. and Kortbeek, L. M. 2011. *Toxocara* and *Ascaris* seropositivity among patients suspected of visceral and ocular larva migrans in the Netherlands: trends from 1998 to 2009. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 873-879.
16. 高倉吉正. 1993. 食品を感染源とするトキシカラ症に関する疫学的研究: イヌ蛔虫の待機宿主としてのニワトリとウシについて. *金沢大十全医誌* 102: 828-835.
17. Wilkins, P.P. 2014. Immunodiagnosis of human toxocariasis and prospects for improved diagnostics. *Curr. Trop. Med. Rep.* 1: 44-51.
18. Yoshida, M., Shirao, Y., Asai, H., Nagase, H., Nakamura, H., Okazawa, T., Kondo, K., Takayanagi, T.H., Fujita, K. and Akao, N. 1999. A retrospective study of ocular toxocariasis in Japan: correlation with antibody prevalence and ophthalmological findings of patients with uveitis. *J. Helminthol.* 73: 357-361.

19. Yoshikawa, M., Nishiofuku, M., Moriya, K., Ouji, Y., Ishizaka, S., Kasahara, K., Mikasa, K., Hirai, T., Mizuno, Y., Ogawa, S., Nakamura, T., Maruyama, H. and Akao, N. 2008. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol. Int.* 57: 525-529.
20. 「わが国における熱帯病・寄生虫症の最適な診断治療体制の構築」に関する研究班. 2014. 寄生虫症薬物治療の手引き -2014- 改訂 8.0 版, pp. 69-71. [<http://trop-parasit.jp/>].

連絡責任者：吉田彩子、宮崎大学感染症学講座寄生虫学分野、〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原 5200、TEL : 0985-85-0990、Fax : 0985-84-3887、E-mail : kukuri@med.miyazaki-u.ac.jp
Correspondence: Ayako YOSHIDA, Department of Infectious Diseases, Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Oaza-Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan.

Zoonotic roundworm infections: Ascarid larva migrans syndrome

Ayako YOSHIDA, Haruhiko MARUYAMA

Department of Infectious Diseases, Division of Parasitology,
Faculty of Medicine, University of Miyazaki

ABSTRACT

Larva Migrans Syndromes (LMSs) are clinical syndromes in humans. Although various parasites have been known to cause LMSs, ascarid nematodes, namely *Toxocara* spp. (*T. canis* and *T. cati*) and *Ascaris suum*, are the most important causative species. In the last decade, 680 clinical cases were diagnosed with ascarid LMS at the University of Miyazaki. Ascarid LMS is clinically divided into four different syndromes: visceral, ocular, neurologic and covert LMS. Currently, serological tests are recognized as the most effective approach for the diagnosis of ascarid LMS. Albendazole treatment is recommended for ascarid LMS, although optimal duration of treatment is still undefined. The common risk factors for ascarid infections have been not only the ingestion of the eggs from contaminated soil, but also the ingestion of larvae from contaminated raw meat or liver of domestic animals such as cattle and chickens. Ascarid LMS is the parasitic zoonosis, therefore a multidisciplinary collaboration between veterinary and medical professionals based on a 'One Health' concept is required to prevent and control ascarid LMS.

Keywords: zoonotic roundworm infection, larva migrans syndrome, *Toxoca canis*, *Toxoca cati*, *Ascaris suum*.

Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*

AKINA HINO¹, TERUHISA TANAKA², MAHO TAKAISHI¹, YUMIKO FUJII¹, JUAN E. PALOMARES-RIUS¹, KOICHI HASEGAWA³, HARUHIKO MARUYAMA¹ and TAISEI KIKUCHI^{1*}

¹ Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, 889-1692 Japan

² Department of Infections, Respiratory and Digestive Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, 903-0213 Japan

³ Department of Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, Kasugai, Aichi, 487-8501 Japan

(Received 14 April 2014; revised 9 May and 4 June 2014; accepted 8 June 2014; first published online 4 August 2014)

SUMMARY

Strongyloides venezuelensis is a parasitic nematode that infects rodents. Although *Strongyloides* species described to date are known to exhibit parthenogenetic reproduction in the parasitic stage of their life cycle and sexual reproduction in the free-living stage, we did not observe any free-living males in *S. venezuelensis* in our strain, suggesting that the nematode is likely to depend on parthenogenetic reproduction. We confirmed by cytological analysis that *S. venezuelensis* produces eggs by parthenogenesis during the parasitic stage of its life cycle. Phylogenetic analysis using nearly the full length of 18S and D3 region of 28S ribosomal RNA gene suggested that *S. venezuelensis* is distantly related to another rodent parasite, namely *Strongyloides ratti*, but more closely related to a ruminant parasite, *Strongyloides papillosus*. Karyotype analysis revealed *S. venezuelensis* reproduces with mitotic parthenogenesis, and has the same number of chromosomes as *S. papillosus* ($2n = 4$), but differs from *S. ratti* ($2n = 6$) in this regard. These results, taken together, suggest that *S. venezuelensis* evolved its parasitism for rodents independently from *S. ratti* and, therefore, is likely to have a different reproductive strategy.

Key words: parthenogenesis, parasitic nematodes, karyotype.

INTRODUCTION

The genus *Strongyloides* comprises over 50 species of nematodes that parasitize mammals, amphibians, reptiles and birds (Viney and Lok, 2007). *Strongyloides* nematodes have complex but interesting life cycles. Infection by *Strongyloides* begins when the infective third stage larvae (iL3) attach to and penetrate the host skin. Once inside the host, they moult twice into parasitic adults and settle in the small intestine of the host. Then, the parasitic adults, all female, produce eggs by parthenogenesis (Fig. 1A). Once the eggs or hatched larvae are excreted from the host, they develop via the homogonic route into iL3 forms or the heterogonic route into free-living stages that reproduce sexually outside the host (Fig. 1A); sexual reproduction in the free-living generation was shown for two species, *Strongyloides ratti* (Viney, 1996) and *Strongyloides papillosus* (Eberhardt *et al.* 2007). The progeny of free-living adults are entirely female and develop into iL3 forms in most *Strongyloides* species, including *S. ratti* and *Strongyloides stercoralis*, with a few exceptions (Yamada *et al.* 1991; Streit, 2008).

Parthenogenetic reproduction by parasitic females was found to be mitotic in cytological studies for

S. papillosus, *Strongyloides ransomi* (Triantaphyllou and Moncol, 1977) and for *S. ratti* (Chitwood and Graham, 1940), and using molecular markers for *S. ratti* (Viney, 1994) and *S. papillosus* (Nemetschke *et al.* 2010). In these species, the progeny from parasitic females can develop into one of three distinct morphologies: free-living females, free-living males (both via the heterogonic route) or iL3s (homogonic route). Although the ratio of these morphologies is influenced by environmental factors such as host immune response, temperature and pH (Arizono, 1976; Moncol and Triantaphyllou, 1978; Nwaorgu, 1983; Viney, 1996; Harvey *et al.* 2000; Minato *et al.* 2008; Sakamoto and Uga, 2013), the detailed mechanisms which determine their route of development remain unclear. Moreover, *S. stercoralis* and *S. ratti* harbour three pairs of chromosomes, and one of them is a sex (X) chromosome. Females of these species have an XX and free-living males have an XO karyotype (Streit, 2008). Genetic material homologous to two chromosomes in *S. ratti*, namely I and X, appears combined into one chromosome in *S. papillosus*. Additionally, an XX/XO karyotype appears to be functionally restored in males by a chromatin diminution event (Nemetschke *et al.* 2010).

Strongyloides venezuelensis parasitizes rodent species including rats, mice and Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* and is distributed worldwide

* Corresponding author: Division of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, 889-1692 Japan. E-mail: taisei_kikuchi@med.miyazaki-u.ac.jp